

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**  
**CAMPUS DE JABOTICABAL**

DISSEMINAÇÃO DE BACTÉRIAS DOS GÊNEROS  
*Campylobacter* E *Salmonella* EM LINHAS DE ABATE DE AVES

**Ana Lígia Lordello Cortez**  
Médica Veterinária

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

2006

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**  
**CAMPUS DE JABOTICABAL**

**DISSEMINAÇÃO DE BACTÉRIAS DOS GÊNEROS**  
***Campylobacter* E *Salmonella* EM LINHAS DE ABATE DE AVES**

**Ana Lígia Lordello Cortez**

**Orientadora: Profa. Dra. Angela Cleusa de Fátima Banzatto de Carvalho**

Tese apresentada como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias *Campus* de Jaboticabal da Universidade Estadual Paulista.

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL  
2006

C828d Cortez, Ana Lúcia Lordello  
Disseminação de bactérias dos gêneros *Campylobacter* e  
*Salmonella* em linhas de abate de aves / Ana Lúcia Lordello Cortez --  
Jaboticabal, 2006  
v, 80 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2006  
Orientador: Angela Cleusa de Fátima Banzatto de Carvalho  
Banca examinadora: Eliana Scarcelli Pinheiro, Vera Cecília Annes  
Ferreira, Adolorata Aparecida Bianco Carvalho, Luís Antonio Mathias  
Bibliografia

1. Abatedouro. 2. Aves. 3. *Campylobacter* spp.. 4. *Salmonella*  
spp.. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e  
Veterinárias.

CDU 619:614.4:636.5

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço  
Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, *Campus* de Jaboticabal.

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

**ANA LÍGIA LORDELLO CORTEZ** - Nascida em Jaboticabal, SP, em 16 de dezembro de 1976, filha de Maria Helena Rodrigues Lordello e Jacinto Luiz Cortez. Médica Veterinária, CRMV-SP nº13.881, graduada em 16 de dezembro de 2000, pela Universidade Federal de Uberlândia, MG, foi bolsista de Iniciação Científica da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), de março de 2000 a fevereiro de 2001. Em 2003 obteve o título de Mestre em Medicina Veterinária, área de concentração Medicina Veterinária Preventiva, no programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista, *Campus* Jaboticabal, foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), de abril de 2001 a março de 2003. Em 2003 iniciou o programa de Doutorado em Medicina Veterinária, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva, nesta mesma instituição, foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), de abril de 2003 a maio de 2006.

"Cada um de nós compõe a sua história,  
cada ser em si carrega o dom de ser capaz  
de ser feliz.."

Almir Sater

# *Dedico*

*A Deus que acima de todas as pessoas concedeu-me o privilégio da existência  
e ilumina e guia todos os meus caminhos.*

*A Palmyra Rodrigues Lordello e Aurélio Lordello Alves,  
meus avós maternos (in memoriam), por todo o amor dedicado ao meu ser e a toda a  
família.*

*Ao Fabio Kiyohara, pelo amor, pela força e pelo incentivo em todas as etapas deste  
doutorado e em muitas outras que ainda virão...*

*A minha mãe, Maria Helena Rodrigues Lordello, pois sem você nada, mas nada  
mesmo, seria possível; aos meus irmãos Vicente Lordello Cortez e Maurício Lordello Cortez, por  
tanto ânimo e força que me deram para continuar sempre e ao meu sobrinho Miguel Lordello dos  
Santos, vida nova que sempre traz bênçãos a uma família.*

## AGRADECIMENTOS

Durante a realização desta pesquisa, foram envolvidas diversas pessoas e entidades, que contribuíram para que se pudesse atingir os objetivos. A todos que proporcionaram condições para vencer esta jornada presto agradecimentos especiais:

À Profa. Dra. Angela Cleusa de Fátima Banzatto de Carvalho, grandiosa mestra, pela orientação e pelos sábios ensinamentos que tanto auxiliaram na realização do trabalho e na minha formação profissional e pessoal.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação da Unesp/ Fcav, Jaboticabal, SP, especialmente da Área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva e especialmente aos professores membros da banca examinadora, pela dedicação e pelos ensinamentos recebidos, Prof. Dr. Luiz Augusto do Amaral, Prof. Dr. Osvaldo Durival Rossi Júnior, Prof. Dr. Luís Antonio Mathias, Profa. Dra. Adolorata Aparecida Bianco de Carvalho, Prof. Dr. Ruben Pablo Schocken-Iturrino, Prof. Dr. Luiz Francisco Prata, Dra. Eliana Scarcelli, Profa. Alice Akimi Ikuno, Profa. Dra. Vera Cecília Annes Ferreira, Dra. Rosa Maria Piatti.

Ao Prof. Dr. Gener Tadeu Pereira, pelo auxílio inestimável nas análises estatísticas.

Ao Fabio Kiyohara, pela leitura crítica da tese, e à Maria Helena Rodrigues Lordello pelas revisões de português.

Ao Instituto Biológico de São Paulo, SP, pela permissão em executar parte de minha pesquisa em suas instalações. À Dra. Eliana Scarcelli e à Mestre Simone Miyashiro, pesquisadoras do Instituto Biológico e pessoas que tanto auxiliaram na realização das técnicas moleculares com as amostras de *Campylobacter* spp.. À Profa. Alice Akimi Ikuno, adorável pesquisadora do Instituto Biológico, pela incontestável atenção com que me recebeu e pelos dias tão corridos que passamos juntas pesquisando *Salmonella* spp. utilizando as técnicas moleculares.

À Hinig Isa Godoy Vicente, minha querida amiga Tuti, que tanto me deu força e apoio durante toda a pós-graduação.

Às amigas de laboratório Ana Maria Centola Vidal-Martins e Karina Paes Bürger pela ajuda nas coletas, no laboratório e em tantos momentos de minha vida.

Às alunas que estagiaram no laboratório e auxiliaram na análise das amostras Vivian Biancardi e Marita V. Cardozo, pelo inestimável auxílio.

Aos amigos, amigas e colegas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal: Adriana Almeida, Bruna Alexandrino, Bruna M. Salotti, Cristiane Fontoura, Estevam Hoppe, Fábio C. Dias, Fagner Freitas, Fernanda Malva, Fernanda Rezende, Fernanda S. Magajevski, Flávia Esteves, Francisco Zafalon, Guilherme Guerra, Lucif A. Nascif Jr., Katiane Almeida, Luciano Ferreira, Ludmila S. S. Barros, Max Resende, Natacha Cereser, Poliana Melo, Patrícia Gelli, Rachel Saba, Raphaella Meirelles, Tatiana A. Cruvinel, Thais Martinelli, Thiago Izidoro, Viviane Souza, pelo auxílio das mais diversas formas e nos momentos mais inusitados.

A todos os funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, especialmente à Liliana Biondi Naka (Lila), ao Waldemar Dibelli Júnior (Diba), à Maria Aparecida Dias Tostes Figueira (Cidinha) e à Mariza Bonafim Borges Lemos, pela ajuda infinita e presença em tantos momentos dessa caminhada.

A todos os funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, *Campus* Jaboticabal, em especial Estela Amália Contri, Isabel A. Buzinaro, Karina Severo, Márcia L. N. dos Santos, Valéria C. Ferreira, pela atenção e pelo auxílio ao longo de todo o curso.

A todos os funcionários da biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, *Campus* Jaboticabal, em especial: Tieko T. Sugahara, Claudemir Antonio Soares, Mabel A. M. Custódio, Marta D. de Andrade, Fábio Assis Pinho e Neli Silvia P. Saccani, pela ajuda com as referências principalmente.

Aos abatedouros de aves que permitiram as colheitas das amostras: sem esta colaboração seria impraticável a realização da pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de doutorado concedida, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro ao projeto, sem os quais seria impossível realizar esta tese.



À Fundação para o Desenvolvimento da Unesp (Fundunesp) e à Pró-reitoria de Pesquisa (Propp) que forneceram auxílio para a tradução de um dos trabalhos publicados por meio do Programa de Internacionalização da Pesquisa da Unesp.

Aos meus pais Maria Helena Rodrigues Lordello e Jacinto Luís Cortez, pela incrível vontade de me ver doutora que os moveu a não medirem esforços para verem este sonho se realizar. Aos meus irmãos Vicente Lordello Cortez e Maurício Lordello Cortez, pela força e pelo exemplo de luta sempre; à Renata Marie Miyazaki e ao meu sobrinho Miguel Lordello dos Santos, pessoas novas que sempre trazem consigo novas energias, obrigada pelo incentivo em sempre continuar!

Ao meu namorado, companheiro, amigo, futuro esposo, incentivador de todas as horas, Fabio Kiyohara, uma pessoa que sabe me entender, amar, acalmar, ouvir... como nenhuma outra... “We’re better together” (Jack Johnson) e “Só enquanto eu respirar vou me lembrar de você” (Fernando Anitelli)... A seus pais, Diana Yae Kiyohara e Pedro Kunihiko Kiyohara, pois sem eles você não existiria, por me tratarem tão bem e por me agradarem tanto e a Audrey Kiyohara, Felipe Kiyohara e Rafael, por serem tão meus amigos e companheiros em qualquer aventura.

Às minhas companheiras de república, nossa República Zoon - melhor companhia que já achei para morar, dividir espaços, tristezas e alegrias, nosso apartamento sempre foi cheio de muita felicidade, aconchego, união, tranquilidade, amizade e companheirismo - Camila Antonio (Folgada), Adélia Pereira Miranda (Celulete) e Camila Franciosi (Pop); à Karolina Von Zuben (Crone) - nossa constante moradora agregada; à Hellen Fernanda Nocchioli Sabino (Babaloo) - saudosa moradora; às amigas e aos amigos que hora ou outra por lá passaram: Fabiana (Minhoca), Mirela, Eduardo (Banda), Carol (Fufu), Rodrigo (Buda), Fernanda (Kenga), Camilo, Regina (Suku), Melissa (Mel), Renata (Yumi), Wellington (Chaves), Fabio (Caiçara), Luis Augusto (Tiozinho), Alessandra (Polenta), Daniela (Vampira), Kátia (Ranzinza), Regina (Estrelinha), Aline (Mirrasga), Eveline (Galega) e tantos outros, pelos momentos de alegria, apoio e descontração. Aos amigos do prédio: Carla, Renata, Hélio (Zóio), Cherre, Rodrigo, Luis Fernando, Téo, Carlinha (Pituca), Márcia e Vivian (Prega), que em um momento ou outro não falharam como vizinhos, mesmo que fosse para emprestar uma xícara de alguma coisa que nos faltava.

À D. Geresina Dinah Nito, minha querida D. Dinah, minha terceira avó tão querida! À Eliana Eiko Nito, Sílvia Seiko Nito e Gabriela S. Nito minhas tão grandes amigas e apoiadoras de todas as horas... Pessoas que me viram crescer e sempre me impulsionaram a ser melhor. Adoro vocês!!!

A todos meus amigos do Coral Jaboticoro (seria difícil citar todos os nomes) - vocês todos moram no meu coração - e à nossa regente Cristina Emboaba. Este grupo composto por tantas pessoas especiais muito me ajudou a ter paciência, me acalmou nos momentos de cansaço, me recebeu de braços abertos sempre que necessitei.

À Marli da Guia Pelizaro Valeri, minha professora de Yoga, que nos últimos dez meses tem me ensinado entre outras coisas o equilíbrio e o controle dos sentimentos neste final de doutorado e que além de tudo foi muito minha amiga e me ajudou em tudo que pode.

A todos meus familiares: avós Jacyntho Cortez Peres Filho e Maria Hortêncio Munhoz Cortez; minha bisavó Soledade Martins Cortez; padrinhos Carlota Lordello Quito e Wanderlei Quito; tios; primos, por todo amor e toda força em momentos tão diversos, em especial meu primo José Manoel Lordello de Moraes Júnior e todos de sua família, por me receberem nas primeiras viagens a São Paulo.

E a todos que de alguma forma colaboraram para a realização desta tese e que não foram aqui explicitamente citados, mas a quem expresso o meu mais profundo agradecimento.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DAS TABELAS.....	iv
LISTA DAS FIGURAS.....	v
Capítulo 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
Referências.....	12
Capítulo 2 - <i>Campylobacter jejuni</i> e <i>Campylobacter coli</i> na linha de abate de aves: caracterização dos isolados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e análise do produto pela técnica do polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) (gene <i>fla A</i> ).....	18
Resumo.....	18
Summary.....	19
1. Introdução.....	20
2. Material e Métodos.....	24
2.1 Amostragem.....	24
2.2 Preparo das amostras para análise.....	24
2.3 Isolamento de <i>Campylobacter</i> spp.....	25
2.4 Extração do DNA das amostras positivas de <i>Campylobacter</i> spp.....	25
2.5 Identificação de amostras positivas de <i>Campylobacter jejuni</i> pela PCR.....	26
2.6 Análise de amostras positivas de <i>Campylobacter jejuni</i> pela PCR-RFLP...	26
2.7 Identificação de amostras positivas de <i>Campylobacter coli</i> pela PCR.....	27
2.8 - Análise estatística.....	28

3. Resultados e Discussão.....	29
4. Conclusões.....	36
5. Referências.....	37
Capítulo 3 - Identificação de <i>Salmonella</i> spp., <i>Salmonella</i> Enteritidis e <i>Salmonella</i> Typhimurium isoladas na linha de abate de aves utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR)-multiplex e avaliação de resistência antimicrobiana.....	44
Resumo.....	44
Summary.....	45
1. Introdução.....	46
2. Material e Métodos.....	51
2.1 Amostragem.....	51
2.2 Preparo das amostras para análise.....	51
2.3 Isolamento de <i>Salmonella</i> spp. e extração do DNA.....	52
2.4 Oligonucleotídeos iniciadores.....	53
2.5 PCR-multiplex.....	54
2.6 Análise de enzima de restrição.....	55
2.7 Teste de sensibilidade a agentes antimicrobianos.....	55
2.8 Análise Estatística.....	56
3. Resultados e Discussão.....	57
4. Conclusões.....	67
5. Referências.....	68

Capítulo 4 - Implicações	74
Referências.....	79

## LISTA DE TABELAS

<b>CAPÍTULO 2</b>	<b>Página</b>
1 - Total de amostras analisadas e de amostras positivas para <i>Campylobacter jejuni</i> colhidas na linha de abate de aves, no período de março de 2003 a agosto de 2004, em abatedouros do Estado de São Paulo.....	29
2 - Amostras isoladas de <i>Campylobacter jejuni</i> de diferentes pontos na linha de abate de aves e seus respectivos abatedouros, de março de 2003 a agosto de 2004, no Estado de São Paulo.....	31
 <b>CAPÍTULO 3</b>	
1 - Seqüência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR-multiplex.	54
2 - Número de amostras positivas para <i>Salmonella</i> spp., <i>S. Enteritidis</i> e <i>S. Typhimurium</i> , do total de amostras colhidas em seis abatedouros, de março de 2003 a agosto de 2004, no Estado de São Paulo.....	57
3 - Amostras isoladas de <i>Salmonella</i> spp., <i>S. Enteritidis</i> e <i>S. Typhimurium</i> de diferentes pontos na linha de abate de aves e seus respectivos abatedouros, de março de 2003 a agosto de 2004, no Estado de São Paulo.....	61
4 - Valores dos halos de resistência aos antimicrobianos testados das 29 amostras isoladas de <i>Salmonella</i> spp., <i>S. Enteritidis</i> e <i>S. Typhimurium</i> nos diferentes pontos na linha de abate de aves, colhidas de março de 2003 a agosto de 2004, no Estado de São Paulo.....	62
5 - Comportamento de resistência frente aos 12 princípios antimicrobianos testados nas 29 amostras isoladas de <i>Salmonella</i> spp., colhidas de março de 2003 a agosto de 2004, no Estado de São Paulo.....	63

## LISTA DE FIGURAS

<b>CAPÍTULO 2</b>	<b>Página</b>
<p>1 - Eletroforese em gel de agarose de amostras isoladas de <i>Campylobacter jejuni</i> provenientes de abatedouros de frango. Linha 1: padrão de 100 pb; linhas 5 e 9: amostra positiva de <i>C. jejuni</i>; linhas 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 14: amostras negativas de <i>C. jejuni</i>; linha 12: controle positivo; linha 13: água esterilizada, usada como controle negativo.....</p>	30
<p>2 - Eletroforese em gel de agarose onde pode ser observada a amostra positiva para <i>C. coli</i>. Linha 1: padrão 100pb; linha 2: controle positivo; linha 3: controle negativo; linha 4: amostra isolada de pena, positiva para <i>C. coli</i>.....</p>	32
<p>3 - Eletroforese em gel de agarose mostrando três perfis de restrição de produtos de PCR-RFLP digeridos pela enzima <i>Hae</i> III. Linhas: 1 e 17, marcador molecular de 100 bp; linha 2: fragmento de 702 pb do gene <i>fla</i> A (controle positivo); linhas 3, 6 e 10: perfil de restrição 1; linhas 12, 13 e 14: perfil de restrição 2; linhas 4 e 5: perfil de restrição 3; linhas 7, 8, 9, 11, 15 e 16: DNA insuficiente.....</p>	33
<b>CAPÍTULO 3</b>	
<p>1 - Análise com enzima de Restrição. Fragmentos de <i>S. Enteritidis</i> e <i>S. Typhimurium</i>, gene plasmidial que codifica virulência de fimbria (<i>pefA</i>) amplificado pela PCR das amostras positivas de <i>Salmonella</i> spp. e digeridas com <i>Kpn</i>I. Linhas: M- padrão 100pb; 1, 3- <i>S. Enteritidis</i>; 2, 4- <i>S. Typhimurium</i>. Condições de Eletroforese: 10µL do produto da PCR, gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo, 80V/1h.....</p>	57
<p>2 - Número de amostras resistentes em relação ao número de bases antimicrobianas testadas.....</p>	64

## DISSEMINAÇÃO DE BACTÉRIAS DOS GÊNEROS *Campylobacter* E *Salmonella* EM LINHAS DE ABATE DE AVES

**RESUMO** - Os objetivos do presente trabalho foram verificar a ocorrência de *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Salmonella* spp., *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium em abatedouros de aves e avaliar a resistência das amostras de *Salmonella* spp. isoladas frente a antimicrobianos de uso comum. Foram colhidas amostras de fezes; penas; água de escaldamento, evisceração e resfriamento; e amostras de carcaça não eviscerada, eviscerada e resfriada em seis abatedouros de aves. *Campylobacter jejuni* foi detectada em 14 amostras (5%), a maior porcentagem foi em amostras de fezes oito amostras (22%), e *C. coli* em foi isolada em uma amostra de pena (0,35%). *Salmonella* spp. foi detectada em 18% (52/288) dos isolados, enquanto os sorotipos *S. Enteritidis* em 5,6% (16/288) e *S. Typhimurium* em 2,4% (7/288). Os testes de resistência aos antimicrobianos apontaram 25 amostras resistentes ao aztreonam e à ampicilina (86,2%), 21 à tetraciclina (72,4%) e 16 à amoxicilina/ácido clavulânico e sulfazotrim (55,2%). Nenhum dos isolados testados apresentou 100% de resistência ou sensibilidade aos antimicrobianos utilizados. Os resultados indicam que há uma necessidade de melhorar a qualidade higiênico-sanitária em linhas de abate de aves e o cuidado com o uso indiscriminado de antibióticos na avicultura, oferecendo aos consumidores produtos livres de agentes zoonóticos.

**Palavras-chaves:** abatedouro, aves, *Campylobacter* spp., PCR, *Salmonella* spp..



## **BACTERIA SPREAD OF THE GENUS *Campylobacter* AND *Salmonella* IN CHICKEN ABATTOIR LINES**

**SUMMARY** - The present study was carried out to report the occurrence of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Salmonella* spp., *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium in chicken abattoirs and to evaluate the resistance of *Salmonella* spp. isolated to antibiotics of common use. Samples of feces; feathers; scald, evisceration, and chiller water; and non-eviscerated, eviscerated, and chilled carcasses were collected from six chicken abattoirs. *Campylobacter jejuni* was isolated in 14 samples (5%), isolation was greater in feces, eight samples (22%), one feather sample was positive for the species *C. coli* (0.35%). *Salmonella* spp. was detected in 18% (52/288) of the isolates, whereas serotypes *S. Enteritidis* were identified in 5.6% (16/288) and *S. Typhimurium* and 2.4% (7/288). Antibiotic tests indicate 25 resistant samples to aztreonam and to ampicilin (86.2%), 21 to tetracycline (72.4%) and 16 to amoxicilin/clavulanic acid and to sulfazotrim (55.2%). None sample tested were 100% resistant or sensitive to all the antibiotics tested. The results exhibit the need to improve hygiene and sanitary standards in poultry slaughter lines, and care with the indiscriminate use of antibiotics in aviculture, offering to the consumers products free of zoonotic agents.

**Keywords:** abattoir, *Campylobacter* spp., chicken, PCR, *Salmonella* spp..

## Capítulo 1 - Considerações Gerais

A incidência global de doenças causadas por alimentos é de difícil estimativa. No entanto, no ano de 2000, cerca de 2,1 milhões de pessoas morreram por doenças diarréicas, e em uma alta proporção desses casos a causa é atribuída a alimentos e água contaminados (WHO, 2002a). Os principais agentes etiológicos destas doenças são bactérias, vírus, parasitas, toxinas, metais e príons. Os sintomas destas doenças variam desde gastroenterite leve até sintomas que podem colocar em risco a saúde, como alterações neurológicas, hepáticas e até síndromes renais (ARCHER & KVENBERG, 1985; BENNETT et al., 1987).

SINELL (1981) citou que as contaminações dos alimentos podem provocar infecções ou intoxicações nos seres humanos e são causadas por diversos agentes, entre os quais estariam incluídas principalmente bactérias da família Enterobacteriaceae, indicando contaminação fecal, pois esses microrganismos têm como *habitat* o trato gastrointestinal dos animais e dos seres humanos. As principais doenças de origem bacteriana transmitidas por alimentos possuem como características comuns um curto período de incubação e um quadro clínico gastrointestinal manifestado por diarréia, náuseas, vômitos e dor abdominal, acompanhado ou não por febre. No entanto, indivíduos muito jovens, idosos ou com o sistema imune debilitado apresentam complicações mais graves, que, muitas vezes, podem levá-los à morte (UNGAR et al., 1992).

A vigilância de doenças de origem alimentar é complicada devido a vários fatores; o primeiro é a não notificação de casos, pois o serviço médico muitas vezes não é procurado, embora a doença possa ser severa ou até mesmo serem reportados freqüentemente casos fatais, no entanto, são mais comuns casos com sintomatologia moderada. Em segundo lugar, muitos patógenos são transmitidos não só por meio dos alimentos, mas também da água ou de pessoa para pessoa, e essa variedade de formas de transmissão também dificulta o diagnóstico (MEAD et al., 1999).

Aves de corte são potenciais carreadoras de patógenos em abatedouros, açougues e cozinhas industriais e domésticas e têm, em particular, uma importância significativa na contaminação cruzada por *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp., dois agentes patogênicos em saúde pública (CARVALHO & CORTEZ, 2003). A legislação estabelece ausência de

*Salmonella* spp. em 25g ou mL do produto (BRASIL, 2001); contudo, não há legislação específica para *Campylobacter* spp., necessitando ampliação dos estudos nesta área para analisar melhor a ocorrência desse patógeno em avicultura e seus potenciais riscos à saúde humana. No Brasil há subnotificação dos casos, mas em países industrializados os casos de enterites por *Campylobacter* spp. são mais freqüentes que os causados por *Salmonella* spp. (WHO, 2000).

Em 1886, Escherich publicou uma série de artigos descrevendo uma bactéria espiralada em colônias provenientes de colons de crianças que haviam morrido: esta bactéria foi chamada de "*Cholera infantum*". Em 1957 King descreveu o isolamento de um *Vibrio* em sangue de crianças com diarréia e, em 1972, Dekeyser e seus colaboradores, microbiologistas belgas, isolaram pela primeira vez a bactéria *Campylobacter* spp. de pacientes com diarréia (BUTZLER, 2004; ALTEKRUSE, 1999).

Depois dos anos 70, em que foi realizado seu isolamento com sucesso, o *Campylobacter jejuni* tornou-se rapidamente a causa mais diagnosticada de gastroenterite em seres humanos, mesmo considerando que os casos reportados representam uma pequena fração da ocorrência atual. A introdução de meios de cultivo seletivos fez com que o diagnóstico de enterites por *Campylobacter* spp. se tornasse um procedimento simples (ALTEKRUSE, 1999).

BUTZLER et al. (1973) propuseram a utilização de um meio seletivo para o isolamento de *Campylobacter* spp. a partir do filtrado do material fecal, contendo bacitracina, polimixina B, novabiocina e actidione, que inibem as bactérias intestinais, permitindo o crescimento de *C. jejuni*, meio este conhecido como de Butzler.

SKIRROW (1977) descreveu o isolamento de *C. jejuni* em meio seletivo contendo vancomicina, polimixina B e trimetoprim, que permitia o desenvolvimento desses patógenos sem a necessidade da prévia filtração das fezes. Com o conhecimento dessas técnicas, vários estudos têm sido efetuados, principalmente em relação à sensibilidade das cepas aos agentes antimicrobianos, resultando em diferentes misturas antibacterianas e antifúngicas que facilitam o isolamento de *Campylobacter* spp. em materiais muito contaminados (CALZADA, 1991). BLASER et al. (1979) propuseram uma nova mistura de drogas contendo vancomicina, trimetoprim, polimixina B, anfotericina B e cefalotina. Segundo esses autores, o

número de isolamentos de *C. jejuni* utilizando meios contendo esses antimicrobianos foi tanto quanto ou maior que o encontro de *Salmonella* spp. ou *Shigella* spp. em pacientes com diarreia.

O gênero *Campylobacter* abrange bactérias Gram-negativas, cujas dimensões variam entre 0,2 e 0,9  $\mu\text{m}$  de largura por 0,5 a 5  $\mu\text{m}$  de comprimento; em forma de bastão curvo, vírgula, "S", asa de gaivota ou espiral; têm como característica motilidade do tipo espiralada, observada claramente em microscópio de contraste de fase ou de campo escuro, produzida por um flagelo polar único em uma ou em ambas as extremidades da célula (BRYAN, 1982; VARNAM & EVANS, 1991). *Campylobacter* spp. é um microrganismo não hemolítico e que não forma esporos; células em culturas com mais de 48 horas tendem a assumir formas esféricas ou cocóides. É uma bactéria microaerófila, com metabolismo respiratório que requer oxigênio para seu crescimento em concentrações de 3% a 15% e dióxido de carbono em concentrações de 3% a 5%; contudo, em alguns casos, o crescimento ocorre em condições aeróbicas com 20% de oxigênio. Não utiliza carboidratos como fonte de carbono (HOLT et al., 1994).

A temperatura ótima de desenvolvimento dessas bactérias é de, aproximadamente, 42°C; multiplicam-se em alimentos úmidos que se mantiverem dentro do intervalo de 37°C a 42°C. Nos alimentos refrigerados *C. jejuni* sobrevive melhor que nos alimentos que são mantidos à temperatura ambiente ou de congelamento, sendo prontamente destruído por temperaturas usadas durante a pasteurização e a cocção dos alimentos (ICMSF, 2000).

A atividade de água ( $a_w$ ) em carne de aves gira em torno de 0,98 e 0,99. *Campylobacter* spp. ocorre como parte da microbiota, como agente comensal, no trato gastrointestinal das aves domésticas e silvestres e no meio ambiente. A temperatura ótima de multiplicação do organismo aproxima-se da temperatura do corpo dos animais homeotermos, favorecendo o estabelecimento destes microrganismos no trato gastrointestinal (GENIGEORGIS, 1987). Quanto aos mecanismos de patogenicidade, sabe-se que produz uma toxina termolábil e que é um microrganismo com capacidades invasivas (VARNAM & EVANS, 1991). Estudos realizados sobre a enteropatogenicidade do *Campylobacter* spp. em diferentes espécies animais revelam que esses microrganismos possuem habilidade de aderir às células intestinais e causarem distúrbios na capacidade de

absorção dos enterócitos e que são responsáveis por outros prejuízos funcionais das células epiteliais intestinais (CAMARONI-JÚNIOR et al., 2002)

As bactérias do gênero *Campylobacter* estão amplamente distribuídas e ocorrem principalmente em animais homeotermos domésticos, selvagens e de produção, são prevalentes em alimentos de origem animal como aves de corte, bovinos, suínos, ovinos, ostras e mariscos (WHO, 2000). São responsáveis por uma gama de doenças nos animais e nos seres humanos, e nestes a enterite é o sinal predominante, tanto nos países em desenvolvimento quanto nos desenvolvidos (ERTAŞ et al., 2004; MODOLO et al., 2005). Estes microrganismos têm sido relatados cada vez mais freqüentemente e em maior número e passaram da obscuridade para uma grande atenção em saúde pública, excedendo até mesmo os casos de *Salmonella* spp. (VARNAM & EVANS, 1991).

O começo dos sintomas da campilobacteriose em seres humanos normalmente acontece dois a cinco dias depois da infecção, podendo variar de um a dez dias. A dose infectante de *C. jejuni* é considerada pequena: de 400 a 500 microrganismos já causam a doença em alguns indivíduos, enquanto em outros um grande número é necessário. Os sintomas clínicos mais comuns incluem diarréia (freqüentemente com sangue nas fezes), dor abdominal, febre, dor de cabeça, náusea e vômito. Os sintomas típicos duram três a seis dias. Um resultado fatal é raro e normalmente é limitado a pacientes muito jovens, idosos ou imunodeprimidos, como pacientes com AIDS, por exemplo. Complicações como bacteremia, hepatite, pancreatite e aborto têm sido relatadas com vários graus de freqüência (WHO, 2000).

Complicações de pós-infecção incluem artrite e desordens como a síndrome de Guillian-Barré, uma polineuropatia desmielinizante inflamatória aguda, que resulta em deficiência orgânica, neurológica e respiratória severa ou morte em um pequeno, mas significativo, número de casos (ALLOS, 1998; DUIM et al., 2000). A incidência alta de diarréias causadas por *Campylobacter* spp., como também sua duração e possíveis seqüelas são fatores que fazem com que esta zoonose tenha importância sob uma perspectiva socioeconômica (WHO, 2000). Os fatores de risco para uma infecção por *Campylobacter* spp. são: infecção recente de algum membro da família pelo agente, consumo recente de

alimentos mal preparados ou viagem a áreas onde as medidas de higiene e as condições sanitárias são de má qualidade (GOLDENRING, 2004).

O isolamento do *Campylobacter* spp. a partir de amostras não clínicas encontra alguns empecilhos, pois a bactéria é sensível ao ambiente extra-intestinal e freqüentemente ocorrem lesões subletais por exposições dos microrganismos às condições de processamento e estocagem dos alimentos, como, por exemplo, aquecimento moderado, congelamento ou resfriamento. A microbiota presente na amostra age de forma competitiva e interfere na multiplicação ou recuperação deste agente (HUMPHREY, 1999). STEINHAUSEROVÁ & FOJTÍKOVÁ (1999) citaram também a sensibilidade destes microrganismos a outros fatores como pH, umidade, concentrações de NaCl, presença de oxigênio e outros.

O diagnóstico de *Campylobacter* spp. é realizado por meio do exame direto ou do cultivo; o uso de métodos sorológicos tem valor para a investigação epidemiológica (FERNANDEZ & FARACE, 2003). O meio de cultivo de eleição é o ágar Brucella, acrescido de uma mistura de antibióticos e sangue desfibrinado, porém há uma variedade de meios que são utilizados, inclusive kits comerciais. Contudo, métodos moleculares como o da reação da polimerase em cadeia (PCR) vêm ao encontro da solução destes problemas de dificuldades de isolamento citados anteriormente, pois facilitam a identificação do agente e proporcionam resultados mais precisos do que os de cultivo padrão. Principalmente em casos duvidosos, esses métodos ajudam a diagnosticar o agente mais do que os métodos comuns (STEINHAUSEROVÁ & FOJTÍKOVÁ, 1999). DENIS et al. (2001) ressaltam ainda que o uso da técnica da PCR auxilia na análise de diferentes tipos de amostras avícolas, contando ainda com a vantagem da rapidez do teste para a detecção de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*.

O microrganismo *Salmonella* spp. não foi descoberto recentemente; *Salmonella typhi* foi a primeira espécie a ser estudada, em 1874, e isolada em cultura pura, em 1884. O primeiro surto de salmonelose confirmado laboratorialmente foi reportado por Gaertner em 1888, causado por uma espécie de *Salmonella* não tifóide, chamada *Bacillus enteritidis* por este cientista. Nesse surto, um total de 57 pessoas tiveram gastroenterite após comer carne proveniente de um bovino doente. Salmon e Smith isolaram um organismo similar de suínos com cólera suína e descreveram-no em detalhes, chamando-o de *Salmonella cholera-suis*;

originou-se, assim, o gênero *Salmonella* (HAJMEER, 2005).

As bactérias do gênero *Salmonella* são patógenos de destacada importância em saúde pública, pertencem à família Enterobacteriaceae, são Gram-negativas, anaeróbias facultativas e habitam o trato intestinal de seres humanos e animais (BRYAN, 1982; VARNAM & EVANS, 1991; HOLT et al., 1994); são móveis ou não, catalase positiva e oxidase negativa, produzem ácidos e podem formar gases na fermentação da glicose, freqüentemente da lactose, reduzem nitrato a nitrito (HAJMEER, 2005). São isoladas de uma grande variedade de hospedeiros, especialmente aves e suínos, mas também de seres humanos, alimentos e do meio ambiente. Assim, estas bactérias são potencialmente patogênicas para os animais domésticos e selvagens e também para os seres humanos (HOLT et al., 1994).

As doenças causadas por *Salmonella* spp. dividem-se em dois grupos, segundo a divisão proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS), utilizada em seu sistema de estatísticas sanitárias: o primeiro composto pela febre tifóide, causada pela *Salmonella typhi*, e as febres entéricas, causadas por *Salmonella paratyphi* (A, B e C); o segundo grupo de doenças é composto pelas enterocolites ou salmoneloses, causadas pelas demais salmonelas, que são os agentes mais freqüentemente veiculados por alimentos (ICMSF, 2000).

Salmonelose é uma gastroenterite de origem zoonótica, transmitida pela ingestão de alimentos e água ou contato com fômites contaminados por fezes de pessoas ou animais e constitui um sério problema de saúde pública (GIL-SETAS et al., 2002). O estabelecimento dos sintomas de salmoneloses depende do sorotipo de *Salmonella* spp. envolvido, da competência dos sistemas de defesa inespecíficos e específicos do indivíduo afetado e das características do alimento envolvido (LANDGRAF & FRANCO, 1996). A incidência real de salmonelas nas toxinfecções alimentares é desconhecida, uma vez que, freqüentemente, pequenos surtos não são relatados para as autoridades de Saúde Pública.

O período de incubação é de seis a 72 horas depois da ingestão do agente, a dose mínima infectante é de  $10^4$  a  $10^7$  células, há uma instalação brusca de febre, mialgias, cefaléia e mal-estar. Os sintomas principais consistem em dores abdominais, náusea, vômitos e diarreia; comumente a salmonelose tem curso benigno e a recuperação clínica

ocorre em dois a quatro dias. O portador convalescente elimina *Salmonella* spp. durante semanas ou, mais raramente, por alguns meses. Uma das complicações é a desidratação, causada pela diarreia, especialmente em crianças pequenas e lactentes; citam-se, também, meningite e septicemia potencialmente mortais (SMITH, 2003).

A doença ocorre em pessoas de qualquer idade, no entanto a incidência é muito mais alta em crianças, idosos e imunodeprimidos, que são mais predispostos (ACHA & SZYFRES, 1986). Os fatores de risco de infecção por *Salmonella* spp. são: consumo de alimentos inadequadamente armazenados ou preparados ou não refrigerados (especialmente perus, galinhas e ovos); membros da família com infecção recente por *Salmonella* spp. ou enfermidade com gastroenterite; hospitalização; consumo recente de carne de aves; manuseio de animais silvestres, em especial os répteis (iguanas, tartarugas, lagartos, cobras, por exemplo), pois podem ser portadores de *Salmonella* spp.; ser pessoa jovem ou de idade avançada, pacientes com transtornos no sistema imunológico (SMITH, 2003).

O aparecimento de cepas de *Salmonella* spp. resistentes a uma grande variedade de antibióticos tem se tornado um problema para a saúde pública (CARRAMIÑANA et al., 2004). Estudos recentes evidenciam as consequências adversas da ocorrência de cepas resistentes, que se dividem em duas categorias: infecções que não ocorreriam se não houvesse a cepa resistente e aumento na frequência de tratamentos falhos, bem como aumento na severidade das infecções. Nos Estados Unidos estima-se que essa resistência antimicrobiana resultou, em aproximadamente 30.000 infecções adicionais por *Salmonella* spp., cerca de mais 300 hospitalizações e dez mortes (WHO, 2005).

Em outro estudo realizado na Dinamarca, verificou-se que pessoas susceptíveis às infecções por *Salmonella* spp. têm apresentado taxa de mortalidade mais alta; o coeficiente de mortalidade para pessoas com infecções resistentes a vários medicamentos foi calculada ser dez vezes mais alta do que para a população em geral (WHO, 2005). Por esse motivo, em casos de gastroenterites por *Salmonella* spp. sem complicações não se recomenda o tratamento, exceto em casos de febre prolongada ou septicemia, sobretudo em crianças pequenas e idosos. A contra-indicação se deve ao fato dos antibióticos prolongarem o estado de portador e possibilitarem o aparecimento de cepas resistentes aos antibióticos (ACHA & SZYFRES, 1986).



São conhecidas mais de 15 classes de antimicrobianos. Essas classes diferem entre si pela estrutura química e pelo mecanismo de ação; antibióticos específicos são necessários para o tratamento de patógenos específicos (WHO, 2002b). Nas últimas décadas tem se observado uma alta proporção de cepas de *Salmonella* spp. com múltipla resistência a antibióticos. Nos países desenvolvidos a principal causa disso deve-se ao uso excessivo de antibiótico nas rações animais, utilizados em doses subterapêuticas como fator de crescimento, e também ao tratamento indiscriminado de pessoas e animais por prescrição médica e veterinária, respectivamente (BERCHIERI & BARROW, 1998). Na Grã-Bretanha o uso profilático de antibióticos contra salmonelose bovina originou a emergência de cepas multirresistentes de *S. Typhimurium*, que causaram epizootias com altas taxas de mortalidade nesta população animal (ACHA & SYFRES, 1986).

A Organização Mundial da Saúde informa que há estimativa de que, do total de antibióticos produzidos no mundo, metade é utilizada em rações animais. Em recente pesquisa na Europa verificou-se que aproximadamente 100 miligramas de antimicrobiano são usados em animais para a produção de um quilograma de carne para consumo humano (WHO, 2005).

A natureza do alimento e das doenças transmitidas por alimentos têm mudado dramaticamente durante os últimos séculos. Certos avanços tecnológicos como a pasteurização e os processos de fabricação de enlatados, por exemplo, foram criados e utilizados em larga escala, no entanto conseguiu-se diminuir, mas não eliminar, algumas doenças de origem alimentar (MEAD et al., 1999).

Os produtos avícolas são freqüentemente indicados como via de transmissão para seres humanos, principalmente quando *Salmonella* Enteritidis ou *Salmonella* Typhimurium são implicadas. Contudo, esta relação permanece obscura, uma vez que a identificação precisa de uma amostra é um ponto crítico para o sucesso de investigações epidemiológicas, que visam a prevenção de surtos de infecção e a erradicação de suas origens. Assim, a exata caracterização do agente é de particular importância para o estabelecimento de correlações entre surtos de salmonelose em humanos e a presença deste microrganismo em aves ou em produtos de origem avícola (SANTOS, 2003).

Para pesquisa de *Salmonella* spp. em alimentos, o método recomendado pelo Bacteriological Analytical Manual (BAM), American Public Health Association (APHA), Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) e Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) é o método clássico de cultivo, desenvolvido com a finalidade de garantir a detecção deste microrganismo, mesmo em alimentos que apresentem situações extremamente desfavoráveis para o seu desenvolvimento, como alimentos com microbiota competidora muito maior que a população de *Salmonella* spp., alimentos em que as células se encontrem em número muito reduzido e/ou alimentos em que as células se encontrem injuriadas pela técnica de preservação, como a aplicação de calor, congelamento, secagem, salga, cura, entre outros (ECKNER et al., 1992).

O isolamento clássico de *Salmonella* spp. divide-se em quatro etapas: pré-enriquecimento, enriquecimento em caldo seletivo, plaqueamento seletivo diferencial e confirmação. A seleção dos meios de cultura e metodologia de preparo e cultivo das amostras variam de acordo com a fonte consultada, visando sempre, no entanto, obter as melhores condições de isolamento frente aos diferentes tipos de amostras (HAJDENWURCEL, 1998).

O pré-enriquecimento objetiva recuperar as células de *Salmonella* spp. que, normalmente, estão presentes em pequenas quantidades e em condições debilitadas nos alimentos processados. O enriquecimento em caldo seletivo tem como objetivo inibir a multiplicação da microbiota acompanhante e promover a elevação preferencial do número de células de *Salmonella* spp., incubando-se a amostra pré-enriquecida em caldo seletivo por 18 a 24 horas. Nesta etapa, recomenda-se a utilização de dois diferentes meios, pois a resistência da *Salmonella* spp. aos agentes seletivos varia de cepa para cepa. O plaqueamento seletivo diferencial visa promover o desenvolvimento preferencial de colônias de *Salmonella* spp., com características típicas que as distingam dos competidores, para posterior confirmação bioquímica e sorológica. Na etapa de enriquecimento, recomenda-se a utilização de, pelo menos, dois meios distintos para o plaqueamento (HAJDENWURCEL, 1998).

Mediante provas bioquímicas e sorológicas confirma-se se os isolados típicos obtidos nas placas são realmente de *Salmonella* spp. (JAY & COMAR, 1988). Portanto, os

procedimentos de cultivo padrão para o isolamento de *Salmonella* spp. em alimentos são trabalhosos e requerem um mínimo de quatro dias para se obterem evidências presuntivas de contaminação (D'AOUST et al., 1990).

A necessidade de métodos mais rápidos e menos laboriosos de detecção tem levado a avanços significativos no desenvolvimento de pesquisa e comercialização de kits de diagnóstico baseados em técnicas sorológicas, imunoabsorbância enzimática, hibridização de ácidos nucleicos, entre outras (D'AOUST et al., 1990). Como alternativa tem-se o uso dos métodos moleculares, como a reação da polimerase em cadeia (polymerase chain reaction - PCR) e tantas outras tecnologias derivadas que têm como característica o alto grau de especificidade se os oligonucleotídeos iniciadores utilizados tiverem um alvo de ação bem determinado, único do microrganismo a ser pesquisado (WOODWARD & KIRWAN, 1996).

Por esse motivo, o estudo da presença de *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp. na linha de abate de aves tem fundamental importância para o entendimento da epidemiologia destes agentes e posterior melhoria no controle higiênico-sanitário e, conseqüentemente, oferecimento ao consumidor de um produto de melhor qualidade.

O uso de técnicas moleculares tem se mostrado uma alternativa válida e que necessita de estudos para verificar suas inúmeras aplicações. A primeira metade da década de 80 assistiu ao desenvolvimento de um método de amplificação de seqüência de DNA que revolucionou a análise genética nesses últimos anos: a PCR. A técnica baseia-se na capacidade da enzima polimerase replicar seqüências de DNA, em certas condições laboratoriais, a partir de um par de pequenos fragmentos iniciadores da fita réplica (oligonucleotídeos iniciadores, ou em inglês: primers) que flanqueiam a seqüência que se deseja amplificar. Por meio de variações alternadas e cíclicas de temperatura que permitem a desnaturação (abertura da fita dupla de DNA), o anelamento (pareamento dos oligonucleotídeos iniciadores) e a extensão (cópia da fita dupla original pela incorporação de nucleotídeos nas fitas complementares), uma determinada seqüência de DNA é amplificada, ciclo após ciclo, em progressão geométrica, o que torna possível sua visualização em gel de eletroforese na forma de uma banda. O desenvolvimento desta técnica e as aplicações dela derivadas habilitaram o americano Kary Mullis ao recebimento do Prêmio Nobel. A PCR tem sido utilizada, por exemplo, desde experimentos relacionados ao seqüenciamento de DNA

até aplicações comerciais na área de diagnósticos. Algumas variações da PCR levaram ao desenvolvimento de técnicas poderosas na análise de diversidade genética, como a do polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (restriction fragment length polymorphism - RFLP), DNA polimórfico amplificado ao acaso (random amplified polymorphic DNA - RAPD), reação em cadeia da polimerase ancorada em seqüências repetitivas pequenas (simple sequence repeat-anchored PCR - SSR-PCR), amplificação seletiva de locos polimórficos microssatélite (selective amplification of microsatellite polymorphic loci - SAMPL) e polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (amplified fragment length polymorphism - AFLP) (FERREIRA, 1996).

## Referências

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 2. ed. Washington: Organization panamericana de la salud, 1986. 989 p.

ALLOS, B. M. *Campylobacter jejuni* strains from patients with Guillian-Barré syndrome. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 4, n. 2, p. 263-268, 1998.

ALTEKRUSE, S. F. *Campylobacter jejuni*: an emerging foodborne pathogen. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 5, n. 1, p. 28-35, 1999.

ARCHER, D. L.; KVENBERG, J. E. Incidence and cost of foodborne diarrhea disease in the United States. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 48, p. 887-94, 1985.

BENNETT, J.; HOLMBERG, S.; ROGERS, M.; SOLOMON, S. Infectious and parasitic diseases. In: AMLER R.; DULL H. **Closing the gap**: the burden of unnecessary illness. New York: Oxford Univ. Press, 1987, p. 102-114.

BERCHIERI JR., A.; BARROW, P. A. O desenvolvimento da microbiota intestinal em pintos de corte: prós e contras. In: CONFERÊNCIA APINCO 1998 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1998, Campinas, São Paulo. **Anais...** Campinas: APINCO, 1998. p. 183-190.

BLASER, M. J.; BERGOWITZ, I. D.; LAFORCE, F. M.; CRAVENS, J.; RELLER, L. B.; WANG, W. L. L.. *Campylobacter enteritis*: clinical and epidemiological features. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 91, p. 179-185, 1979.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n° 12, de 2 de janeiro de 2001. **Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos**. 2001. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/regis/resol/12\\_oirac.num](http://www.anvisa.gov.br/regis/resol/12_oirac.num)>. Acesso em: 14. nov. 2005.

BRYAN, F. L. **Diseases transmitted by foods**: a classification and summary. 2nd ed.. Atlanta: Centers for Disease Control, 1982, p. 84-8237.

BUTZLER, J. P. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 10, p. 868-876, 2004.

BUTZLER, J. P.; DEKEYSER, P.; DETRAIN, M.; DEHAEN, F. Related vibrio in stools. **Journal of Pediatrics**, St Louis, v. 82, p. 493-495, 1973.

CALZADA, C. T. **Incidência de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* no município de São Paulo – caracterização dos isolamentos em sorotipos e biótipos**.1991.171 f.Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991.

CAMARONI-JÚNIOR, J. G.; MODOLO, J. R.; PADOVANI, C. R., LOPES, C. A. M. Presença de *Campylobacter* na mucosa dos segmentos intestinais de suínos com enterite/diarréia. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 1, p. 13-17, 2002.

CARRAMIÑANA, J. J.; ROTA, C.; AUGUSTÍN, I.; HERRERA, A. High prevalence of multiple resistance to antibiotics in *Salmonella* serovars isolated from a poultry slaughterhouse in Spain. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 104, p. 113-139, 2004.

CARVALHO, A. C. F. B.; CORTEZ, A. L. C. Contaminação de produtos avícolas industrializados e seus derivados por *Campylobacter jejuni* e *Salmonella* sp. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 1, p. 57-62, 2003.

D'AOUST, J. Y.; SEWELL, A.; JEAN, A. Limited sensitivity of short (6h) selective enrichment for detection of foodborne *Salmonella*. **Journal of Food Protect**, Des Moines, v. 53, p. 562-565, 1990.

DENIS, M.; REFRÉGIER-PETTON, J.; LAISNEY, M.-J.; ERMEL, G.; SALVAT, G. *Campylobacter* contamination on French chicken production from farm to consumers. Use of PCR assay for detection and identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, p. 255-267, 2001.

DUIM, B.; WIN, A. C.; VAN BELLKUM, A.; RIGTER, A.; VAN LEEUWEN, N. W. J.; ENDTZ, H. P.; WAGENAAR, J. A. Amplified fragment length polymorphism analysis of *Campylobacter jejuni* strains isolated from chickens and patients with gastroenteritis or Guillian-Barré or Miller Fisher syndrome. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 66, p. 3917-3923, 2000.

ECKNER, K. F.; DUSTMAN, W. A.; CURIALE, M. S. Use of an elevated temperature and novobiocin in modified enzyme-linked immunoabsorbent assay for the improved recovery of *Salmonella* from foods. **Journal of Food Protection**, Ames, v.55, p.758-762, 1992.

ERTAŞ, 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 method. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, p. 203-209, 2004.

FERNANDEZ, H.; FARACE, M. I. **Manual de procedimentos: *Campylobacter***. 2003. Disponível em: <<http://www.panalimentos.org/salmsurv/docs/manual/Manual%20Campylobacter.pdf>>. Acesso em: 15 nov. 2005.

FERREIRA, M. E. **Biodiversidade: perspectivas e oportunidades tecnológicas**. 1996. Disponível em: <<http://www.bdt.fat.org.br/publicacoes/padct/bio/cap8/3/meliaste.html>>. Acesso em:16 nov. 2005.

GENIGEORGIS, C. A importância do *Campylobacter* na avicultura. **Avicultura Industrial**, São Paulo, v. 8, n. 6, p. 6-12, 1987.

GIL-SETAS, A.; RAMOS, A. M.; SALAS, C. M.; DOMÍNGUEZ, M. U.; ELIA, M. E. Salmonelosis no tifoidea em un área de salud de Navarra, España. **Revista Española de Salud Publica**, Madrid, v. 76, n. 1, p. 49-56, 2002.

GOLDENRING, J. **Enteritis por *Campylobacter***. 2004. Disponível em: <<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000224.htm>>. Acesso em: 14 nov. 2005.

HAJDENWURCEL, J. R. **Atlas de microbiologia de alimentos**. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora, 1998. 66 p.

HAJMEER, M. ***Salmonella* spp.** 2005. Disponível em: <<http://www.vetmed.ucdavis.edu/PHD/PHR150/2005/1505B6-Salm-MH.PDF>>. Acesso em: 15 nov. 2005.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; WILLIAMS, S. T. **Bergery's manual of determinative bacteriology**. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787 p.

HUMPHREY, T. **The significance of *Campylobacter* species as foodborne pathogens**. 1999 Disponível em: <<http://www.sofht.co.uk/technicla/campylobacter.htm>>. Acesso em: 31 out. 2005.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOOD. ICMSF. **Microorganismos de los alimentos. 1:** su significado y métodos de enumeración. 2nd ed. Zaragoza: Acribia, 2000. 439 p.



JAY, L. S.; COMAR, D. Comparative study of TECRA *Salmonella* Visual Immunoassay and Australian Standard cultural methods for analysis of salmonellae in foods. **Food Technology in Australia**, Sydney, v.40, p.186–191, 1988.

LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D. G. M. Doenças microbianas de origem alimentar provocadas por enteropatógenos. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 17, p. 77-113, 1996.

MEAD, P. S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; McCAIG, L. F.; BRESEE, J. S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P.; TAUXE, R. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 5, p. 607-625, 1999.

MODELO, J. R.; AUGUSTO FILHO, O.; PINTO, J. P. A. N.; PADOVANI, C. R.; SIMÕES, L. B.; CARVALHO, J. L. B. *Campylobacter* em carcaças resfriadas de frangos: análise espacial do fator de risco para a saúde pública. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 135, p. 40-46, 2005.

SANTOS, L. R. Padronização da RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso) para caracterização molecular de *Salmonella* Enteritidis. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia de Uruguaiana**, Uruguaiana, v. 10, p. 72-86, 2003.

SINELL, H. J. **Introducción a la higiene de los alimentos**. Zaragoza: Ed. Acribia, 1981. 167p.

SKIRROW, M. B. *Campylobacter* enteritis: a “new” disease. **British Medical Journal**, London, v. 2, p. 9-11, 1977.

SMITH, S. D. **Enterocolitis por Salmonella**. 2003. Disponível em: <<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000294.htm>>. Acesso em: 15 nov. 2005.

STEINHAUSEROVÁ, I.; FOJTÍKOVÁ, K. Serotyping and identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains of human and animal origin using PCR method. **Acta Veterinaria BRNO**, Kobenhavn, v. 68, p. 149-154, 1999.

UNGAR, M. L.; GERMANO, M. I. S.; GERMANO, P. M. L. Riscos e conseqüências da manipulação de alimentos para a saúde pública. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 6, p. 14-16, 1992.

VARNAM, A. H.; EVANS M. G. **Foodborne pathogens**: an illustrated text. St. Louis: Moby-Year Book, 1991. p. 209-34.

WOODWARD, M. J; KIRWAN, S. E. S. Detection of Salmonella enteritidis in eggs by the polymerase chain reaction. **Veterinary Record**, London, v. 138, p. 411-413, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. **Campylobacter**. 2000. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/en/print.html>>. Acesso em: 13 nov. 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. **Food safety and foodborne illness**. 2002a. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/print.html>>. Acesso em: 30 jan. 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. **Use of antimicrobials outside human medicine and resultant antimicrobial resistance in humans**. 2002b. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs268/en/print.html>>. Acesso em: 13 nov. 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. **Drug-resistance Salmonella**. 2005. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/print.html>>. Acesso em: 13 nov. 2005.

**Capítulo 2 - *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* na linha de abate de aves: caracterização dos isolados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e análise do produto pela técnica do polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) (gene *fla A*)**

**Resumo** - O gênero *Campylobacter* tem grande importância em saúde pública, principalmente pelo fato de que suas espécies podem causar diarreia em seres humanos. Estas espécies podem ser encontradas em água, alimento e no trato intestinal das aves. Este estudo investigou possíveis fontes de infecção e meios de transmissão de *Campylobacter* spp. em abatedouros de aves no Estado de São Paulo. Foram colhidas 288 amostras, em seis estabelecimentos as quais incluíram: fezes; penas; água de esaldamento, de evisceração e de resfriamento; carcaça não eviscerada, eviscerada e resfriada. Após o teste de isolamento microbiológico de *Campylobacter* spp., foi realizada uma reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*. A porcentagem de isolados para *Campylobacter jejuni* foi de 5%, e a maior porcentagem foi em amostras de fezes (22%). Foi detectada uma amostra positiva para *C. coli* (0,35%). Posteriormente, os isolados de *Campylobacter jejuni* foram analisados usando a técnica de polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) utilizando o gene da flagelina (*fla A*) e a enzima de restrição *Hae* III, com o intuito de subtipar molecularmente as 14 amostras positivas para *C. jejuni* isoladas, sendo agrupadas em três diferentes perfis de restrição. Os resultados indicam que há uma necessidade de melhorar a qualidade higiênico-sanitária em abatedouros de aves, oferecendo aos consumidores produtos livres de agentes zoonóticos.

Palavras-chaves: abatedouro, aves, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, flagelina, PCR-RFLP.

***Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in chicken abattoir, characterization of the isolates by Polymerase Chain Reaction (PCR) and analysis of the product by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (*fla A* gene)**

**Summary** - The genus *Campylobacter* has great prominence in public health because it includes species that may cause diarrhea. These species may be found in water, food and in the intestinal tract of chickens. This study investigated possible infection sources and transmission routes of *Campylobacter* spp. in chicken abattoirs in São Paulo State, Brazil. A total of 288 samples of feces, feathers, scald water, evisceration water, chiller water, and non-eviscerated, eviscerated, and chilled carcasses were collected from six chicken abattoirs. Polymerase chain reaction (PCR) using specific primers for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* were performed in *Campylobacter* spp. isolated samples. The percentage of isolated samples for *Campylobacter jejuni* was 5%, isolation was greater in feces samples (22%). One sample was positive for the species *C. coli* (0.35%). *C. jejuni* culture positive samples were further analyzed using PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) using the flagellin gene (*fla A*) and the *Hae* III enzyme, and grouped into three different restriction profiles. The results indicate that it is necessary to improve quality control in chicken abattoirs offering to the consumers products free of zoonotic agents.

Keywords: abattoir, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, chicken, flagellin, PCR-RFLP.

## 1 - Introdução

As enfermidades diarréicas em seres humanos constituem um problema de saúde pública mundial. Especialmente em países em desenvolvimento, espécies de *Campylobacter* spp. têm sido responsabilizadas como um dos agentes etiológicos que mais tiveram destaque em doenças veiculadas por alimentos (FITZGERALD et al., 2001; ZORMAN & MOŽINA, 2002). Essas espécies são amplamente isoladas de animais homeotermos, e a maioria das infecções por *Campylobacter* spp. possuem caráter zoonótico; no entanto, há apenas duas décadas a campilobacteriose foi reconhecida como zoonose. Desde então, uma série de estudos vêm sendo conduzidos e, embora a maioria dos casos seja relacionada a sintomas limitados à diarréia, uma seqüela severa representada por polineuropatia desmielinizante inflamatória aguda, a síndrome de Guillian-Barré, pode ocorrer (ALLOS, 1998; DUIM et al., 2000).

O gênero *Campylobacter* tem grande importância na saúde pública, pois várias espécies deste gênero podem causar diarréia e seu isolamento tem apresentado maior frequência em seres humanos, alimentos e água (ALTEKRUSE, 1999; ZHAO et al., 2001). A transmissão de *Campylobacter* spp. está geralmente associada ao consumo de alimentos contaminados (SKIRROW & BLASER, 1995). Contudo, um grande número de surtos envolvendo a água têm sido relatados, e esta pode ser considerada um importante meio de transmissão (JONES & ROWORTH, 1996). Surtos de campilobacteriose estão também associados em grande número a carne de aves e seus subprodutos (EVANS, 1992; PEARSON, 2000; CARVALHO & CORTEZ, 2003).

Para a avicultura, as duas espécies mais importantes são *Campylobacter coli* e *Campylobacter jejuni*. A espécie *C. coli* está intimamente relacionada com a espécie *C. jejuni*, sendo seus mecanismos de patogenicidade muito semelhantes; ocorre predominantemente em aves e suínos e é relatada em seres humanos e outros animais (GENIGEORGIS, 1987; VARNAM & EVANS, 1991). *C. jejuni* é amplamente distribuído no trato gastrointestinal de mamíferos e de aves domésticas e selvagens (TOOD, 1992; OOSTEROM, 1994; ZORMAN & MOŽINA, 2002). *C. jejuni* é capaz de hidrolisar o hipurato de sódio, enquanto *C. coli* assim como todas as outras espécies do gênero *Campylobacter* não

possuem o gene codificante para a enzima hipuricase (*hip*), e, assim, não são capazes de hidrolisar o mesmo substrato (LINTON, 1997). Há ainda uma outra espécie, *Campylobacter lari*, usualmente isolada em gaivotas; casos de enterites estão relacionados a esta espécie quando o indivíduo não teve contato com carne de frango (GENIGEORGIS, 1987).

Uma grande variedade de espécies pode abrigar este microrganismo em seu trato intestinal: suínos, ovinos, bovinos, cães, gatos e aves domésticas e selvagens (ACHA & SZYFRES, 1986; TOOD, 1992; WHO, 2000). Durante o abate das aves, este patógeno pode ser transferido do intestino para a superfície da carne, sendo esta uma relevante forma de contaminação dos produtos avícolas (OOSTEROM, 1994; BRYAN & DOYLE, 1995). No Brasil, diversos autores têm relatado a presença de *C. jejuni* em fezes de seres humanos com diarreia aguda ou crônica, especialmente em crianças e até em portadores assintomáticos (SCARCELLI et al., 1998). A infecção causada por *C. jejuni* representa a ocorrência antecedente mais comum da síndrome de Guillian-Barré (ALLOS, 1998; DUIM et al., 2000). A estimativa de casos desta desordem desmielinizante, que resulta numa paralisia neuromuscular aguda, é de um caso em cada 2.000 pessoas atingidas pela campilobacteriose; cerca de 40% dos casos de pacientes com esta síndrome tiveram infecção evidente por *C. jejuni* (ALLOS, 1998).

*C. jejuni* é a espécie isolada, com mais freqüência, em casos de gastroenterites de origem bacteriana em seres humanos (LINTON, 1997; BUTZLER, 2004); é o mais comum causador de morbidade em países desenvolvidos e em desenvolvimento, representando um considerável escoamento de recursos econômicos e de saúde pública (BUTZLER, 2004). ZHAO et al. (2001) relatam 2,5 milhões de casos de enterite provocados por *C. jejuni* nos Estados Unidos, número que já superou os casos de salmonelose e shigelose (FITZGERALD et al., 2001). Na Inglaterra e no País de Gales, o número de casos notificados de *C. jejuni* pelos serviços de saúde pública tem sofrido um acréscimo considerável nos últimos anos, passando de 34.000 em 1990 para 54.000 em 2000, ultrapassando em 3,6 vezes os casos de infecção por *Salmonella* spp. (DESAI et al., 2001). Na Dinamarca, o número de casos confirmados triplicou no período de 1992 a 1999, atingindo o índice de 78 a cada 100.000 habitantes acometidos pela enfermidade, sendo 95% dos casos devidos ao *C. jejuni* (NIELSEN et al., 2000). Na República Tcheca, 20.000 casos foram registrados no ano

2000, representando cerca de 200 casos a cada 100.000 habitantes (STEINHAUSEROVÁ et al., 2002). No Japão, no período de 1996 a 2000, *C. jejuni* foi responsável por 40,5% dos casos de pacientes que apresentavam melena (OBANA et al., 2002).

O consumo de alimentos contaminados por *C. jejuni*, especialmente carne e subprodutos de aves inadequadamente processados ou parcialmente cozidos, é considerado a principal via de transmissão da campilobacteriose a seres humanos (SCARCELLI et al., 2003), sendo, portanto, uma zoonose.

CARVALHO et al. (2002), utilizando técnicas microbiológicas, analisaram 291 amostras de diferentes pontos em abatedouros e isolaram *C. jejuni* em 21 das 50 amostras de fezes (42%), em 19 das 50 amostras de penas (38%), 8 das 30 amostras de água do tanque de escaldamento (26,6%), 19 das 31 amostras de água de evisceração (61,3%), 18 das 50 amostras de carcaças pós-evisceração (36%), concluindo que as etapas de evisceração e depenação constituem importantes pontos de contaminação no processamento industrial. CASON et al. (1997) observaram a ocorrência de 20% de *Campylobacter* spp. em carcaças de aves.

O mecanismo preciso de disseminação de *Campylobacter* spp. dos animais para o ser humano ainda não está bem estabelecido e tem sido objeto de vários estudos. É necessário determinar métodos de mensuração seguros, que possam ajudar no estudo da disseminação da infecção (STEINHAUSEROVÁ et al., 2002). Em avaliações epidemiológicas, diversos métodos recentemente desenvolvidos têm sido empregados na subtipagem de amostras de *C. jejuni*, como, por exemplo, as técnicas moleculares (FRASER et al., 1992; DELONG et al., 1996; STEINHAUSEROVÁ et al., 2002).

O uso de técnicas moleculares, como a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e a técnica de polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP), que se baseia no estudo da homologia de seqüências, vêm ganhando cada vez mais destaque na pesquisa de microrganismos enteropatógenos devido às suas vantagens, como a possibilidade de pesquisar um grande número de amostras em curto intervalo de tempo e a sensibilidade dos testes. No Brasil há poucos estudos empregando essas técnicas na pesquisa de *C. jejuni* e *C. coli*.

Atualmente, tem-se empregado a combinação das técnicas da PCR com a técnica de RFLP, resultando na PCR-RFLP, utilizando-se especialmente o gene *fla A*, codificante para a proteína flagelina de *C. jejuni*, que pode estar envolvida em surtos de origem alimentar (FITZGERALD et al., 2001). O gene da flagelina (*fla A*) pode servir como um bom marcador epidemiológico e de bastante utilidade para identificar *C. jejuni* (ZORMAN & MOŽINA, 2002).

O presente trabalho propôs realizar um estudo na linha de abate de frangos e teve como objetivos ampliar pesquisas referentes à ocorrência de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* em abatedouro de aves; avaliar a ocorrência destes patógenos intestinais na água na linha de abate; e caracterizar as amostras isoladas de *C. jejuni* utilizando a técnica da PCR-RFLP.



## 2 - Material e Métodos

### 2.1 - Amostragem

Foram colhidas 288 amostras, incluindo: fezes; penas; água de escaldamento, de evisceração e de resfriamento; e amostras obtidas por enxaguadura a partir de carcaça não eviscerada, eviscerada e resfriada obtidas por enxaguadura. As colheitas ocorreram no início, meio e final da jornada de trabalho e foram feitas 12 visitas em três abatedores de aves com Serviço de Inspeção Federal (SIF) (B, C e F) e em três abatedores com Serviço de Inspeção Estadual (SISP) (A, D e E), todos localizados no Estado de São Paulo.

As amostras de fezes foram colhidas na plataforma de recebimento das aves, em sacos de polietileno esterilizados; as penas foram colhidas em áreas adjacentes à depenadeira e, da mesma forma, colocadas em sacos de polietileno esterilizados. Volumes de 400mL das amostras de águas de escaldamento, evisceração e resfriamento foram colocados em frascos esterilizados (500mL). As amostras a partir de carcaça não eviscerada, eviscerada e resfriada foram colhidas na linha de abate pelo método de enxaguadura, que consistiu em colocar a carcaça em sacos esterilizados de polietileno com 300mL de água peptonada 1%. A solução resultante era colocada em frascos esterilizados (500mL).

As amostras foram transportadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável, até o Laboratório de Análises de Alimentos do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, *Campus Jaboticabal* – Unesp.

### 2.2 - Preparo das amostras para análise

**Amostras de fezes:** das amostras de fezes foi pesado 1g e diluído em 10mL de solução salina 0,9%; homogeneizou-se e deixou-se decantar por cinco minutos (CASTRO et al., 1997).

**Amostras de penas:** 25g de penas foram adicionados a 45mL de caldo tioglicolato e agitados vigorosamente.

**Amostras das águas:** 100mL de cada uma das amostras de água dos tanques de depeação, evisceração e refrigeração foram transferidos para frascos esterilizados contendo 100mL de água peptonada a 2% e incubados por 24 horas a 43°C. Após este período, uma alíquota de 50mL do volume total foi retirada e centrifugada por 30 minutos a 8.000 rpm à temperatura de 4°C; o sedimento acrescido de 2mL do sobrenadante foi homogeneizado e processado como descrito a seguir.

**Amostras obtidas a partir de carcaças:** As amostras de água de enxaguadura de carcaça não eviscerada, eviscerada e resfriada foram primeiramente incubadas por 24 horas a 42°C; retirou-se uma alíquota de 50mL do volume total e centrifugou-se por 30 minutos, a 8.000 rpm, à temperatura de 4°C. Reservou-se o sedimento mais 2mL do sobrenadante, que foram homogeneizados.

### 2.3 - Isolamento de *Campylobacter* spp.

A etapa a seguir repetiu-se para todas as amostras: duas alçadas do sedimento misturados com 2mL do sobrenadante foram semeadas em meio ágar Brucella sangue adicionado de suplemento FBP (0,025% de sulfato ferroso, 0,025% de piruvirato de sódio e 0,025% de metabissulfito de sódio), 2% de uma mistura de antibióticos (vancomicina 10mg/mL, trimetoprim 5mg/mL, polimixina 2,5UI/mL, anfotericina B 5mg/mL e cefalotina 15mg/mL) e 7% de sangue desfibrinado de carneiro, de acordo com o que estabeleceu BLASER et al. (1979).

Os meios foram incubados por 48 horas a 42°C em atmosfera microaerófila, utilizando o kit Anaerocult<sup>®</sup> C (Merck). A identificação das colônias suspeitas de *Campylobacter* spp. foi realizada por meio da morfologia microscópica após coloração de Gram, que se apresentavam como bastonetes curvos, em forma de S e Gram-negativos.

### 2.4 - Extração do DNA das amostras positivas de *Campylobacter* spp.

Das 288 amostras colhidas, 143 amostras que apresentaram isolados suspeitos tiveram seu DNA extraído pela técnica de fervura, que consiste em ferver, por dez minutos,

uma suspensão composta por 1mL de água ultrapura (Milli Q<sup>®</sup>) e três a cinco colônias resultantes de culturas de dois a três dias (NISHIMURA et al., 1996).

#### 2.5 - Identificação de amostras positivas de *C. jejuni* pela PCR

Todas as 143 amostras foram pesquisadas utilizando os oligonucleotídeos iniciadores HIP412F (5'-GAA GAG GGT TTG GGT GGT G-3') e HIP1288R (5'-AGC TAG CTT CGC ATA ATA ACT TG-3') (LINTON et al., 1997), os quais foram usados para amplificar o DNA de *C. jejuni*, tendo como alvo o gene *hip*, da hipuricase. Foi preparada uma mistura para cada amostra de 17,25µL de água ultrapura (Milli Q<sup>®</sup>), 8µL de dNTPs, 5µL de tampão, 1,5µL de MgCl<sub>2</sub>, 4µL de cada um dos dois iniciadores, 0,25µL da enzima *Taq* polimerase, totalizando 40µL. Esta mistura, adicionada de 10µL de DNA de cada amostra de DNA extraído, era colocada em um eppendorf, levada ao termociclador (marca PT 200, MJ Research) e submetida a uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; depois, a 30 ciclos de amplificação que consistiam em desnaturação (94°C, por 1 minuto), hibridização (58°C, por 1 minuto) e extensão (72°C, por 1 minuto), seguido por um último passo de extensão final a 72°C, por 10 minutos (LINTON et al., 1997).

#### 2.6 - Análise de amostras positivas de *C. jejuni* pela PCR-RFLP

Os oligonucleotídeos iniciadores na PCR-RFLP foram: 5'-TAC TAC AGG AGT TCA AGC CTT-3' e 5'-GTT GAT GTA ACT TGA TTT TTG-3' (NISHIMURA et al., 1996), utilizados na reação que teve como alvo o gene da flagelina (*fla A*) de *C. jejuni*. Foi preparada uma mistura de 17,25µL de água ultrapura (Milli Q<sup>®</sup>), 8µL de dNTPs, 5µL de tampão, 4µL de cada um dos iniciadores citados acima e 0,25µL da enzima *Taq* polimerase e somando 40µL desta mistura, que era adicionada de 10µL de DNA. As amostras eram colocadas em termociclador e submetidas a uma desnaturação a 94°C por 5 minutos e depois submetidas a 30 ciclos de amplificação que incluíam desnaturação (94°C, por 1 minuto), hibridização (55°C, por 1 minuto) e extensão (72°C, por 1 minuto). O último passo de extensão final foi realizado a 72°C, por 10 minutos. Os fragmentos de 702 pares de base (pb) das amostras positivas

foram digeridos usando a enzima de restrição *Hae* III (NISHIMURA et al., 1996). Esta digestão consistiu em preparar uma mistura de 16µL da enzima *Hae* III, 32µL de tampão, 176µL de água ultrapura (Milli Q<sup>®</sup>), distribuir em 14 eppendorfs e incubar a 37°C, por 2 horas (NISHIMURA et al., 1996). As amostras eram submetidas à corrida em gel de agarose 1,4%.

## 2.7 - Identificação de amostras positivas de *C. coli* pela PCR

Foram utilizadas as 143 culturas de *Campylobacter* spp. que tiveram o DNA extraído pela técnica de fervura, como descrito anteriormente, e a amplificação foi realizada utilizando-se os seguintes oligonucleotídeos iniciadores: CC18F (5'-GGT ATG ATT TCT ACA AAG CGA G-3') e CC519R (5'-ATA AAA GAC TAT CGT CGC GTC-3'), os quais são específicos para *C. coli*, gene da enzima aspartoquinase, que cataliza a fosforilação do ácido aspártico (LINTON et al., 1997). Preparava-se uma mistura de 17,25µL de água ultrapura (Milli Q<sup>®</sup>), 8µL de dNTPs, 5µL de tampão, 1,5µL de MgCl<sub>2</sub>, 4µL de cada um dos dois iniciadores e 0,25µL da enzima *Taq* polimerase, somando 40µL, que eram adicionados a 10µL de DNA de cada amostra e colocados em um eppendorf. Na seqüência, as amostras eram colocadas em termociclador e submetidas à desnaturação a 94°C, por 5 minutos, depois eram realizados 30 ciclos de amplificação que incluíam: desnaturação (94°C, por 1 minuto), hibridização (60°C, por 1 minuto) e extensão (72°C, por 1 minuto). Finalmente, as amostras eram submetidas a uma extensão final a 72°C, por 10 minutos (LINTON et al., 1997).

Todos os produtos amplificados de *C. jejuni* (gene *fla A* e gene *hip*) e *C. coli* foram analisados em gel de agarose a uma voltagem constante de 5-6 V.cm<sup>-1</sup>, utilizando sempre um marcador padrão de peso molecular de 100 pb DNA (Gibco-BRL), amostras negativas e amostras de referência como controle positivo. Para *Campylobacter jejuni* foi utilizada a cepa CDC 913/PC-264 e para *Campylobacter coli* a cepa ATCC A3315. Os géis de agarose a 1,4% foram fotografados sob luz UV (300-320 nm) com uma câmera Digital Kodak DC/120 Zoom. As imagens foram analisadas usando o programa 1D Image Analysis (Kodak Digital Science).

## 2.8 - Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando o programa SAS 6.12 (SAS, 1998). Os testes verificaram a independência das tabelas de contingência, utilizando o Teste de Fisher ( $\alpha = 0,05$ ), e foi testada a presença e a ausência de *Campylobacter* spp. nos oito pontos de colheita avaliados; a presença ou a ausência de *Campylobacter* spp. nos seis abatedouros; e a presença de SIF e SISF e a ocorrência de *Campylobacter* spp..

### 3 - Resultados e Discussão

De um total de 288 amostras colhidas, a porcentagem de amostras positivas de *Campylobacter jejuni* foi de 4,9% (Tabela 1). A maior porcentagem de isolados de *C. jejuni* foi observada em amostras de fezes (22,2%). As amostras que não se apresentaram positivas foram as de água de resfriamento, de carcaça não eviscerada e de carcaça resfriada.

Tabela 1 - Total de amostras analisadas e de amostras positivas para *Campylobacter jejuni* colhidas na linha de abate de aves, no período de março de 2003 a agosto de 2004, em abatedouros do Estado de São Paulo.

Amostras	Número de amostras	Amostras positivas <i>C. jejuni</i>	
		n	%
Fezes	36	8	22,2
Penas	36	2	5,6
Água de escaldamento	36	1	2,8
Água de evisceração	36	1	2,8
Água de resfriamento	36	0	0,0
Carcaça não eviscerada	36	0	0,0
Carcaça eviscerada	36	2	5,6
Carcaça resfriada	36	0	0,0
Total	288	14	4,9

SCARCELLI et al. (2003), analisando 55 amostras de carcaça de aves, utilizando técnica de filtração para isolamento, reportaram 20% de positividade para *C. jejuni*, valor este maior do que o encontrado no presente trabalho, este fato pode ser explicado por diferenças nas técnicas utilizadas ou mesmo pela utilização de antibióticos na ração e maior controle sanitário nas granjas reduzindo assim a carga bacteriana nas carcaças, bem como pelo uso de cloro na água dos abatedouros, fatores estes que podem ter contribuído para o resultado inferior da presente pesquisa em relação ao trabalho de SCARCELLI et al. (2003).

Estes dados corroboram a importância das aves como fonte de contaminação de *C. jejuni* para o ser humano e para outras espécies animais (SKIRROW, 1991; ALTEKRUSE, 1999).

A figura 1 demonstra amostras positivas e negativas para *Campylobacter jejuni* nas colheitas realizadas.



Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose de amostras isoladas de *Campylobacter jejuni* provenientes de abatedouros de frango. Linha 1: padrão de 100 pb; linhas 5 e 9: amostra positiva de *C. jejuni*; linhas 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 14: amostras negativas de *C. jejuni*; linha 12: controle positivo; linha 13: água esterilizada, usada como controle negativo.

Neste trabalho, apesar da frequência de isolados ter sido alta em amostras de fezes (22,2%), uma amostra de água de evisceração estava contaminada com *C. jejuni* (2,8%) e a presença de *C. jejuni* em água de resfriamento e de carcaça resfriada não foi identificada. Achados diferentes dos de CASTRO et al. (1997), pois detectaram altas porcentagens de contaminação por *C. jejuni* em água de evisceração de abatedouros de aves (35,7%) e também observaram *Campylobacter* spp. em águas de escaldamento e de resfriamento. VASHIN & STOYANCHEV (2004), em pesquisa na Bulgária, observaram que as etapas de depeação e evisceração e a água de resfriamento foram os pontos de contaminação mais relevantes no processo de abate de aves, resultados que diferiram também do presente trabalho, pois foram as amostras de fezes as que mais estavam contaminadas.

O escaldamento a 58°C faz com que haja um decréscimo na contaminação por *Campylobacter* spp. na carcaça de aves; entretanto, este processo do abate não elimina completamente a contaminação (OOSTEROM & DE WILDE, 1983). HINTON JR. et al. (2004) afirmaram que as operações de processamento das carcaças de aves, tais como

escaldamento, depenação, evisceração e resfriamento, podem afetar o nível de contaminação da carcaça por enteropatógenos. Mas a contagem destes patógenos ainda é significativa na superfície da carne, conforme afirmaram VASHIN & STOYANCHEV (2004). Estes resultados corroboram os dados do presente trabalho, que verificou duas amostras de carcaças evisceradas positivas, indicando que mesmo após as carcaças terem passado pelo processo de escaldamento podem ainda apresentar o patógeno, aumentando o perigo de contaminações cruzadas dentro do abatedouro (VASHIN & STOYANCHEV, 2004). Substâncias como cloro têm sido utilizadas como inibidores do desenvolvimento de microrganismos na superfície da carne de frango (SILVA, 1998), o que, no caso dos abatedouros pesquisados, pode ter ocorrido, explicando o fato de não terem ocorrido amostras isoladas de água de resfriamento e de carcaças resfriadas, pela inibição por meio do cloro.

As 14 amostras isoladas para *C. jejuni*, analisadas juntamente com os abatedouros onde foram colhidas, estão apresentadas na Tabela 2. Pode-se constatar que o abatedouro que teve maior número de amostras positivas foi o D 35,7% (5/14), seguido pelo E e B, com 28,6% (4/14) e 21,4% (3/14), respectivamente.

Tabela 2 - Amostras isoladas de *Campylobacter jejuni* de diferentes pontos na linha de abate de aves e seus respectivos abatedouros, de março de 2003 a agosto de 2004, no Estado de São Paulo.

Abatedouro	Tipo de Inspeção	<i>Campylobacter jejuni</i>
A	SISP	0
B	SIF	3
C	SIF	1
D	SISP	5
E	SISP	4
F	SIF	1

No abatedouro A não foram observadas amostras positivas para *C. jejuni*; é preciso considerar que os lotes de aves avaliados eram originários de diferentes locais de criação, e que pode não ter havido contaminação das aves abatidas nos dias de colheita de amostra.



Pode-se supor que alguns lotes não estavam contaminados por *Campylobacter* spp. provavelmente devido ao uso de antibióticos na dieta destas aves, quando ainda estavam em fase de criação.

Nas amostras de penas uma foi positiva para *Campylobacter coli*, representada no gel de eletroforese (Figura 2).

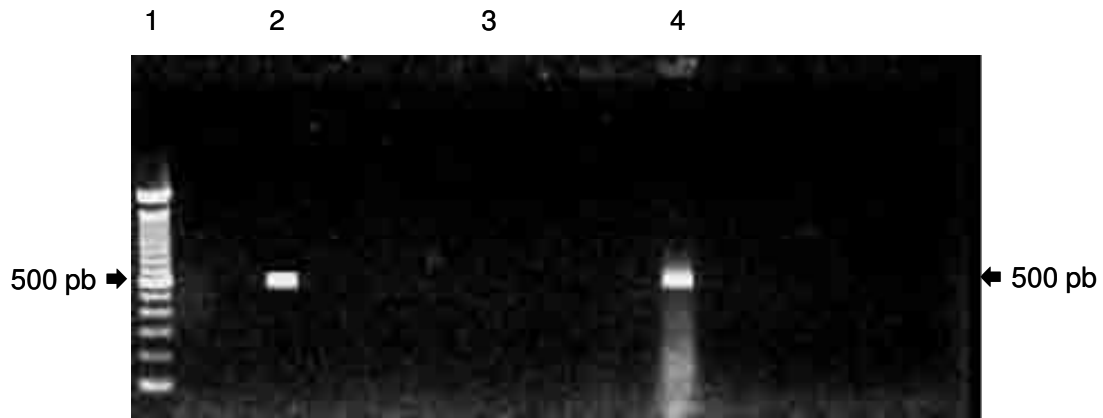


Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose onde pode ser observada a amostra positiva para *C. coli*. Linha 1: padrão 100pb; linha 2: controle positivo; linha 3: controle negativo; linha 4: amostra isolada de pena, positiva para *C. coli*

Em 0,35% das amostras *C. coli* foi detectado. Este valor é menor do que o encontrado no trabalho de ERTAŞ et al. (2004), que analisaram amostras de intestino e fígado de 200 aves e observaram 11% de positividade para *C. coli*. NIELSEN & NIELSEN (1999) estabeleceram que a frequência de *C. coli* foi de 15% em 156 amostras de diferentes produtos de aves. Os resultados apresentados por esse autores demonstram uma diferença na ocorrência de *C. coli* em relação ao presente trabalho. No entanto, estudos sobre prevalência de campilobacteriose em aves indicam que a espécie *C. jejuni* é encontrada de forma mais comum do que *C. coli* (GENIGEORGIS, 1987; ERTAŞ et al., 2004; MODOLO et al., 2005) fato que ocorreu na presente pesquisa.

ZHAO et al. (2001), nos Estados Unidos, analisando 184 amostras de carne crua de aves, observaram que as amostras, em sua maioria, apresentavam-se positivas para *Campylobacter* spp. (70,7%). No Brasil, altas porcentagens de *C. jejuni* e *C. coli*, de 25% a 50%, têm sido isoladas de aves saudáveis (MACHADO et al., 1994; CASTRO et al., 1997). As prevalências de *C. jejuni* em produtos avícolas podem variar de 0 a 100%

(GENIGEORGIS, 1987). A presença de *C. jejuni* e *C. coli* em carcaças pode ser fundamental na transmissão de campilobacteriose a seres humanos (ERTAŞ et al., 2004).

As 14 amostras positivas para *C. jejuni* na PCR foram analisadas pela técnica de PCR-RFLP; destes isolados evidenciaram-se três diferentes padrões de perfis de restrição, denominados 1, 2 e 3 (Figura 3). Os perfis 1 e 2 ocorreram três vezes cada um, e o perfil 3 ocorreu duas vezes. Outras seis amostras analisadas não apresentaram bandas na eletroforese.

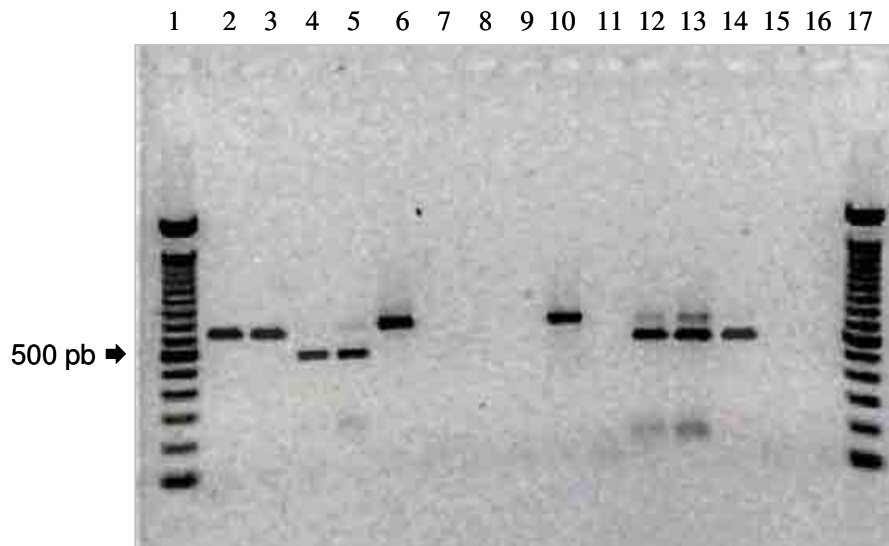


Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose mostrando três perfis de restrição de produtos de PCR-RFLP digeridos pela enzima *Hae* III. Linhas: 1 e 17, marcador molecular de 100 bp; linha 2: fragmento de 702 pb do gene *fla* A (controle positivo); linhas 3, 6 e 10: perfil de restrição 1; linhas 12, 13 e 14: perfil de restrição 2; linhas 4 e 5: perfil de restrição 3; linhas 7, 8, 9, 11, 15 e 16: DNA insuficiente.

Com relação à distribuição dos perfis de restrição entre os abatedouros, dois perfis de restrição diferentes foram detectados no abatedouro B: o perfil 1, observado em uma amostra de fezes, e o perfil 3, presente em duas amostras de fezes. No abatedouro C as amostras não tiveram seu DNA cortados pela enzima *Hae* III. No abatedouro D, foi detectado o perfil de restrição 1 em amostra de fezes, as demais amostras não tinham sítio de ligação para a enzima *Hae* III. O perfil de restrição 2 foi detectado no abatedouro E em uma amostra de fezes e em duas amostras de penas. Nenhuma amostra positiva de *C. jejuni* foi verificada no abatedouro A. Não foi possível analisar as amostras positivas do abatedouro F pela

técnica de PCR-RFLP, devido ao fato de algumas cepas não terem sítio de restrição para a Hae III, não havendo um perfil, portanto, a ser detectado por esta enzima.

As amostras de alguns abatedouros não apresentaram *C. jejuni* e *C. coli*, provavelmente por não terem sido colonizadas pelo agente, e alguns fatores podem ter contribuído para este fato, como, por exemplo, a adição de antibióticos na ração durante a fase de produção das aves. O aumento na produção de carne mundial em muitos países desenvolvidos ocorreu devido à intensificação da produção, que vem acompanhada, freqüentemente, do uso de antimicrobianos, os quais são utilizados na terapia de doença e na promoção do crescimento, particularmente na produção de aves (WHO, 2002).

Os três diferentes perfis de restrição identificados no presente estudo são similares aos encontrados em estudo utilizando a mesma técnica, com fezes humanas na China e no Japão por NISHIMURA et al. (1996); também correspondem aos perfis observados em amostras de fezes de aves e humanos na República Tcheca por STEINHAUSEROVÁ et al. (2002) e por SCARCELLI et al. (2003) em amostras do Brasil e da Itália. A similaridade entre esses perfis sugere uma distribuição mundial desses diferentes subtipos de *C. jejuni*. A presença de amostras positivas para *C. jejuni* com diferentes perfis de restrição, já reportados em amostras de fezes de seres humanos em outros trabalhos utilizando a mesma técnica, corrobora a hipótese de que as aves podem atuar como uma importante fonte disseminadora de *Campylobacter* spp. na transmissão para os seres humanos, sendo a campilobacteriose uma importante zoonose (ACHA & SZYFRES, 1986; BUTZLER, 2004).

Além desta distribuição cosmopolita deve-se destacar a possibilidade do *C. jejuni* causar doença em seres humanos tanto sob a forma aguda com diarreia, dores abdominais, câibras, náusea, vômito e febre, bem como doenças crônicas, como a síndrome de Guillian-Barré, artrite reativa, miocardite e pericardite; podendo levar à morte crianças, idosos e imunocomprometidos (KOTULA & PANDYA, 1995).

A reprodutibilidade e a capacidade discriminatória de métodos de tipificação são necessárias para identificar a origem das infecções e delimitar as possíveis rotas de contaminação e origem das infecções pelos diferentes perfis de restrição (DESAI et al., 2001). Além disso, novas técnicas laboratoriais são necessárias para diferenciar surtos não epidemiologicamente relacionados (FITZGERALD et al., 2001). Freqüentemente,

contaminações alimentares por múltiplas cepas de *Campylobacter* spp. impedem a delimitação de rotas de transmissão e melhor reconhecimento dos surtos (DESAI et al., 2001).

A análise estatística (Teste de Fisher,  $\alpha = 0,05$ ) (ZAR, 1999) indicou que houve diferença significativa entre a presença e a ausência de *Campylobacter* spp. nos oito pontos de colheita avaliados ( $p \leq 0.05$ ). Por outro lado, não houve diferença significativa entre a presença ou a ausência de *Campylobacter* spp. nos seis abatedouros pesquisados bem como no tipo de abatedouro pesquisado (SIF ou SISP) ( $p > 0,05$ ).

#### 4 - Conclusões

Este trabalho demonstrou que as fezes são importantes vias de eliminação, e as penas, ao serem contaminadas pelas fezes, tornam-se importantes vias de transmissão de bactérias do gênero *Campylobacter* spp. das aves para a linha de abate, portanto a origem da contaminação advém do local onde as aves foram produzidas. O processamento parece diminuir a contaminação nas carcaças, por isso modificações na produção, no transporte e no processamento seriam mais efetivos na redução da população destes patógenos nas aves antes do abate.

A contaminação ao longo da linha de abate diminuiu, concluindo-se assim que os procedimentos utilizados no processo de abate, tais como cloração da água e resfriamento, são eficientes na diminuição do número de patógenos, pois nas fezes, penas, água de esaldamento, água de evisceração e carcaça eviscerada foram encontradas mais amostras contaminadas e nas amostras de água de resfriamento e carcaça resfriada não foram detectadas amostras positivas.

Os resultados obtidos neste estudo, de acordo com a metodologia utilizada, indicam que o processamento inadequado das aves nos abatedouros pode representar uma forma de introdução de *C. jejuni* e *C. coli* na cadeia alimentar de seres humanos, enfatizando assim a importância de melhorias nas medidas de controle destes microrganismos em abatedouros de aves, bem como em etapas que antecedem o abate.

Adicionalmente, por estes patógenos terem sido isolados na carcaça eviscerada, há risco de contaminação da carcaça resfriada, apesar de não terem sido isolados, por isso os consumidores devem ser alertados e educados para os procedimentos corretos de manuseio, sanitização e cozimento das aves, a fim de eliminar estes e outros patógenos potenciais causadores de intoxicações alimentares.

## 5 - Referências

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 2. ed. Washington: Organization panamericana de la salud, 1986. 989 p..

ALLOS, B. M. *Campylobacter jejuni* strains from patients with Guillian-Barré syndrome. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 4, n. 2, p. 263-268, 1998.

ALTEKRUSE, S. F. *Campylobacter jejuni*: an emerging foodborne pathogen. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 5, n. 1, p. 28-35, 1999.

BLASER, M. J.; BERCOWITZ, I. D.; LAFORCE, F. M.; CRAVENS, J.; RELLER, L. B.; WANG, W. L. L.. *Campylobacter enteritis*: clinical and epidemiological features. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia v. 91, p. 179-185, 1979.

BUTZLER, J. P. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 10, p. 868-876, 2004.

BRYAN, F. L.; DOYLE, M. P. Health risks and consequences of *Salmonella* and *Campylobacter jejuni* in raw poultry. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 58, n. 3, p. 326-344, 1995.

CARVALHO, A. C. F. B.; CORTEZ, A. L. C. Contaminação de produtos avícolas industrializados e seus derivados por *Campylobacter jejuni* e *Salmonella* sp. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 1, p. 57-62, 2003.

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

CASON, J. A.; BAILEY, J. S.; STERN, N. J.; WHITTEMORE, A. D.; COX, N. A. Relationship between aerobic bacteria, *Salmonella*, and *Campylobacter* on broiler carcasses. **Poultry Science**, Champaign, v. 76, n. 8, p. 1037-1041, 1997.

CASTRO, A. G. M.; GENOVEZ, M. E.; SCARCELLI, E.; TORRES, A. P.; CARDOSO, M. V.; PASCHOAL, A. L. S.; SOUZA, C. A. I.; CARRASCO, S. Monitoramento de *Campylobacter* spp. ao longo da linha de abate de frangos de corte. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 21-26, 1997.

DELONG, W. J.; JAWORSKI, M. D.; WARD, A. C. S. Antigenic and restriction enzyme analysis of *Campylobacter* spp. associated with abortion in sheep. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 57, p. 163-167, 1996.

DESAI, M.; LOGAN, J. M. J.; FROST, J. A.; STANLEY, J. Genome sequence-based fluorescent length polymorphism of *Campylobacter jejuni*, its relationship to serotyping, and its implications for epidemiological analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 11, p. 3823-3829, 2001.

DUIM, B.; WIN, A. C.; VAN BELLKUM, A.; RIGTER, A.; VAN LEEUWEN, N. W. J.; ENDTZ, H. P.; WAGENAAR, J. A. Amplified fragment length polymorphism analysis of *Campylobacter jejuni* strains isolated from chickens and patients with gastroenteritis or Guillian-Barré or Miller Fisher syndrome. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 66, p. 3917-3923, 2000.

ERTAŞ, 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 method. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, p. 203-209, 2004.

EVANS, S. Introduction and spread of thermophilic *Campylobacter* in broilers flocks. **Veterinary Research**, Paris, v. 131, n. 24, p. 574-576, 1992.

FITZGERALD, C.; HELSEL, L. O.; NICHOLSON, M. A.; OLSEN, S. J.; SWERDLOW, D. L.; FLAHART, R.; SEXTON, J.; FIELDS, P. I. Evaluation of methods for subtyping *C. jejuni* during an outbreak involving a food handler. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 7, p. 2386-2390, 2001.

FRASER, A. D. E.; BROOKS, B. W.; GARCIA, M. M.; LIOR, H. Molecular discrimination of *Campylobacter coli* serogroup 20 biotype I (Lior) strains. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 30, p. 267-280, 1992.

GENIGEORGIS, C. A importância do *Campylobacter* na avicultura. **Avicultura Industrial**, São Paulo, v. 6, n.6, p. 6-12, 1987.

HINTON JR., A; CASON, J. A.; HUME, M. E.; INGRAM, K. D. Spread of *Campylobacter* spp. During poultry processing in different seasons. **International Journal of Poultry Science**, v. 3, n. 7, p. 432-437, 2004.

JONES, I. G.; ROWORTH, M. An outbreak of Escherichia coli O:157 and campylobacteriosis associated with contamination of a drinking water supply. **Public Health**, London, v. 110, p. 277-282, 1996.

KOTULA, K. L.; PANDYA, Y. Bacterial contamination of broiler chicken before scalding. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 58, n. 12, p. 1326-1329, 1995.

LINTON, D. Old and new Campylobacters: a review. **PHLS Microbiology Digest**, v.13, n. 1, p. 10-15, 1997.



LINTON, D.; LAWSON, A. J.; OWEN, R. J.; STANLEY, J. PCR detection, identification to species level, and fingerprint of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, n. 10, p. 2568-2572, 1997.

MACHADO, R. A.; TOSIN, I.; LEITÃO, M. F. F. Occurrence of *Salmonella* sp. and *Campylobacter* sp. in chickens during industrial processing. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 25, p. 239-244, 1994.

MODELO, J. R.; AUGUSTO FILHO, O.; PINTO, J. P. A. N.; PADOVANI, C. R.; SIMÕES, L. B.; CARVALHO, J. L. B. *Campylobacter* em carcaças resfriadas de frangos: análise espacial do fator de risco para a saúde pública. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 135, p. 40-46, 2005.

NIELSEN, E. M.; NIELSEN, N. L. Serotypes of *C. jejuni* and *C. coli* isolated from poultry products. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 46, p. 199-205, 1999.

NIELSEN, E. M.; ENGBERG, J.; FUSSING, V.; PETERSEN, L.; BROGREN, C. H.; ON, S. L. Evaluation of phenotypic and genotypic methods for subtyping *Campylobacter jejuni* isolates from humans, poultry, and cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 10, p. 3800-3810, 2000.

NISHIMURA, M.; NUKINA, M.; YUAN, J. M.; SHEN, B. Q.; MA, J. J.; OHTA, M.; SAIDA, T.; UCHIYAMA, T. PCR-based RFLP analysis and serotyping of *Campylobacter jejuni* isolated from diarrheic patients in China and Japan. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 142, p. 133-138, 1996.

OBANA, M.; SAGARA, H.; AOKI, T.; KIM, R.; TAKIZAWA, Y.; TSUNODA, T.; IRIMAJIRI, S.; YAMASHITA, K. The current status of infectious enteritis in Japan: reports of the "Research

Group for Infectious Enteric Diseases, Japan" in the last 5 years (1996-2000). **Kansenshogaku Zasshi**, v. 76, n. 5, p. 355, 2002.

OOSTEROM, J. *Campylobacter jejuni* in foods of animal origin. In: \_\_\_\_\_. **Report on a WHO consultation on epidemiology and control of campylobacteriosis in animals and humans**. Bilthoven, 1994. p. 49-56.

OOSTEROM, J.; DE WILDE, G. J. A. Origin and prevalence *Campylobacter jejuni* in poultry processing. **International Journal of Food Protection**, Ames, v. 46, p. 339-344, 1983.

PEARSON, A. D. Continuous source outbreak of campylobacteriosis traced to chicken. **International Journal of Food Protection**, Ames, v. 63, p. 309-314, 2000.

SAS INSTITUTE. **User's guide**: version 6.12. 4. ed. Cary, 1998, v. 2.

SCARCELLI, E.; GENOVEZ, M. E.; CARDOSO, M. V.; SOUZA, M. C. A. M.; GRASSO, L. M. P. S.; SOUZA, C. A. I.; TORRES, A. P. Avaliação do potencial de disseminação de *Campylobacter* spp. por diferentes espécies animais. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 65, p. 55-61, 1998.

SCARCELLI, E.; MIYASHIRO, S.; PIATTI, R. M.; CAMPOS, F. R.; CASTRO, A. G. M.; CARDOSO, M. V.; FRANCISCO, W.; RICHTZENHAIN, L. J.; GENOVEZ, M. E. Emprego da técnica do Polimorfismo de Comprimentos dos Fragmentos de Restrição (RFLP) do produto obtido pela Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) do gene FLA A na subtipagem de amostras de *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* isoladas de frangos de corte e humanos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70, supl. 3, p. 1-5, 2003.

SILVA, J. A. **Microrganismos patogênicos em carne de frango**. 1998. Disponível em: <<http://www.bichoonline.com.br/artigos/ha0019.htm>>. Acesso em: 14 mar. 2006.

SKIRROW, M. B.; BLASER, M. J. *Campylobacter jejuni*. In: BLASER, M. J. et al. **Infections of the gastrointestinal tract**. New York: Raven Press, 1995. p.123-138.

SKIRROW, M. B. Epidemiology of *Campylobacter* enteritis. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 12, p. 9-16, 1991.

STEINHAUSEROVÁ, I.; CESCOVA, J.; NEBOLA, M. PCR/Restriction fragment length polymorphism (RFLP) typing of human and poultry *Campylobacter jejuni* strains. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 34, p. 354-358, 2002.

TOOD, E. C. D. Foodborne disease in Canada- a 10-years summary from 1975-1984. **International Journal of Food Protection**, Ames, v. 55, p. 123-132, 1992.

VARNAM, A. H.; EVANS M. G. **Foodborne pathogens**: an illustrated text. St. Louis: Moby-Year Book, 1991. p. 209-34.

VASHIN, I. T.; STOYANCHEV, T.T. Incidence and microbial diversity of *Campylobacter* spp. Isolates during the slaughterhouse processing of poultry and critical control points of the process. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, Bulgarian, v. 7, n. 3, p. 173-180, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. **Campylobacter**. 2000. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/en/print.html>>. Acesso em: 13 nov. 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. **Use of antimicrobials outside human medicine and resultant antimicrobial resistance in humans**. 2002. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs268/en/print.html>>. Acesso em: 13 nov. 2005.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. New Jersey: Prentice Hall, 1999. p. 663.

ZHAO, C.; GE, B.; VILLENA, J.; SUDLER, R.; YEH, E.; ZHAO, S.; WHITE, D. G.; WAGNER, D.; MENG, J. Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, and *Salmonella* serovars in retail chicken, turkey, pork, and beef from the greater Washington, D. C., area. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 67, n. 12, p. 5431-5436, 2001.

ZORMAN, T.; MOŽINA, S. S. Classic and molecular identification of thermotolerant campylobacters from poultry meat. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 40, n. 3, p. 177-184, 2002.

### Capítulo 3 - Identificação de *Salmonella* spp., *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium isoladas na linha de abate de aves utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR)-multiplex e avaliação de resistência antimicrobiana

**Resumo** - O presente trabalho teve como objetivo verificar a ocorrência de *Salmonella* spp., *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium em abatedouros de aves e avaliar a resistência das amostras isoladas frente a antimicrobianos de uso comum. Foram colhidas amostras de fezes; penas; água de escaldamento, evisceração e resfriamento; e amostras de carcaça não eviscerada, eviscerada e resfriada em seis abatedouros de aves. Inicialmente, foi realizado o isolamento microbiológico e o teste de sensibilidade a 12 agentes antimicrobianos; as amostras positivas para *Salmonella* spp. isoladas foram caracterizadas utilizando-se a PCR-Multiplex para identificação de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium. Os oligonucleotídeos iniciadores que tinham como alvo os genes *invA* (gene de invasão do gênero *Salmonella*, 521pb), *sefA* (antígeno de fímbria de *S. Enteritidis*, 497pb) e *pefA* (que codifica plasmídeo de fímbria de *S. Typhimurium*, 330pb). *Salmonella* spp. foi detectada em 18% (52/288) dos isolados, enquanto *S. Enteritidis* em 5,6% (16/288) e *S. Typhimurium* em 2,4% (7/288). Os testes de resistência aos antimicrobianos apontaram 25 amostras resistentes ao aztreonam e à ampicilina (86,2%), 21 à tetraciclina (72,4%) e 16 à amoxicilina/ácido clavulânico e sulfazotrim (55,2%). Os isolados apresentaram menor resistência à gentamicina, com uma amostra (3,45%). Nenhum dos isolados testados apresentou 100% de resistência ou sensibilidade aos antimicrobianos utilizados. Os resultados indicam que há uma necessidade de melhorar a qualidade higiênico-sanitária em linhas de abate de aves e o cuidado com o uso indiscriminado de antibióticos na avicultura.

Palavras-chave: abatedouro de aves, PCR-multiplex, *Salmonella* spp., *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium.

**Identification of *Salmonella* spp., *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium isolates from chicken abattoir lines by Polymerase Chain Reaction (PCR)-Multiplex technique and antibiotic resistance evaluation**

**Summary** - The present study was carried out to report the occurrence of *Salmonella* spp., *Salmonella* Enteritidis, and *Salmonella* Typhimurium in chicken abattoirs and the resistance of these isolated samples to antibiotics of common use. Samples of feces; feathers; scald, evisceration, and chiller water; and non-eviscerated, eviscerated, and chilled carcasses were collected from six chicken abattoirs. Firstly were accomplish a microbiological isolation, and were done a sensibility test to 12 antibiotics, and then the isolates were identified by a multiplex-PCR to investigate the occurrence of *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium. Were used three sets of primers targeting the *invA* (521 bp), *pefA* (330 bp), and *sefA* (497 bp) gene sequences for *Salmonella* spp., *S.* Typhimurium and *S.* Enteritidis, respectively. *Salmonella* spp. was detected in 18% (52/288) of the isolates, whereas serovars Enteritidis and Typhimurium were identified in 5.6% (16/288) and 2.4% (7/288), respectively. Antibiotic tests indicate 25 resistant samples to aztreonam and to ampicilin (86.2%), 21 to tetracycline (72.4%) and 16 to amoxicilin/clavulanic acid and to sulfazotrim (55.2%). The isolates showed lower resistance to gentamicin, with one resistant sample (3.45%); two samples were resistant to ampicacin (6.9%). None sample tested were 100% resistant or sensitive to all the antibiotics tested. The results exhibit the need to improve hygiene and sanitary standards in poultry slaughter lines, and care with the indiscriminate use of antibiotics in aviculture.

Keywords: chicken abattoir, Multiplex-PCR, *Salmonella* spp., *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium.

## 1 - Introdução

*Salmonella* spp. é um patógeno de importância na indústria de alimentos, pois é isolado e identificado com frequência como agente etiológico de surtos de doenças veiculadas por alimentos (SIQUEIRA et al., 2003). É um microrganismo isolado de carne de aves, e o consumo desta mal-cozida ou a contaminação de outros alimentos cozidos pela carne crua é a principal causa de infecções relacionadas a produtos de origem avícola (BOER & HAHNÉ, 1990; SOUMET et al., 1999).

Por ser *Salmonella* spp. um agente presente no trato gastrointestinal das aves domésticas, cuidados no abate devem ser tomados para que a carne não venha a se contaminar, principalmente no momento da evisceração, que é uma operação feita de maneira brusca e leva ao rompimento das vísceras, contaminando assim a carne e tornando possível a veiculação do agente aos seres humanos.

*Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium são os sorotipos de *Salmonella* spp. mais frequentes em nosso meio e causam enfermidade de distribuição mundial. A gastroenterite por *Salmonella* spp. é uma zoonose que se transmite pela ingestão de alimentos, água ou contato com fômite, contaminados por fezes de pessoa ou animal infectado (ACHA & SZYFRES, 1986; FURTADO et al., 1998; GIL-SETAS et al., 2002).

A incidência de salmonelose em seres humanos continua aumentando em várias partes do mundo, mesmo com todo o desenvolvimento tecnológico utilizado na produção de alimentos e a adoção de melhores medidas higiênico-sanitárias. A preocupação com a qualidade dos alimentos envolve não só os riscos de veiculação de enfermidades para o consumidor, mas também perdas econômicas devidas às alterações microbianas ocorridas no alimento.

Os surtos de salmonelose humana podem ter um custo bastante elevado, pois devem ser computados os custos médicos e as perdas de produtividade, de modo que a legislação proíbe a existência deste microrganismo em 25 g ou mL de alimento (BRASIL, 1993). Nos países em desenvolvimento, as diarreias agudas causadas por água ou alimentos contaminados constituem a principal síndrome das febres tifóide, paratifóide e das

salmoneloses, que têm sido responsáveis por elevada taxa de mortalidade e morbidade infantil.

Levantamentos epidemiológicos realizados em vários países situam as salmonelas entre os agentes patogênicos mais freqüentemente encontrados em surtos de toxinfecção de origem alimentar, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento, sendo os produtos avícolas um dos mais relevantes veículos de transmissão de *Salmonella* spp. A presença de *Salmonella* spp. em aves e sua transmissão a seres humanos representam um sério problema sanitário para a avicultura e a saúde pública (ACHA & SZYFRES, 1986).

Em trabalho conduzido no Rio Grande do Sul, foi verificada a ocorrência de surtos de salmonelose em 99 relatórios de investigação destes; a salmonelose correspondeu a 74,7%, sendo 11,4% associados ao consumo de carne de aves (NADVORNY et al., 2004). No Estado do Rio de Janeiro, em estudo de 53 surtos que acometeram 461 pessoas, a *Salmonella* spp. foi responsável por 7% e atingiu maior número de indivíduos (15,8%), inclusive com um óbito (FERNANDEZ et al., 2001). ZHAO et al. (2001) relatam a ocorrência de 1,4 milhões de casos de salmonelose em seres humanos nos Estados Unidos.

Tanto a presença quanto a disseminação de *Salmonella* spp. nos alimentos representam uma importante preocupação na indústria avícola, já que podem determinar um decréscimo no consumo de carne de aves representando uma ameaça ao comércio avícola nacional e internacional (IKUNO et al., 2004). *Salmonella* spp. é rotineiramente detectada em amostras clínicas, de alimentos e de meio ambiente, utilizando cultivo microbiológico, depois de ser realizado um enriquecimento seletivo e poderem ser sorotipadas. Embora esse microrganismo tenha uma multiplicação rápida, mais de 72 horas são necessárias para sua cultura e sorotipagem (WOODWARD & KIRWAN, 1996). Dado que a técnica PCR e outras técnicas moleculares propiciam um resultado rápido e com alto grau de especificidade, constituem uma ferramenta de grande utilidade no diagnóstico microbiológico (WOODWARD & KIRWAN, 1996). STONE et al. (1994), além dos fatores supracitados, comentam ainda o fato do uso das várias técnicas de PCR propiciarem um aumento do número de amostras positivas e, ao mesmo tempo, reduzido número de falsos negativos, podendo as amostras serem processadas em grande número e em um curto período de tempo.



Em pesquisa com diversos alimentos enviados para um laboratório na cidade de São Paulo, SP, nas 140 amostras isoladas de *Samonella* spp. havia 17 sorotipos, e *S. Enteritidis* esteve presente em dez dos 12 tipos de alimentos pesquisados, sendo o frango “in natura” o alimento em que mais se obteve isolados, 77,1% (LÍRIO et al., 1997). Em trabalho com cortes de frango (coxa e peito) verificaram-se, de um total de 15 amostras, quatro positivas para *Salmonella* spp. (26,7%) (GONÇALVES et al., 1998). Trabalho com carcaças de frango determinou uma freqüência de *Salmonella* spp. de 94% (CASON et al., 1997). SANTOS et al. (2000), avaliando 150 carcaças de frango congeladas, identificaram 32% das amostras positivas para *Salmonella* spp..

Estudo reunindo casos em 15 países da Europa (Áustria, Bélgica, Dinamarca, Inglaterra e País de Gales, França, Alemanha, Irlanda, Itália, Holanda, Portugal, Escócia, Espanha, Suécia e Suíça) notificou 59.965 isolados de *Salmonella* spp., em 1993, e 55.911, em 1995 (ROWE & BARTLETT, 1997). Os autores ainda ressaltam que a infecção por *S. Typhimurium* é um problema emergente. A maior parte das *S. Typhimurium* isoladas na Inglaterra e no País de Gales são estirpes multirresistentes aos medicamentos, o que reduz as opções terapêuticas nos casos de infecção invasiva (ROWE & BARTLETT, 1997).

O uso de antibióticos como promotores de crescimento é um assunto que tem gerado muita polêmica, tanto com relação a preocupações com a saúde animal, pela perda da eficiência ao longo do tempo, quanto com a saúde humana, pelo desenvolvimento de cepas resistentes.

O surgimento de cepas resistentes de *Salmonella* spp. é comum, e esse fato é agravado com o uso indiscriminado de antibiótico em rações animais, principalmente os promotores de crescimento. Portanto, rações avícolas têm sido relatadas como um elo de grande importância no ciclo epidemiológico da salmonelose aviária. REIS et al. (1995) relatam ainda que o emprego de antibióticos em rações, para promover o crescimento, tem contribuído para potencializar a distribuição de salmonelas resistentes presentes nas aves, agravando assim as infecções alimentares causadas por estas bactérias.

Analisando 200 amostras de ração avícola, BERCHIERI JR. et al. (1993) verificaram que 20 (10%) estavam contaminadas com mais de um sorotipo de *Salmonella* spp.; ao testarem as cepas isoladas frente à ação de antimicrobianos, detectaram 92,86% resistentes

à tetraciclina, 75% à cefalotina, 46,5% à ampicilina, 21,4% à amicacina e sulfazotrim, 17,9% ao cloranfenicol e 6,3% à cefoxitina. BERCHIERI JR. & PAULILO (1985) testaram a sensibilidade de 139 cepas de *Salmonella* spp. isoladas de amostras de farinha de origem animal pertencentes a 32 sorotipos e verificaram que todas as cepas foram sensíveis ao cloranfenicol e sulfato de colistina e resistentes a sulfazotrim, bacitracina e penicilina. Verificou-se também resistência parcial a tetraciclina (77,1%), ácido nalidíxico (18%), nitrofurantoína (2,16%), amicacina (1,44%) e cefoxitina (0,7%).

Em estudo com 60 amostras de farinha de carne e osso e 60 de farinha de sangue, constituintes de ração para animais, identificaram-se 25 amostras positivas para *Salmonella* spp. e oito sorotipos; o maior índice de resistência a antimicrobianos foi em relação ao ácido nalidíxico (43,1%), seguido por estreptomicina (3,4%) e ampicilina (1,7%) (CALIXTO et al., 2002). Os autores ainda ressaltam que a utilização de farinhas de origem animal como fonte de proteína na ração de frangos é ponto importante e deve ser monitorada, pela potencialidade da contaminação por *Salmonella* spp., que pode chegar à carne e aos ovos.

Em outra pesquisa, BERCHIERI JR. et al. (1987), testando 18 amostras de *Salmonella* spp. isoladas de abatedouros, verificaram que todas foram sensíveis à colistina e ao ácido nalidíxico e resistentes à tetraciclina. Foi verificada resistência parcial aos seguintes antimicrobianos: amicacina, ampicilina, cefalotina, cloranfenicol, lincospectin, neomicina, tobramicina e nitrofurantoína. MARTINS et al. (2000) analisaram 26 amostras de miúdos de aves e isolaram 11 amostras de *Salmonella* spp., observando que 54,5% das amostras foram resistentes ao cloranfenicol e 45% à ampicilina.

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de estudar a ocorrência de *Salmonella* spp., *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium em abatedouros de aves no Estado São Paulo e avaliar a ocorrência destes patógenos intestinais na água na linha de abate. Além disso, as amostras de *Salmonella* spp. isoladas foram caracterizadas utilizando a técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) do tipo multiplex utilizando oligonucleotídeos iniciadores que tinham como alvo os genes *invA* (gene de invasão do gênero *Salmonella*), *sefA* (antígeno de fimbria de *S. Enteritidis*) e *pefA* (que codifica plasmídeo de fimbria de *S. Typhimurium*). Objetivou-se também avaliar o comportamento

das amostras de *Salmonella* spp. frente à ação de antimicrobianos de uso comum em avicultura.

## 2 - Material e Métodos

### 2.1 - Amostragem

Em um total de 12 visitas, 288 amostras foram colhidas, incluindo: fezes; penas; água de escaldamento, de evisceração e de resfriamento; e amostras de carcaça não eviscerada, eviscerada e resfriada obtidas por enxaguadura. As colheitas ocorreram no início, meio e final da jornada de trabalho, em três abatedores de aves com Serviço de Inspeção Federal (SIF) (B, C e F) e em três abatedores com Serviço de Inspeção Estadual (SISP) (A, D e E), todos localizados no Estado de São Paulo.

As amostras de fezes foram colhidas na plataforma de recebimento das aves, em sacos de polietileno esterilizados. As penas foram colhidas em áreas adjacentes à depenadeira e, da mesma forma, colocadas em sacos de polietileno esterilizados. Volumes de 400mL das amostras de águas de escaldamento, evisceração e resfriamento foram colocados em frascos esterilizados (500mL). As amostras de carcaça não eviscerada, eviscerada e resfriada foram colhidas na linha de abate pelo método de enxaguadura, que consistiu em colocar a carcaça em sacos esterilizados de polietileno com 300mL de água peptonada 1%. A solução resultante era colocada em frascos esterilizados (500mL).

As amostras foram transportadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável até o Laboratório de Análises de Alimentos do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, *Campus Jaboticabal* – Unesp.

### 2.2 - Preparo das amostras para análise:

**Amostras de fezes:** das amostras de fezes foi pesado 1g e diluído em 10mL de solução salina 0,9%, misturou-se e deixou-se decantar por 5 minutos.

**Amostras de penas:** 25g de penas foram adicionados em 45mL de caldo tioglicolato e agitados vigorosamente (BERCHIERI JR. et al., 1987).

**Amostras das águas:** 100mL das amostras de água dos tanques de depenação, evisceração e refrigeração foram transferidos para frascos esterilizados contendo 100mL de água peptonada a 2%, incubados por 24 horas a 43°C (BERCHIERI JR. et al., 1987).

**Amostras de carcaças:** As amostras de carcaça não eviscerada, eviscerada e resfriada obtidas por enxaguadura foram primeiramente incubadas por 18 a 24 horas a 43°C (BERCHIERI JR. et al., 1987).

### 2.3 - Isolamento de *Salmonella* spp. e extração do DNA

Todas as amostras isoladas foram processadas de acordo com as normas brasileiras (BRASIL, 1993). Os procedimentos a seguir foram os mesmos para todas as amostras isoladas: 1mL foi transferido para tubo contendo 10mL de caldo selenito-cistina e para tubo com 10mL de caldo Rappaport-Vassiliadis, ambos os meios adicionados de 0,1mL de novobiocina 4%; incubava-se por 24 horas a 43°C. Uma alçada foi semeada em placa contendo ágar verde-brilhante vermelho de fenol-lactose-sacarose (BPLS) e em placas contendo ágar Mac Conkey, incubados por 24 horas a 37°C. A partir do ágar BPLS foram selecionadas colônias características de *Salmonella* spp., as quais são incolores ou rosadas, entre translúcidas e ligeiramente opacas, cujo meio básico apresentava tom maravilha; do ágar Mac Conkey foram selecionadas as colônias incolores com meio básico de cor palha. As colônias sugestivas foram semeadas em ágar tríplice açúcar ferro (TSI) inclinado e ágar lisina ferro (LIA) inclinado; após incubação por 24 horas a 37°C, procurou-se observar na leitura a base ácida com gás e bisel alcalino com produção de H<sub>2</sub>S, para o meio TSI; para o meio LIA cor inalterada, permanecendo púrpura, com ou sem produção de H<sub>2</sub>S.

Foi realizada confirmação com teste sorológico de aglutinação rápida. Este consistiu em adicionar 2mL de solução salina a 0,85% ao cultivo do ágar TSI. Após homogeneização, foram depositadas duas gotas da suspensão em lâmina de vidro, acrescentando uma gota do soro Salmonela polivalente somático sobre uma das gotas da suspensão, misturando-as, e sobre a outra, uma gota do soro Salmonella flagelar; após 1 a 2 minutos verificou-se se ocorreu aglutinação (BRASIL, 1993). As amostras positivas apresentaram aglutinação para os dois tipos de soro e foram semeadas em meio ágar nutriente, incubadas por 24 horas a

37°C e devidamente refrigeradas, para posterior análise de PCR-multiplex.

Colônias de dois a três dias de cultivo em meio ágar nutriente foram submetidas à extração do DNA empregando um kit comercial (Wizard<sup>®</sup> Sv Genomic DNA Purification System, Promega). Inicialmente, foram homogeneizadas com 200µL de tampão de digestão, 50µL de EDTA (pH 8,0), 20µL de proteinase K (20mg/mL) e 5µL de solução RNase A (4mg/mL) (fornecidos no kit) e incubadas em banho-seco (Thermomixer 5436, Eppendorf) a 65°C por duas horas. A seguir, a preparação foi aplicada na coluna (Wizard<sup>®</sup> SV Minicolumn Assembly) e centrifugada a 12.000 rpm por três minutos. O filtrado foi descartado e a coluna foi lavada por quatro vezes com 650µL de solução de lavagem com centrifugação a 12.000 rpm por dois minutos. Após a última lavagem, o DNA foi eluído com 200µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, EDTA 1 mM) e armazenado a -20 °C.

#### 2.4 - Oligonucleotídeos iniciadores

As seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores usados na técnica de PCR-multiplex foram selecionadas baseadas em regiões conservadas 5'-3' do gene de invasão (*invA*) de *Salmonella* spp. (número de acesso no GenBank: M90846), do gene de fímbria (*sefA*) de *Salmonella* Enteritidis (número de acesso no GenBank: L03833) e do plasmídeo de virulência de fímbria (*pefA*) de *Salmonella* Typhimurium (número de acesso no GenBank: AB041905). Esta última seqüência gênica amplifica tanto para *S. Enteritidis* quanto para *S. Typhimurium*, contudo a diferenciação é feita pela presença de um sítio de restrição para a enzima *Kpn* I, o qual não existe em *S. Enteritidis*. As seqüências de iniciadores utilizada no estudo estão demonstradas na Tabela 1.

Tabela 1 - Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR-multiplex.

Gene alvo	Sequência de nucleotídeos (5'-3')	Posição e orientação na seqüência-alvo*	Fragmento amplificado (pb)	Número de acesso
<i>invA-1</i>	TTG TTA CGG CTA TTT TGA CCA	929 → 949	521	M90846
<i>invA-2</i>	CTG ACT GCT ACC TTG CTG ATG	1429 ← 1449		
<i>sefA-1</i>	GCA GCG GTT ACT ATT GCA GC	175 → 194	330	L03833
<i>sefA-2</i>	TGT GAC AGG GAC ATT TAG CG	485 ← 504		
<i>pefA-1</i>	TTC CAT TAT TGC ACT GGG TG	2891 → 2910	497	AB041905
<i>pefA-2</i>	GGC ATC TTT CGC TGT GGC TT	3368 ← 3387		

\* a seta indica a orientação dos oligonucleotídeos.

## 2.5 - PCR-multiplex

A amplificação foi realizada em volume de 25µL, contendo 2,5µL de tampão de reação (50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl, pH 8,3), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM da mistura de dNTPs, 0,2 µM de cada primer *invA* (STONE et al., 1994), 0,5 µM de cada primer *sefA* (WOODWARD & KIRWAN, 1996) e 0,1µM de cada primer *pefA* (HANEDA et al., 2001), 2,5U de *Taq* DNA polimerase (MBI Fermentas) e 2µL de amostras de DNA. A amplificação foi realizada em termociclador automático (PTC-100, MJ Research) por 35 ciclos repetidos de desnaturação (94°C, por 30segundos), hibridização (55°C, por 1 min) e extensão (72°C, por 1 min), com uma extensão final a 72°C por 7 minutos. A análise do produto amplificado foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE (40 mM de Tris-acetato, 1 mM de EDTA, pH 7,5) e o produto foi evidenciado com brometo de etídeo (0,5µg/mL). A imagem no gel, sob luz UV, foi registrada em fotodocumentador acoplado a um computador (Alphamager™ 1220, Alpha Innotech Corporation). O padrão de peso molecular empregado foi o de 100 pb (MBI Fermentas). Amostras de referência, usadas como controle positivo foram *Salmonella cholerasuis* subsp. cholerasuis serotype Enteritidis - ATCC 13076 e *Salmonella cholerasuis* subsp. cholerasuis serotype Typhimurium - ATCC 19585.

## 2.6 - Análise de enzima de restrição

Para identificação do produto final amplificado para o gene *pefA*, 10µL do produto foi digerido com 2U da enzima de restrição *Kpn* I (GibcoBRL<sup>®</sup>) a 37°C por três horas. Os produtos da digestão foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídeo.

## 2.7 - Teste de sensibilidade a agentes antimicrobianos

O teste de sensibilidade a agentes antimicrobianos realizado com 29 amostras de *Salmonella* spp. (16 amostras de *Salmonella* spp., nove amostras de *S. Enteritidis* e quatro amostras de *S. Typhimurium*) seguiu a metodologia de Kirby-Bauer (BAUER et al., 1966). Utilizaram-se doze antimicrobianos, sendo: amoxicilina mais ácido clavulânico (20 e 10µg), aztreonam (30µg), amicacina (30µg), ampicilina (10µg), cefalotina (30µg), cefoxitina (30µg), cefotaxima (30µg), cloranfenicol (30µg), gentamicina (10µg), sulfazotrim (25µg), tetraciclina (30µg) e tobramicina (10µg) (Multidiscos – Laborclin).

Para a realização desta prova, as amostras de *Salmonella* spp. foram inoculadas em caldo tripticase soja e incubadas à temperatura de 37°C, por 20 horas. Após este período, realizou-se a centrifugação das amostras a 4°C, 8.000 rpm, por 10 minutos, retirou-se o sobrenadante e completou-se com solução salina a 0,9% até obtenção de uma turvação semelhante ao padrão cinco da solução de cloreto de bário. Essa solução foi obtida pela adição de 0,5mL de uma solução de cloreto de bário 1%, completando o volume para 10mL mediante a junção de um soluto de ácido sulfúrico a 1% (BIER, 1990). A partir de cada uma das amostras foi feita a semeadura em ágar Müller-Hinton/sangue, utilizando-se um suabe de algodão estéril. Retirava-se o excesso do caldo pressionando-se o algodão nas paredes do tubo para depois semear nas placas de forma uniforme. Após cinco minutos, usando uma pinça flambada, colocaram-se os polidiscos de antibiótico, incubou-se por 18 horas à temperatura de 37°C; decorrido este tempo, procedeu-se à medição dos halos de inibição formados em torno dos respectivos princípios ativos (BAUER, et al. 1966), cujos resultados



foram comparados com os da tabela fornecida pelo laboratório fabricante dos referidos discos.

## 2.8 - Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa SAS, versão 6.12 (SAS, 1998). Os testes verificaram a independência das tabelas de contingência, utilizando o método de Fisher, e foi testada a significância estatística da ocorrência de *Salmonella* spp. entre os seis abatedouros e entre o isolamento de *Salmonella* spp. observado nos oito pontos de colheita de amostras.

### 3 - Resultados e Discussão

Das 288 amostras submetidas ao isolamento microbiológico para *Salmonella* spp., 52 foram positivas; os resultados da PCR-multiplex, que identificaram os sorotipos *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, estão demonstrados na Tabela 2. A freqüência de isolados de *Salmonella* spp. variou de 5,6 a 25%, enquanto para *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* as freqüências variaram de zero a 11,1% e de zero a 8,3%, respectivamente.

As amostras mais contaminadas por *Salmonella* spp. foram as de carcaça não eviscerada, que somaram nove amostras (25%), e as de águas do tanque de resfriamento, também nove amostras (25%). As amostras de fezes e de carcaça resfriada mostraram níveis de contaminação por *Salmonella* spp. de 22,2%. Em relação ao número de amostras positivas em cada um dos oito pontos de amostragem, pode-se observar que havia pelo menos duas amostras positivas para *Salmonella* spp., *Salmonella* Enteritidis ou *Salmonella* Typhimurium em cada ponto pesquisado.

Tabela 2 - Número de amostras positivas para *Salmonella* spp., *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, do total de amostras colhidas em seis abatedouros, de março de 2003 a agosto de 2004, no Estado de São Paulo.

Amostras	Número	<i>Salmonella</i> spp.		<i>S. Enteritidis</i>		<i>S. Typhimurium</i>	
		n	%	n	%	n	%
Fezes	36	8	22,2	2	5,6	0	0
Penas	36	3	8,3	1	2,8	0	0
Água de escaldamento	36	2	5,6	1	2,8	0	0
Água de evisceração	36	7	19,4	1	2,8	1	2,8
Água de resfriamento	36	9	25,0	4	11,1	2	5,6
Carcaça não eviscerada	36	9	25,0	0	0	3	8,3
Carcaça eviscerada	36	6	16,7	3	8,3	1	2,8
Carcaça resfriada	36	8	22,2	4	11,1	0	0
Total	288	52	18,0	16	5,6	7	2,4

A Figura 1 mostra foto de gel de agarose com a reação de restrição, digeridas pela enzima *KpnI*, realizada nas amostras de *Salmonella* spp., para detecção de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium.

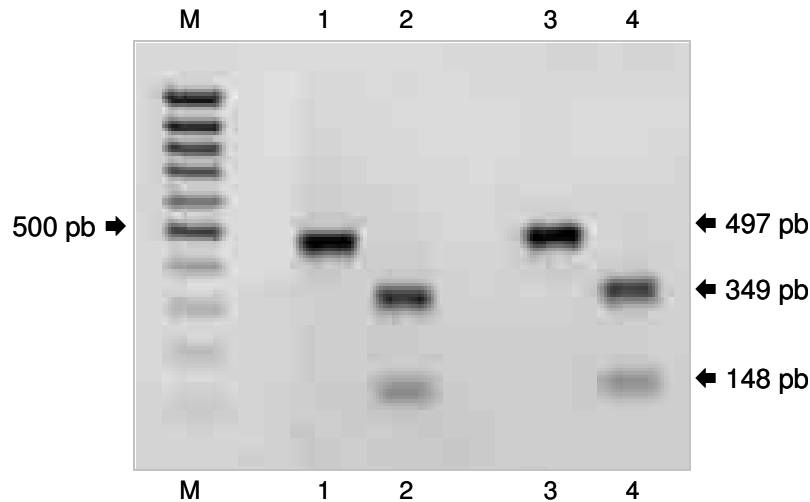


Figura 1 - Análise com enzima de Restrição. Fragmentos de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, gene plasmidial que codifica virulência de fimbria (*pefA*) amplificado pela PCR das amostras positivas de *Salmonella* spp. e digeridas com *KpnI*. Linhas: M- padrão 100pb; 1, 3- *S. Enteritidis*; 2, 4- *S. Typhimurium*. Condições de Eletroforese: 10 µL do produto da PCR, gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo, 80V/1h.

Ao se analisarem sob a técnica de PCR-Multiplex as amostras isoladas microbiologicamente, 52 foram positivas para *Salmonella* spp. (18%), 16 para *Salmonella* Enteritidis (5,6%) e sete para *Salmonella* Typhimurium (2,4%). Em estudo microbiológico realizado com cortes de aves, 15 amostras de coxa e peito, no Estado do Rio de Janeiro a frequência de *Salmonella* spp. foi de 26,7% (GONÇALVES et al., 1998). Nos Estados Unidos, CASON et al. (1997) observaram 20% de ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de aves. Estudos realizados no Reino Unido apresentaram prevalências deste enteropatógeno de 25% (HARRISON et al., 2001) a 29% em aves de corte (JORGENSEN et al., 2002). São resultados acima dos valores observados na presente pesquisa que verificou 18% para ocorrência de *Salmonella* spp.. LILLARD (1990) observou que a contaminação cruzada por *Salmonella* spp. ocorre durante o abate das aves; contudo, em seis pontos de colheita avaliados por aquele autor, a incidência de *Salmonella* spp. aumentou apenas na carcaça após o resfriamento, o que difere do resultado do presente estudo que verificou este patógeno em todos os tipos de amostras colhidas ao longo de toda a linha da abate.

Nos Estados Unidos 25 amostras positivas de *Salmonella* spp. (3%) foram detectadas em 184 amostras de carnes de aves (ZHAO et al., 2001), cujo resultado é menor do que o observado na presente pesquisa, que apresentou ocorrência maior de amostras positivas de *Salmonella* spp. (18%). SANTOS et al. (2000), no Estado de São Paulo, observaram 32% (48/150) de positividade para *Salmonella* spp. em amostras congeladas de aves, utilizando métodos bacteriológicos. Essa ocorrência é superior à descrita neste estudo. Assim sendo, a avaliação de dados já publicados envolvendo ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças e cortes de aves e amostras de abatedouro varia consideravelmente.

Em estudo realizado no Reino Unido com 241 amostras de carcaças de aves cruas, *Salmonella* spp. foi identificada em 25% das amostras, e o sorotipo *S. Enteritidis* foi um dos mais isolados (JORGENSEN et al., 2002). Esses achados estão acima dos valores verificados neste estudo para *S. Enteritidis* (5,6%). NIEROP et al. (2005) relataram 19 amostras positivas entre as 99 amostras de carcaças de frango frescas e congeladas colhidas em açougues na África do Sul e submetidas à PCR utilizando o gene *invA*.

Outros autores reportaram, em pesquisa com 140 diferentes amostras de alimentos na cidade de São Paulo, 17 sorotipos do gênero *Salmonella*; dessas amostras, *S. Enteritidis* foi recuperada de dez dos 12 tipos de alimentos avaliados, e a porcentagem mais alta de isolados foi observada nas carcaças de aves frescas (77,1%) (LÍRIO et al., 1997).

*Salmonella* spp. foi observada em 16 amostras de cortes de aves (35%) em um estudo realizado no Estado de São Paulo com o uso de técnicas microbiológicas, *S. Enteritidis* foi recuperada de três amostras de coxas de aves e de nove amostras de asas, resultados que estão em acordo com os encontrados nesta pesquisa (COSTA, 1996). Por outro lado, BERCHIERI JR. et al. (1987), utilizando técnicas microbiológicas, não detectaram nem *S. Enteritidis* nem *S. Typhimurium* em aves de abatedouros, mas reportaram 21 amostras positivas e 11 sorotipos de *Salmonella* spp.. SANTOS et al. (2000), analisando 150 carcaças congeladas, detectaram 48 amostras positivas, sendo identificados 11 sorotipos, dos quais 60,4% (29/48) eram *S. Enteritidis*.

SCUDERI et al. (1996) resumem resultados de aproximadamente 1.699 surtos, ocorridos entre os anos de 1991 a 1994, envolvendo alimentos na Itália, e reportaram que 81% dos surtos eram causados por *Salmonella* spp., a maioria destes, 50 surtos, tinha como

agente *S. Enteritidis*, e um número menor, três surtos, *S. Typhimurium*. Esses achados suportam os resultados observados no presente trabalho no qual a ocorrência de *S. Typhimurium* foi menor que a ocorrência de *S. Enteritidis*. Porém ambos os enteropatógenos *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, identificados nas amostras, são possíveis agentes de toxinfecção alimentar para o homem, em conformidade com os relatos de SCUDERI et al. (1996) e WARD & THRELFALL (1997).

Testes rápidos para *Salmonella* spp. podem contribuir na identificação, porém não substituem as técnicas de cultivo microbiológico, pois o isolamento dos organismos ainda é necessário para a sorotipagem e a determinação de perfis de resistência para estudos epidemiológicos. Contudo, na rotina, para diagnósticos de base, as técnicas moleculares devem ser consideradas, pois permitem a análise de um grande número de amostras em um período de tempo relativamente curto.

A comparação dos resultados obtidos neste estudo com os reportados em outras pesquisas deve levar em consideração vários fatores, como as diferenças na origem das amostras, os métodos de detecção, os procedimentos de amostragem, a sanitização dos abatedouros, os níveis de processamento e a contaminação cruzada dos produtos (BRYAN & DOYLE, 1995), mormente as contaminações dos próprios lotes, que podem ter grandes variações.

As 52 amostras contaminadas com *Salmonella* spp., *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, analisadas juntamente com os abatedouros onde foram colhidas, estão apresentadas na Tabela 3. Pode-se constatar que o abatedouro que teve maior número de amostras positivas foi o F 34,6% (18/52), seguido pelo B e C, com 17,3% (9/52); nos seis abatedouros foi identificado pelo menos um dos dois sorotipos estudados, o que demonstra que a disseminação do agente nas amostras foi bastante ampla.

Tabela 3 - Amostras isoladas de *Salmonella* spp., *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* de diferentes pontos na linha de abate de aves e seus respectivos abatedouros, de março de 2003 a agosto de 2004, no Estado de São Paulo.

Abatedouro	Tipo de Inspeção	<i>Salmonella</i> spp.	<i>S. Enteritidis</i>	<i>S. Typhimurium</i>
A	SISP	5	2	0
B	SIF	9	4	4
C	SIF	9	7	2
D	SISP	7	2	0
E	SISP	4	1	0
F	SIF	18	0	1

CARDOSO et al. (2000), realizando pesquisa com *Salmonella* spp. em 120 amostras de dois abatedouros da mesma região do abatedouro B, encontraram valores discordantes dos da presente pesquisa, pois não verificaram nenhuma amostra contaminada por bactérias do gênero *Salmonella*.

Com relação aos testes de resistência aos antibióticos, os valores dos halos de resistência, em milímetros, das 29 amostras de *Salmonella* spp., *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* estão dispostos na Tabela 4. No presente trabalho foram utilizados princípios ativos que são adotados com certa frequência na terapêutica humana, pela preocupação com a saúde pública; esta escolha deve-se ao fato da preocupação em se ter números suficientes de opções para o tratamento da salmonelose em seres humanos.

Tabela 4 - Valores dos halos de resistência aos antimicrobianos testados das 29 amostras isoladas de *Salmonella* spp., *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* nos diferentes pontos na linha de abate de aves, colhidas de março de 2003 a agosto de 2004, no Estado de São Paulo.

Amostra	Tamanho dos halos (mm)											
	AMC	ATM	AMI	AMP	CFL	CFO	CTX	CLO	GEN	SUT	TET	TOB
1 – S	15	0	27	13	0	20	0	25	17	0	0	19
2 – SE	14	0	18	13	17	27	14	26	18	16	26	17
3 – SE	0	0	17	0	10	14	0	23	15	0	21	0
4 – S	21	24	18	19	20	22	23	24	17	21	0	12
5 – SE	14	13	19	0	0	11	19	0	12	19	21	18
6 – ST	12	0	0	0	0	12	12	0	17	16	15	9
7 – SE	20	28	20	14	28	24	26	24	15	25	23	12
8 – ST	13	0	23	13	17	23	16	25	20	12	0	15
9 – SE	18	0	20	8	18	19	11	28	23	18	21	17
10 – SE	10	0	20	0	0	13	0	0	18	0	0	0
11 – ST	13	14	19	0	0	10	16	0	17	29	0	17
12 – SE	11	0	19	0	14	20	14	16	16	0	0	15
13 – SE	13	0	19	15	0	0	0	15	18	11	0	12
14 – SE	12	0	17	0	12	19	14	28	17	0	0	15
15 – S	13	0	21	0	0	0	0	20	19	0	0	15
16 – S	15	0	22	0	12	13	0	20	19	0	0	18
17 – S	13	0	25	11	13	0	11	24	23	0	0	20
18 – S	13	0	19	0	0	0	13	13	17	0	0	18
19 – S	12	0	13	0	14	20	15	14	15	15	0	19
20 – S	14	0	18	12	11	0	14	15	18	0	21	12
21 – S	0	0	21	0	0	13	11	0	18	0	0	19
22 – S	14	0	17	11	16	20	14	21	19	0	0	18
23 – ST	0	0	21	0	0	0	0	0	15	0	0	23
24 – S	25	0	23	17	14	17	12	18	18	17	0	17
25 – S	14	18	20	13	16	18	23	16	17	17	20	15
26 – S	0	18	20	0	0	0	13	0	15	0	0	19
27 – S	13	13	22	8	14	18	14	25	19	0	0	12
28 – S	15	15	20	11	0	11	18	0	18	19	0	16
29 – S	17	0	21	0	0	20	0	16	18	0	0	0

S= *Salmonella* spp., SE= *Salmonella* Enteritidis ou ST= *Salmonella* Typhimurium. Números em vermelho indicam resistência. AMC = amoxicilina e ácido clavulânico, ATM = aztreonam, AMI = amicacina, AMP = ampicilina, CFL = cefalotina, CFO = ceftoxitina, CTX = cefotaxima, CLO = cloranfenicol, GEN = gentamicina, SUT = sulfazotrim, TET = tetraciclina e TOB = tobramicina.

Verifica-se que os resultados das amostras de *Salmonella* spp. isoladas frente aos antibióticos foram os seguintes, quanto à sensibilidade: 96,5% foram sensíveis à gentamicina (28/29), 69,0% à tobramicina (20/29) e 48,3% ao cloranfenicol (14/29). Nenhuma das

amostras testadas apresentou 100% de resistência ou de sensibilidade aos princípios antimicrobianos utilizados. Foram observados resultados intermediários, os quais devem ser considerados resistentes, pois o uso dessas drogas antimicrobianas como sensíveis somente faria seleção de cepas resistentes; nove amostras (31,03%) apresentaram comportamento intermediário à amoxicilina/ ácido clavulânico, sete (24,14%) ao cloranfenicol e cinco (17,24%) à cefotaxima (Tabela 6).

Na tabela 5 observa-se que, das 29 amostras analisadas, 25 eram resistentes ao aztreonam e à ampicilina (86,2%), 21 à tetraciclina (72,4%) e 16 à amoxicilina/ácido clavulânico e sulfazotrim (55,2%). As amostras testadas apresentaram menor resistência à gentamicina, com uma (3,45%) amostra resistente. Duas (6,9%) amostras foram resistentes à amicacina.

Tabela 5 - Comportamento de resistência frente aos 12 princípios antimicrobianos testados nas 29 amostras isoladas de *Salmonella* spp., colhidas de março de 2003 a agosto de 2004, no Estado de São Paulo.

Antimicrobiano	Número de amostras (Porcentagem)			Total
	Resistente	Sensível	Intermediário	
Amoxicilina / Ác. clavulânico	16 (55,17)	4 (13,79)	9 (31,03)	29
Amicacina	27 (93,10)	2 (6,9)	-	29
Ampicilina	25 (86,21)	2 (6,9)	2 (6,9)	29
Aztreonam	25 (86,21)	2 (6,9)	2 (6,9)	29
Cefalotina	22 (75,86)	3 (10,34)	4 (13,79)	29
Cefoxitina	15 (51,72)	13 (44,82)	1 (3,45)	29
Cefotaxima	21 (72,43)	3 (10,34)	5 (17,24)	29
Cloranfenicol	8 (27,60)	14 (48,28)	7 (24,14)	29
Gentamicina	1 (3,45)	28 (96,55)	-	29
Sulfazotrim	16 (51,17)	10 (34,48)	3 (10,34)	29
Tetraciclina	21 (72,43)	7 (24,14)	1 (3,45)	29
Tobramicina	9 (31,03)	20 (68,97)	-	29
<b>Total</b>	206	108	34	348

SANTOS et al. (2000) pesquisaram 150 amostras de carcaças de frango congeladas e encontraram 48 amostras positivas; nas análises de resistência aos antimicrobianos,



verificaram baixas resistências ao aztreonam e amicacina 2,1% (1/48) e à tetraciclina 6,2% (3/48), resultados inferiores aos do presente trabalho, que apresentou 86,21%, 93,1%, 72,43%, ao aztreonam, amicacina e tetraciclina, respectivamente. Os resultados foram semelhantes apenas em relação à gentamicina, para a qual o autor obteve 4,2% (2/48) das amostras resistentes, e o presente trabalho, 3,45% (1/29).

Em estudo da presença de *Salmonella* spp. em 200 amostras de ração para aves, BERCHIERI JR. et al. (1993) encontraram, em 10% das amostras positivas para este microrganismo, os seguintes percentuais de resistência aos antimicrobianos testados: 75% cefalotina, 46,5% ampicilina, 21,4% amicacina e sulfazotrim, 17,9% cloranfenicol e gentamicina, 6,3% cefoxitina. Esses resultados assemelham-se aos dados da presente pesquisa em relação à cefalotina, cujas amostras apresentaram resistência de 75%, porém foram inferiores para ampicilina (86%), amicacina (93%), sulfazotrim (51%), cloranfenicol (27%) e cefoxitina (52%) e superiores para gentamicina (3,45%) neste estudo.

Os resultados referentes à resistência antimicrobiana servem de alerta, pois o uso indiscriminado de antibióticos no tratamento de infecções e a adição em rações animais como promotores de crescimento têm contribuído para a emergência de resistência entre cepas de *Salmonella* spp. e outras bactérias (BERCHIERI JR. & BARROW, 1998). Apenas a gentamicina e a amicacina poderiam ser empregadas em terapêutica veterinária, pois as cepas testadas foram sensíveis a esses antimicrobianos.

A Figura 2 demonstra o número de amostras isoladas resistentes em relação ao número de princípios antimicrobianos testados. Observa-se o número elevado de amostras que apresentaram multirresistência antimicrobiana, sete e seis amostras apresentaram resistência a 8 e 9 princípios antimicrobianos testados, respectivamente. Destaca-se a importância em saúde pública destas amostras que apresentaram multirresistência, pelo risco de infecção a seres humanos.

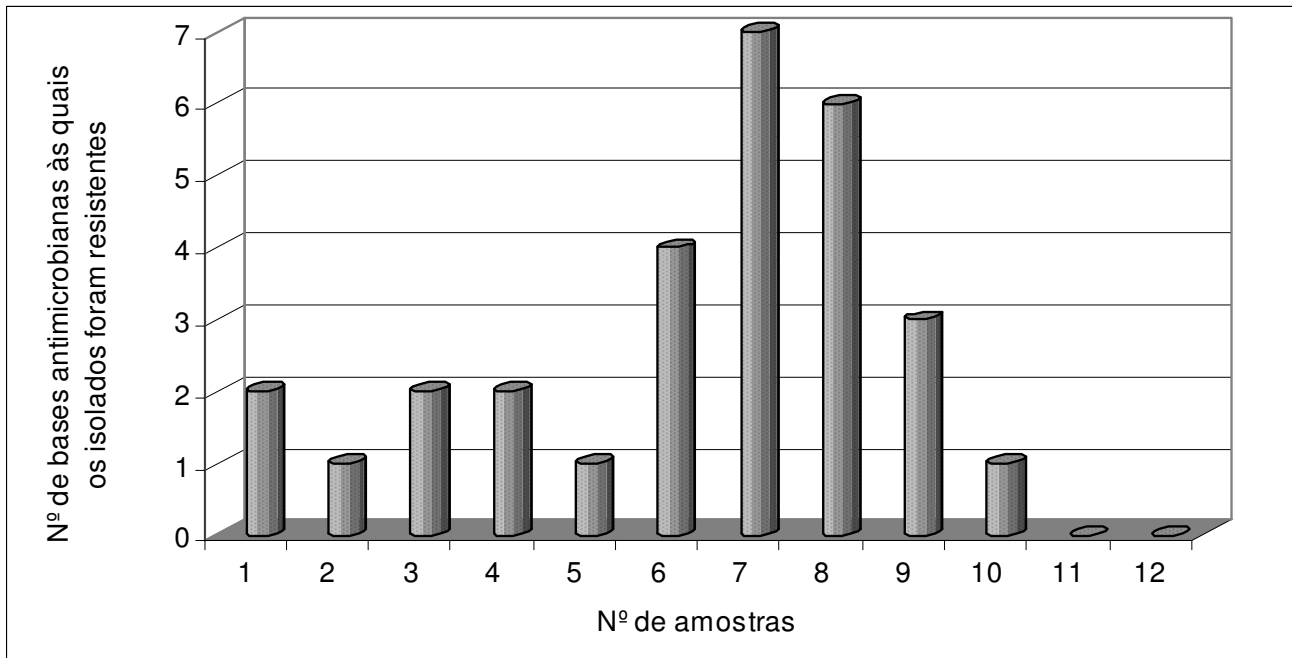


Figura 2 - Número de amostras resistentes em relação ao número de bases antimicrobianas testadas.

Dados de literatura mostram valores diferentes do encontrado na presente pesquisa; em trabalho com carcaças e cortes comerciais de frangos, 40 das amostras testadas (53,63%) mostraram-se resistentes a um princípio ativo, 13 amostras a dois e três princípios (16,45%) e duas a quatro e a cinco princípios ativos (2,53%), nenhuma das amostras estudadas mostrou-se resistente a seis ou mais princípios ativos (COSTA, 1996). HADAD & JEMEL (1990) encontraram 84,6% das cepas de *Salmonella* spp. testadas resistentes a um princípio e 50% sensíveis a três ou mais drogas.

BOKANYL JR. et al. (1990) testaram a resistência de cepas de *Salmonella* spp. frente à ação da ampicilina, gentamicina, tetraciclina e cloranfenicol e observaram que 37 das 55 cepas testadas foram resistentes a um ou mais princípios (67,3%). Todas as cepas foram sensíveis ao cloranfenicol, e nenhuma amostra foi resistente a mais de quatro princípios. A discordância dos achados encontrados nesses trabalhos com os dados da presente pesquisa pode, de alguma forma, ser explicada pelo fato do tempo transcorrido entre a realização das citadas pesquisas, por esses antibióticos terem sido testados há mais de 15 anos.

A Organização Mundial da Saúde alerta para a emergência de um grande número de amostras multirresistentes a antibióticos; além disso, muitas cepas de *Salmonella* spp. têm desenvolvido multirresistência como parte do material genético do microrganismo. Como resultado, há uma limitação severa das possibilidades de tratamento efetivo de infecções em seres humanos (WHO, 2005), pela redução do número de antibióticos de escolha.

A análise estatística (Teste exato de Fisher,  $\alpha = 0,05$ ) (ZAR, 1999) indicou diferença significativa em relação à ocorrência de *Salmonella* spp. entre os seis abatedouros ( $p \leq 0,05$ ). O isolamento de *Salmonella* spp. em abatedouros de aves com Serviço de Inspeção Estadual (SISP) foi menor ( $p \leq 0,05$ ) do que nos abatedouros com Serviço de Inspeção Federal (SIF). Nenhuma diferença significativa foi observada entre os oito pontos de colheita de amostras ( $p > 0,05$ ).

Esta diferença significativa entre a ocorrência em abatedouros com SISP e SIF pode ser devido ao maior número de lotes abatidos provenientes de diferentes produtores nos abatedouros com SISP, aumentando assim as chances de isolamentos. Mas também durante as visitas aos abatedouros foi possível verificar que não havia diferenças nas condições higiênicas entre alguns abatedouros com SISP e SIF; grandes abatedouros com SIF tinham uma melhor organização e melhores condições higiênico-sanitárias nas suas linhas de abate, porém pequenos abatedouros com SIF assemelhavam-se aos abatedouros com SISP, e isso talvez possa explicar a diferença entre os abatedouros.

#### 4 - Conclusões

O presente estudo reporta a ocorrência de *Salmonella* spp. em abatedouros no Estado de São Paulo, assim como de *S. Enteritidis* e de *S. Typhimurium*. Os resultados indicam que as aves comercializadas podem ser fontes de infecção para seres humanos, e, conseqüentemente, medidas de controle devem ser implantadas, a fim de reduzir os riscos da contaminação da carne de aves. Os sorotipos *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* podem ser encontrados em abatedouros de aves, principalmente pela presença de fezes e penas contaminadas, mas a água também pode ser um importante veículo de transmissão destes patógenos na linha de abate. Os resultados referentes à resistência antimicrobiana servem de alerta, pois o uso indiscriminado de antibióticos pode levar à seleção de cepas resistentes, e estas podem estar presentes nos alimentos de origem animal e causar graves infecções em seres humanos. A partir dos achados observados neste estudo é possível concluir que há uma necessidade de melhorar os métodos de controle de qualidade, tendo como objetivo evitar a contaminação dos abatedouros de aves por *Salmonella* spp..

## 5 - Referências

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 2. ed. Washington: Organization panamericana de la salud, 1986. 989 p.

BAUER, A. W.; KIRB, M. M.; SHERRIN, J. D. Antibiotics susceptibility testing by standardized single disk method. **American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

BERCHIERI JR., A.; BARROW, P. A. O desenvolvimento da microbiota intestinal em pintos de corte: prós e contras. In: CONFERÊNCIA APINCO 1998 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1998, Campinas, São Paulo. **Anais...** Campinas: APINCO, 1998. p. 183-190.

BERCHIERI JR., A.; FERNANDES, S. A.; IRINO, K.; QUINTANA, J. L.; SANTOS, A. J. *Salmonella* in poultry feeds in Brazil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 22-25, 1993.

BERCHIERI JR., A.; PAULILO, A. C. Sensibilidade a antimicrobianos por *Salmonella* isolados de farinha de origem animal utilizados no preparo de rações. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 56-60, 1985.

BERCHIERI JR., A.; ROSSI JR., O. D.; PAULILLO, A. C.; IRINO, K.; FERNANDES, S. A.; ÁVILA, F. A.; PESSOA, G. V. A.; CALZADA, C. T. *Salmonella* em abatedouro avícola. **Arts Veterinária**, Jaboticabal, v. 3, n. 1, p. 81-87, 1987.

BIER, O. **Microbiologia e imunologia**. 3. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1990. 1234 p.

BOER, E.; HAHNÉ, M. Cross contamination with *Campylobacter jejuni* and *Salmonella* spp. from raw chicken products during food preparation. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 53, n. 12, p. 1067-1068, 1990.

BOKANYL JR., R. P.; STEPHENS, J. F.; FOSTER, D. N. Isolation and characterization of salmonella from broiler carcasses or parts. **Poultry Science**, Champaign, v. 69, n. 1, p. 592-598, 1990.

BRASIL. Portaria n. 100, de 10 de agosto de 1993. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 1993. Seção I, n. 156, p. 11950.

BRYAN, F. L.; DOYLE, M. P. Health risks and consequences of *Salmonella* and *Campylobacter jejuni* in raw poultry. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 58, n. 3, p. 326-344, 1995.

CALIXTO, A. E. R.; SERAFINI, A. B.; KIPNIS, A.; ANDRÉ, M. C. D. P. B. Prevalência de *Salmonella* e ocorrência de cepas resistentes a antimicrobianos em insumos de rações para aves produzidos por um matadouro-frigorífico com fiscalização permanente, em Goiânia, GO. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 101, p. 56-62, 2002.

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N.C.; CASTRO, A. G. M.; KANASHIRO, A. M. I. Pesquisa de *Salmonella* spp., coliformes totais, coliformes fecais e mesófilos em carcaças de frango e produtos derivados de frangos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 67, n. 1, 2000. Disponível em: <[http://biologico.sp.gov/arquivos/v67\\_1/pesquisa\\_salmonella.htm](http://biologico.sp.gov/arquivos/v67_1/pesquisa_salmonella.htm)>. Acesso em: 21 abr. 2005.

CASON, J. A.; BAILEY, J. S.; STERN, N. J.; WHITTEMORE, A. D., COX, N. A. Relationship between aerobic bacteria, Salmonellae, and *Campylobacter* on broiler carcasses. **Poultry Science**, Champaign, v. 76, n. 8, p. 1037-1041, 1997.

COSTA, F. N. **Sorotipos de Salmonella em carcaças e cortes de frangos obtidos na indústria e no comércio e comportamento das cepas isoladas frente à ação de antimicrobianos**. 1996. 72 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1996.

FERNANDEZ, A. T.; FORTES, M. L. M.; ALEXANDRE, M. H. S.; BASTOS, C. S. P.; VIANNA, E. P. L. Ocorrência de surtos de doenças transmitidas por alimentos na cidade do Rio de Janeiro. 2001 Disponível em: <[http://www.unigranrio.br/veterinaria/surtosnacidade\\_rj.doc](http://www.unigranrio.br/veterinaria/surtosnacidade_rj.doc)>. Acesso em: 25 abr. 2005.

FURTADO, C.; ADAK, G. C.; STUART, J. M.; WALL, P. G.; EVANS, H. S.; CASEMORE, D. P. Outbreaks of waterborne infectious intestinal disease in England and Wales 1992-1995. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 121, p. 109-119, 1998.

GIL-SETAS, A.; RAMOS, A. M.; SALAS, C. M.; DOMÍNGUEZ, M. U.; ELIA, M. E. Salmonelosis no tifoidea em un área de salud de Navarra, España. **Revista Española de Salud Pública**, Madrid, v. 76, n. 1, p. 49-56, 2002.

GONÇALVES, P. M. R.; FRANCO, R. M.; ZAMBORLINI, L. C. Enumeração de enterococos e coliformes fecais, pesquisa de Salmonella e indicação presuntiva de Proteus, em cortes e miúdos de frango congelados. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 12, n. 53, p. 42-47, 1998.

HADAD J.J.; JEMEL A. Antimicrobial resistance among Salmonellae from animals. **Veterinary Medical Journal**, Giza, v. 38, n. 1, p. 35-43, 1990.

HANEDA, T.; OKADA, N.; NAKAZAWA, N.; KAWAKAMI, T.; DANBARA, H. Complete DNA sequence and comparative analysis of the 50-kilobase virulence plasmid of Salmonella enterica serovar Choleraesuis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 69, n. 4, p. 2612-2620, 2001.

HARRISON, W. A.; GRIFFITH, C. J.; TENNANT. D.; PETERS, A. C. Incidence of *Campylobacter* and *Salmonella* isolated from retail chicken and associated packing in South Wales. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 33, p. 450-454, 2001.

IKUNO, A. A.; KANASHIRO, A. M. I.; KIYOTA, S.; CASTRO, A. G. M.; FERREIRA, V. C. A.

Multiplex PCR for accurate diagnosis of poultry infection by using *Salmonella* invA, sefA, spvC genes sequences as molecular markers. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, p. 265-267, 2004.

JORGENSEN, F.; BAILEY, R.; WILLINS, S.; HENDERSON, P.; WARCING, D. R.; BOLTON, E. J.; FROST, J. A.; WARD, L.; HUMPHREY, T. J. Prevalence and numbers of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. on cow, whole chicken in relation to sampling methods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 76, p. 151-164, 2002.

LILLARD, S. H. The impact of commercial processing procedures on the bacterial contamination and cross-contamination of broiler carcasses. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 53, n. 3, p. 202-204, 1990.

LÍRIO, V. S.; SILVA, E. A.; STEFORI, S.; CAMARGO, D.; RECCO, E. A. P.; MALUF, Y.; MIYAZAWA, T. T.; NEVES, D. V. A.; OLIVEIRA, V. M. R. Frequência de 17 sorotipos de *Salmonella* isolados de alimentos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 12, n. 55, p. 36-42, 1997.

MARTINS, S. C. S.; SERIO, J.; MATTEI, A. C. M.; ALBUQUERQUE, L. M. B. *Salmonella* em miúdos de aves – Resistência a antibióticos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 78/79, p. 74-76, 2000.

NADVORNY, A.; FIGUEIREDO, D. M. S. SCHMIDT, V. Ocorrência de *Salmonella* sp. em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Rio Grande do Sul em 2000. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 32, n. 1, p. 47- 51, 2004.

NIEROP, W.; DUSÉ, A. G.; MARAIS, F.; AITHMA, N.; THOTHOBOLO, N.; KASSEL, M.; STEWART, R.; POLGIETER, A.; FERNANDES, B.; GALPIN, J. S.; BOOMFIELD, S. F. Contamination of chicken carcass in Gauteng, South Africa, by *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Campylobacter*. **International Journal of Food Microbiology**,



Amsterdam, v. 99, p. 1-6, 2005.

REIS, R. B.; KRUGER, C. S.; MACIEL, M. S. *Salmonella* spp. em produtos cárneos comercializados no município de Cuiabá-MT. Avaliação da metodologia de pesquisa. Modelos de resistência a drogas antimicrobianas. **Ciência e Tecnologia**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 1, p. 74-78, 1995.

ROWE, B.; BARTLETT, C. R. L. *Salmonella* enteritidis e *Salmonella* typhimurium na Europa Ocidental, de 1993 a 1995: relatório da vigilância da Salm-Net. **Euro Surveillance Monthly**, Oslo, v. 2, n. 2, p. 4-6, 1997.

SANTOS, D. M. S. S.; BERCHIERI JR., A.; FERNANDES, S. A.; TAVECHIO, A. T.; AMARAL, L. A. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 1, p. 39-42, 2000.

SAS INSTITUTE. **User's guide**: version 6.12. 4. ed. Cary, 1998, v. 2.

SCUDERI, G.; FANTASIA M.; FILETICI, E.; ANASTASIO, M. P. Foodborne outbreaks caused by salmonella in Italy, 1991-1994. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 116, p. 257-265, 1996.

SIQUEIRA, R. S.; DODD, C. E. R.; REES, C. E. D. Phage amplification assay as rapid method for *Salmonella* detection. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, p. 118-120, 2003.

SKIRROW, M. B.; BLASER, M. J. *Campylobacter jejuni*. In: BLASER, M. J. et al. **Infections of the gastrointestinal tract**. New York: Raven Press, 1995. p.123-138.

SOUMET, C., ERMEL, G., ROSE, N., ROSE, V., DROUIN, P., SALVAT, G., COLIN, P. Evaluation of a multiplex assay for simultaneous identification of *Salmonella* sp., *Salmonella*

Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium from environmental swabs of poultry hoses. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 28, p. 113-117, 1999.

STONE, G. G.; OBERST, R. D.; HAYS, M. P.; McVEY, S.; CHENGAPPA, M. M. Detection of *Salmonella* serovars from clinical samples by enrichment Broth cultivation-PCR procedure. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, n. 7, p. 1742-1749, 1994.

WARD, L.R.; THRELFALL, E.J. **Human salmonellosis in England and Wales**: current situation. In: SALMONELLA AND SALMONELLOSIS SYMPOSIUM, 1997, Ploufragan. **Proceedings...** Ploufragan. 1997. p. 547-549.

WOODWARD, M. J; KIRWAN, S. E. S. Detection of *Salmonella* enteritidis in eggs by the polymerase chain reaction. **Veterinary Record**, London, v. 138, p. 411-413, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. **Drug-resistance *Salmonella***. 2005. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/print.html>>. Acesso em: 13 nov. 2005.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**, New Jersey: Prentice Hall, 1999. p. 663.

ZHAO, C., GE, B.; VILLENA, J.; SUDLER, R.; YEH, E.; ZHAO, S.; WHITE, D. G.; WAGNER, D.; MENG, J. Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, and *Salmonella* serovars in retail chicken, turkey, pork, and beef from the greater Washington, D. C., area. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 67, n. 12, p. 5431-5436, 2001.

## Capítulo 4 - Implicações

Em saúde pública o tema segurança alimentar tem merecido destaque e é motivo de preocupação de governos, empresas e consumidores de todo o mundo. A Organização Mundial de Saúde (OMS) define segurança alimentar (“food safety”) como a garantia de que o alimento não causará nenhum mal ao consumidor e não apresenta riscos químicos, biológicos ou relativos à natureza do alimento. A ocorrência de doenças alimentares é de difícil estimativa, mas sabe-se que, somente no ano de 2000, cerca de 2,1 milhões de pessoas morreram devido a doenças diarreicas (WHO, 2002). A incidência dessas doenças pode ser de 10 a 200 vezes o número que é notificado, pois muitas pessoas não procuram o serviço de saúde (VEEK et al., 1992).

A campilobacteriose é uma zoonose de distribuição mundial, sendo seu principal representante a espécie *Campylobacter jejuni*, microrganismo ubiqüitário, que se comporta como agente patogênico ou fazendo parte da microbiota normal do trato gastrointestinal de bovinos, aves, ovinos, cães e gatos, assim como de animais selvagens (SCARCELLI et al., 1998). No entanto, *Campylobacter coli* também é isolado em estudos de prevalência de campilobacteriose, só que em menor número. Atribui-se como fonte de infecção das bactérias deste gênero para o ser humano o contato direto com animais portadores, o consumo de alimentos de origem animal e água contaminados, sobretudo a ingestão de leite não pasteurizado e carnes cruas ou mal processadas de aves, suínos e bovinos (SCARCELLI et al., 1998).

Dentre os sorotipos de *Salmonella* spp., *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium são exemplos mais freqüentes em nosso meio e causam a salmonelose, uma enfermidade de caráter zoonótico e de distribuição mundial. A gastroenterite por *Salmonella* spp. é transmitida pela ingestão de alimentos, água ou contato com fômite, contaminados por fezes de pessoa ou animal infectado.

COSTA (1996) cita várias medidas que podem ser adotadas para prevenir a transmissão de *Salmonella* spp. para seres humanos e animais, e essas ações de controle também podem ser aplicadas para *Campylobacter* spp.. Tais medidas, na de produção avícola, estão relacionadas com manejo adequado, uso de produtos químicos na ração, uso

de técnicas de exclusão competitiva e tratamento das rações por calor ou radiação; nos abatedouros preconiza-se, principalmente, a adoção do uso de cloro na água de lavagem da carcaça, controle da temperatura da água de imersão das carcaças, renovação do volume de água do sistema, higienização dos equipamentos dos abatedouros, uso de ácido acético na água de escaldagem, alcalinização do pH da água de escaldamento, temperatura adequada na estocagem das carcaças, uso de radiação ionizante e ácido acético glacial em carcaças pré-resfriadas e embaladas, bem como embalagem em atmosfera modificada.

Apesar dos esforços para eliminar a contaminação por *Salmonella* spp. em aves, melhorias na qualidade microbiológica na linha de processamento, minimização da contaminação cruzada e abate de aves livres de *Salmonella* spp. são as medidas de controle mais eficazes a serem utilizadas para evitar surtos em seres humanos (BAILEY, 1993). Em trabalho realizado no Rio Grande do Sul, com surtos alimentares de origens diversas, o enteropatógeno *Salmonella* spp. foi apontado como o maior responsável pelos surtos estudados (73%). Os autores sugerem que a utilização de matéria-prima sem inspeção sanitária e a manipulação incorreta dos alimentos constituíram-se nos fatores predisponentes à contaminação dos alimentos por *Salmonella* spp., e ressaltam a necessidade de controle deste patógeno nas aves, a partir da granja, e da adoção de boas práticas de fabricação (NADVORNY et al., 2004).

Dentre os cuidados que devem ser adotados pelos consumidores, pode-se relacionar o consumo de carne e ovos bem cozidos, somado a medidas higiênico-sanitárias na manipulação dos alimentos e refrigeração adequada (COSTA, 1996). As principais precauções no manuseio e preparação de alimentos de origem animal, com o intuito de reduzir a contaminação cruzada, são: cozimento das carnes a uma temperatura e tempo adequados; lavagem das mãos com sabão depois de manusear produtos de origem animal e limpeza com sabão e água quente de equipamentos (facas, utensílios, tábuas e outros) utilizados na preparação de alimentos crus de origem animal (BUTZLER, 2004). No aspecto contaminação cruzada, a carcaça de frango descongelada assume capital importância, devido à possibilidade de transferência passiva de microrganismos para outros alimentos; durante o descongelamento e o processamento em locais comuns, a água de degelo em contato com outros alimentos, principalmente os que serão ingeridos "in natura", pode

contaminá-los, explicando assim a origem freqüente de surtos de origem alimentar (CASTRO et al., 1997; SLUTSKER et al., 1998). SCARCELLI & PIATTI (2002) enumeram também, como cuidados higiênicos sanitários primordiais, conservar os alimentos cárneos em temperatura de refrigeração, nunca deixá-los à temperatura ambiente, consumir a carne resfriada no mesmo dia ou até o final do dia seguinte, proteger os alimentos de roedores, moscas ou outros insetos, preparar alimentos cárneos e ingeri-los ainda quentes, resfriando-os imediatamente após o cozimento caso seja necessário armazená-los.

O presente trabalho verificou a ocorrência de *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Salmonella* ssp., *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium em seis abatedouros avícolas do Estado de São Paulo. Pelos resultados obtidos, nas condições em que foi realizada a pesquisa, pode-se inferir que a contaminação advém das aves e que esta ocorre ainda em sua fase de produção. Quando encaminhadas ao abatedouro, essas aves carregam os agentes patogênicos estudados, principalmente nas fezes, e podem contaminar outras carcaças durante o processo de abate. Essas carcaças representam prováveis fontes de infecção e quando chegam aos consumidores expõem os mesmos ao risco de contrair campilobacteriose e salmonelose. A qualidade da carcaça é mensurável, e sua contaminação representa, geralmente, perda de altos valores econômicos. Por isso, acredita-se que para resultados satisfatórios, deve haver uma interação entre todos os setores da produção de frangos: fábrica de ração, granja de matrizes, central de incubação, produtores, abatedouros e comerciantes.

A importância das aves de corte na transmissão de campilobacteriose e salmonelose tem grande relevância em relação aos demais grupos de animais que se destinam ao abate para obtenção de carne. Na pesquisa de *Salmonella* spp. foram isoladas amostras positivas ao longo de todos os pontos pesquisados da linha de abate; já na pesquisa de *C. jejuni* e *C. coli*, não foram encontradas carcaças resfriadas contaminadas, no entanto esse risco existe. O que este trabalho demonstram é que se deve fazer a prevenção e o controle destes patógenos desde o local onde as aves são produzidas até seu abate, a fim de evitar os riscos de contaminação nos abatedouros e conseqüentemente aos consumidores, procurando melhorar a inocuidade dos produtos de origem avícola. Durante o abate devem-se tomar

cuidados especialmente durante a evisceração, pois nesta fase as bactérias contidas nas fezes podem ser transferidas à carne (CASTRO et al., 1997; SLUTSKER et al., 1998).

VEEK et al. (1992) ressaltam a importância da investigação epidemiológica de doenças de origem alimentar, especificando que uma das principais perdas é a econômica, devido ao emprego de recursos tanto públicos quanto privados. Existe um dispêndio com serviços médicos, queda da produtividade de pessoas doentes, perdas da indústria pelos alimentos rejeitados, funcionários doentes, entre outros. Portanto, a contaminação de alimentos representa um elevado risco à saúde pública, principalmente para crianças, idosos e imunodeprimidos.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), por meio da Instrução Normativa nº. 70 (BRASIL, 2003) instituiu o Programa de redução de patógenos, que tem entre seus objetivos a verificação da prevalência da *Salmonella* spp. nos produtos avícolas (frangos “in natura”), formação de um banco de dados para análise dos índices de contaminação nos produtos avícolas, estabelecimento de padrões quantitativos de aceitabilidade da contaminação dos produtos, monitoramento constante do nível de contaminação por este patógeno em estabelecimentos de abate de aves e aumento das garantias da inocuidade dos produtos avícolas no mercado interno e externo. No entanto, ainda não há legislação específica para *Campylobacter* spp., o que demonstra uma necessidade de revisão na lei brasileira.

Um outro aspecto a ser considerado é o alerta da OMS para a emergência de um grande número de amostras multirresistentes a antibióticos; além disso, muitas cepas de *Salmonella* spp. têm incorporado essa característica em seu material genético. Como resultado há uma limitação severa das possibilidades de tratamento efetivo de infecções em seres humanos (WHO, 2005), pela redução do número de antibióticos de escolha.

É necessário que médicos veterinários, zootecnistas e outros profissionais ligados ao agronegócio avícola, incluindo aqui os produtores rurais, juntem seus esforços aos dos médicos e dos profissionais ligados à área de saúde humana, não apenas no sentido de fazer um uso racional e seguro dos antimicrobianos, mas também, no sentido de controlar a dispersão de bactérias resistentes ou de genes de resistência. Essa é a posição que vem sendo empregada e recomendada como estratégia global pela OMS e pela OIE

(Organização Mundial de Saúde Animal) para o controle e manejo da resistência aos antibióticos.

Um dos maiores desafios enfrentados pela avicultura é evitar a ocorrência de doenças transmissíveis aos seres humanos e garantir a saúde e o desempenho das aves.

## Referências

BAILEY, J. S. Control of *Salmonella* and *Campylobacter* in poultry production. A summary of work at Russel Research Center. **Poultry Science**, Champaign, v. 72, n. 6, p. 1169-1173, 1993.

BUTZLER, J. P. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 10, p. 868-876, 2004.

BRASIL. Instrução Normativa n. 70, de 6 de outubro de 2003. **Programa de redução de patógenos -monitoramento microbiológico controle de *Salmonella* sp. em carcaças de frangos e perus.** 2003. Disponível em: <[http://www.avisite.com.br/legislacao/in\\_70\\_reduc\\_patogenos.asp](http://www.avisite.com.br/legislacao/in_70_reduc_patogenos.asp)>. Acesso em: 14 abr. 2006.

CASTRO, A. G. M.; GENOVEZ, M. E.; SCARCELLI, E.; TORRES, A. P.; CARDOSO, M. V.; PASCHOAL, A. L. S.; SOUZA, C. A. I.; CARRASCO, S. Monitoramento de *Campylobacter* spp. ao longo da linha de abate de frangos de corte. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 21-26, 1997.

COSTA, F. N. **Sorotipos de *Salmonella* em carcaças e cortes de frangos obtidos na indústria e no comércio e comportamento das cepas isoladas frente à ação de antimicrobianos.** 1996. 72 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1996.

NADVORNY, A.; FIGUEIREDO, D. M. S. SCHMIDT, V. Ocorrência de *Salmonella* sp. em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Rio Grande do Sul em 2000. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 32, n. 1, p. 47- 51, 2004.



SCARCELLI, E.; GENOVEZ, M. E.; CARDOSO, M. V.; SOUZA, M. C. A. M.; GRASSO, L. M. P. S.; SOUZA, C. A. I.; TORRES, A. P. Avaliação do potencial de disseminação de *Campylobacter* spp. por diferentes espécies animais. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 65, p. 55-61, 1998.

SCARCELLI, E.; PIATTI, R.M. Patógenos emergentes relacionados à contaminação de alimentos de origem animal. **Biológico**, São Paulo, v.64, n.2, p.123-127, 2002.

SLUTSKER et al., Foodborne diseases. Emerging pathogens and trends. *Infectious Disease Clinics of North America*, Philadelphia, v. 12, n. 1, p. 199-216, 1998.

VEEK, M. E.; WEITZMAN, I.; SWANSON, R. C.; LUCAS, J. P. Investigation of foodborne illness outbreaks. In: VANDERZANT, C. E.; SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3. ed., Washington; APHA, 1992, 1912 p., p. 747-761.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. **Food safety and foodborne illness**. 2002. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/print.html>>. Acesso em: 30 jan. 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. **Drug-resistance *Salmonella***. 2005. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/print.html>>. Acesso em: 13 nov. 2005.