

***Campylobacter* sp EM MECÔNIO DE PINTAINHOS E EM CLOACA DE REPRODUTORAS DE CORTE**

***Campylobacter* sp IN MECONIUM OF ONE DAY OLD CHICKS AND SWAB CLOACAL FROM BREEDER HENS**

Belchiolina Beatriz FONSECA¹; Ricardo Alfredo SONCINI²; Andréa Leão Carneiro FREZZA³; Daise Aparecida ROSSI⁴

1. Médica Veterinária; 2. Médico Veterinário, Sadia Alimentos S/A; 3. Médica Veterinária, Mestranda em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária - FAMEV, Universidade Federal de Uberlândia – UFU; 4. Professora, Doutora, FAMEV – UFU. daiser@umarama.ufu.br

RESUMO: *Campylobacter* sp é um importante patógeno veiculado pelos alimentos e os produtos de origem aviária são os mais implicados na transmissão desses microrganismos aos humanos. O conhecimento das formas de transmissão de bactérias do gênero *Campylobacter* entre as aves irá permitir o estabelecimento de formas de controle eficientes nas granjas para impedir a disseminação desse agente. A principal via de transmissão nos aviários é a horizontal, porém a transmissão vertical deve ser objeto de estudo por ser uma via ainda não comprovada. O objetivo desse estudo foi verificar em um mesmo lote de aves a presença da *Campylobacter* sp em galinhas matrizes e em mecônio de pintainhos de corte de um dia. O diagnóstico, foi realizado por PCR automatizado, o BAX System da DuPont[®]. Foram coletados e analisados suabes cloacais de 33 aves (*pool* de três aves), totalizando 11 amostras e mecônio de pintainhos recém-eclodidos (*pool* de três), totalizando 10 amostras. A positividade foi de 80% (8/10) para as amostras de mecônio e 54,55% (6/11) das amostras obtidas de galinhas. Esses resultados representam indícios da transmissão vertical, mas outras pesquisas devem ser conduzidas utilizando técnicas moleculares para detecção de *Campylobacter* sp em amostras de fezes, assim como técnicas de genotipificação dos espécimes isolados para comprovação da transmissão vertical.

PALAVRAS-CHAVE: *Campylobacter* sp. Frangos de corte. Transmissão vertical.

INTRODUÇÃO

O gênero *Campylobacter* vem se destacando como um microrganismo emergente relacionado com a contaminação de alimentos, principalmente os de origem aviária, em diversas partes do mundo (AQUINO, 1995). Estas bactérias são a primeira causa de gastroenterite em humanos nos Estados Unidos e em outros países desenvolvidos (FRIEDMAN et al., 1998). O trato intestinal das aves domésticas é considerado o principal reservatório de *Campylobacter jejuni* (HIETT, 2002). Porém, a infecção em aves geralmente não é associada com a doença clínica mesmo que um grande número de bactérias seja excretado nas fezes (MACHADO, 1994).

Pela importância da associação da *Campylobacter* sp com os alimentos de origem aviária, o conhecimento das formas de transmissão do agente faz-se necessário para um controle eficaz nas granjas. Segundo Refrégier-Petton et al. (2001) várias pesquisas vêm sendo conduzidas para determinar as formas de infecção nas aves. Fatores da granja como alta temperatura e ar estático no aviário, qualidade deficiente da água, ausência de pedilúvio e presença de cascudinhos são

considerados pontos críticos para contaminação dos lotes.

A transmissão vertical do *Campylobacter* nas aves de granja ainda é tema de discussão por muitos autores. Assim, mais estudos necessitam ser conduzidos para seu entendimento, principalmente pela dificuldade de isolamento do agente em ovos e pintainhos de um dia de idade com o uso de cultura tradicional (BAKER et al., 1987; RABIE, 1992; ZAKI; REDA, 1995; SAHIN et al., 2003; YOUNG et al., 1999). Essa dificuldade no isolamento é devida às características da bactéria, que é altamente sensível às condições ambientais como temperatura, tensão de oxigênio e ressecamento. Em condições adversas a *Campylobacter* gera formas viáveis, mas não cultiváveis (VNC) especialmente na presença de biofilmes derivados de aviários (TRACHOO et al., 2002). Essas formas não são cultiváveis em meios de cultura, porém, são infectivas (MORENO et al., 2001).

Pela dificuldade de isolamento e identificação de microrganismos exigentes como a *Campylobacter* sp por métodos de cultura tradicional, técnicas de biologia molecular vêm sendo aplicadas para identificação. Para aumentar a rapidez dos resultados e diminuir erros operacionais,

aparelhos automatizados utilizando a tecnologia de PCR são utilizados com grande sucesso na indústria de alimentos.

O propósito desse estudo foi verificar a presença da *Campylobacter jejuni* e/ou *Campylobacter coli* em mecônio de pintainhos recém-nascidos e em matrizes para verificar indícios da transmissão vertical.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras foram coletadas em uma granja de matrizes pesadas e em um incubatório comercial localizado no estado de Minas Gerais, Brasil e analisadas no Laboratório de Biotecnologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (LABIO/FAMEV/UFU).

Foram coletadas com o auxílio de suabe estéril, material cloacal individual de 33 matrizes com idade de 40 semanas, que foram agrupados em *pool* de três aves de forma a totalizar 11 amostras. No mesmo dia da coleta das matrizes foram colhidas amostras de mecônio de 30 pintainhos oriundos do mesmo lote. A coleta do mecônio foi realizada após fricção na região abdominal dos pintainhos recém nascidos e o material depositado em suabe estéril. Cada amostra foi composta por um *pool* de mecônio de três pintainhos totalizando 10 amostras. As amostras foram acondicionadas em tubos contendo 10mL de água peptonada estéril e imediatamente enviadas em caixa isotérmica com gelo ao laboratório para análise.

No laboratório as amostras foram imediatamente processadas de forma asséptica em fluxo laminar. O material contido no meio de transporte foi transferido para 10mL de caldo Bolton (Oxoid[®]) em dupla concentração suplementado com antibióticos (40mg/L de cefoperazona de sódio 40mg/L de vancomicina, 40g/L de trimetoprim e 100mg/L de cyclohexamida - Oxoid[®]). Este material foi incubado em atmosfera de microaerofilia (5% de O₂ e 10% de CO₂) obtido por meio de geradores (Probac microaerobic generator[®]) a 37°C durante 24 horas.

Como controle positivo foi utilizado uma cultura de *Campylobacter jejuni* (ATCC 33291) em forma não cultivável diluída em 10mL de água peptonada estéril. Como controle negativo o teste foi realizado com todos os reagentes necessários, porém sem o uso de cultura.

Para verificar a presença/ausência de *Campylobacter jejuni* e/ou *Campylobacter coli* foi utilizado o PCR automatizado BAX System da DuPont[®]. Os procedimentos foram realizados de

acordo com as orientações do fabricante. Uma alíquota de 5 μ L da amostra enriquecida em caldo Bolton foi transferida para tubos eppendorf (Bioexpress-USA[®]) e adicionada de 200 μ L de protease. A mistura foi mantida durante 20 minutos a 37°C e 95°C por 10 minutos e após, transferida para um bloco de resfriamento, com temperatura de 2°C-8°C por 5 minutos. Após resfriamento, uma alíquota de 50 μ L foi transferida para o tubo de PCR que acompanha o teste e contém o *pellet* com os *primers*, dNTPs, a enzima *Taq* DNA-polimerase, o corante fluorescente, o controle interno e os demais reagentes necessários para a reação PCR. Os tubos foram tampados com as tampas ópticas e transferidos para o termociclador/detector, onde o programa pré-estabelecido no hardware do equipamento foi executado. Ao final do ciclo de amplificação e detecção, o equipamento automaticamente liberou os resultados na tela do computador (USER'S GUIDE, 2000).

RESULTADOS

Os resultados foram lidos na tela do computador que acompanha o BAX como positivo ou negativo e na forma gráfica. Foi determinada positividade de 54,55% (6/11) nos suabes cloacais das matrizes e 80,00% (8/10) nas amostras de mecônio dos pintainhos de um dia. A amostra contendo células não cultiváveis de *Campylobacter jejuni* (ATCC 33291) utilizada como controle positivo e o tubo contendo somente a protease e reagentes, utilizado como controle negativo tiveram resultados positivo e negativo, respectivamente.

DISCUSSÃO

A positividade de 54,55% nas galinhas matrizes foi inferior aos índices observados por Kazwala et al. (1990) e Buhr et al. (2002) que encontraram prevalência de 80% e 90% em lotes de matrizes. Segundo Fernandes (2003) a prevalência de *Campylobacter* sp em matrizes é proporcional ao *status* sanitário da granja e, provavelmente, os índices obtidos neste estudo refletem esta condição.

De acordo com Young (1999) pintainhos de um dia de idade naturalmente não são infectados por *C. jejuni*. Esta afirmação discorda com o índice de 80% de positividade para *Campylobacter jejuni* e/ou *Campylobacter coli* determinado neste estudo. Provavelmente, os isolamentos foram devidos ao uso de técnicas moleculares, já que as características intrínsecas do mecônio, como o baixo pH, causam injúria nas células de *Campylobacter* sp. Provavelmente, nesse tipo de matriz a bactéria se

transforme em forma viável e não cultivável (VNC). Situação semelhante foi observada em um estudo conduzido por Hiatt et al. (2002) que obtiveram positividade para *Campylobacter* sp em 70% e 100% das amostras de casca de ovos e penugem, respectivamente, quando utilizaram técnica do PCR direto. As mesmas amostras analisadas pelo método de cultura tradicional foram 100% negativas.

Apesar dos raros achados da *Campylobacter* sp em ovos embrionados e pintainhos de um dia sugerir que não há transmissão vertical, Buhr et al. (2002) encontraram *Campylobacter* sp no trato reprodutivo de 92% das galinhas comerciais analisadas. Na cloaca, vagina, útero, magno e istmo os índices de isolamento foram de 100%, 83,33%, 58,33%, 33,33% e 16,66%, respectivamente. A presença da bactéria no trato reprodutivo aponta a possibilidade da passagem da bactéria através do ovo e o nascimento de pintainhos infectados.

Vários estudos têm relatado a dificuldade de isolar bactérias do gênero *Campylobacter* em ovos. Doyle (1984) não encontrou a *Campylobacter* sp no conteúdo interno de ovos após os mesmos terem permanecido em contato com cultura de *Campylobacter* em três temperaturas diferentes. Baker (1987); Rabie (1992), Zaki e Reda (1995) também não conseguiram isolar *Campylobacter* em gema de ovos. Sahin et al. (2003) demonstraram que a *Campylobacter* tem limitada capacidade de penetrar na casca de ovos mesmo em reprodutoras que eliminam *Campylobacter* em fezes, concluindo que a transmissão vertical é provavelmente um evento raro. Todos estes estudos foram realizados com técnica tradicional de cultura.

Cox et al. (2002) compararam por dois métodos genotípicos: análise do ribotipo *PstI* e por sequência de DNA, espécimes de *Campylobacter* sp isolados de reprodutoras e sua progênie e encontraram padrões genéticos idênticos nos dois

métodos. Este estudo aponta evidência importante da transmissão vertical. Amostras de mecônio coletadas assepticamente como neste estudo, deveriam ser negativas para o patógeno se não houvesse a transmissão vertical.

O sucesso da detecção de *Campylobacter* em mecônio obtida com o uso PCR automatizado BAX System[®] demonstra a necessidade do uso de técnicas moleculares em outros estudos. Este sistema tem sido mundialmente utilizado para detecção de agentes como *Salmonella* sp, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria* sp e outros microrganismos, em amostras de alimentos e ambientais (BAILEY, 1998; NORTON, 2000; HOCHBEERG et al. 2001; BAILEY; COSBY, 2003; BRASIL, 2004).

A alta sensibilidade e especificidade do BAX[®] para outras amostras aliada a alta positividade em mecônio nesse estudo representam indícios da transmissão vertical de *Campylobacter* sp em aves. Porém, outros trabalhos utilizando técnicas moleculares devem ser desenvolvidos para demonstrar *Campylobacter* sp em amostras de mecônio, assim como a determinação da relação epidemiológica dos espécimes isolados das reprodutoras e da progênie.

CONCLUSÃO

O isolamento de *Campylobacter* sp em mecônio de pintainhos recém eclodidos é possível com o uso de técnicas moleculares como o PCR automatizado e é um forte indício da transmissão vertical. Porém, como ainda há poucos estudos sobre a transmissão vertical da *Campylobacter* sp utilizando técnicas moleculares tradicionais ou automatizadas faz-se necessários pesquisas detalhadas para o melhor entendimento do diagnóstico e transmissão desse agente.

ABSTRACT: *Campylobacter* sp is an important agent that causes food infection and the consume of avian products was the principal way of transmission of this organism to human been. The knowledge of the forms of transmission of the *Campylobacter* between the birds will allow the establishment of efficient forms of control in the farms to hinder the dissemination of this agent. The main transmission routes on chicken farms is horizontal however, the vertical transmission must be object of study still, it's not proven the objective of this research, that was to verify the presence of *Campylobacter* sp in breeder hens and meconium. The used diagnostic method, was the automatized system PCR, the BAX System of the DuPont[®]. The microbiological analyses were performed, using cloacal swabs from 33 breeder hens (pool of 3 hens each sample) and meconium samples from 30 one day old chicks (pool of 3 broilers each sample). Analysis of the meconium showed 80% (8/10) positive and breeder hens by the cloacal swab method 54,55% (6/11). These results represent indications of the vertical transmission, but other research must be lead using molecular techniques for detention of *Campylobacter* sp in excrement samples, as well as genetics techniques of isolated specimens to evidence the vertical transmission.

KEYWORDS: *Campylobacter* sp. Chickens. Vertical transmission. Epidemiology.

REFERENCIAS

- AQUINO, M. H. C.; FRANCO, R. M.; TIBANA, A. *Campylobacter jejuni* na avicultura: importância e método de controle. **Higiene Alimentar**, v. 36, n. 9, p. 17-19, 1995.
- BAILEY, J. S. Detection of *Salmonella* cells within 24 to 26 hours in poultry samples with the polymerase chain reaction BAX®System. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 7, p. 792-795, 1998.
- BAILEY, J. S.; COSBY, D. E. Detection of *Salmonella* from chicken rinses and chicken hot dogs with the automated BAX® PCR system. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 11, p. 2138-2140, 2003.
- BAKER, R. C.; PAREDES, M. D.; QURESHI, R.A. Prevalence of *Campylobacter jejuni* in eggs and poultry meat in New York State. **Poultry Science**, v. 66, n. 11, p. 1766-1770, 1987.
- BRASIL. Instrução Normativa nº41, de 7 de junho de 2004. Validação da metodologia utilizada pelo sistema de detecção patogênica para alimentos e amostras ambientais – A-BAX® para detecção de *Salmonella* spp em amostras de alimentos, água e amostras ambientais (swab), como método alternativo e equivalente ao método de referência do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Diário Oficial da União**, Brasília DF, n. 113, 15 jun. 2004. Seção 1, p.3-6.
- BUHR, R. J.; COX, N. A.; STERN, N. J.; MUSGROVE, J. L.; WILSON, J. L.; HIETT, K. L. Recovery of *Campylobacter* from segments of the reproductive tract of broiler breeder hens. **Avian Disease**, n. 46, p. 919-924, 2002.
- COX, L. A. Re-examining the causes of campylobacteriosis. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 6, n. 3., 2002.
- DOYLE, M.P. Association of *Campylobacter jejuni* with laying hens and eggs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 533-536, 1984.
- FERNANDEZ, H.; SALAZAR, R.; LANDSKRON, E. Occurrence of thermotolerant species of *Campylobacter* in three groups of hens maintained under different environmental conditions. **Revista de Microbiologia**, v. 24, n. 4, p. 265-268, 1993.
- FRIEDMAN, C. R.; NEIMANN, J.; WEGENER, H. C.; TAUXE, R. V. Epidemiology of *C. jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. In: **Proceedings of the Infectious Disease**. Society of America. ANNUAL MEETING, 36, 1998.
- HIETT, K.L.; COX, N. A.; STERN, N. Direct Polymerase Chain Reaction Detection of *Campylobacter* spp. in Poultry Hatchery Samples. **Avian Disease**, v. 46, n. 1, p. 219-223, 2002.
- KAZWALA, R. R.; COLLINS, J. D.; HANNAN, J.; CRINION, R. A.; O'MAHONY, H. Factors responsible for the introduction and spread of *Campylobacter jejuni* infection in commercial poultry production. **The Veterinary Record**, v. 126, p. 305-306, 1990.
- HOCHBERG, A. M.; ROERING, A.; GANGAR, V.; CURIALE, M.; BARBOUR, W. M.; MROZINSKI, P. M. Sensitivity and specificity of the BAX® for screening *Listeria monocytogenes* assay: Internal validation and independent laboratory study. **The Journal of AOAC International**, v. 84, n. 4, p. 1087- 1097, 2001.
- MACHADO, R. A.; TOSIN, I.; LEITÃO, M. F. F. Occurrence of *Salmonella* sp e *Campylobacter* sp. in chickens during industrial processing. **Revista de Microbiologia**, n. 25, p. 239-244, 1994.

MORENO, Y.; HERNÁNDEZ, M.; FÉRRUS, M. A.; ALONSO, J. L.; BOTELLA, S. Direct detection of thermotolerant *Campylobacter*s in chicken products by PCR and in situ hybridization. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 152, p. 577-582, 2001.

NORTON, D. M.; MCCAMEY, M.; BOOR, K. J.; WIEDMANN, M. Application of the BAX® for screening/genus *Listeria* polymerase chain reaction system for monitoring *Listeria* species in cold-smoked fish and in the smoked fish processing environment. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 3, p. 343-346, 2000.

RABIE, N. S. M. **Studies on *Campylobacteriosis* in chickens**. 1992. 160p. Thesis Faculty of Veterinary Medicine, Cairo University, Cairo, 1992.

REFRÉGIER-PETERSONON J.; ROSE N.; DENIS M.; SALVAT G. Risk factors for *Campylobacter* spp. contamination in French broiler-chicken flocks at the end of the rearing period. **Preventive Veterinary Medicine**, n. 50, p. 89-100, 2001.

SAHIN, O.; KOBALKA, P.; ZHANG, Q. Detection and survival of *Campylobacter* in chicken eggs. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 5, p. 1070-1074, 2003.

TRACHOO, N.; FRANK, J. F.; STERN, N. J. Survival of *Campylobacter jejuni* biofilms isolated from chicken houses. **Journal of Food Protection**, v. 65, p. 1110-1116, 2002.

USER'S GUIDE BAX®. **System PCR assay with automated detection for bacterial screening**. Wilmington, De: Du Pont Qualicon, 2000.

YOUNG, C. R.; ZIPRIN, R. L.; HUME, M. E.; STANKER, L. H. Dose response and organ invasion of day-of-hatch leghorn chicks by different isolates of *Campylobacter jejuni*. **Avian Diseases**, n. 43, p. 763-767, 1999.

ZAKI, M. M.; REDDA, W. W. *Campylobacteriosis* in Poultry. **Veterinary Medical Journal Giza**, v. 43, n. 1, p. 71-76, 1995.