

Campylobacter coli* no fluxograma de abate de suínos e pesquisa dos genes *cdt

Campylobacter coli in Swine Slaughtering Flowchart and Research of *cdt* Genes

Camile Milan, Thamiris Pereira de Moraes, Marina de Mattos Ferrasso, Celina Nunes Ebersol, Amilton Clair Pinto Seixas Neto, Éverton Fagonde da Silva & Cláudio Dias Timm

ABSTRACT

Background: *Campylobacter* spp. are among the microorganisms most commonly associated with foodborne disease. *Campylobacter* spp. isolation from pigs during the slaughter and final products have been reported in several countries, including Brazil. However, very little is known about the sources of contamination in the slaughtering flowchart and how these microorganisms are spread in processing plants. Considering the possibility of the pigs carry *Campylobacter* spp. since the farm or its products are contaminated in the slaughterhouse, this study had as aim to track *Campylobacter* spp. in pig slaughtering flowchart to understand the behavior of these pathogens in the production line.

Materials, Methods & Results: Forty animals of 10 lots, four from each lot, were followed during slaughter. Stool samples were collected from the floor of each enclosure where the pigs were housed on the farm and immediately after stunning on slaughterhouse. Samples from carcass surface were collected after removal of the animals from scrap machine, after evisceration and before the refrigeration chamber. It was also collected surface samples from jowls and samples from the scalding tank water before and after the passage of animals. The swabs containing samples were plated onto Columbia agar supplemented with activated charcoal, oxygen reduction solution and antibiotics supplement, and incubated at 42°C for 48 h under microaerobic conditions. The colonies which presented with a shiny and moist appearance were analyzed by Gram staining for identification of *Campylobacter* by morphology, and then tested for catalase and oxidase. The *Campylobacter* isolates were identified for species *C. jejuni* or *C. coli* by PCR. Bands profiles were determined by rep-PCR and used to compare the strains. *Campylobacter* was isolated from 19 (9.5%) of the 200 pig samples analyzed, seven (36.8%) of the rectum, seven (36.8%) after evisceration and five (26.3%) before the refrigeration chamber. *Campylobacter* was not isolated from jowls and from scalding tank water. All isolates were *C. coli* and *cdt* negative. Persistence of strains originating from the farm and cross contaminations during the slaughtering flowchart was identified by the analysis of the bands profiles obtained by rep-PCR.

Discussion: *C. coli* was the species of *Campylobacter* present in the swine intestinal tract and in the swine slaughterhouse. The animals, once contaminated, can carry the microorganism during the stages of the slaughtering flowchart. The farm where the animals came from is an important source of contamination during processing, however cross contamination also plays a relevant role. The evisceration was considered the most critical stage, due to the greater number of isolates obtained after this procedure, what emphasize the importance of the hygienic-sanitary management in this stage. *Campylobacter* spp. can survive, despite not being able to multiply, in foods at refrigeration temperatures (-1 to 5°C) for one to three weeks. Therefore, the high percentage of isolates obtained from the carcass before the refrigeration chamber may represent a problem, since the contamination of the carcasses that enter in this sector can be maintained until the food reaches the consumer. There was no similarity between strains isolated from different lots, indicating that there were no persistence of strains both in the farm and in the slaughterhouse.

Keywords: carcass, contamination, food safety, public health.

Descritores: carcaça, contaminação, segurança dos alimentos, saúde pública.

INTRODUÇÃO

Campylobacter spp. são microrganismos comumente associados a doenças transmitidas por alimentos de origem animal e as espécies *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari* estão entre as mais frequentemente implicadas em infecções alimentares em humanos [9]. Com relação aos suínos, *C. coli* é a espécie que mais tem sido isolada do sistema gastrointestinal desses animais [20]. Os suínos podem ser portadores assintomáticos de *Campylobacter* spp., o que aumenta a probabilidade de contaminação das carcaças durante o processo de abate [11].

Um dos fatores de patogenicidade de *Campylobacter*, responsável pelos sinais clínicos em humanos, é a toxina citoletaldistensiva (CDT), composta pelas subunidades proteicas *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*, codificadas pelos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*, respectivamente. É necessária a expressão dos três genes para que a proteína esteja na sua forma ativa e possa penetrar nas células [24].

O isolamento de *Campylobacter* spp. de suínos no abate e nos produtos finais têm sido reportado em vários países [4,23], incluindo o Brasil [3,19]. Entretanto, muito pouco é conhecido sobre as fontes de contaminação no fluxograma de abate e a forma de disseminação desses microrganismos nos estabelecimentos processadores.

Considerando a possibilidade dos suínos serem portadores de *Campylobacter* spp. desde a granja ou de seus produtos serem contaminados no próprio frigorífico, o objetivo deste trabalho foi rastrear *Campylobacter* spp. no fluxograma de abate de suínos para identificar as fontes de contaminação e pesquisar a presença dos genes *cdt* nos isolados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta das amostras

Quarenta suínos de uma granja de ciclo completo, localizada no sul do Rio Grande do Sul, foram acompanhados durante o fluxograma de abate em frigorífico legalmente estabelecido no sul do Rio Grande do Sul, cadastrado e inspecionado pela Divisão de Inspeção Sanitária de Produtos de Origem Animal da Secretaria de Agricultura, Pecuária e Irrigação do Estado. Foram realizadas coletas de amostras de fezes para a pesquisa de *Campylobacter* spp. duas semanas antes do carregamento para o abate (tempo necessário

para o processamento das amostras em laboratório), com o uso de propés descartáveis, caminhando em diferentes direções no interior das baias. Em seguida, com o auxílio de zaragoas estéreis, foram coletadas amostras do material do propé, totalizando três amostras por baia. Imediatamente após a coleta, o material foi encaminhado ao laboratório em meio de transporte Cary Blair¹ em caixa isotérmica com gelo. Foram acompanhados 20 animais de cinco baias em que foi identificada a presença de *Campylobacter* spp. nas amostras de fezes coletadas na granja e 20 animais de cinco baias em que o microrganismo não foi isolado.

Quatro animais de cada baia foram identificados com brincos e acompanhados durante o fluxograma de abate. Foram coletadas amostras de fezes após a insensibilização, através da introdução de uma zaragatoa no reto do animal. Através da fricção de uma zaragatoa em uma área de 100 cm² delimitada por gabarito de aço inoxidável esterilizado foram coletadas amostras após a depiladeira, na superfície da pele, a 15 cm da linha de dorso, iniciando a medida a partir da 5^a costela; após a abertura da cavidade abdominal, na superfície interna da carcaça, a 10 cm das articulações das costelas com as vértebras, iniciando a medida a partir da 5^a costela; e imediatamente antes da carcaça entrar na câmara fria, na superfície da pele, a 15 cm da linha de dorso, iniciando a medida a partir da 5^a costela. Também foram coletadas amostras da papada, através da fricção de uma zaragatoa na superfície interna da papada, e da água utilizada no tanque de escaldagem, antes de iniciar o abate de cada baia e após a passagem dos animais, em frascos de vidro esterilizados, em quantidade aproximada de 50 mL.

Obtenção dos isolados

Para isolamento de *Campylobacter* spp., as zaragoas com as amostras foram diretamente semeadas em superfície de Columbia Blood Agar Base², adicionado de 0,4% (m/v) de carvão ativado, 5% (m/v) de suplemento de solução redutora de oxigênio FBP [6] e 1% (m/v) de suplemento *Campylobacter* I¹ com mistura de antibióticos. As placas foram incubadas a 42°C por 48 h em atmosfera de microaerofilia (85% N₂, 10% CO₂, 5% O₂).

As colônias típicas, com brilho d'água e espalhadas, foram analisadas morfo-tintorialmente pela coloração de Gram. As colônias com morfologia típica de bastonetes delgados, em forma de S ou asa de gaivota foram testadas para a produção das enzimas

catalase e oxidase. As culturas dos isolados catalase e oxidase positivas foram criopreservadas em meio estoque (1 mL de glicerol, 8 mL de Caldo *Brucella* e 1 mL de Soro Fetal Bovino).

Identificação e análise dos isolados

O DNA dos isolados suspeitos de *Campylobacter* spp. foi extraído [17] e analisado através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para identificação das espécies *C. jejuni* e *C. coli* [8]. Após a identificação da espécie, foi realizada a pesquisa genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* através da técnica de multiplex PCR [12].

Os perfis moleculares dos isolados foram determinados por rep-PCR [15], utilizando o *primer* (GTG)5 (GTGGTGGTGGTGGTG) [22].

RESULTADOS

Das 200 amostras coletadas de suínos, 19 (9,5%) albergavam *Campylobacter* spp., sendo 13 (6,5%) de animais oriundos de baias positivas e 6 (3%) de animais de baias negativas. Destes, 7 (36,8%) foram isolados das amostras de fezes obtidas do reto e 7 (36,8%) da superfície da pele na pós-evisceração. Os outros 5 (26,3%) foram isolados das carcaças na entrada da câmara fria (Tabela 1). As baias consideradas como negativas foram aquelas em que não houve o isolamento da bactéria nas fezes coletadas duas semanas antes do

abate. Todos os isolados obtidos no estudo foram identificados como *C. coli* e nenhum deles apresentava os genes *cdt*.

Em relação aos animais provenientes das baias positivas, na baía 1, o isolado da granja foi indistinguível do isolado obtido do suíno 3 antes da entrada na câmara fria. Na baía 2, a cepa isolada da granja foi intimamente relacionada com as cepas obtidas do animal 3, enquanto que a cepa isolada do animal 1 foi considerada diferente. Os animais da baía 3 apresentaram dois isolados diferentes entre si e diferentes daquele obtido na granja. Na baía 4, os isolados obtidos do animal 2 após a evisceração e na entrada da câmara fria foram considerados intimamente relacionados, mas diferentes da granja.

Quanto aos animais provenientes de baias negativas, observou-se que na baía 1 os isolados obtidos do reto e após a evisceração foram considerados intimamente relacionados. Já os isolados das demais baias foram considerados diferentes.

Não houve similaridade entre os isolados obtidos de baias/lotes diferentes.

DISCUSSÃO

Todos os 19 (100%) isolados obtidos foram identificados como *C. coli*, confirmando resultados de outras pesquisas [1,2,21] que também relatam a maior ocorrência dessa espécie em suínos.

Tabela 1. Presença de *Campylobacter* spp. na granja e no fluxograma de abate de suínos.

Baía	Água inicial	Reto ^a	Após depiladeira	Após evisceração	Entrada na câmara fria	Papada	Água final
Positivas^b							
1	-	----	----	----	--+-	----	-
2	-	--+-	----	--+-	+---	----	-
3	-	+---	----	---+	----	----	-
4	-	----	----	++--	++--	----	-
5	-	--+-	----	++--	----	----	-
Negativas							
6	-	--+-	----	--+-	----	----	-
7	-	--++	----	----	----	----	-
8	-	+---	----	----	---+	----	-
9	-	----	----	----	----	----	-
10	-	----	----	----	----	----	-

^aNas colunas onde aparecem quatro símbolos (+ ou -), cada um corresponde a um suíno. A ordem dos animais é a mesma em toda linha. Ausência de *Campylobacter* (-); presença de *Campylobacter* (+). ^bPositivas: baias com presença de *Campylobacter* nas amostras de fezes; Negativas: baias com ausência de *Campylobacter* nas amostras de fezes.

Os isolados obtidos neste estudo foram analisados pela técnica de rep-PCR para avaliar a similaridade entre os padrões de bandas obtidos. Através desta comparação, foi possível considerar possíveis fontes de contaminação das carcaças, identificando a persistência das cepas no decorrer do fluxograma.

Na baía 1, o isolado na granja foi indistinguível do isolado do suíno 3 obtido antes da entrada na câmara fria. Da mesma forma, na baía 2, a cepa isolada da granja era similar às cepas do animal 3 obtidas do reto e após a evisceração. Estas constatações indicam que a contaminação teve origem na granja e que as boas práticas durante o processamento foram falhas, pois os animais se mantiveram contaminados durante o fluxograma.

Dos animais 1 da baía 3 e 3 da baía 5 foram obtidos isolados do reto distintos dos isolados da granja. É possível que esses animais já estivessem contaminados, mas só passaram a eliminar a bactéria nas fezes posteriormente, devido a situações de estresse, como o transporte e o jejum, que podem aumentar a taxa de excreção de microrganismos patogênicos [16]. Outra possibilidade é que as cepas que esses animais albergavam não estivessem presentes nas amostras de fezes obtidas do chão das baias. Essas considerações também podem explicar o isolamento de *C. coli* do reto de animais das baias 6, 7 e 8, que não apresentaram o microrganismo nas amostras da granja, adicionando-se ainda a possibilidade de que os animais tenham se contaminado na granja, posteriormente à coleta das fezes.

Os isolados obtidos do animal 1 da baía 2 antes da câmara fria, do animal 4 da baía 3 após a evisceração e dos animais 1 e 2 da baía 4 e 1 e 2 da baía 5 após a evisceração e antes da câmara fria foram todos distintos dos isolados obtidos na granja, indicando que a fonte de contaminação teve origem no interior da planta frigorífica. Embora não tenham sido isoladas cepas idênticas de diferentes animais no fluxograma de abate, a ocorrência de contaminação cruzada dentro do frigorífico, através do contato com fômites contaminadas por outros animais não pode ser descartada. Por outro lado, a similaridade entre os isolados do animal 2 da baía 4 obtidos após a evisceração e na entrada da câmara fria, assim como entre os isolados do animal 3 da baía 1 obtido na entrada da câmara fria e o isolado oriundo da granja, e também entre os isolados do animal 3 da baía 6 obtidos do reto e após a evisceração demonstram que a contaminação se manteve entre uma etapa e outra e mesmo, no último caso, durante todo o fluxograma até a chegada à câmara

fria. Estes resultados indicam que as boas práticas no manejo higiênico-sanitário adotadas durante o processamento foram falhas.

A ausência de similaridade entre as cepas isoladas de baias/lotes diferentes, indica que não houve persistência de cepas tanto na granja quanto no frigorífico. As coletas foram realizadas no período de um ano, tendo um espaçamento entre elas de pelo menos um mês, o que pode ter influenciado na não persistência da cepa e possibilitado a entrada de novas estirpes.

Sete (36,8%) amostras coletadas na etapa pós-evisceração apresentaram *C. coli*. Durante a evisceração, o rompimento do intestino pode representar uma fonte de contaminação de carcaça [7], uma vez que a contaminação acontece, geralmente, a partir da bactéria presente no conteúdo intestinal¹. Tecidos linfóides de suínos, como linfonodos, também podem albergar *Campylobacter* e a contaminação pode ocorrer se as operações de evisceração causarem o rompimento dos mesmos [13]. Outro fator de risco nesta etapa é a oclusão do reto mal feita. A oclusão do reto é uma etapa que ocorre antes da evisceração, com o objetivo de evitar a contaminação fecal da carcaça nas etapas posteriores. Consiste em realizar uma ligadura com linha resistente ou uso de grampos de aço inoxidável [14]. Se não for bem realizada, esta etapa pode acarretar em extravasamento do conteúdo fecal durante a evisceração, contaminando assim a carcaça.

Cinco carcaças estavam contaminadas com *C. coli* imediatamente antes da entrada nas câmaras frias. *Campylobacter* spp. podem sobreviver, apesar de não conseguirem se multiplicar, em alimentos em temperaturas de refrigeração (-1 a 5°C) por uma a três semanas [9]. Logo, o elevado percentual de isolamentos (26,3%) obtidos pode representar um problema, uma vez que a contaminação das carcaças que entram neste setor pode se manter até o alimento chegar ao consumidor.

Nenhuma amostra de água do tanque de escaldagem estava contaminada com *C. coli* e não foram obtidos isolados nas coletas realizadas após a depiladeira. O calor aplicado durante a escaldagem, quando adequado, é capaz de reduzir de forma eficiente os níveis de bactérias [5].

C. coli não foi isolado das amostras de papada. Este resultado é importante do ponto de vista higiênico-sanitário, uma vez que a papada é utilizada como matéria-prima para a produção de embutidos, podendo ser considerada potencial fonte de contaminação destes produtos.

Nenhum isolado foi positivo para a presença dos genes *cdt*. A presença destes genes tem sido reportada como menos comum em *C. coli* [18]. Embora alimentos contaminados com cepas de *Campylobacter* spp. sem a presença dos genes *cdt* causem menos danos que os contaminados com cepas portadoras, a atenção com a qualidade higiênico-sanitária de alimentos deve ser ressaltada, uma vez que a capacidade da bactéria provocar sintomatologia independe da produção da toxina [10].

CONCLUSÃO

C. coli é a principal espécie de *Campylobacter* presente no trato intestinal de suínos. Os animais, uma vez contaminados, podem carrear o microrganismo durante as etapas do fluxograma de abate. A granja de origem é uma importante fonte de contaminação durante o processamento, entretanto as contaminações cruzadas também têm papel relevante.

A evisceração foi considerada a etapa mais crítica, devido ao maior número de isolamentos nas amostras obtidas logo após este procedimento, ressaltando a importância dos cuidados de manejo higiênico-sanitário nesta etapa.

Os genes *cdt* não foram encontrados nos isolados obtidos no estudo.

MANUFACTURERS

¹HimediaLaboratoriesPvtLtd. Mumbai, India.

²AcumediaManufacturers Inc. Lansing, MI, USA.

Acknowledgements. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento da pesquisa.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of paper.

REFERENCES

- 1 Alter T., Gaull F., Kasimir S., Gürtler M., Mielke H., Linnebur M. & Fehlhaber K. 2005. Prevalences and transmission routes of *Campylobacter* spp. strains within multiple pig farms. *Veterinary Microbiology*. 108: 251-261.
- 2 Andrade L.A.F., Esteves W.T.C., Thomé J.D.S. & Filgueiras A.L.L. 2014. Bactérias termofílicas do gênero *Campylobacter* em suínos do estado do Rio de Janeiro. *Vigilância Sanitária em Debate*. 2(1): 46-50.
- 3 Biasi R.S., Macedo R.E.F., Malaquias M.A.S. & Franchin P.R. 2011. Prevalence, strain identification and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. isolated from slaughtered pig carcasses in Brazil. *Food Control*. 22(5): 702-707.
- 4 Bohaychuk V.M., Gensler G.E. & Barrios P.R. 2011. Microbiological baseline study of beef and pork carcasses from provincially inspected abattoirs in Alberta, Canada. *Canadian Veterinary Journal*. 52(10): 1095-1100.
- 5 Bolton D.J., Pearce R.A., Sheridan J.J., Blair I.S., McDowell D.A. & Harrington D. 2002. Washing and chilling as critical control points in pork slaughter hazard analysis and critical control point (HACCP) systems. *Journal of Applied Microbiology*. 92: 893-902.
- 6 George H.A., Hoffmann P.S., Krieg N.R. & Smibert R.M. 1978. Improved media for growth and aerotolerance of *Campylobacter fetus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 8: 36-41.
- 7 Guise H.J., Penny R.H.C., Baynes P.J., Abbott T.A., Hunter E.J. & Johnston A.M. 1995. Abattoir observations of the weights of stomachs and their contents in pigs slaughtered at known time after their last feed. *British Veterinary Journal*. 151(6): 659-670.
- 8 Harmon K.M., Ransom G.M. & Wesley I.V. 1997. Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by polymerase chain reaction. *Molecular Cell Probes*. 11: 195-200.
- 9 Hunt J.M., Abeyta C. & Tran T. 2001. *Campylobacter*. Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual (BAM). Chapter 7. Disponível em: <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm072616.htm>. [Accessed online in January 2017].
- 10 Jain D., Prasad K.N., Sinha S. & Husain N. 2008. Differences in virulence attributes between cytolethal distending toxin positive and negative *Campylobacter jejuni* strains. *Journal of Medical Microbiology*. 57: 267-272.
- 11 Malakauskas M., Jorgensen K., Nielsen E.M., Ojeniyi B. & Olsen J.E. 2006. Isolation of *Campylobacter* spp. from a pig slaughterhouse and analysis of cross-contamination. *International Journal of Food Microbiology*. 108: 295-300.
- 12 Martínez I., Mateo E., Churrua E., Girbau C., Alonso R. & Fernandez-Astorga A. 2006. Detection of *cdtA*, *cdtB*, and *cdtC* genes in *Campylobacter jejuni* by multiplex PCR. *International Journal of Medicine Microbiology*. 296: 45-48.

- 13 Nesbakken T., Ecner K., Hoidal H.K. & Rotterud O.J. 2003. Occurrence of *Yersinia enterocolitica* and *Campylobacter* spp. in slaughter pigs and consequences for meat inspection slaughtering, and dressing procedures. *International Journal of Food Microbiology*. 80: 231-240.
- 14 Brasil. 1995. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria nº711, de 01/11/1995. Aprova as normas técnicas de instalações e equipamentos para abate e industrialização de suínos. *Diário Oficial da União*. 03 nov. 1995, Seção I, p.17625.
- 15 Rasschaert G., Houf K., Imberechts H., Grijspeerd K., De Zutter L. & Heyndrickx M. 2005. Comparison of Five Repetitive-Sequence-Based PCR Typing Methods for Molecular Discrimination of *Salmonella enterica* Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 43(8): 3615-2623.
- 16 Rosenfold K. & Andersen H.J.A. 2003. Factors of significance for pork quality - a review. *Meat Science*. 64: 219-237.
- 17 Sambrook J. & Russel D.W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1200p.
- 18 Silva D.T., Tejada T.S., Cunha C.C., Lopes N.A., Agostinetto A., Collares T., Leon P.P.M. & Timm C.D. 2014. Ocorrência de *Campylobacter* em carne de frango, fezes de frango e humanas e pesquisa dos genes *cdt*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 66(1): 297-304.
- 19 Silva G.O., Carvalho A.F., Miyashiro S., Nassar A.F.C., Piatti R.M. & Scarcelli E. 2012. Detecção de fatores de virulência em estirpes de *Campylobacter* spp. isoladas de carcaças de suínos abatidos em frigoríficos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 64(5): 1209-1215.
- 20 Steinhäuserova I., Fojtikova K. & Matiasovic J. 2001. Subtyping of *Campylobacter* spp. strains and their incidence in piglets. *Acta Veterinaria Brunensis*. 70: 197-201.
- 21 Varela N.P., Friendship R.M. & Dewey C.E. 2007. Prevalence of *Campylobacter* spp. isolated from grower-finished pigs in Ontario. *Canadian Veterinary Journal*. 48(5): 515-517.
- 22 Versalovic J., Schneider M., De Bruijn F.J. & Lupski J.R. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria with repetitive sequencebased polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*. 5: 25-40.
- 23 Wang J.P., Yeh K.S., Hsieh M.W., Fang C.Y., Chen Z.W. & Lin J.H. 2013. Pathogenic microbiological baseline survey of pork carcasses in Taiwan. *Journal of Food Protection*. 6: 928-1108.
- 24 Young K.T., Davis L.M. & Dirita V.J. 2007. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nature Reviews*. 5: 665-679.

