

Caracterização de estirpes de *Campylobacter coli* isoladas de carcaças de ovinos e de efluentes de abatedouro do estado de São Paulo

[*Characterization of Campylobacter coli strains isolated from the carcasses of sheep and of wastewater of abattoir in the state of São Paulo*]

R.C. Fredrigo¹, A.F. Carvalho², A.F.C. Nassar², P.F. Kobayashi¹,
A.M. Costa¹, S. Miyashiro², E. Scarcelli^{2*}

¹Programa de Pós-graduação – Instituto Biológico – São Paulo, SP

²Instituto Biológico – São Paulo, SP

RESUMO

Doença bacteriana zoonótica, a campilobacteriose é responsável mundialmente por frequentes casos de gastroenterite humana. *Campylobacter* spp. apresenta fator de virulência associado à diarreia, denominado toxina citoletal distensiva (CDT), sendo codificado pelos genes do complexo *cdt*. Os objetivos do presente estudo foram: 1) isolar e identificar estirpes de *Campylobacter* spp. de 102 suabes de carcaças e 102 suabes retais de ovinos (*Ovis aries*) e de sete amostras de água dos efluentes, antes e depois do tratamento de desinfecção de abatedouro localizado no estado de São Paulo; e 2) detectar, pela técnica de multiplex-PCR, a presença do complexo de genes *cdt*. Foram isoladas e identificadas, por métodos fenotípicos e genotípicos, sete estirpes de *Campylobacter coli* provenientes de 4/102 (3,92%) das amostras de suabes retais, 1/102 (0,98%) de suabes de carcaças e 2/7 (28,5%) das águas dos efluentes. Dos isolados de suabes retais, em 2/7 (28,6%) estirpes foi detectada a presença dos genes *cdt*. Trata-se do primeiro relato de isolamento de estirpes de *Campylobacter coli* provenientes de abatedouro de ovinos e das estirpes portadoras do complexo de genes *cdt* nessa espécie animal no Brasil.

Palavras-chave: ovinos, *Campylobacter coli*, abatedouro, complexo *cdt*, efluentes

ABSTRACT

A zoonosis and bacterial disease, campylobacteriosis is responsible for frequent cases of human gastroenteritis worldwide. *Campylobacter* spp. presents the virulence factor called cytolethal distensive toxine (CDT), responsible for diarrhea and codified by the *cdt* gene. The aims of this study were: 1) to isolate and identify *Campylobacter* spp. strains from 102 carcass swabs and 102 rectal swabs of sheep (*Ovis aries*) and seven samples of wastewater, before and after the disinfection treatment, collected from the abattoir of the state of São Paulo; and 2) to detect the presence of *cdt* gene complex by Multiplex-PCR in strains of *Campylobacter* spp. Seven strains of *Campylobacter coli* were isolated and identified by phenotypic and genotypic methods: 4/102 (3.92%) from rectal swabs, 1/102 (0.98%) from carcass swabs and 2/7 (28.5%) from wastewater. From the rectal swab samples 2/7 (28.6%) strains were detected with the *cdt* gene. This is the first report on the isolation of *Campylobacter coli* from sheep abattoir, and of strains carrying the *cdt* gene complex in this animal species in Brazil.

Keywords: sheep, *Campylobacter coli*, abattoir, *cdt* complex, wastewater

INTRODUÇÃO

O rebanho brasileiro de ovinos é de aproximadamente 17,6 milhões (IBGE, 2011) concentrados em maiores números nas regiões

Nordeste e Sul do Brasil, com representatividade também nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e Norte do país.

O estímulo para a maior produção de ovinos de corte resultou no aumento do número de animais

Recebido em 23 de março de 2015

Aceito em 16 de setembro de 2015

*Autor para correspondência (*corresponding author*)

E-mail: pinheiro@biologico.sp.gov.br

abatidos. Apesar do crescimento na produção desse tipo de carne nos últimos anos, o Brasil ainda realiza importações, principalmente de países como Uruguai, Argentina e Nova Zelândia, para abastecer o mercado consumidor, visto que a oferta constante de carne ovina de alta qualidade e de cortes padronizados ainda é insuficiente (Viana, 2008). Atualmente a caprino-ovicultura de corte brasileira vem enfrentando grandes desafios, que culminam em sua estagnação, sendo a abrangente informalidade, desde a criação animal até o momento do abate, uma notória realidade nessa cadeia produtiva (Melo *et al.*, 2008; Simplicio, 2011).

Espécies do gênero *Campylobacter* spp. podem ser hospedeiras do trato gastrointestinal de ovinos, principalmente *Campylobacter jejuni*, *C. coli* e *C. fetus* subsp. *fetus* (OIE, 2012). Entre os alimentos de origem animal, as carcaças e as vísceras têm sido motivo de alerta, devido à possível ocorrência de contaminação com as fezes durante as operações da linha de abate, sendo uma via potencial de transmissão desse patógeno de origem alimentar para os humanos. Nos abatedouros, observa-se uma oscilação da contaminação das carcaças em relação aos processos convencionais de evisceração, dependendo da planta de processamento industrial. Há escassez de pesquisas sobre a ocorrência de *Campylobacter* spp. em ovinos, tanto como agente causador de abortamentos como contaminante das fezes e, conseqüentemente, das carcaças destinadas ao abate (Alterkruse *et al.*, 1999; Horrocks *et al.*, 2009).

A toxina mais estudada produzida por estirpes de *C. coli*, *C. jejuni* e *C. fetus* subsp. *fetus* denomina-se toxina citoletal distensiva (CDT), codificada pelo complexo de genes *cdt*, que consiste de três genes adjacentes denominados *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*. Esse fator de virulência é responsável pela alteração morfológica das células intestinais, produzindo distensão progressiva e posterior morte celular, devido ao acúmulo intracelular de 3'5'-adenosina-monofosfato-cíclico (AMPC) (Martinez *et al.*, 2006; Asakura *et al.*, 2008). De acordo com Asakura *et al.* (2007), a presença dos três genes é requerida para a indução da plena atividade da toxina. Martinez *et al.* (2006) relatam que estirpes de *Campylobacter* spp. podem sofrer

mutações nas regiões do gene *cdt* e conseqüentemente comprometer a expressão da atividade toxigênica. Diferentemente de outras toxinas produzidas por bactérias entéricas, a CDT é inativada quando submetida à temperatura de 70°C por 15 minutos ou pela tripsina (Forsythe, 2002).

O presente trabalho teve como objetivos: 1) isolar e identificar por métodos fenotípicos e genotípicos estirpes de *Campylobacter* spp. de amostras de carcaças e fezes de ovinos, assim como da água de efluentes de abatedouro localizado no estado de São Paulo; 2) detectar nas estirpes de *Campylobacter* spp., pela técnica da multiplex-PCR, a presença do complexo de genes *cdt*, responsável pela expressão do fator de virulência da produção da toxina citoletal distensiva (CDT).

MATERIAL E MÉTODOS

Entre 2010 e 2012, foram colhidas 204 amostras originárias de ovinos (*Ovis aries*), sendo 102 suabes de carcaças e 102 suabes retais. Os ovinos foram abatidos em abatedouro localizado no estado de São Paulo, sob fiscalização do Serviço de Inspeção Estadual (Serviço de Inspeção do Estado de São Paulo – SISPE), com capacidade de abate/dia de cerca de 300 animais. Nesse estabelecimento, também eram abatidos bovinos e suínos, separadamente.

Foram colhidas sete amostras da água dos efluentes, sendo quatro das águas colhidas antes do tratamento de desinfecção do abatedouro e três após o tratamento, nos dias de abate dos ovinos.

As amostras foram obtidas por meio de esfregaços da região dorsal e lateral do lado interno da carcaça, atingindo todo o comprimento do animal, pós-evisceração e antes do processo de lavagem e acondicionamento em câmara fria. Após a colheita, os suabes de carcaças foram introduzidos em tubos contendo 5mL de meio infusão cérebro coração (BHI, Difco-BBL - USA). Utilizou-se o meio Cary Blair (Difco-BBL - USA) para o transporte da amostra retal, colhida antes da evisceração. Sendo o Cary Blair um meio de transporte semissólido, as fezes contidas nos suabes retais foram suspensas em 5mL de meio BHI (Difco-BBL - USA). As amostras de água dos efluentes

Caracterização de estirpes...

antes e depois do tratamento de desinfecção foram colhidas em frascos estéreis (coletor universal) de 80 mL. Todas as amostras foram transportadas em caixas isotérmicas, com gelo reciclável, à temperatura de 2°C a 8°C, e processadas no mesmo dia da colheita.

As amostras de carcaças e reto foram submetidas ao procedimento bacteriológico para isolamento e identificação bioquímica de *Campylobacter* spp.: 100µL das suspensões em meio BHI (Difco-BBL - USA) dos suabes retais e de carcaças foram aplicados em meio ágar Brucella (Difco-BBL - USA), adicionado de 5% de sangue desfibrinado de carneiro e suplemento antibiótico (Laborclin - Brasil) seletivo para *Campylobacter* spp., composto por polimixina B (1.000UI/L), cicloheximida (20mg/L), novobiocina (5mg/L) e bacitracina (15.000UI/L). Em sequência, 2mL de cada suspensão foram filtrados em membrana de éster de celulose (Millipore - França), com poros de 0,65µm, utilizando-se suporte plástico (*swinex* - Millipore - França) e seringas estéreis, sendo 100µL desse filtrado aplicados em meio ágar Brucella sangue. As placas foram incubadas por 48-72 horas, em estufa de microaerofilia (5% CO₂, 10% O₂), a 37°C (Castro *et al.*, 1997; Scarcelli *et al.*, 1998; OIE, 2012).

Após o período de incubação, as colônias suspeitas foram classificadas por meio de métodos presuntivos para o gênero *Campylobacter* (coloração de Gram, observação de mobilidade em microscópio de campo escuro e teste de oxidase), e a identificação complementar espécie-específica foi realizada pelas provas bioquímicas: catalase, formação de H₂S em meio de tríplex açúcar ferro (TSI), hidrólise do hipurato, sensibilidade ao ácido nalidixico (30µg) e à cefalotina (30µg) (OIE, 2012).

As amostras de água dos efluentes antes e depois do tratamento de desinfecção foram submetidas a duas centrifugações sucessivas. Oitenta mililitros foram centrifugados a 3.000 X g (Super T21-Sorval - USA) por 15 minutos, visando à

decação de grandes partículas em suspensão, e três mililitros do sobrenadante foram centrifugados a 14.000 X g (5415C-Eppendorff - Alemanha) por 15 minutos, objetivando a concentração das células bacterianas. Dois mililitros do sobrenadante mais o sedimento de cada amostra de água foram submetidos ao procedimento bacteriológico para isolamento de *Campylobacter* spp., como descrito anteriormente (Castro *et al.*, 1997; OIE, 2012).

Para os testes genotípicos, as estirpes de *Campylobacter* spp. isoladas tiveram seu DNA extraído pelo *kit* comercial Ilustra Bacterial Genomic PREP Mini Spin (GE Healthcare-USA), segundo especificações do fabricante. O DNA obtido foi conservado à temperatura de -20°C. Visando confirmar a positividade das estirpes identificadas presuntivamente pelas provas bioquímicas, foi pesquisada a presença do gene gênero-específico para detecção de *Campylobacter* spp. O DNA extraído foi submetido à amplificação por meio da PCR, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores da região 16S rRNA, que corresponde a um fragmento de 1004pb, segundo Marshall *et al.* (1999). Os iniciadores empregados foram: CAH 16S 1a 5'-AAT ACA TGC AAG TCG AAC GA-3' e CAH 16S 1b 5'-TTA ACC CAA CAT CTC ACG AC-3' (Tab. 1).

Com o objetivo de também confirmar pela PCR a triagem inicial realizada pelas provas bioquímicas complementares para *Campylobacter coli*, foi pesquisada a presença do gene codificante da enzima aspartoquinase, utilizando-se os nucleotídeos iniciadores que correspondem a um fragmento de 500pb, segundo Linton *et al.* (1997): CC18F 5'-GGT ATG ATT TCT ACA AAG CGA G-3' e CC519R 5'-ATA AAA GAC TAT CGT CGC GTG-3' (Tab. 1).

O DNA das estirpes de *Campylobacter coli* isoladas foi submetido à técnica da multiplex-PCR (Tab. 1), com iniciadores (Tab. 2) e metodologia descritos por Asakura *et al.* (2008) para detecção dos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*.

Tabela 1. Descrição das condições das reações de PCR convencional empregadas

Alvo - PCR	Reação	Termociclador/ controles	Ciclos
<i>Campylobacter</i> spp. 16S rRNA	Volume final de reação de 50µL: tampão PCR 10 X (500mM de KCl, 15mM de Mg Cl ₂ , 100mM de TRIS-HCl, pH 9,0); 1,5mM de Mg Cl ₂ ; 200mM de dNTPs (200mM de cada nucleotídeo dCTP, dATP, dGTP, dTTP); 50pmol de cada iniciador (CAH 16S 1a e CAH 16S 1b); 2,5U de <i>Taq</i> DNA polimerase (Invitrogen-USA) e 10µL do DNA extraído	PT 200 (MJ Research-USA)/ <i>Campylobacter coli</i> ATCC 47478.	95°C-2 min 30 x 94°C-30 s 52°C-30 s 72°C-90s 72°C-10 min 4°C- ∞
<i>Campylobacter coli</i> aspartoquinase	Volume final de reação de 50µL: tampão PCR 10 X (500mM de KCl, 15mM de MgCl ₂ , 100mM de TRIS-HCl, pH 9,0); 2,5mM de MgCl ₂ ; 200mM de dNTPs (200 mM de cada nucleotídeo dCTP, dATP, dGTP, dTTP); 40pmol de cada iniciador (CC18F e CC519R); 2,5U de <i>Taq</i> DNA polimerase (Invitrogen-USA) e 10µL do DNA extraído		95°C-5 min 25 x 94°C-1 min 60°C-1 min 72°C-1 min 72°C-10 min 4°C- ∞
Multiplex-PCR <i>cdtA</i>, <i>cdtB</i> e <i>cdtC</i>	Volume final de reação de 50µL: tampão PCR 10 X (500mM de KCl, 15mM de Mg Cl ₂ , 100mM de TRIS-HCl, pH 9,0); 1,5mM de Mg Cl ₂ ; 200mM de dNTPs (200mM de cada nucleotídeo dCTP, dATP, dGTP, dTTP); 20pmol de cada <i>primer</i> (<i>CcspAU1</i> , <i>CcspAR1</i> , <i>CcSPBU5</i> , <i>CcSPBR5</i> , <i>CcspCUI</i> e <i>CcspCRI</i>); 1,0U de <i>Taq</i> DNA polimerase (Invitrogen-USA) e 10 µL do DNA extraído		94°C-5 min 30 x 94°C-30 s 55°C-30 s 72°C-30 s 72°C-10min 4°C- ∞

Tabela 2. Sequência dos iniciadores do complexo de genes *cdt* para *Campylobacter coli*, descritos por Asakura *et al.* (2008)

Espécie de <i>Campylobacter</i>	Primers	Sequência	Pares de bBases
	<i>cdtA</i>	<i>CcspAU1</i> 5'-ATTGCCAAGGCTAAAATCTC-3' <i>CcspAR1</i> 5'-GATAAAGTCTCCAAAACACTGC-3'	329
<i>Campylobacter coli</i>	<i>cdtB</i>	<i>CcSPBU5</i> 5'-TTTAATGTATTATTTGCCGC-3' <i>CcSPBR5</i> 5'-TCATTGCCTATGCGTATG-3'	413
	<i>cdtC</i>	<i>CcspCUI</i> 5'-TAGGGATATGCACGCAAAAG-3' <i>CcspCRI</i> 5'-GCTTAATACAGTTACGATAG-3'	313

As análises de todos os produtos amplificados foram realizadas por eletroforese em gel de agarose a 2,0%. Os géis foram corados por brometo de etídeo (0,5µg/mL) e posteriormente fotografados sob luz ultravioleta (300-320nm) pelo sistema de foto-documentação, câmara Kodak Digital DC/120 Zoom, e analisados com o *software* 1D Image Analysis (Kodak Digital Science).

RESULTADOS

Duas estirpes provenientes de suabes retais (R10 e R24), uma de suabe de carcaça (C92) e duas de águas dos efluentes antes da desinfecção (A5 e A6) foram identificadas fenotipicamente pelas provas presuntivas como *Campylobacter* spp. e confirmadas genotipicamente pela PCR, por meio da pesquisa da presença do gene gênero-específico 16S rRNA, para detecção de *Campylobacter* spp. (Fig. 1).

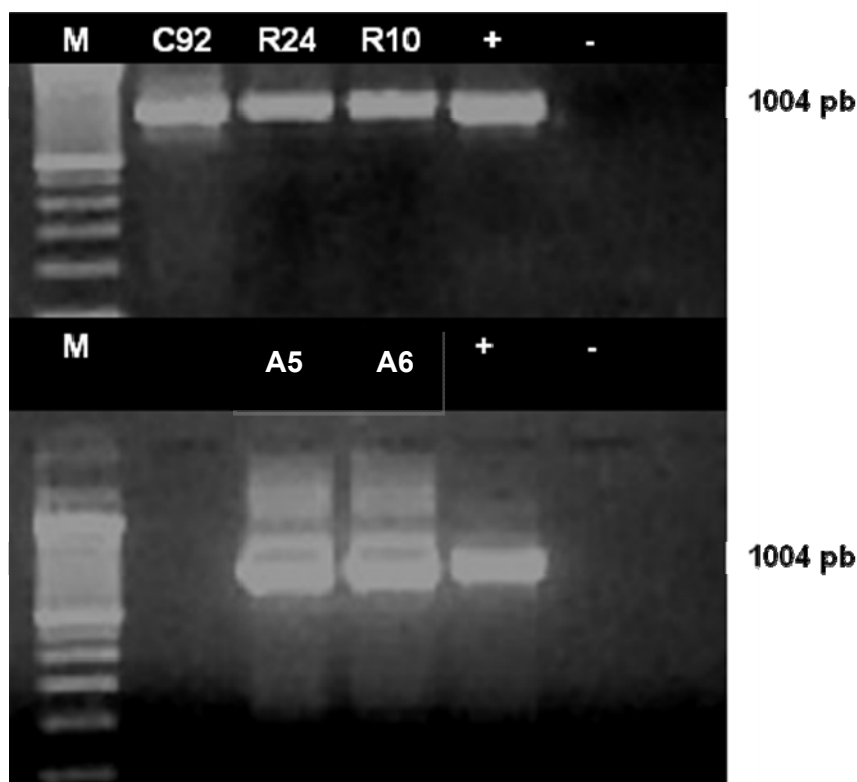


Figura 1. Eletroforese dos produtos amplificados pela PCR para detecção do gene gênero-específico 16S rRNA para *Campylobacter* spp. das amostras isoladas de suabe de carcaça (C92), de suabes retais (R24 e R10) e das águas dos efluentes (A5 e A6). M: marcador de peso molecular (100pb DNA ladder Invitrogen); + controle positivo (*C. coli* ATCC 47478); - controle negativo (água ultrapurificada).

Duas estirpes isoladas de suabes retais (R18 e R66) foram caracterizadas, por meio das provas bioquímicas complementares, como *Campylobacter coli*. Essas estirpes foram confirmadas pela PCR mediante a detecção do gene espécie-específico codificante da enzima aspartoquinase (Tab. 3).

As demais estirpes (R10, R24, C92, A5 e A6) foram previamente classificadas como inconclusivas quanto à espécie pelas provas bioquímicas. Estas apresentaram perfil de resistência aos antibióticos cefalotina e ácido nalidíxico compatível com *C. lari* e *C. coli*, porém, na PCR espécie-específica, foram identificadas como *C. coli* (Tab. 3).

Tabela 3. Resultados das provas bioquímicas e PCR para identificação da espécie de *Campylobacter* spp. das amostras isoladas

Amostras	Oxidase/catalase	Hidrólise do hipurato	Produção de H ₂ S em TSI	Suscetibilidade à cefalotina	Suscetibilidade ao ác. nalidíxico	Identificação bioquímica	Identificação molecular (PCR)
R10	+/+	-	-	R	R*	<i>C. coli/C. lari</i>	<i>C. coli</i>
R18	+/+	-	-	R	S	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>
R24	+/+	-	-	R	R*	<i>C. coli/C. lari</i>	<i>C. coli</i>
R66	+/+	-	-	R	S	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>
C92	+/+	-	-	R	R*	<i>C. coli/C. lari</i>	<i>C. coli</i>
A5	+/+	-	-	R	R*	<i>C. coli/C. lari</i>	<i>C. coli</i>
A6	+/+	-	-	R	R*	<i>C. coli/C. lari</i>	<i>C. coli</i>

(+) Positivo; (-) negativo; (R) resistente; (S) sensível; (R*) resistência atípica.

Do total de suabes retais de ovinos, *Campylobacter coli* foi isolado de 4/102 (3,92%), e das carcaças, *C. coli* foi isolado de 1/102 (0,98%). Das amostras de água dos efluentes antes e depois do tratamento de desinfecção do abatedouro, *C. coli* foi isolado em 2/7 (28,5%) das águas antes da desinfecção.

Foi detectado o complexo de genes *cdt* em 2/7 (28,6%) estirpes de *C. coli* provenientes do reto, e a estirpe da amostra R18 apresentou os três genes adjacentes simultaneamente (*cdtA*, *cdtB* e *cdtC*), enquanto a R66 continha apenas os genes *cdtA* e *cdtC*. (Fig.2).

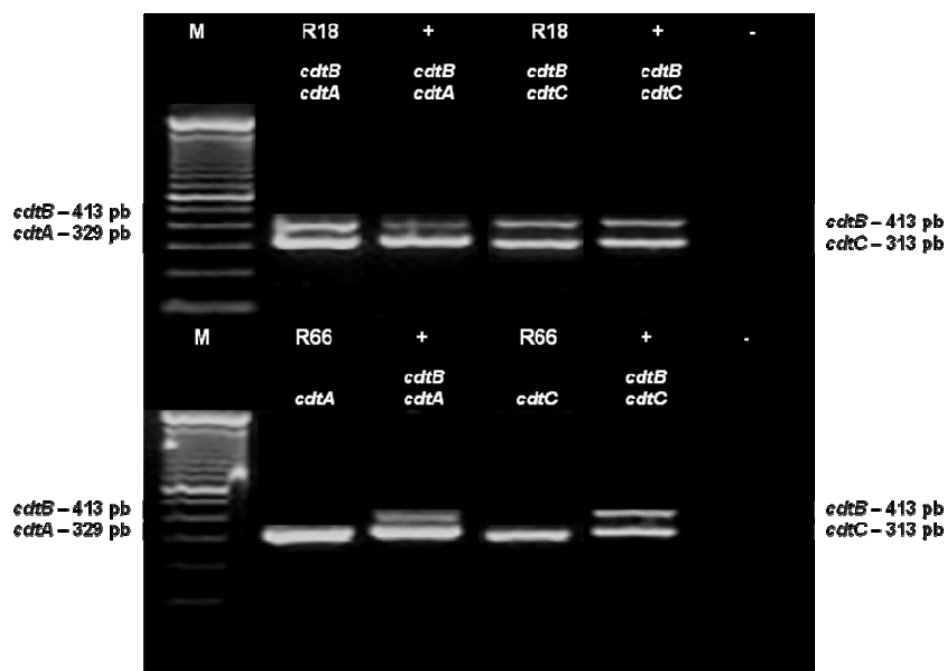


Figura 2. Eletroforese dos produtos amplificados pela PCR para detecção dos genes da toxina CDT (*cdtA*, *cdtB* e *cdtC*) de *Campylobacter coli* das estirpes oriundas das amostras R18 e R66. M: marcador de peso molecular (100pb DNA ladder Invitrogen); colunas R18 a R66: estirpes de *Campylobacter coli*; + controle positivo (*C. coli* ATCC 47478); - controle negativo (água ultrapurificada).

DISCUSSÃO

Os resultados das amostras de fezes do presente estudo são semelhantes aos descritos por outros autores no Brasil, mas inferiores aos relatados em outros países. No Brasil, Scarcelli *et al.* (1998) isolaram *Campylobacter jejuni* de 2/69 (2,9%) das fezes de ovinos provenientes de central de inseminação artificial. Rizzo *et al.* (2011), em rebanhos ovinos do estado de São Paulo, que apresentavam problemas reprodutivos, isolaram *Campylobacter* spp. de 10/274 (3,65%) amostras de fezes.

Em abatedouro da Nigéria, Raji *et al.* (2000) isolaram *Campylobacter* spp. de 7/250 (2,8%) suabes retais de ovinos. Na Suíça, Zweifel *et al.* (2004) obtiveram percentual de isolamento de 17,5% (114/653) para *Campylobacter* spp. oriundos de fezes colhidas do ceco de ovinos em abatedouros. Na Grã-Bretanha, Milnes *et al.* (2008) isolaram *Campylobacter* spp. de 312/713 (43,8%) fezes de ovinos de abatedouro. Garcia *et al.* (2010), mediante pesquisa realizada em abatedouro de ovinos na Escócia, isolaram *Campylobacter* spp. de 39/80 (49%) amostras de fezes.

Cinco estirpes confirmadas pela PCR como *C. coli* foram classificadas como inconclusivas quanto à espécie nas provas bioquímicas, pois apresentaram perfil de resistência aos antibióticos cefalotina e ácido nalidíxico compatível com *C. coli* e *C. lari*. No entanto, *C. lari* é isolada mais frequentemente de humanos, cães e aves. Pelos relatos de ocorrência de *Campylobacter* spp. em ovinos, as espécies predominantes são *C. jejuni*, *C. coli* e *C. fetus* subsp. *fetus*. Os testes moleculares foram decisivos para a definitiva classificação da espécie, o que enfatiza a utilização de ambas as técnicas na caracterização das espécies de *Campylobacter* spp.

Campylobacter coli foi isolado de 1/102 (0,98%) das carcaças. Resultados semelhantes foram observados nos Estados Unidos por Duffy *et al.* (2001), que obtiveram isolamento de *Campylobacter* spp. de 0,3% (7/2.226) das amostras de carcaças de ovinos durante o abate. Varderlinde *et al.* (1999), em pesquisa realizada em 25 abatedouros da Austrália, isolaram *C. jejuni* e *C. coli* em 1,29% de um total de 470 amostras de carcaças de ovinos. No entanto, na

Turquia, Bostan *et al.* (2009) isolaram *Campylobacter* spp. de 26/120 (21,6%) amostras de carcaças de ovinos.

As possíveis fontes de contaminação dos animais de produção por *Campylobacter* spp. são numerosas, portanto é essencial o controle dos pontos de entrada da bactéria, como, por exemplo, controle de reservatórios animais (aves e suínos), de introdução de novos animais no plantel e de fontes de abastecimento de água (Garénaux *et al.*, 2008). Segundo Humphrey *et al.* (2007), os níveis de eliminação desse agente patogênico podem ser maiores nos animais após a chegada ao abatedouro, devido ao estresse sofrido durante o transporte.

Campylobacter coli foi detectado em duas amostras de águas originárias dos efluentes anteriores ao tratamento de desinfecção, inferindo-se que o tratamento das águas pode ser eficaz na diminuição da viabilidade do agente e evitar que ele seja disseminado pelos efluentes do abatedouro. As águas dos efluentes eram compostas por uma mistura complexa (sangue, gordura, resíduos de carne, água de lavagem dos currais, água do banho de aspersão dos animais, água de lavagem da sala de matança e conteúdo do trato gastrointestinal dos ovinos), que promove a concentração do agente e facilita sua dispersão pelas instalações do abatedouro, se não for adequadamente desinfetada.

O gênero *Campylobacter* possui elevada sensibilidade a condições adversas, não sobrevivendo em superfícies ressecadas (Humphrey *et al.*, 2007), sob alta concentração de oxigênio (Quinn *et al.*, 2005) e elevada concentração de cloreto de sódio (Altekruse *et al.*, 1999). As amostras podem apresentar fatores limitantes quando muito contaminadas, congeladas ou aditivadas, os quais prejudicariam o isolamento do agente (Scarcelli *et al.*, 2005) e poderiam justificar a baixa frequência de isolamento de *Campylobacter* spp. do total de amostras.

O fato de os isolados de *C. coli* provenientes de suabes retais de ovinos apresentarem características diversas pode ser um indicativo de que se trata de duas estirpes distintas e de que a estirpe R66 pode ser considerada “mutante”. De acordo com Martinez *et al.* (2006), as estirpes de *Campylobacter* podem sofrer mutações na região

dos genes *cdt*, não apresentando um ou nenhum dos três genes adjacentes, como relatado no caso da amostra R66, em que não foi identificado o gene *cdtB*, podendo consequentemente comprometer a expressão da atividade toxigênica (Asakura *et al.*, 2007). As subunidades *cdtA* e *cdtC* são responsáveis pela ligação com as células suscetíveis, enquanto a subunidade *cdtB* é responsável pela atividade da toxina que, ao entrar no núcleo da célula, apresenta função semelhante à DNase-I, levando a um bloqueio na divisão das células do epitélio intestinal e consequente processo de distensão e morte (Yamasaki *et al.*, 2006).

Acik *et al.* (2013) detectaram os genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* em 54,5%, 55,9% e 52,3%, respectivamente, em estirpes de *Campylobacter* spp. de fezes de ovinos saudáveis na Turquia. Em estirpes de *C. jejuni* isoladas de animais e humanos, Martinez *et al.* (2006) detectaram a ocorrência do complexo de genes *cdt* em 98% (98/100) das estirpes. Bang *et al.* (2003), em 40 isolados de *C. jejuni* e *C. coli* oriundos de 20 amostras de fezes bovinas colhidas em abatedouro da Dinamarca e 20 fezes de suínos colhidas em explorações suinícolas, detectaram o complexo de genes *cdt* em 82,5% (33/40) dos isolados, sendo os genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* identificados em 95%, 100% e 90% dos isolados, respectivamente.

No Brasil, Carvalho *et al.* (2010) detectaram pela primeira vez, utilizando a técnica da multiplex-PCR, os três genes (*cdtA*, *cdtB* e *cdtC*) em 5/13 (38,46%) estirpes de *C. jejuni*, sendo quatro estirpes provenientes de amostras de frangos (n=80) resfriados e uma de amostra de pé de alface lisa (n=40), adquiridos no município de São Paulo. Três estirpes de *C. coli* também foram isoladas, porém nenhuma apresentou os genes *cdt*.

Silva *et al.* (2012) isolaram 31 (15,9%) estirpes de *Campylobacter* spp. em 195 amostras de carcaças, fezes e linfonodos mesentéricos de suínos abatidos em frigoríficos do estado de São Paulo. Pela técnica da multiplex-PCR, foi detectada a presença do complexo de genes *cdt* em 28 estirpes de *C. coli*, as quais apresentavam os três genes simultaneamente, enquanto três estirpes de *C. jejuni* foram negativas para a

detecção desses genes. Os autores detectaram, pela primeira vez no estado de São Paulo, a presença dos genes *cdt* em 100% das estirpes de *C. coli* provenientes de suínos abatidos em frigoríficos, o que configura os suínos, assim como os ovinos, como uma fonte potencial de disseminação de estirpes virulentas de *Campylobacter coli*, tanto para os trabalhadores dos frigoríficos como para os consumidores das carcaças e subprodutos.

Silva *et al.* (2014), no Rio Grande do Sul, analisaram, para pesquisa de *Campylobacter* spp., amostras de conteúdo fecal de aves de corte, de produtos de frango (coxa, sobrecoxa, asa, dorso, carne moída e fígado) e de fezes de humanos. Os autores também pesquisaram a presença dos genes *cdt* pela PCR. A bactéria foi isolada de 61% das amostras de fezes de frango, 20% de produtos de frango e 3% de fezes de humanos. A maioria dos isolados foi determinada como *C. jejuni*, e, destes, 93,5% apresentaram os genes para a toxina CDT, porém, diferentemente do presente estudo, nenhum isolado de *C. coli* apresentou os genes *cdt*.

Pelos resultados obtidos no presente estudo, verifica-se que, em abatedouro do estado de São Paulo, animais da espécie ovina albergam em seu trato gastrointestinal estirpes de *Campylobacter coli* portadoras de genes de virulência, e, durante operações da linha de abate, principalmente após o processo de evisceração, eventuais contaminações das carcaças podem ocorrer por meio do derramamento de material fecal, comprometendo a inocuidade do produto cárneo.

A partir dos evidentes riscos de contaminação, há necessidade de se aplicarem princípios do programa de Análises de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), como controles de temperatura, intervenções químicas e congelamento rápido nas indústrias de processamento, com o objetivo de minimizar a possível contaminação dos produtos (Humphrey *et al.*, 2007). Além disso, outros programas de autocontrole são fundamentais para implantação do APPCC, como as Boas Práticas de Fabricação (BPF) e o Procedimento Padrão de Higiene Operacional (PPHO).

CONCLUSÕES

Campylobacter coli é capaz de contaminar carcaças de ovinos durante a linha de abate e efluentes de abatedouros. O tratamento de desinfecção dos efluentes parece ser eficaz para a eliminação de *C. coli*. Trata-se do primeiro relato de isolamento de *C. coli* proveniente de fezes e de carcaças de ovinos e de águas de efluentes em abatedouro do estado de São Paulo e do primeiro relato de estirpes de *C. coli* portadoras dos genes de virulência do complexo *cdt*, isoladas de ovinos, no Brasil.

REFERÊNCIAS

- ACIK, M.N.; KARAHAN, M.; ONGOR, H. *et al.* Investigation of virulence and cytolethal distending toxin genes in *Campylobacter* spp. isolated from sheep in Turkey. *Foodborne Pathog. Dis.*, v.10, p.589-594, 2013.
- ALTEKRUSE, S.F.; STERN, N.J.; FIELDS, P.I. *et al.* *Campylobacter jejuni* – an emerging foodborne pathogen. *Emerg. Infect. Dis.*, v.5, p.28-35, 1999.
- ASAKURA, M.; SAMOSORNSUK, W.; TAGUCHI, M. *et al.* Comparative analysis of cytolethal distending toxin (*cdt*) genes among *Campylobacter jejuni*, *C. coli* and *C. fetus* strains. *Microb. Pathog.*, v.42, p.174-183, 2007.
- ASAKURA, M.; SAMOSORNUK W.; HINENOYA, A. *et al.* Development of a cytolethal distending toxin (*cdt*) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the detection and identification of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter fetus*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, v.52, p.260-266, 2008.
- BOSTAN, K.; AYDIN, A.; ANG, M.K. Prevalence and antibiotic susceptibility of thermophilic *Campylobacter* species on beef, mutton, and chicken carcasses in Istanbul, Turkey. *Microbial. Drug Resist.*, v.15, p.143-149, 2009.
- BANG, D.D.; NIELSEN, E.M.; SCHEUTZ, F. *et al.* PCR detection of seven virulence and toxin genes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from Danish pigs and cattle and cytolethal distending toxin production of the isolates. *J. Appl. Microbiol.*, v.94, p.1003-1014, 2003.
- CARVALHO, A.F.; SILVA, D.M.; AZEVEDO, S.S. *et al.* Detecção dos genes da toxina citolethal distensiva em estirpes de *Campylobacter jejuni* isoladas de carcaças de frangos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v.62, p.1054-1061, 2010.
- CASTRO, A.G.M.; GENOVEZ, M.E.; SCARCELLI, E. *et al.* Monitoramento de *Campylobacter* spp. ao longo da linha de abate de frangos de corte. *Arq. Inst. Biol.*, v.64, p.21-26, 1997.
- DUFFY, E.A.; BELK, K.E.; SOFOS, J.N. *et al.* Microbial contamination occurring on lamb carcasses processed in the United States. *J. Food Prot.*, v.64, p.503-508, 2001.
- FORSYTHE, S.J. *Microbiologia da Segurança Alimentar*. Porto Alegre: Artmed, 2002.
- GARCIA, A.B.; STEELE, W.B.; TAYLOR, D.J. Prevalence and carcass contamination with *Campylobacter* in sheep sent for slaughter in Scotland. *J. Food Saf.*, v.30, p.237-250, 2010.
- GARÉNAUX, A.; LUCHETTI-MIGANEH, C.; ERMEL, G. *et al.* Better understanding of the *Campylobacter* conundrum. Nova York: Nova Science Publishers, 2008, 151p.
- HORROCKS, S.M.; ANDERSON, R.C.; NISBET, D.J. *et al.* Incidence and ecology of *Campylobacter jejuni* and *coli* in animals. *Anaerobe*, v.15, p.18-25, 2009.
- HUMPHREY, T.; O'BRIEN, S.; MADSEN, M. *Campylobacters* as zoonotic pathogens: a food production perspective. *Int. J. Food Microbiol.*, v.117, p.237-257, 2007.
- PRODUÇÃO da Pecuária Municipal, 2011. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2011/>>. Acessado em: 19 mar. 2015.
- LINTON, D.; LAWSON, A.J.; OWEN, R.J. *et al.* PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. *J. Clin. Microbiol.*, v.35, p.2568-2572, 1997.
- MARSHALL, S.M.; MELITO, P.L.; WOODWARD, D.L. *et al.* Rapid identification of *Campylobacter*, *Acobacter*, and *Helicobacter* isolates by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the 16S r RNA gene. *J. Clin. Microbiol.*, v.37, p.4158-4160, 1999.

- MARTINEZ, I.; MATEO, E.; CHURRUCA, E. *et al.* Detection of *cdtA*, *cdtB*, and *cdtC* genes in *Campylobacter jejuni* by multiplex PCR. *Int. J. Med. Microbiol.*, v.296, p.45-48, 2006.
- MELO, C.B.; ALMEIDA, B.M.; OLIVEIRA, A.A. *et al.* Avaliação de uma metodologia profilática contra a mastite clínica em ovelhas da raça Santa Inês. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.60, p.1011-1013, 2008.
- MILNES, A.S.; STEWART, I.; CLIFTON-HADLEY, F.A. *et al.* Intestinal carriage of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157, *Salmonella*, thermophilic *Campylobacter* and *Yersinia enterocolitica*, in cattle, sheep and pigs at slaughter in Great Britain during 2003. *Epidemiol. Infect.*, v.136, p.739-751, 2008.
- Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. In: MANUAL of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. OIE, 2012. p.1185 - 1191. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.09.03_CAMPYLO.pdf>. Acessado em: 08 fev. 2012.
- QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E. *et al.* (Eds.). *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*. Porto Alegre: ARTMED, 2005. 512p.
- RAJI, M.A.; ADEKEYE, J.O.; KWAGA, J.K. *et al.* Bioserogroups of *Campylobacter* species isolated from sheep in Kaduna State, Nigeria. *Small Rum. Res.* v.37, p.215-221, 2000.
- RIZZO, H.; GREGORY, L.; BERARDI, F. *et al.* Análise de fator de risco e avaliação clínica de ovinos com histórico de distúrbios reprodutivos infectados por *Campylobacter* pertencentes a criatórios do Estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 9., 2011, Goiânia-GO. *Anais... Botucatu: FEPMVZ*, 2011. v.18, p.954-958.
- SCARCELLI, E.; GENOVEZ, M.E.; CARDOSO, M.V. *et al.* Avaliação do potencial de disseminação de *Campylobacter* spp. por diferentes espécies animais. *Arq. Inst. Biol.*, v.65, p.55-61, 1998.
- SCARCELLI, E.; MIYASHIRO, S.; CAMPOS, F.R. *et al.* Detecção de *Campylobacter jejuni* em carcaças e cortes de frangos, pela reação da polimerase em cadeia. *Hig. Alimentar*, v.19, p.71-75, 2005.
- SILVA, G.O.; CARVALHO, A.F.; MIYASHIRO, S. *et al.* Detecção de fatores de virulência em estirpes de *Campylobacter* spp. isoladas de carcaças de suínos abatidos em frigoríficos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.64, p.1209-1215, 2012.
- SILVA, D.T.; TEJADA, T.S.; CUNHA, C. C. *et al.* Ocorrência de *Campylobacter* em carne de frango, fezes de frango e humanas e pesquisa dos genes *cdt* - *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.66, p.297-304, 2014.
- SIMPLÍCIO, A.A. Caprinocultura e ovinocultura de corte no Brasil: pontos para reflexão. *Rev. CFMV*, v.17, p.27-36, 2011.
- VANDERLINDE, P.B.; SHAY, B.; MURRAY, J. Microbiological status of Australian sheep meat. *J. Food Protec.*, v.62, n.4, p.380-385, 1999.
- VIANA, J.G.A. Panorama geral da ovinocultura no mundo e no Brasil. *Rev. Ovinos*, v.4, p.1-9, 2008.
- YAMASAKI, S.; ASAKURA, M.; TSUKAMOTO, T. *et al.* Cytolethal distending toxin (CDT): genetic diversity, structure and role in diarrheal disease. *Toxin Rev.*, v.25, p.61-88, 2006.
- ZWEIFEL, C.; ZYCHOWSKA, M.A.; STEPHAN, R. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. isolated from slaughtered sheep in Switzerland. *Int. J. Food Microbiol.*, v.92, p.45-53, 2004.