



Instituto Politécnico de Castelo Branco
Escola Superior Agrária

Relatório de Estágio

Avaliação da contaminação por *Campylobacter* spp. de amostras de codorniz recolhidas num matadouro

Susete Clara Pereira
Engenharia Biológica e Alimentar

Orientadores:

Prof. Dr.^a Cristina Maria Baptista Santos Pintado

Prof. Dr.^a Maria João dos Ramos Fraqueza

Castelo Branco, Novembro de 2009



Relatório de Estágio

**Avaliação da contaminação por *Campylobacter*
spp. de amostras de codorniz recolhidas num
matadouro**

Susete Clara Pereira
Engenharia Biológica e Alimentar

Orientadores:

Prof. Dr.^a Cristina Maria Baptista Santos Pintado

Prof. Dr.^a Maria João dos Ramos Fraqueza

Castelo Branco, Novembro de 2009

“As doutrinas expressas neste trabalho são da inteira responsabilidade do seu autor”

Local de estágio: Faculdade de Medicina Veterinária, Departamento de Produção

Animal e Segurança Alimentar, Universidade Técnica de Lisboa

Orientador Interno: Prof. Dr.^a Cristina Maria Baptista Santos Pintado

Orientador Externo: Prof. Dr.^a Maria João dos Ramos Fraqueza

Agradecimentos

Na realização do estágio e elaboração do presente trabalho final de curso, várias foram as pessoas que de alguma forma, directa ou indirectamente, prestaram o seu valioso contributo para a sua elaboração e às quais não posso deixar de agradecer:

À minha Família pela dedicação, paciência, incentivo e amizade com que sempre pude contar em todas as etapas da minha vida.

À Professora Doutora Maria João Fraqueza, minha orientadora externa, pela transmissão de conhecimentos, pela disponibilidade e ajuda prestada na elaboração do trabalho escrito. Grata pelo seu apoio, estímulo e amizade ao longo do estágio.

À Técnica Superior Maria José Fernandes e Técnica Profissional Maria Helena Fernandes, pela ajuda prestada durante o trabalho prático e teórico, pela paciência e boa disposição, amizade, motivação, conhecimentos transmitidos e pela possibilidade de colaboração na realização de análises microbiológicas e químicas.

À Faculdade de Medicina Veterinária, pelo facto de ceder a oportunidade de estagiar no laboratório do Departamento de Produção Animal e Segurança Alimentar.

À Professora Doutora Cristina Maria Baptista dos Santos Pintado por ter aceite ser minha orientadora interna, pela confiança que depositou em mim, acreditando nas minhas capacidades para cumprir os objectivos propostos e pela disponibilidade e pela ajuda prestada.

Um muito obrigado também para todos os que, durante a realização deste trabalho, me privilegiaram com a sua amizade.

Índice

Índice de figuras.....	iv
Índice de tabelas.....	v
Resumo.....	vi
Abstract.....	vii
I – Introdução.....	1
II – Revisão Bibliográfica.....	3
1. Campilobacteriose.....	3
1.1. Campilobacteriose humana e Campilobacteriose em aves.....	3
1.2. Campilobacteriose humana em Portugal.....	4
1.3. <i>Campylobacter</i> spp.....	4
1.4. Patogenia e tratamento.....	5
1.5. Fontes de contaminação.....	6
2. Carne de aves.....	6
2.1. Consumo de carne de aves em Portugal.....	6
2.2. Microbiologia da carne.....	7
2.3. Microrganismos indicadores de higiene das carcaças.....	8
2.3.1. <i>Enterobacteriaceae</i>	8
2.3.2. <i>Escherichia coli</i>	9
3. Medidas preventivas para o controlo de <i>Campylobacter</i> spp.....	9
4. Aplicação da metodologia de identificação molecular de <i>Campylobacter</i> spp., PCR <i>Multiplex</i>	12
III – Desenvolvimento Experimental.....	14
1. Material e métodos.....	14
1.1. Recolha de amostras.....	14
1.2. Análise microbiológica.....	15
1.2.1. Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i>	15

1.2.1.1. Preparação da amostra e diluições.....	15
1.2.1.2. Sementeira e incubação	15
1.2.1.3. Contagem de colónias.....	16
1.2.2. Pesquisa e contagem de <i>Campylobacter</i> spp.	16
1.2.2.1. Preparação da amostra	16
1.2.2.2. Contagem de <i>Campylobacter</i> spp.....	17
1.2.2.3. Pré-enriquecimento.....	17
1.2.2.4. Isolamento.....	17
1.2.2.5. Identificação de colónias suspeitas de <i>Campylobacter</i> spp.	18
1.2.2.5.1. Selecção de colónias suspeitas	18
1.2.2.5.2. Caracterização morfológica de colónias suspeitas	18
1.2.2.5.3. Provas Bioquímicas: catalase, oxidase e hipurato.....	18
1.2.2.6. Identificação genética de <i>Campylobacter</i> spp. com base no método de biologia molecular, PCR <i>Multiplex</i>	19
1.2.2.6.1. Extracção de DNA a partir de culturas puras.....	20
1.2.2.6.2. Reacção de PCR <i>Multiplex</i>	20
1.2.2.6.3. Electroforese em gel de agarose	21
1.3. Tratamento estatístico dos resultados	22
2. Apresentação dos resultados.....	22
2.1. Avaliação da qualidade de higiene das carcaças de codorniz	22
2.2. Pesquisa e contagem de <i>Campylobacter</i> spp.....	24
2.3. Comparação dos métodos utilizados para isolamento de <i>Campylobacter</i> em intestino de codorniz.....	30
3. Discussão e conclusões	31
Referências bibliográficas	33

Anexos:

Anexo 1: Consumo de aves e coelhos em Portugal

Anexo 2: Incidência de campilobacteriose na EU

Anexo 3: Fotografias do Procedimento Experimental

Índice de figuras

Figura 1. Electroforese em gel de agarose a 1,5% de produtos da reacção PCR <i>Multiplex</i>	29
Figura I. Incidência de zoonoses em humanos na EU referentes a 2007 (Fonte EFSA, 2009)	Anexo 1
Figura II. Amostra de intestinos de codorniz	Anexo 3
Figura III. Amostra de peles de pescoço.....	Anexo 3
Figura IV. Preparação de peitos cauterizados para análise microbiológica.....	Anexo 3
Figura V. Pesagem de amostra.....	Anexo 3
Figura VI. Homogeneização da suspensão em Stomacher Lab Blender 400.....	Anexo 3
Figura VII. Amostra em meio de enriquecimento em condições de microaerofilia.....	Anexo 3
Figura VIII. Aspecto de colónias de <i>Enterobacteriaceae</i> em placa de meio VRBG	Anexo 3
Figura IX. Aspecto de colónias de <i>Campylobacter</i> spp. em placa de meio mCCD	Anexo 3
Figura X. Aspecto de colónias de <i>Campylobacter</i> spp. em placa de meio de Agar Sangue Columbia.....	Anexo 3

Índice de tabelas

Tabela 1. Amostras recolhidas em diferentes dias de abate	14
Tabela 2. <i>Mix</i> de reagentes da reacção de PCR <i>Multiplex</i> utilizada	21
Tabela 3. Resultados obtidos da contagem de <i>Enterobacteriaceae</i> em pele de pescoço	23
Tabela 4. Resultados obtidos da contagem de <i>Enterobacteriaceae</i> em peito de codorniz	23
Tabela 5. Resultados obtidos da pesquisa de <i>Campylobacter</i> em 25g de amostra de intestinos de codornizes provenientes de diferentes produtores/bandos	24
Tabela 6. Resultados obtidos da pesquisa de <i>Campylobacter</i> em 25g de amostra de peles de pescoço de codornizes provenientes de diferentes produtores/bandos ..	25
Tabela 7. Resultados obtidos da pesquisa de <i>Campylobacter</i> em 25g de amostra de peitos de codornizes provenientes de diferentes produtores/bandos	25
Tabela 8. Resultados da caracterização morfológica, fenotípica e genética dos isolados suspeitos de <i>Campylobacter</i> spp.....	26
Tabela 9. Contagem de <i>Campylobacter</i> spp. em amostras de pele de pescoço e de peito de codornizes provenientes de diferentes produtores/bandos	29
Tabela 10. Comparação de resultados obtidos de <i>Campylobacter</i> spp. entre a pesquisa em 25g de intestino e pesquisa directa de intestino	30
Tabela I. Consumo de aves e coelhos em Portugal (Fonte INE, 2009).....	Anexo 2

Resumo

As doenças de origem alimentar provocadas por microrganismos patogénicos constituem um problema de saúde pública. Destes microrganismos patogénicos deparamo-nos com a bactéria *Campylobacter* spp. que se encontra disseminada na natureza e cuja presença está associada à carne de aves.

O presente trabalho visa avaliar a incidência de *Campylobacter* spp. em codorniz de produção intensiva, de diferentes bandos, avaliando a sua qualidade higiénica . Em dias diferentes de abate, num matadouro foram recolhidas amostras de intestinos e peles de pescoço após lavagem, e carcaças de peitos de codorniz, após o túnel de refrigeração. Às amostras recolhidas realizou-se a contagem de *Enterobacteriaceae* e a pesquisa e contagem de *Campylobacter* spp..

Recorreu-se a métodos de caracterização fenotípica e genotípica para identificação de *Campylobacter* spp. através de métodos moleculares de detecção e identificação, técnica de PCR *Multiplex*.

As carcaças de codorniz apresentaram níveis de *Enterobacteriaceae* com uma média de 4,1 log ufc/g em pele de pescoço e 1,2 log ufc/g em peito de codorniz. Relativamente ao nível da contaminação por *Campylobacter* spp., este é de 100% no total das amostras analisadas. Dos 182 isolados, 41 foram identificados como sendo, *Campylobacter coli* (38/41), *Campylobacter jejuni* (2/41) ou *Campylobacter* spp. (1/41).

Palavras-Chave: *Campylobacter* spp., *Enterobacteriaceae*, codorniz, PCR *Multiplex*.

Abstract

The food-borne diseases caused by pathogenic micro-organisms are considered a public health problem. From these pathogens we are faced with *Campylobacter* spp. which is widespread in nature and whose presence is associated with poultry.

This study aims to evaluate the incidence of *Campylobacter* spp. quail in intensive production of different bands, assessing their hygienic quality. On different days of slaughter in an abattoir, were collected intestines samples, neck skin of carcasses after being washed, and quail carcasses, after cooling tunnel. To the collected samples was carried out the counting of *Enterobacteriaceae* and the detection and counting of *Campylobacter* spp.

The phenotypic and genotypic characterization of isolates were performed for the *Campylobacter* spp. identification, using molecular methods of detection and identification such as PCR *Multiplex*.

The quail carcasses had presented levels of *Enterobacteriaceae* with an average of 4,1 log ufc/g at neck skin and 1,2 log ufc/g in quail chest. Relatively to the level of the *Campylobacter* spp. contamination, this is of 100% in the total of the analyzed samples. Of the 182 isolated ones, 41 had been identified as being *Campylobacter coli* (38/41), *Campylobacter jejuni* (2/41) or *Campylobacter* spp. (1/41).

Keywords: *Campylobacter* spp., *Enterobacteriaceae*, quail, PCR *Multiplex*.