

ISOLAMENTO DE *Campylobacter* TERMÓFILOS SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO EM AMOSTRAS DE CARNE E VÍSCERAS DE FRANGO RESFRIADAS

CRISTIANE VANIEL¹; JANAÍNA SCHNEIDER E SILVA²; JOLINE DALLA VECCHIA³; SIMONE RAUBER WÜRFEL⁴; ELIEZER AVILA GANDRA⁵; WLADIMIR PADILHA DA SILVA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas - cristianevaniel@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Pelotas - janaina.255@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas - kihdallavecchia@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas - simone_rauber@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – gandraea@hotmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas - wladimir.padilha2011@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Campylobacter* são de grande importância em saúde pública, sendo reconhecidas como causadoras de gastroenterite de origem alimentar em humanos (KUANA et al., 2008). *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* e *C. upsaliensis* são as espécies denominadas termófilas, por terem seu desenvolvimento ótimo entre 42°C e 43°C, dentre as quais *C. jejuni* e *C. coli* destacam-se como as principais envolvidas nas infecções humanas (REES et al., 1995). Esses micro-organismos fazem parte da microbiota intestinal de animais de sangue quente (GONÇALVES et al., 2012), sendo o trato intestinal das aves considerado o reservatório primário de *C. jejuni* (PARK, 2002).

Conforme dados epidemiológicos, o principal veículo de transmissão do patógeno são os frangos (GONÇALVES et al., 2012) e a contaminação de seus produtos pode ocorrer durante as etapas do abate, através da propagação de material fecal (FAO/WHO, 2009). Segundo BOGNAR et al. (2012), a carne e miúdos são as principais porções contaminadas.

Por ser um micro-organismo de crescimento lento e extremamente fastidioso, requer condições de cultivo específicas, como atmosfera com baixas concentrações de oxigênio e temperatura entre 37°C e 42°C (SIMÕES, 2010). Além disso, são necessárias etapas de pré-enriquecimento, enriquecimento e posterior inoculação em meios seletivos (GONÇALVES et al., 2012) contendo antibióticos, os quais permitem o crescimento das estirpes de *Campylobacter* presentes nas amostras em análise, inibindo a proliferação de micro-organismos competidores (SIMÕES, 2010).

Frente ao exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar os métodos de inoculação direta (ID) e enriquecimento em caldo (EC), por 24 e 48 horas, utilizando dois meios seletivos, para a detecção de *Campylobacter* termófilos em carne e vísceras de frangos resfriadas, comercializadas no sul do Brasil.

2. METODOLOGIA

Foram adquiridas doze amostras de carne e vísceras de frango comercializadas no sul do Rio Grande do Sul, sendo elas: frango inteiro (n=2), peito (n=2), coxa (n=2), coxinha da asa (n=2), sobrecoxa (n=2) e fígado (n=2).

O material coletado foi armazenado sob refrigeração e encaminhado ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos/DCTA/FAEM/UFPel, onde foram realizadas as análises microbiológicas.

O isolamento e a identificação fenotípica foram realizados de acordo com o *International Organization for Standardization* (ISO 10272-1, 2006), com adaptações. Para controle das análises, foram utilizadas as seguintes linhagens bacterianas: *C. jejuni* ATCC 33291, *C. lari* NCTC 11352 e *C. coli* CAMPY 1003.

A amostragem foi realizada através da obtenção de 10g de fragmentos de pele e também por rinsagem, efetuada em 150mL de água peptonada tamponada 1% (Oxoid®). Uma alíquota proveniente da rinsagem foi utilizada para inoculação direta em ágar Preston (Oxoid®) e ágar mCCD (Oxoid®), sendo incubados em microaerofilia (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂) a 42°C por 48h. Além disso, o material foi inoculado nos mesmos meios seletivos após enriquecimento por 24 e 48h em caldo Bolton (Oxoid®) naquelas condições.

Os fragmentos de pele foram inoculados diretamente em caldo Bolton (Oxoid®) e incubados a 42°C em microaerofilia por 24 e 48h. Posteriormente, uma alíquota de cada amostra foi inoculada em ágar Preston (Oxoid®) e ágar mCCD (Oxoid®), e incubados a 42°C em microaerofilia, por 48h.

As colônias típicas ou suspeitas foram identificadas por meio de morfologia microscópica, detecção da atividade da catalase e oxidase, verificação da capacidade de hidrolisar o acetato de indoxil e o hipurato de sódio.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Campylobacter termófilos foram detectados em 100% das amostras analisadas, sendo identificadas as espécies *C. jejuni* (100%) e *C. coli* (8,33%).

Os resultados do isolamento de *Campylobacter* termófilos em ágar Preston (Oxoid®) e ágar mCCD (Oxoid®), utilizando os métodos de ID e EC, por 24 e 48 horas, são demonstrados na Figura 1.

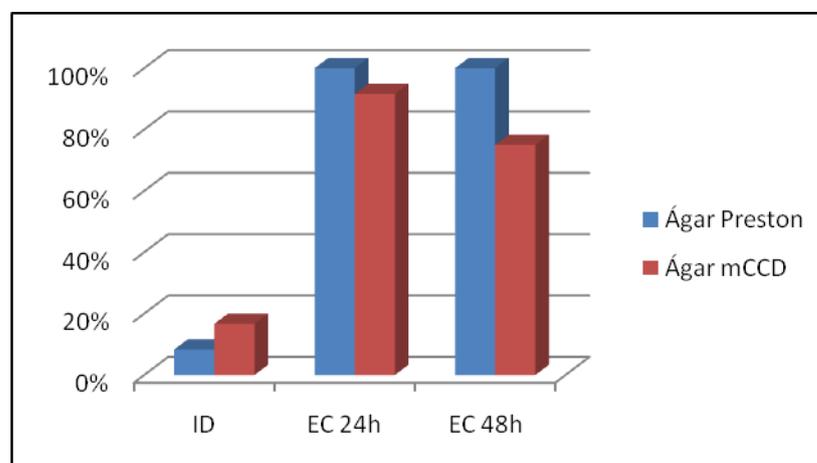


Figura 1. Isolamento de *Campylobacter* termófilos em carne e vísceras de frango resfriadas, sob diferentes condições de cultivo.

Por meio de ID, foi possível identificar a bactéria em 25% (n=3) das amostras, sendo 16,67% (n=2) através do ágar mCCD (Oxoid®) e 8,33% (n=1) pelo ágar Preston (Oxoid®). O restante das amostras não apresentou crescimento em nenhum dos meios seletivos utilizados.

Através do EC por 24h, *Campylobacter* termófilos foram isolados em 100% das amostras, sendo 100% (n=12) pelo ágar Preston (Oxoid®) e 91,67% (n=11) por meio do ágar mCCD (Oxoid®). Nessas condições, houve pouco crescimento de micro-organismos contaminantes. Já no EC por 48h, observou-se crescimento

abundante de microbiota competidora, entretanto, a bactéria também foi detectada em 100% das amostras, sendo 100% (n=12) positivas em ágar Preston (Oxoid®) e 75% (n=9) em ágar mCCD (Oxoid®).

Segundo THEOPHILO; JAKABI (2008), a ID não é suficientemente sensível para a detecção dessas bactérias em amostras de alimentos, onde há baixa concentração do micro-organismo, corroborando o resultado obtido no presente estudo, no qual se obteve somente três amostras positivas.

Por outro lado, o EC favoreceu o isolamento de *Campylobacter* termófilos nessas amostras. Contudo, pode-se notar que o tempo de incubação é um fator importante, visto que, a partir de 24h de incubação, a concentração de micro-organismos competidores aumenta de forma significativa, reduzindo os índices de isolamento de *Campylobacter* (ACMSF, 2010; VAZ et al., 2012).

De acordo com a *International Organization for Standardization* (2006), o meio seletivo indicado para a detecção de *Campylobacter* termófilos em alimentos é o ágar mCCD. No entanto, o presente estudo indica que o ágar Preston foi o mais eficaz para o isolamento desses micro-organismos.

A adição de suplementos ao ágar Preston, como o sulfato ferroso, metabissulfito de sódio e piruvato de sódio, contribui para o isolamento de *Campylobacter* termófilos, uma vez que propicia maior tolerância desses micro-organismos ao oxigênio (WONGLUMSOM et al., 2001; MEDEIROS, 2011). Além disso, a adição de antibióticos aos meios de cultura suprime o crescimento da microbiota acompanhante, favorecendo o desenvolvimento de *Campylobacter* (LINE et al., 2001).

4. CONCLUSÕES

O enriquecimento em caldo por 24 horas, seguido da inoculação em ágar Preston, favorece a detecção de *Campylobacter* termófilos, sendo, portanto, mais eficaz para isolamento dessas bactérias em amostras de alimentos.

5. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo apoio financeiro (Processo nº 483807/2012-5). À Capes, CNPq e FAPERGS pela concessão de bolsas de estudo. À Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) pela cessão das linhagens bacterianas utilizadas como controle.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADVISORY COMMITTEE ON THE MICROBIOLOGICAL SAFETY OF FOOD (ACMSF). **The isolation of *Campylobacter* spp. from food and environmental samples.** Surveillance Working Group. Discussion Paper ACM/994. 2010.

BOGNAR, B.Z.; CASTRO, R.S.; RIBEIRO, A.B. Contaminação por *Campylobacter* spp. em fezes, miúdos e carne de Frango. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia.** v.7, n.2, p.16-24, 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Salmonella and Campylobacter in chicken meat : meeting report. Microbiological risk assessment series N° 19.** FAO/WHO, Rome, Geneva, 2009.

GONÇALVES, K. O.; YAMANAKA, E. H. U.; ALMEIDA, A. P. I.; CHANO, L. J.; RIBEIRO, A. B. Pesquisa de *Campylobacter* spp. em carnes de frango comercializadas na cidade de Campo Mourão-PR. **Alimentação e Nutrição**, Araraquara, v. 23, n. 2, p. 211-216, 2012.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). **Microbiology of food and animal feeding stuffs** – Horizontal method for detection and enumeration of thermotolerant *Campylobacter* spp. – Part 1: detection method. (ISO 10272-1:2006 [E]). Geneva: ISO, 2006. 16 p.

KUANA S.L.; SANTOS L.R.; RODRIGUÊS L.B.; BORSOI A.; KELLERMANN A.; SALLE C.T.P.; MORAES H.L.S.; NASCIMENTO V.P. Pré-enriquecimento e isolamento direto para identificação de *Campylobacter* em swabs cloacais e carcaças de frango. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.36, p.21-24, 2008.

LINE J.E.; STERN N.J.; LATTUADA C.P.; BENSON S.T. Comparison of methods for recovery and enumeration of *Campylobacter* from freshly processed broilers. **Journal of Food Protection**. v. 64, p. 982-986, 2001.

MEDEIROS, V. M. **Isolamento e identificação fenotípica e molecular das espécies termofílicas de *Campylobacter* a partir de frango resfriado**. 2011. 94p. Dissertação (Mestrado Profissional) – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

PARK, S.F. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**. v. 74, p. 177-188, 2002.

REES, J. H.; SOUDAIN, S. E.; GREGSON, N. A.; HUGHES, R. A. C. *Campylobacter jejuni* Infection and Guillain-Barré Syndrome. **The New England Journal of Medicine**, n.333, p.79-1374, 1995.

SIMÕES, A. M. M. **Avaliação da contaminação por *Campylobacter* spp. em peitos de frango embalados em atmosfera protetora e em superfícies do ambiente fabril**. 2010. 99f. Dissertação (Mestrado em Segurança Alimentar)-Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa.

THEOPHILO, G. N. D.; JAKABI, M. **Manual Técnico**. WHO Global Salm-Surv Nível III. Capacitação Integrada. *Campylobacter* spp. Diagnóstico laboratorial: métodos clássicos e moleculares. 2008.

VAZ, C.S.L.; VOSS-RECH, D.; POZZA, J. S.; SANTOS, F. B. O.; COLDEBELLA, A.; SILVA, V. S. Frequency of thermophilic *Campylobacter* in commercial broiler farms in southern Brazil using different culturing techniques and selective media. **World's Poultry Science Journal**, v. 68, v. 1, p. 268-270. 2012.

WONGLUMSOM, W.; VISHNUBHATLA, A.; KIM J.M.; FUNG D.Y.C. Enrichment media for isolation of *Campylobacter jejuni* from inoculated ground beef and chicken skin under normal atmosphere. **Journal of Food Protection**. V.64, p. 630-634, 2001.