

## Avaliação de diferentes alíquotas de enxaguadura para a contagem pelo método direto de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango resfriadas

Evaluation of the different rinse volumes for performing the direct technique for *Campylobacter* spp. enumeration in chilled broiler carcasses

RIALA6/1630

Thalyta Marina BENETTI<sup>1\*</sup>, Wanda Moscalewski ABRAHÃO<sup>2,3</sup>, Isabelle Dangui FERRO<sup>4</sup>, Renata Ernlund Freitas MACEDO<sup>4</sup>, Tereza Cristina Rocha Moreira de OLIVEIRA<sup>1</sup>

\*Endereço de correspondência: <sup>1</sup>Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Pr 445 Km 380, Campus Universitário, Caixa Postal 6001, Londrina - PR / Brasil. Tel: +55 41 9919 8113; +55 43 3371 5968. E-mail: benetti.thalyta@gmail.com

<sup>2</sup>Seção de Microbiologia de Alimentos, Laboratório Central do Estado do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

<sup>4</sup>Pós-graduação em Ciência Animal, Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, São José dos Pinhais, PR, Brasil.

Recebido: 05.09.2013 – Aceito para publicação: 23.12.2014

### RESUMO

O método direto de detecção e contagem de *Campylobacter* spp. em carne de frango é de fácil execução, porém os volumes de 100 µL e de 400 µL, preconizados em algumas metodologias, muitas vezes impossibilitam a contagem de colônias pela ocorrência de crescimento confluinte ou de microbiota contaminante. O objetivo do presente estudo foi de avaliar os diferentes volumes de enxaguadura de carne de frango com a finalidade de minimizar a interferência da microbiota contaminante, sem comprometer a sensibilidade do método. Os volumes de enxaguadura de 5, 10, 50, 100 e 400 µL foram testados utilizando-se os meios seletivo diferenciais ágar carvão cefoperazona desoxicolato modificado (mCCDA) e ágar Bolton modificado. A presença de *Campylobacter* spp. foi confirmada por métodos fenotípicos e por PCR. No entanto, a estratégia de utilização de volumes menores do que 100 µL de enxaguadura não melhoraram o isolamento e a contagem de colônias de *Campylobacter*, porque houve diminuição da sensibilidade do ensaio. A provável solução para minimizar a interferência da microbiota contaminante seria desenvolver novos meios seletivos ou incorporá-los aos antimicrobianos já existentes.

**Palavras-chave.** *Campylobacter* spp., quantificação, método direto, carcaça de frango refrigerada.

### ABSTRACT

The direct method for detecting and enumerating *Campylobacter* spp. in chicken meat is easy to perform, but the volumes of 100µL and 400µL, as recommended in some methodologies, are often unable to achieve the colonies counts due to the occurrence of confluent growth or microbial contaminants. This study aimed at evaluating the different volumes for rinsing chicken meats in order to minimize the interference of microbial contaminants, without compromising the sensitivity of direct methodology. Rinse volumes of 5, 10, 50, 100 and 400µL were tested using the modified charcoal cefoperazone deoxycholate agar (mCCDA) and modified Bolton agar. The presence of *Campylobacter* was confirmed by phenotypic methods and PCR assay. However, the strategy of using less than 100 µL of rinse volumes did not improve the isolation and enumeration of *Campylobacter* colonies, because it reduces the sensitivity of the assay. Thus, a possible solution to minimize the interference of microbial contaminants would be in developing new selective media or incorporate them into other existing antimicrobial drugs.

**Keywords.** *Campylobacter* spp., quantification, direct method, chilled broiler carcasses.

## INTRODUÇÃO

A alta prevalência de *Campylobacter* spp. em frangos de corte levou à necessidade de implementação de estratégias para impedir a contaminação da carne de frango por esse patógeno em todos os níveis da cadeia de produção. A detecção e enumeração de *Campylobacter* spp. em carne de frango são essenciais para reduzir os riscos de contaminação<sup>1</sup>.

*Campylobacter* spp. são micro-organismos fastidiosos que requerem temperatura de crescimento e meios de cultivo seletivos específicos, além de atmosfera de incubação em microaerofilia. A quantificação de *Campylobacter* spp. em carne de frango é necessária nas avaliações de risco que exige métodos quantitativos confiáveis. A quantificação deve ser realizada antes do enriquecimento (método direto) com a sementeira da enxaguadura da carne de frango em meios seletivos específicos<sup>2</sup>.

Estudos associaram as dificuldades na contagem de *Campylobacter* em carne de frango à sua baixa competitividade frente à microbiota contaminante e à incapacidade dos agentes antimicrobianos adicionados aos meios seletivos de eliminar esta contaminação. Além da interferência da microbiota contaminante da carne de frango, é comum verificar colônias de *Campylobacter* sobrepostas umas às outras, assim como, espalhadas sobre o Ágar carvão cefoperazona desoxicolato modificado (mCCDA) o que torna difícil a contagem de colônias. O volume da enxaguadura utilizado no método direto pode, portanto, dificultar a contagem desse patógeno<sup>3,4</sup>.

O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes volumes de enxaguadura de carne de frango com a finalidade de minimizar a interferência da microbiota contaminante no isolamento e contagem de *Campylobacter* spp., sem comprometer a sensibilidade do método direto.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostragem

Quarenta amostras de carcaças de frango resfriadas produzidas no Estado do Paraná foram coletadas, na sua embalagem original, em diferentes estabelecimentos comerciais da cidade de Curitiba, Paraná. As amostras foram representativas de oito marcas diferentes, com cinco unidades amostrais cada. Após a coleta as amostras foram encaminhadas sob refrigeração

ao laboratório e analisadas ao seu recebimento.

Após a retirada asséptica da embalagem original, dos miúdos, dos pés e da cabeça, as carcaças foram pesadas e colocadas em sacos estéreis. O enxágue das carcaças foi realizado com adição de água peptonada tamponada a 0,1 % (Oxoid, Inglaterra) na proporção de 1 mL para cada grama de peso da carcaça, com fricção de toda a superfície do frango por aproximadamente dois minutos. Alíquotas da enxaguadura foram utilizadas para os testes de detecção e de enumeração de *Campylobacter* spp.

### Método Direto de Detecção e Contagem de *Campylobacter* (ISO 10272-2:2006)

Alíquotas de 5, 10, 50, 100, e 400 µL da enxaguadura foram semeadas em duplicata para placas de Ágar mCCDA (CM 739) (Oxoid, Inglaterra), suplementado com cefoperazone (16,0 mg/L) e anfotericina B (5,0 mg/L) (SR 155E) (Oxoid, Inglaterra) e para placas de Ágar Bolton modificado, preparado conforme descrito por Franchin et al<sup>5</sup>. As placas foram incubadas a 37 °C durante 4 horas com posterior incubação a 41,5 ± 0,5 °C por 48 horas em microaerofilia por injeção de atmosfera modificada (5 % O<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub>, 85 % N<sub>2</sub>) (Air Liquide, Brasil) durante 20 segundos.

A confirmação da presença de *Campylobacter* foi realizada, inicialmente, pela observação ao microscópio da morfologia típica em preparações a fresco das colônias isoladas ou confluentes coradas com solução de azul de metileno 1 % (Laborclin, Brasil), e em esfregaços corados pelo Gram (Laborclin, Brasil). Se a morfologia característica foi observada nas preparações microscópicas, as colônias foram reisoladas em Ágar Tripticase de Soja (TSA) suplementado com 5 % de sangue de carneiro desfibrinado (Newprov, Brasil), incubado a 36 ± 1 °C durante 24 e 48 horas sob microaerofilia.

A identificação fenotípica foi realizada com as provas de catalase, oxidase, hidrólise hipurato, indoxil acetato, e avaliação da sensibilidade ao ácido nalidíxico e cefalotina (Oxoid, Inglaterra). Paralelamente, foi realizada a identificação empregando o sistema API Campy® (Biomerieux, França) de acordo com as instruções do fabricante, e confirmadas em nível de gênero por PCR (reação de cadeia polimerase) em Tempo Real.

A quantificação foi realizada considerando o volume da enxaguadura empregado, de acordo com as seguintes equações: Q = n x 2,5, quando utilizado a alíquota de 400 µL, Q = n x 10, Q = n x 20, Q = n x 100, Q = n x 200, para as alíquotas respectivas de 100, 50, 10

**Tabela 1.** Resultados das contagens de *Campylobacter* pelo método direto utilizando 100 e 400 µL da enxaguadura da carcaça de frango

Amostras Positivas	Método Direto (UFC/g)	
	400µL	100µL
01	>6,3 x 10 <sup>2</sup>	> 2,5 x 10 <sup>3</sup>
03	> 6,3 x 10 <sup>2</sup>	1,4 x 10 <sup>2</sup>
12	> 6,3 x 10 <sup>2</sup>	1,0 x 10 <sup>2</sup>
15	> 6,3 x 10 <sup>2</sup>	8,0 x 10 <sup>2</sup>
18	> 6,3 x 10 <sup>2</sup>	> 2,5 x 10 <sup>3</sup>
20	> 6,3 x 10 <sup>2</sup>	> 2,5 x 10 <sup>3</sup>
23	> 6,3 x 10 <sup>2</sup>	1,1 x 10 <sup>3</sup>
27	2,5 x 10 <sup>1</sup>	6,0 x 10 <sup>1</sup>
29	2,3 x 10 <sup>2</sup>	1,3 x 10 <sup>2</sup>
30	> 6,3 x 10 <sup>2</sup>	> 2,5 x 10 <sup>3</sup>
31	> 6,3 x 10 <sup>2</sup>	> 2,5 x 10 <sup>3</sup>
34	> 6,3 x 10 <sup>2</sup>	> 2,5 x 10 <sup>3</sup>

e 5 µL, onde *n* correspondeu ao número total de colônias características presentes na placa com confirma o fenotípica. O resultado foi expresso em UFC/g.

#### Identifica o molecular do g nero *Campylobacter* por PCR em Tempo Real

A identifica o molecular do g nero *Campylobacter* nos isolados identificados bioquimicamente foi realizada por PCR em Tempo Real, utilizando o método TaqMan. A extra o do DNA foi realizada utilizando o sistema reagente NewGene Prep e NewGene Preamp, disponibilizado pela Simbios Tecnologia (Canoas, Brasil). As amplia es por PCR em Tempo Real foram realizadas em um volume final de aproximadamente 30 µL contendo 28 µL de TaqMan Kit Master Mix *Campylobacter* (Simbios Tecnologia, Brasil) este composto por tampão, dNTP's, água ultrapura, *primers* e sonda, 0,32 µL de Taq polimerase e 2 µL de DNA. As condi es de rea o foram: aquecimento a 95  C durante 3 minutos, 40 repeti es de 95  C por 15 segundos e 60  C por 1 minuto. Em todas as rea es de PCR foram utilizados DNA de *C. jejuni* ATCC 33291, como controle positivo, e água ultrapura e tampão do Kit Master Mix com a enzima Taq polimerase, como controles negativos. As leituras da fluorescência foram realizadas pelo equipamento 7300 Real-Time PCR (Applied Biosystems, EUA) a cada ciclo de amplia o e, posteriormente, analisadas pelo Sequence Detection Software (SDS) v 1.3 (Applied Biosystems, EUA).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Algumas discussões nos últimos 10 anos têm sido realizadas sobre a melhor metodologia para detec o e quantifica o de *Campylobacter* a partir de carne de frango. Embora vários métodos tenham sido desenvolvidos nos últimos 30 anos não existe um consenso sobre qual metodologia seria a mais adequada para garantir a sensibilidade e a reprodutibilidade dos resultados<sup>6-8</sup>.

No presente trabalho, 12 (30,0 %) das 40 amostras de carne de frango analisadas foram positivas para *Campylobacter* spp. pelo método direto, quando volumes de 100 e 400 µL de enxaguadura foram utilizados (Tabela 1). A contagem de colônias, no entanto, foi possível de ser realizada em apenas seis e duas das 12 amostras positivas quando volumes de 100 e 400 µL de enxaguadura foram utilizados, respectivamente. Nas demais amostras as colônias estavam confluentes e a contagem impossível de ser realizada. Quando volumes de 5, 10 e 50 µL foram utilizados, somente foi possível a detec o e contagem de *Campylobacter* em 4, 3 e 1 das 12 amostras positivas, respectivamente.

Todas as colônias com morfologia típica de *Campylobacter* nas prepara es microscópicas foram identificadas como *Campylobacter* pelas provas fenotípicas e pela PCR em Tempo Real e, não houve divergência na identifica o entre as provas fenotípicas e

o sistema API Campy® (Biomérieux).

O método de PCR tem sido utilizado como técnica de detecção do gênero *Campylobacter* em alimentos por superar muitos dos problemas associados com os métodos tradicionais de cultivo. As espécies de *Campylobacter* são frequentemente difíceis de cultivar, e extremamente suscetíveis ao estresse ambiental e as condições ao que o alimento é submetido. A metodologia de PCR têm a maior taxa de detecção entre os métodos de identificação biológica, e sob condições otimizadas mostra também alta especificidade<sup>6</sup>.

Embora o método direto ISO 10272-2 preconize a utilização de 100 µL de enxaguadura para o isolamento e contagem de *Campylobacter* spp. em alimentos, esse volume impossibilitou a contagem devido a confluência das colônias ou crescimento muito grande de microbiota contaminante. Assim sendo, a solução para minimizar ou solucionar a interferência da microbiota contaminante ou a confluência de colônias de *Campylobacter* não seria a diminuição do volume da enxaguadura, mas provavelmente desenvolver novos meios seletivos ou incorporar aos já existentes outros antimicrobianos.

Franchin et al<sup>9</sup> propuseram a utilização de volumes de 400 µL de enxaguadura porque, segundo a experiência desses autores, muitas amostras de carne de frango apresentam contagem baixa de *Campylobacter*, e para que o método tenha sensibilidade suficiente volumes de 400 µL precisam ser utilizados. No presente estudo não foi encontrado amostras de carne de frango com contagens baixas detectadas somente após a utilização de volumes de 400 µL.

A dificuldade na contagem de *Campylobacter* spp. em carne de frango tem sido relacionada à sua baixa competitividade frente a microbiota contaminante e à incapacidade dos agentes antimicrobianos utilizados nos meios seletivos de inibir essa microbiota. A estratégia de utilização de volumes menores que 100 µL de enxaguadura, testada no presente trabalho, facilitou a contagem porque houve menor interferência da microbiota contaminante no desenvolvimento de *Campylobacter*, porém a diminuição do volume também diminuiu consideravelmente a sensibilidade do método direto.

No presente trabalho, o ágar Bolton modificado, indicado por Franchin et al<sup>9</sup>, foi utilizado em paralelo ao ágar mCCDA, preconizado na metodologia ISO 10272-2. A cor escura do mCCDA, a coloração acinzentada das colônias de *Campylobacter* e as bordas das colônias

pouco definidas nesse meio dificultaram a visualização e a distinção entre colônias típicas e atípicas. Esse fato exigiu a necessidade de realizar preparações microscópicas das colônias de todas as amostras analisadas. Essa dificuldade já havia sido previamente descrita por Habib et al<sup>10</sup> e Franchin et al<sup>8</sup>. O Ágar Bolton modificado foi escolhido para ser utilizado em paralelo ao mCCDA porque as colônias típicas de *Campylobacter* apresentaram bordas bem definidas de coloração marrom sob um fundo claro devido à redução do corante 2,3,5-trifeniltetrazólio, o que facilitou a triagem de colônias típicas de *Campylobacter*. No presente trabalho, embora colônias típicas de *Campylobacter* tenham sido mais facilmente triadas no meio de Ágar Bolton, foi necessário também realizar preparações microscópicas das colônias para confirmação morfológica de *Campylobacter* em todas as amostras analisadas.

O Ágar Bolton não mostrou frequência maior de isolamento, apesar de permitir uma melhor visualização das colônias de *Campylobacter*. Sete das doze amostras positivas foram identificadas exclusivamente pelo Ágar mCCDA e três pelo Ágar Bolton. A presença de *Campylobacter* foi confirmada em duas amostras em ambos os meios de cultura. Assim sendo, a necessidade de se utilizar no mínimo dois diferentes meios seletivos para o isolamento de *Campylobacter* foi confirmada.

## CONCLUSÃO

O método direto de detecção e contagem de *Campylobacter* em carne de frango, empregado na rotina dos laboratórios de análise, é de fácil execução, porém precisa de adequações. A utilização de volumes menores de 100 µL de enxaguadura não pode ser utilizada porque diminui consideravelmente a sensibilidade do método.

---

## AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Universidade Estadual de Londrina (UEL) pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado concedida à Thalyta Marina Benetti.

---

## REFERÊNCIAS

1. Ahmed R, León-Velarde CG, Odumeru JA. Evaluation of novel agars for the enumeration of *Campylobacter* spp. in poultry retail samples. *J Microbiol Methods*.2012;88:304-10. Disponível em: [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22226753>].
2. Hutchison ML, Walters LD, Allen VM, Mead GC, Howell M. Measurement of *Campylobacter* numbers on carcasses in British poultry slaughterhouses. *J Food Prot*.2006;69:421-4. Disponível em: [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16496586>].
3. Habib I, Sampers I, Uyttendaele M, Berkvens D, Zutter LD. Performance characteristics and estimation of measurement uncertainty of three plating procedures for *Campylobacter* enumeration in chicken meat. *Food Microbiol*.2008;25:65-74. Disponível em: [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17993378>].
4. Medeiros VM, Bricio SML, Filgueiras ALL, Clementino MCM. Use of Bolton broth for selective enrichment and comparative analysis of its performance with direct plating methodology for isolating *Campylobacter* spp. from chilled chicken carcasses. *Rev Inst Adolfo Lutz*.2012;71:456-61. Disponível em: [<http://revistas.bvs-vet.org.br/rialutz/article/view/5255/4519>].
5. Franchin PR, Aidoo KE, Batista CRV. Sources of poultry meat contamination with thermophilic *Campylobacter* before slaughter. *Braz J Microbiol*.2005;36:157-62. Disponível em: [<http://www.scielo.br/pdf/bjm/v36n2/arq11.pdf>].
6. Oliveira TCRM, Barbut S, Griffiths MW. A robotic DNA purification protocol and real-time PCR for the detection of *Campylobacter jejuni* in foods. *J Food Prot*.2005;68:2131-5. Disponível em: [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16245718>].
7. ISO. International Organization for Standardization - ISO 10272 Microbiology of Food and Animal Feeding Stuff - Horizontal Method for Detection and Enumeration of *Campylobacter* spp. - Part 2: Enumeration Method. ISO, Geneva, Switzerland, 2006.
8. Richardson LJ, Cox NA, Bailey JS, Berrang ME, Cox, JM, Buhr RJ, et al. Evaluation of TECRA broth, Bolton broth, and Direct Plating for recovery of *Campylobacter* spp. from Broiler Carcass Rinsates from Commercial Processing Plants. *J Food Prot*.2009;72:972-77. Disponível em: [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19517723>].
9. Franchin PR, Ogliari PJ, Batista CRV. Frequency of thermophilic *Campylobacter* in broiler chickens during in industrial processing in a Southern Brazil slaughterhouse. *Br Poult Sci*.2007;48:127-32. Disponível em: [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17453803>].
10. Habib I, Uyttendaele M, De Zutter L. Evaluation of ISO 10272:2006 standard versus alternative enrichment and plating combinations for enumeration and detection of *Campylobacter* in chicken meat. *Food Microbiol*.2011;28:1117-23. Disponível em: [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21645809>].