



Pré-enriquecimento e isolamento direto para identificação de *Campylobacter* em swabs cloacais e carcaças de frango*

Pre enrichment and direct plating in the identification of *Campylobacter* in cloacae swabs and broiler carcasses

Suzete Lora Kuana¹, Luciana Ruschel dos Santos², Laura Beatriz Rodrigues², Anderlise Borsoi¹, Aline Kellermann¹, Carlos Tadeu Pippi Salle¹, Hamilton Luiz de Souza Moraes¹ & Vladimir Pinheiro do Nascimento¹

RESUMO

Campylobacter são microorganismos patogênicos associados com aves ou alimentos de origem avícola e sua importância está relacionada à alta prevalência de *Campylobacter* nos frangos de corte e suas carcaças, correlacionados com gastroenterite em humanos. Neste estudo, monitorou-se 22 lotes de frango de corte com idades entre 3 a 5 semanas na granja e 35 dias no abate e avaliou-se os métodos de pré-enriquecimento (PE) e isolamento direto (ID) para identificação de *Campylobacter* em swabs cloacais e carcaças de frango. Realizaram-se 22 análises de swabs cloacais pelo PE e pelo ID, 96 análises de carcaças pelo ID e, destas, 95 pelo PE. Para o isolamento direto a partir de swabs utilizou-se o ágar mCCDA acrescido de suplemento seletivo, acondicionado em embalagem não permeável e microaerofilia com mistura de gases (5% O₂, 10% CO₂ e 85% N₂). Para o PE, os swabs foram inoculados em pool no caldo Bolton suplementado com antibióticos e 200 mg/L de TTC, seguido de inoculação em ágar mCCDA, também em microaerofilia. As carcaças também foram analisadas para ambos os métodos, utilizando-se caldo Bolton no pré-enriquecimento, seguido de inoculação em mCCDA ou isolamento direto em ágar Bolton com TTC, sempre em microaerofilia. Não houve diferença significativa ($p=1,00$) entre os métodos de pré-enriquecimento e isolamento direto nas amostras de swabs e carcaças. Identificou-se 81,8% lotes positivos por ID e 77,3% pelo PE na análise dos swabs e 99,0% das carcaças pelo PE e 97,9% pelo ID. Os métodos de pré-enriquecimento e isolamento direto foram homogêneos e sensíveis para detecção de *Campylobacter* em amostras de swabs cloacais e carcaças de frango. Entretanto, pela praticidade e antecipação dos resultados em 24 horas, recomenda-se a utilização do método de isolamento direto.

Descritores: *Campylobacter*, pré-enriquecimento, isolamento direto, swabs cloacais, carcaças de frangos.

ABSTRACT

Campylobacter are pathogenic microorganisms associated with poultry or poultry products. Its importance is related to high prevalence of *Campylobacter* in broiler flocks and in carcasses, which frequency is correlated to gastroenteritis in human. This study was realized in 22 broiler chicken flocks with from 3 to 5 weeks and the slaughter age of 35 days. Were evaluated the pre-enrichment (PE) and direct plating (DP) in the identification of *Campylobacter* in cloacae swabs and broiler carcasses. Were analyzed 22 cloacae swabs by PE and DP, 96 carcasses by DP, and of these, 95 by PE. In the DP, the swabs were plated directly onto selective modified agar (mCCDA) and placed in waterproof bags, under microaerophilia, with a gas mixture (5% O₂, 10% CO₂ and 85% N₂). In the PE, they were pooled onto Bolton broth supplemented with antibiotics, 15 g/L of agar, 0.5g/L of iron sulfate and 200 mg/L of TTC, followed by plating onto mCCDA, also under microaerophilia. Carcasses were assessed in both methods using Bolton broth in PE, followed by plating onto mCCDA, and DP onto Bolton agar with TTC. No statistically significant difference ($p=1.00$) was observed in swabs and carcasses samples between PE and DP methods. The flocks yielded positive for DP and PE 81.8% (18/22) and 77.3% (17/22) of cases, respectively. In broiler carcasses was noted rates of 99.0% (95/96) for PE and 97.9% (94/96) for DP. The pre-enrichment and direct plating methods were homogeneous and sensitive for the detection of viable cells of *Campylobacter* isolates obtained from cloacae swabs and broiler carcasses. However, direct plating should be recommended, due to its practical usefulness and to the possibility of having the results within 24 hours.

Key words: *Campylobacter*, pre-enrichment, direct plating, cloacae swabs, broiler carcasses.

*Trabalho originado da Dissertação de Mestrado do primeiro autor. Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PGCV-UFRGS).
¹Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS/Brasil. ²Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo (FAMV), Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, RS. CORRESPONDÊNCIA: L.R. Santos [luruschel@upf.br; Fax: (54) 3316 8485].

INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Campylobacter* são reconhecidas como causa comum de gastroenterite em humanos e os produtos de origem animal, especialmente avícolas, são considerados o principal veículo para infecções humanas. O trato intestinal das aves domésticas é um reservatório de *Campylobacter* [11] e as carcaças e vísceras comestíveis podem se contaminar durante o abate, carreando, assim, o agente para produtos acabados e prontos para consumo [3].

Por ser um microorganismo microaerófilo, o *Campylobacter* é considerado de difícil cultivo, além da inexistência de metodologias padronizadas e intervenções estratégicas específicas para a redução da contaminação das carcaças de frango pelo agente. Entretanto, o uso de suplementos (0,025% de sulfato de ferro, metabissulfito de sódio e piruvato de sódio) possibilitam maior tolerância ao oxigênio, sem a necessidade do acréscimo de sangue, por reduzir os componentes tóxicos derivados do oxigênio, como peróxido de hidrogênio, oxigênio simples e íons superóxidos [16]. Além disso, o incremento dos meios de cultura com a adição de antibióticos suprime a microbiota fecal competidora e favorece o crescimento de campilobacters em colônias facilmente detectáveis. Adicionalmente, diferentes métodos de isolamento têm sido relatados, incluindo ou não passos de pré enriquecimento seletivo, seguidos de inoculação em ágar seletivos [9].

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os métodos de pré-enriquecimento (PE) e isolamento direto (ID) para identificação de *Campylobacter* em *swabs* cloacais e carcaças de frango.

MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi realizado em 22 aviários de uma agroindústria do sul do Brasil, entre outubro e novembro de 2002. A escolha das granjas foi ao acaso e intencional para aves a partir das três semanas de idade, uma vez que há uma incidência maior e de forma crescente até o abate para a colonização por *Campylobacter* [13]. Foram realizadas 22 análises de *swabs* cloacais pelos métodos de pré-enriquecimento e de isolamento direto (ID), (onde uma amostra positiva caracterizou o lote como positivo), 96 carcaças pelo isolamento direto e destas, 95 pelo pré-enriquecimento. Os *swabs* foram introduzidos na cloaca e o material fecal imediatamente colocado em meio de transporte *Cary Blair Medium* (CM 519, Oxoid)¹ e as carcaças foram coletadas durante o

abate, previamente marcadas com um lacre após a escalda e retirada das penas.

Processamento microbiológico de pré-enriquecimento

Os *swabs* cloacais foram inoculadas em *pool* em 60mL de caldo de enriquecimento seletivo Bolton (CM983, Oxoid)¹, com suplemento seletivo contendo cefoperazona, trimetoprim, vancomicina e cicloheximida (SR183E, Oxoid)¹. O ar foi removido dentro do frasco, de forma a criar um fluxo de uma mistura de 5% O₂, 10% CO₂ e 85% N₂, estabelecendo assim a microaerofilia e as amostras incubadas por 24 horas a 42°C. Subseqüentemente, 1 ìL foi estriado em ágar mCCDA (CM739, Oxoid)¹, com suplemento seletivo (SR155, Oxoid)¹ e incubado por 48 h em microaerofilia (5% O₂, 10% CO₂ e 85% N₂). As colônias suspeitas foram identificadas presuntivamente e confirmadas pelo teste de aglutinação em látex.

As carcaças foram rinsadas em 150mL de água peptonada tamponada 1% (AP 1%) e agitadas manualmente por 2 minutos. Transferiu-se 10mL para frascos contendo 90mL de caldo de enriquecimento seletivo Bolton (CM983, Oxoid)¹, adicionado de suplemento seletivo contendo cefoperazona, trimetoprim, vancomicina e cicloheximida (SR183E, Oxoid)¹. O ar foi removido de dentro do frasco, de forma a criar um fluxo com uma mistura de 5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂ e as amostras incubadas por 24 horas a 42°C. Subseqüentemente, 1ìL foi estriado em ágar mCCDA (CM739, Oxoid)¹, com suplemento seletivo (SR155, Oxoid)¹, incubados em microaerofilia (5 % O₂, 10% CO₂ e 85% N₂) por 48h. As colônias suspeitas foram identificadas presuntivamente e confirmadas pelo teste de aglutinação em látex.

Processamento microbiológico de isolamento direto

Foi procedida a cultura das amostras de *swabs* de cloaca conforme o método de isolamento direto, identificação presuntiva e teste de aglutinação em látex. O isolamento direto foi realizado a partir da rinsagem das carcaças com 150mL em AP 1%, conforme descrito no método de pré-enriquecimento. Foram transferidas alíquotas de 0,1mL e espalhadas com a alça de Drigalsky em placas de meio seletivo. Foi utilizado como meio seletivo o caldo de enriquecimento seletivo Bolton (CM983, Oxoid)¹ sem sangue lisado de cavalo e suplementado com antibióticos (SR183E, Oxoid)¹, 15g/L de ágar, 0,5g/L de sulfato de ferro e 200 mg/L de TTC, este último para facilitar a identificação das colônias [10]. As placas foram incubadas em microaerofilia (5% O₂, 10% CO₂, e 85% N₂) por 48 h e as colônias submetidas

à identificação presuntiva de *Campylobacter* e confirmadas por aglutinação em látex.

Para análise estatística utilizou-se a comparação das frequências marginais pelo teste de McNemar ($p < 0,05$) e os resultados foram avaliados com auxílio do programa estatístico *Statistical Package for the Social Sciences* e do programa BRAILE, D.M. & GODOI, M.F. para o teste de acurácia.

RESULTADOS

Os resultados do isolamento de *Campylobacter* em swabs cloacais utilizando os métodos de pré-enriquecimento (PE) e isolamento direto (ID) são apresentados na Tabela 1. Os resultados do isolamento de *Campylobacter* em carcaças de frango utilizando os métodos de pré-enriquecimento e isolamento direto são apresentados na Tabela 2.

Tabela 1. Isolamento de *Campylobacter* em swabs cloacais utilizando os métodos de pré-enriquecimento (PE) e isolamento direto (ID)*

Método	Isolamento direto positivo ²	Isolamento direto negativo	Total
Pré-enriquecimento positivo	17/22 (77,3%)	0/22 (0,0%)	17/22 (77,3%)
Pré-enriquecimento negativo	1/22 (4,5%)	4/22 (18,2%)	5/22 (22,7%)
Total	18/22 (81,8%)	4/22 (18,2%)	22/22 (100%)

*Teste exato de McNemar ($P=1,00$; $g1 = 1$)

Tabela 2. Isolamento de *Campylobacter* em carcaças de frangos utilizando os métodos de pré-enriquecimento (PE) e isolamento direto (ID)*

Método	Isolamento direto positivo	Isolamento direto negativo	Total
Pré-enriquecimento positivo	93/95 (96,9%)	2/95 (2,1%)	95 (99%)
Pré-enriquecimento negativo	1/95 (1,0%)	0/95 (0,0%)	1 (1%)
Total	94 (97,9%)	2/95 (2,1%)	96 (100%)

*Teste exato de McNemar ($P = 1,00$; $g1 = 1$)

DISCUSSÃO

Não houve diferença significativa ($p=1,00$) entre os métodos avaliados para isolamento de *Campylobacter* a partir de swabs cloacais, com identificação de 81,8% (18/22) de lotes positivos pelo ID e 77,3% (17/22) pelo PE e em carcaças de frango, com 99,0% (95/96) pelo PE e 97,9% (94/96) pelo ID.

Em concordância com o presente trabalho, não foi encontrada diferença significativa entre os procedimentos de pré-enriquecimento no meio de Hunt e posterior inoculação no meio mCCDA e isolamento direto em ágar Cefex (ambos em microaerofilia) para isolamento de *Campylobacter* em carcaças de frango [9]. Três meios sólidos seletivos (*Peterz's Charcoal Cefoperazone Deoxycolate Agar* (mCCDA), *Campy-Cefex Agar* e *Charcoal-based selective Medium*) foram testados para isolamento de *Campylobacter* em

carcaças, miúdos (moela e fígado) e cortes de aves e não apresentaram diferenças significativas entre eles, com 76%, 64% e 68% de isolamento, respectivamente. Entretanto, o isolamento de *Campylobacter* em swabs cloacais demonstrou positividade de 55% pelo ID e apenas 7% com o pré-enriquecimento [6].

O método de análise e o plano de amostragem são decisivos para o isolamento de *Campylobacter* [4,8] e três fatores seriam fundamentais para o isolamento de *Campylobacter*: o uso de meios seletivos; a incubação em atmosfera com redução de oxigênio e adição de CO₂ e a incubação no isolamento primário a 42° C [12]. O cultivo de *Campylobacter* tem sido realizado nas rotinas laboratoriais pelo incremento dos meios de cultura, nos quais a adição de antibióticos suprime a microbiota fecal competidora e favorece o crescimento da bactéria [15].

No presente estudo, a positividade de 99,0% pelo PE e 97,9% pelo ID para *Campylobacter* em carcaças coletadas no abatedouro foi similar aos 98,0% encontrados nos EUA [14]. Entretanto, foi superior aos 83% encontrados em carcaças resfriadas adquiridas em supermercados da Grã-Bretanha, sugerindo que os níveis de contaminação podem ter sido reduzidos pelo tempo de exposição em condições aeróbicas [8]. Entre 30 e 100% das aves abrigam o *Campylobacter* no intestino [1] e a bactéria foi detectada em fezes de frango em 83%, 86,8% e 90% das amostras examinadas, respectivamente [2,5,7].

A contaminação das carcaças é dependente da idade e do nível da contaminação dos lotes na granja e da influência de variáveis relativas à produção, transporte e processo. A determinação do nível de contaminação nas carcaças por *Campylobacter* teria

implicações mais severas na exposição para o consumidor do que a simples frequência com níveis baixos, sendo fundamental a padronização das metodologias para a pesquisa de *Campylobacter*, paralelamente a um esclarecimento epidemiológico para uma melhor rastreabilidade, tanto para aves vivas como para carcaças de frango e seus produtos [10].

CONCLUSÃO

A acurácia entre os métodos de pré-enriquecimento e isolamento direto foi de 96,9%, indicando que os dois métodos podem ser utilizados para a identificação de *Campylobacter*. Entretanto, devido à antecipação dos resultados em 24 horas, recomenda-se adotar o método de isolamento direto.

NOTAS INFORMATIVAS

¹Oxoid, Cambridge, England.

REFERÊNCIAS

- 1 **Berrang M.E., Smith D.P. & Windham W.R. 2004.** Effect of intestinal content contamination on broiler carcass *Campylobacter* counts. *Journal of Food Protection*. 67: 235-238.
- 2 **Blaser M.J., LaForce F.M., Wilson N.A. & Wang W.L. 1980.** Reservoirs for human campylobacteriosis. *Journal of Infectious Diseases*. 141: 665-669.
- 3 **Carvalho A.C.F.B., Lima V.H.C., Pereira G.T. & Schocken-Iturrino R.P. 2001** *Campylobacter* em granja avícola. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. 96: 191-195.
- 4 **Domínguez C., Gómez I. & Zumalacárregui J. 2002.** Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in retail chicken meat in Spain. *International Journal of Food Microbiology*. 72: 165-168.
- 5 **Grant I.H., Richardson N.J. & Bokenheuser V.D. 1980.** Broiler chickens as potential source of *Campylobacter* infections in humans. *Journal of Clinical Microbiology*. 11: 508-510.
- 6 **Hald B., Wedderkopp A. & Madsen M. 2000.** Thermophilic *Campylobacter* spp. in Danish broiler production: a cross-sectional survey and a retrospective analysis of risk factors for occurrence in broiler flocks. *Avian Pathology*. 29: 123-131.
- 7 **Jaramilo H.F. 1983.** Espécies termofílicas de *Campylobacter*: aspectos bacteriológicos, epidemiológicos e patogênicos. 114p. São Paulo, SP. Tese de Doutorado. Escola Paulista de Medicina, São Paulo.
- 8 **Joergensen F., Bailey R., Williams S. & Henderson P. 2002.** Prevalence and numbers of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. on raw, whole chickens in relation to sampling methods. *International Journal of Food Microbiology*. 76: 151-164.
- 9 **Line J.E., Stern N.J., Lattuada C.P. & Benson S.T. 2001.** Comparison of methods for recovery and enumeration of *Campylobacter* from freshly processed broilers. *Journal of Food Protection*. 64: 982-986.
- 10 **Line J.E. 2001.** Development of a selective differential agar for isolation and enumeration of *Campylobacter* spp. *Journal of Food Protection*. 64: 1711-1715.
- 11 **Mead G.C. 2002.** Factors affecting intestinal colonisation of poultry by *Campylobacter* and role of microflora in control. *World's Poultry Science Journal*. 58: 169-178.
- 12 **Shih D.Y.C. 2000.** Isolation and identification of enteropathogenic *Campylobacter* spp. from chicken in Taipei. *Journal of Food Protection*. 63: 304-308.
- 13 **Stern N.J. 1995.** Influence of season and refrigerated storage on *Campylobacter* spp. contamination of broiler carcasses. *Journal Applied Poultry Research Savoy*. 4: 235-238.
- 14 **Stern N.J. & Robach M.C. 2003.** Enumeration of *Campylobacter* spp. in broiler feces and in corresponding carcasses. *Journal of Food Protection*. 66: 1557-1563.
- 15 **Uyttendaele M. & Debevere J. 1996.** Evaluation of Preston medium for detection of *Campylobacter jejuni* in vitro and in artificially and naturally contaminated poultry products. *Food Microbiology*. 13: 115-122.
- 16 **Wonglumsom W., Vishnubhatla A., Kim J.M. & Fung D.Y.C. 2001.** Enrichment media for isolation of *Campylobacter jejuni* from inoculated ground beef and chicken skin under normal atmosphere. *Journal of Food Protection*. 64: 630-634.