



**QUANTIFICAÇÃO DE *Campylobacter* spp. TERMOTOLERANTES EM AMOSTRAS
DE CARÇAÇAS DE FRANGO CONGELADAS**

Sarah Jarschel de **Camargo**¹; Juliano **Borsato-Moysés**²; Maristela da Silva do **Nascimento**³;
Neusely da **Silva**⁴; Valéria Christina Amstalden **Junqueira**⁵

Nº14239

RESUMO - O desempenho de meios de cultura para quantificação de bactérias do gênero *Campylobacter* spp. em carne de frango foi avaliado comparativamente neste trabalho. Trinta amostras de carcaças de frango inteiras congeladas, de diferentes marcas comerciais, foram adquiridas no comércio varejista de Campinas, SP. Após descongelamento, as amostras foram pesadas e submetidas à lavagem superficial (externa e interna) durante dois minutos, sendo utilizado Água Peptonada Tamponada (BPW) como diluente, na proporção de 4 g de amostra por mL de diluente. A contagem de colônias foi realizada de acordo com a metodologia ISO 10272-2:2006, com plaqueamento em superfície, em dois diferentes meios de cultura, o Ágar Carvão Cefoperazona Desoxicolato Modificado (m-CCDA) como meio de referência e o meio cromogênico CampyFood Agar (CFA), ambos em duplicata, com inóculo de 250 µL. Posteriormente foram verificadas a morfologia, motilidade e realizados os testes de produção de oxidase, crescimentos a 41,5 °C em aerobiose e a 25 °C em microaerofilia, para a confirmação de *Campylobacter* spp. termotolerantes. O m-CCDA detectou a presença da bactéria em quatro amostras (13 %) com contagem variando de 0,3 logUFC/g a 0,9 logUFC/g. O CFA detectou a presença em oito amostras (27 %) com contagem variando de 0,04 log UFC/g a 2,1 logUFC/g. O meio cromogênico CFA foi mais eficaz no isolamento. Em decorrência da importância que esse grupo microbiano representa para a saúde pública mundial, a contaminação constatada em alimentos mantidos sob congelamento remete à necessidade do monitoramento constante desses produtos alimentícios.

Palavras-chaves: Carne de frango; *Campylobacter*; meios de cultura; m-CCDA; CFA.

¹Autor: Bolsista CNPq (PIBIC), Graduanda em Ciências Biomédicas, VerisMetrocampIBTA, Campinas-SP; sarahjarschelc@gmail.com

²Autor: Doutorando em Microbiologia; UNESP, Campus de São José do Rio Preto; julianoborsato@uol.com.br

³Colaborador: Pesquisador Científico do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Campinas-SP;

⁴Colaborador: Pesquisador Científico do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Campinas-SP;

⁵Orientador: Pesquisador Científico do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Campinas-SP; vcj@ital.sp.gov.br



ABSTRACT-The performance of culture media for quantification of bacteria of the genus *Campylobacter* spp. in chicken meat was comparatively evaluated in this work. Thirty samples of whole frozen chicken carcasses from different commercial brands were purchased in retail stores in Campinas, SP. After thawing, the samples were weighed and superficially cleaned (internal and external) for two minutes, being used Buffered Peptone Water (BPW) as diluent, at a ratio of 4 g of sample per mL of diluent. The colony counting was conducted according to ISO 10272-2:2006 methodology, with surface plating in two different culture media, Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Modified Agar (mCCDA) as a reference medium and the chromogenic CampyFood Agar (CFA), both in duplicate with 250 μ L inoculum. Subsequently the morphology and motility were verified and oxidase production tests performed, growth at 41.5 °C in aerobic and 25 °C in microaerobic for confirmation of thermotolerant *Campylobacter* spp. The mCCDA detected the presence of the bacteria in four samples (13%) with count ranging from 0.3 logCFU/g to 0.9 logCFU/g. The CFA has detected the presence in eight samples (27%) with counts ranging from 0.04 logCFU/g to 2.1 logCFU/g. The CFA chromogenic medium was more effective in isolation. Due to the importance of this microbial group for global public health, the contamination found in food kept under freezing evidences the need for constant monitoring of these food products.

Key-words: Chicken meat; *Campylobacter*; culture media, mCCDA, CFA.

1 INTRODUÇÃO

Conforme a Organização Mundial de Saúde (OMS) as espécies termotolerantes de *Campylobacter* são a causa mais freqüente de campilobacterioses em humanos (OMS, 2011). Dependendo do alimento envolvido, como produtos avícolas e dos grupos de risco, como crianças com idade inferior a cinco anos e pessoas entre 15 e 29 anos, principalmente com o sistema imunológico comprometido, uma dose infectante de 500 células pode ser suficiente para causar a infecção, conforme o Centers for Disease Control and Prevention (CDC, 2010; NAYAK, 2012).

A principal rota de transmissão do patógeno é o consumo de alimentos contaminados, especialmente carne mal cozida, sendo a carne de frango evidenciada como o principal fator de veiculação desta zoonose (FAO, 2009; CDC, 2010).

O monitoramento do risco associado entre espécies de *Campylobacter* e a carne de frango é dependente dos métodos de detecção e enumeração (HABIB; UYTENDAELE; ZUTTER, 2011),



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

sendo essencial a utilização de diferentes métodos para a confirmação deste gênero microbiano (EUZÉBY, 2010).

O congelamento reduz a população, mas estudos demonstraram que *Campylobacter* pode ser detectado em carne de frango mesmo depois de várias semanas a -20 °C (BABAKHANI; BRADLEY; JOENS, 1993; ALTER; SCHERER, 2006; JASSON et al., 2007; HABIB; ZUTTER; UYTENDAELE, 2013). Com isto, confirma-se que esses micro-organismos conseguem sobreviver nessas condições de estocagem. A contaminação das carcaças é primariamente superficial, mas as células podem penetrar em aberturas e fendas da pele, onde proteínas, ácidos graxos e gorduras oferecem proteção contra a ação deletéria do congelamento (SOLOW; CLOAK; FRATAMICO, 2003; DAVIS; CONNER, 2007).

Com relação à detecção e enumeração do patógeno no alimento, tradicionalmente, o procedimento de amostragem para a análise de carcaças de frango inteiras citado na literatura é a lavagem superficial (externa e interna). O método tem fundamentação científica sólida e foi incorporado por diferentes países para o estabelecimento de padrões microbiológicos (FSIS, 2011).

Os meios de cultura tradicionais empregados nas metodologias de isolamento e enumeração de *Campylobacter* spp. termotolerantes em alimentos contêm diversas combinações de agentes sequestrantes para aumentar a tolerância ao oxigênio e de antibióticos para reduzir a competição da microbiota acompanhante (ISO 10272-2, 2006). Como um forte alicerce à pesquisa deste grupo, a utilização de meios cromogênicos têm se estabelecido como uma importante ferramenta na enumeração de *Campylobacter*. O método de referência ISO 10272-2 (2006) (enumeração) utiliza testes tradicionais para a confirmação do gênero *Campylobacter*: morfologia e motilidade, teste de oxidase, crescimento a 25 °C em atmosfera microaerófila e crescimento a 41,5 °C em atmosfera aeróbia. Segundo Ahmed, Léon-Velarde e Odumeru (2012) pode haver um desenvolvimento mínimo em condições aeróbias a 41,5 °C.

Em decorrência da importância que *Campylobacter* spp. termotolerantes representam à saúde pública mundial, comparou-se o desempenho de diferentes meios de cultura na quantificação desses micro-organismos em carne de frango.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAGEM

Foram adquiridas 30 amostras de carcaças de frango inteiras, congeladas, de diferentes marcas comerciais, sob fiscalização sanitária, no prazo de validade, no comércio varejista de



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

Campinas, SP. Conforme a ISO 10272-2 (2006) estas foram acondicionadas em um recipiente isotérmico contendo gelo reciclável e encaminhadas de imediato ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos (CCQA) do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Campinas, SP, sendo estocadas sob congelamento até o momento dos ensaios.

Cada amostra foi preparada por meio da lavagem superficial da carcaça inteira, descrito na seção subsequente.

2.2 LAVAGEM SUPERFICIAL DA CARÇAÇA INTEIRA

Foi conduzida conforme descrito pelo Food Safety and Inspection Service (FSIS) do United States Department of Agriculture (USDA). Asepticamente, a carcaça foi transferida para uma bolsa plástica estéril, pesada em balança semi-analítica, e o peso obtido foi dividido por quatro para ser definido o volume (mL) de Água Peptonada Tamponada (BPW), padronizado em 4:1 (carcaça:diluyente), seguindo homogeneização manual por 35 rotações por minuto (RPM) durante 2 min, de forma a lavar a parte interna e externa da carcaça (FSIS, 2011). A diluição decimal seriada subsequente foi realizada em água peptonada 0,1 % (H₂O_p).

2.3 MÉTODO ISO 10272-2:2006 (ENUMERAÇÃO)

A cepa de referência *Campylobacter jejuni* da Coleção de Culturas de Bactérias de Interesse em Saúde (CCBS 44406) - (American Type Culture Collection - ATCC 33291), cedida pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, foi utilizada como controle positivo.

A partir da água de lavagem e das diluições decimais seriadas de cada amostra, obtidas nos diferentes diluentes, foram inoculadas alíquotas de 250 µL das mesmas (volume equivalente a 1 g), nos meios de cultura seletivos, em duplicata:

Ágar Carvão Cefoperazona Desoxicolato Modificado (m-CCDA), suplementado com 4 mL/L de solução estéril dos antibióticos cefoperazona de sódio (32 mg/L) e anfotericina B (10 mg/L), com incubação a 41,5 °C/48 h, em microaerofilia (jarra de anaerobiose com kit de geração de gás para 5 % O₂, 10 % CO₂ e 85 % N₂). As colônias típicas são acinzentadas, geralmente com brilho metálico, planas e úmidas, com tendência ao espalhamento, porém outras formas podem ocorrer.

CampyFood Agar (CFA), meio cromogênico pronto para o uso, com incubação a 41,5 °C/48 h, em microaerofilia, às mesmas condições. As colônias típicas variam entre vermelho alaranjado a vermelho escuro, com ou sem brilho metálico. Eventualmente podem apresentar coloração rosa avermelhado ao marrom escuro, podendo apresentar espalhamento com bordas irregulares.



2.4 TESTES DE CONFIRMAÇÃO DE *Campylobacter* spp. TERMOTOLERANTES

A partir das placas de contagem, foram selecionadas de três a cinco colônias típicas para a confirmação. A partir disto, foram feitas estrias de esgotamento da cultura de cada colônia em uma placa de Columbia Blood Agar (CBA), suplementado com sangue de cavalo desfibrinado 5 % para purificação. Posteriormente, as placas de CBA foram incubadas a 41,5 °C/48 h, em atmosfera microaerófila. Após este período, foram utilizadas as culturas em CBA para a realização dos testes de confirmação.

2.5 MORFOLOGIA E MOTILIDADE

Cada colônia foi suspensa em 1mL de Caldo Brucella para serem examinadas a morfologia (coloração de Gram) e motilidade (montagem úmida) por meio de microscopia óptica. As culturas típicas de *Campylobacter* spp. termotolerantes são pequenos bastonetes curvos, Gram negativos, espiralados, com arranjo em forma de “S”, com motilidade “saca rolha”.

2.6 PRODUÇÃO DE OXIDASE

Foi retirada uma pequena quantidade da cultura e espalhada sobre uma tira contendo reagente, observando se ocorre o desenvolvimento de uma cor azul intensa em aproximadamente 10 s (teste positivo). O não desenvolvimento da cor azul no intervalo de 1 min considero teste como negativo. *Campylobacter* spp. termotolerantes são oxidase positivos.

2.7 CRESCIMENTO A 25 °C EM ATMOSFERA MICROAERÓFILA

Foi estriada uma alçada da cultura em uma nova placa e incubada a 25 °C/48 h, em atmosfera microaerófila. *Campylobacter*spp. termotolerantes não crescem nestas condições.

2.8 CRESCIMENTO A 41,5 °C EM ATMOSFERA AERÓBIA

Foi estriada uma alçada da cultura em uma nova placa e incubada a 41,5 °C/48 h, em atmosfera aeróbia. *Campylobacter* spp. termotolerantes raramente crescem nestas condições.



3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O m-CCDA detectou a presença da bactéria em quatro amostras (13 %) com contagem entre 0,3 logUFC/g e 0,9 logUFC/g. O CFA detectou a presença em oito amostras (27 %) com contagem variando de 0,04 logUFC/g a 2,1 logUFC/g. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 1.

No estudo conduzido por Ahmed, León-Velarde e Odumeru (2012) foram analisadas 95 amostras de carne de frango. Deste total, 17 % e 26 % respectivamente, apresentaram colônias típicas de *Campylobacter* spp. termotolerantes nos meios de cultura m-CCDA e CFA, sendo que, do total de cepas isoladas em ambos os meios, 90 % e 87 % foram confirmadas como pertencentes a esse grupo microbiano, demonstrando sensibilidade e especificidade no isolamento. Contudo, Franchin, Ogliari e Batista (2007) obtiveram 64 % das amostras de carcaças de frango congeladas em uma indústria de processamento contaminadas com esse grupo microbiano, percentual positivo superior a este trabalho. O meio de cultura CFA também foi mais eficaz no isolamento desses micro-organismos na pesquisa desenvolvida por Habib, Uyttendaele e Zutter (2011), positividade foi verificada em 17 amostras e, no m-CCDA, em 15 amostras para um n = 49.

4. CONCLUSÃO

Constatamos que o meio cromogênico CFA foi mais eficaz no isolamento de *Campylobacter* spp. termotolerantes, sendo também confirmada a capacidade desses micro-organismos sobreviverem em carcaças de frango congeladas.

A contaminação verificada em alimentos mantidos sob congelamento remete a necessidade do monitoramento constante desses produtos alimentícios.

5. AGRADECIMENTOS

À CAPES e ao CNPq respectivamente, pelas bolsas de doutorado e de iniciação científica concedidas ao primeiro e segundo autores. À FAPESP pelo auxílio financeiro concedido.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, R.; LEÓN-VELARDE, C. G.; ODUMERU, J. A. Evaluation of novel agars for the enumeration of *Campylobacter* spp. in poultry retail samples. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 88, n. 2, p. 304-310, 2012.

ALTER, T.; SCHERER, K. Stress response of *Campylobacter* spp. and its role in food processing. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, Berlin, v. 53, n. 8, p. 351-357, 2006.



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

Tabela 1. Contagem de *Campylobacter* spp. termotolerantes em carcaças de frango congeladas utilizando Ágar Carvão Desoxicolato Modificado (m-CCDA) e CampyFood Agar (CFA).

Amostra	m-CCDA (UFC/g)	CFA (UFC/g)
1	<1	<1
2	<1	<1
3	<1	<1
4	<1	<1
5	<1	<1
6	<1	<1
7	<1	<1
8	<1	<1
9	<1	<1
10	<1	<1
11	8	<1
12	<1	<1
13	<1	<1
14	<1	<1
15	<1	<1
16	<1	59
17	7	<1
18	<1	<1
19	<1	116
20	3	17
21	<1	<1
22	<1	<1
23	<1	<1
24	<1	<1
25	<1	<1
26	<1	2
27	<1	1
28	<1	27
29	<1	3
30	2	2

Legenda. Negrito = resultado positivo.



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

BABAKHANI, F. K.; BRADLEY, G. A.; JOENS, L. A. Newborn piglet model for campylobacteriosis. **Infection and Immunity**, Washington, D. C., v. 61, n. 8, p. 3466-3475, 1993.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. National Center for Zoonotic, Vector-Borne, and Enteric Diseases. **Campylobacter**, Atlanta, 2010. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/campylobacter/>>. Acesso em: 6 dez. 2013.

DAVIS, M. A.; CONNER, D. E. Survival of *Campylobacter jejuni* on poultry skin and meat at varying temperatures. **Poultry Science**, Champaign, v. 86, n. 4, p. 765-777, 2009.

EUZÉBY, J. P. **Campylobacter**. In: Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire, Toulouse, 2010. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/cc/campylobacter.html>>. Acesso em: 4. mar. 2014.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO/WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Codex Alimentarius. **Risk assessment of Campylobacter spp. in broiler chickens**. Roma, 2009. 161 p. Disponível em: <http://www.fao.org/fileadmin/templates/agns/pdf/jemra/MRA_12.pdf>. Acesso em: 6 dez. 2013.

FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE - FSIS/UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA. **Isolation, identification and enumeration of Campylobacter jejuni/ coli/ lari from poultry rinse and sponge samples**, Washington, D.C., 2011. Disponível em: <http://www.fsis.usda.gov/PDF/MLG_41_01.pdf>. Acesso em: 3 mar. 2014.

FRANCHIN, P. R.; OGLIARI, P. J.; BATISTA, C. R. V. Frequency of thermophilic *Campylobacter* in broiler chickens during industrial processing in a Southern Brazil slaughterhouse. **British Poultry Science**, London, v. 48, n. 2. p.127-132, 2007.

HABIB, I.; UYTTENDAELE, M.; ZUTTER, L. **Campylobacter species**. In: Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. 4. ed. DOYLE, M. P.; BUCHANAN, R. L. (Eds.). Washington, D.C.: ASM Press, 2013. p. 263-286).

HABIB, I.; UYTTENDAELE, M.; ZUTTER, L. Evaluation of ISO 10272:2006 standard versus alternative enrichment and plating combinations for enumeration and detection of *Campylobacter* in chicken meat. **Food Microbiology**, Amsterdam, v. 28, n. 6, p. 1117-1123, 2011.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO 10272-2:2006. Microbiology of food and animal feeding stuffs - **Horizontal method for the detection and enumeration of Campylobacter spp.** - Part 2: Colony-count technique. 1. ed. Geneva, 2006. 13 p.

JASSON, V.; UYTTENDAELE, M.; RAJKOVIC, A.; DEBEVERE, J. Establishment of procedures provoking sub-lethal injury of *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli* O157 to serve method performance testing. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 118, n. 3, p. 241-249, 2007.

NAYAK, R. *Campylobacter jejuni*. In: Bad Bug Book - **Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins**. 2. ed. LAMPEL, K. A.; AL-KHALDI, S.; CAHILL, S. M. (Eds.). Silver Spring: FDA, 2012. p. 17-20. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodbornIllnessContaminants/UCM297627.pdf>>. Acesso em: 31 mar. 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - OMS. **Campylobacter**. Factsheet nº.255, Geneva, 2011. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/en/>>. Acesso em: 25 mar. 2014.

SOLOW, B. T.; CLOAK, O. M.; FRATAMICO, P. M. Effect of temperature on viability of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* on raw chicken or pork skin. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 66, n. 11, p. 2023-2031, 2003.