

TÉCNICAS LABORATORIAIS PARA ISOLAMENTO DE *Campylobacter* EM MATERIAL AVÍCOLA

Daiane Voss-Rech* e Clarissa Silveira Luiz Vaz

Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC

**daiane.rech@embrapa.br*

O gênero *Campylobacter* tem sido reconhecido mundialmente como agente de enterocolite humana transmitida por alimentos. Sua importância como doença transmitida por alimentos é crescente e simultaneamente crescem os esforços laboratoriais para detecção do patógeno. Diversos métodos de coleta e isolamento vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de obter melhores resultados na detecção bacteriológica de *Campylobacter*. Inúmeras variações dos métodos microbiológicos convencionais (ADVISORY COMMITTEE ON THE MICROBIOLOGICAL SAFETY OF FOOD, 2010; INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2006; USDA/FSIS, 1998), técnicas de cultura seletiva como passagem por membrana filtrante e centrifugação (BOLTON, et al., 1988; STEELE; MCDERMOTT, 1984) ou associação destas (MÉGRAUD, 1987; SPEEGLE, et al., 2009) vêm sendo utilizadas para o isolamento de *Campylobacter*. Apesar das inúmeras possibilidades metodológicas, a divergência entre os resultados e a inexistência de um método de referência para amostras de origem aviária dificultam a definição do método de isolamento a ser utilizado no laboratório. Como suporte à linha de pesquisa com *Campylobacter*, na Embrapa Suínos e Aves, foi necessário desenvolver estudos para selecionar um protocolo para o isolamento de *Campylobacter* a partir de amostras de origem aviária. A seguir descreveremos os resultados desta experiência.

Coleta e transporte das amostras

As condições de coleta e transporte de amostras destinadas à análise microbiológica de *Campylobacter* devem considerar algumas características deste gênero. São bactérias que requerem baixa tensão de oxigênio para multiplicação. São sensíveis a concentrações superiores a 2% de NaCl a 30-35°C ou 1% a 4°C. O pH ótimo está entre 6,5 e 7,5 e são sensíveis à desidratação (HOLT, 1994). Sobrevivem melhor em baixas temperaturas, porém são sensíveis ao congelamento (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2006; HUNT; ABEYTA, 1995).

Sendo assim, as amostras coletadas devem ser transportadas sob refrigeração e processadas rapidamente. Amostras íntegras, como cecos ou carcaças de frango podem ser embaladas e transportadas em sacos plásticos. Amostras naturalmente mais expostas às condições ambientais, como suabes de cloaca e de arrasto, devem ser transportadas em meio de conservação. Ágar Cary-Blair e Caldo Peptonado Tamponado 1% (CPT) são boas soluções como meio de transporte sólido e líquido, respectivamente, pois são de fácil acesso aos laboratórios e apresentam capacidade tamponante, que favorece a manutenção das amostras até o processamento.

Um estudo sobre a colonização de frangos de corte por *Campylobacter* demonstrou que a detecção da bactéria ocorreu a partir da terceira semana, sendo possível estimar o percentual de suabes de cloaca positivos, aumentando gradativamente a partir da detecção dos primeiros positivos e atingindo quase 100% do lote no pré-abate (VAZ, et al. 2012a) (Figura 1), sendo este o período mais indicado para a coleta das amostras.

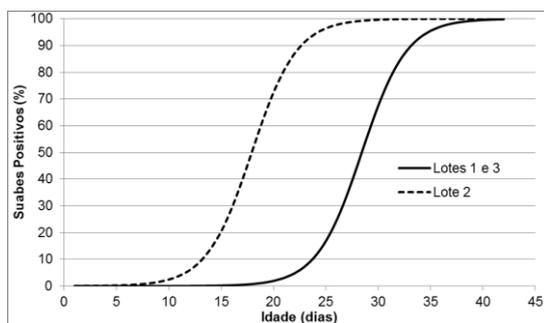


Figura 1. Percentual de suabes de cloaca positivos para *Campylobacter* em três lotes de frangos conforme modelo logístico ajustado.

Isolamento laboratorial

Aspectos gerais

O isolamento de *Campylobacter* demanda que o laboratório disponha de algumas condições mínimas, como geradores de microaerofilia ou mistura gasosa adequada (N_2 :85%, O_2 :5% e CO_2 :10%) (Figura 2), meios de cultura e antimicrobianos específicos, amostras controle e treinamento laboratorial.

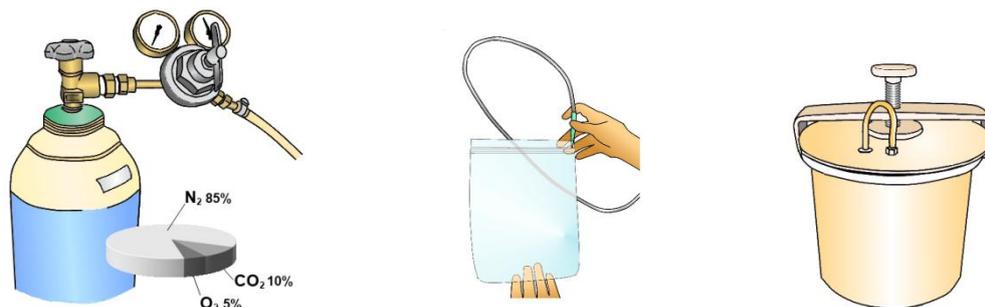


Ilustração: Alexandre Matthiensen/Embrapa

Figura 2. Equipamentos e acessórios utilizados na Embrapa Suínos e Aves para geração e manutenção de condições microaerófilas no cultivo de *Campylobacter*

Existem três principais fatores que dificultam o isolamento de *Campylobacter*:

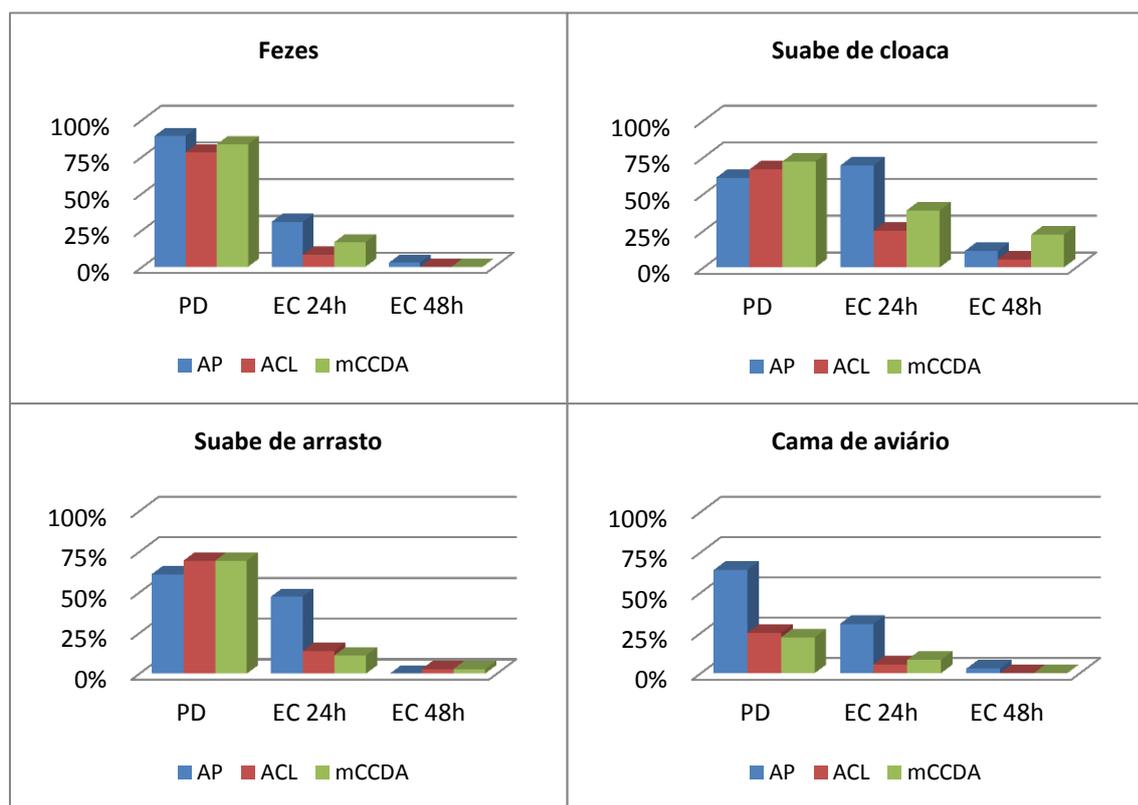
1. Amostras muito contaminadas com flora competitiva;
2. Amostras com baixo número de micro-organismos;
3. Células injuriadas pelas condições de armazenamento e processamento (congelamento, dessecação, aquecimento, acidificação e exposição ao oxigênio) (ADVISORY COMMITTEE ON THE MICROBIOLOGICAL SAFETY OF FOOD, 2010; THEOPHILO; JAKABI, 2008).

O uso de antimicrobianos e antifúngicos nos meios de cultura é indispensável para reduzir a flora contaminante, dentre os quais podemos citar: trimetoprim, vancomicina, anfotericina B, cefalotina, polimixina B, cefoperazona, rifampicina e outras. Suplementos redutores de oxigênio como sulfato ferroso, metabissulfito e piruvato de sódio, hemina, sangue e carvão bacteriológico também são componentes de alguns meios de cultura (HUNT; ABEYTA, 1995).

Nossa experiência

Material de campo

Um trabalho foi desenvolvido para avaliar a eficiência de diferentes meios seletivos e estratégias de isolamento para detecção de *Campylobacter* termófilos em material avícola, rotineiramente usado em pesquisas ou monitorias microbiológicas de aves (cama de aviário, fezes, suabes de cloaca e de arrasto). O estudo demonstrou que amostras de fezes, suabe de cloaca e suabe de arrasto coletados de lotes de frangos a partir de quatro semanas de idade apresentaram maior frequência de isolamento da bactéria (Figura 3) (VAZ, et al., 2012b) e seriam os mais adequados para monitoria de *Campylobacter* em frangos de corte.



ACL: Agar Campy-Line; mCCDA: Agar Carvão Cefoperazona Deoxycolato modificado

Figura 3. Detecção de *Campylobacter* termófilos em amostras de origem aviária conforme diferentes estratégias e meios seletivos para isolamento bacteriológico

O mesmo trabalho demonstrou que para as amostras de cama de aviário o plaqueamento direto (PD) em Ágar Preston foi o mais efetivo para detecção de *Campylobacter* ($p < 0,05$). Para as demais amostras não houve diferença estatística entre os três meios seletivos analisados no PD. Para as amostras de suabes de cloaca e de arrasto não houve diferença estatística entre o plaqueamento direto ou o enriquecimento em Caldo Bolton (EC) por 24h em Ágar Preston. Em relação à cama e fezes, o PD foi mais eficiente no isolamento de *Campylobacter* se comparado ao EC 24h, independente do meio seletivo utilizado.

Por outro lado, o EC por 48h não favoreceu o isolamento de *Campylobacter* em cama de aviário, fezes, suabes de arrasto e de cloaca em relação ao PD e ao EC por 24h (Figura 3) (VAZ, et al., 2012b). Esse resultado sugere que o tempo de incubação no enriquecimento em caldo é um fator importante: a partir de 24h a flora competitiva aumenta reduzindo os índices de isolamento de *Campylobacter*, que ficam ainda menores após 48h (ADVISORY COMMITTEE ON THE MICROBIOLOGICAL SAFETY OF FOOD, 2010; VAZ, et al., 2012b).

O plaqueamento direto facilita o isolamento de *Campylobacter* por inibir a proliferação exacerbada de contaminantes naturalmente presentes na amostra, entretanto, é descrito como não suficientemente sensível para a detecção em amostras com baixa concentração do micro-organismo. O enriquecimento seletivo favorece o isolamento de *Campylobacter* nestas amostras (THEOPHILO; JAKABI, 2008). Assim, a combinação do PD e do EC por 24h pode ser avaliada para aumentar a probabilidade de isolamento.

Baseado nesses resultados e considerando o ganho em termos de custo e tempo de execução do ensaio, o plaqueamento direto em dois meios seletivos com diferentes composições de suplementos seletivos (ex. AP e mCCDA) pode ser recomendado como primeira opção para detecção de *Campylobacter* em cama de aviário, fezes, suabes de arrasto e de cloaca; podendo ser associado ao EC 24h para análise de suabes de cloaca e de arrasto. O protocolo utilizado na Embrapa Suínos e Aves para isolamento de *Campylobacter* em amostras aviárias segue o fluxograma descrito na Figura 4.

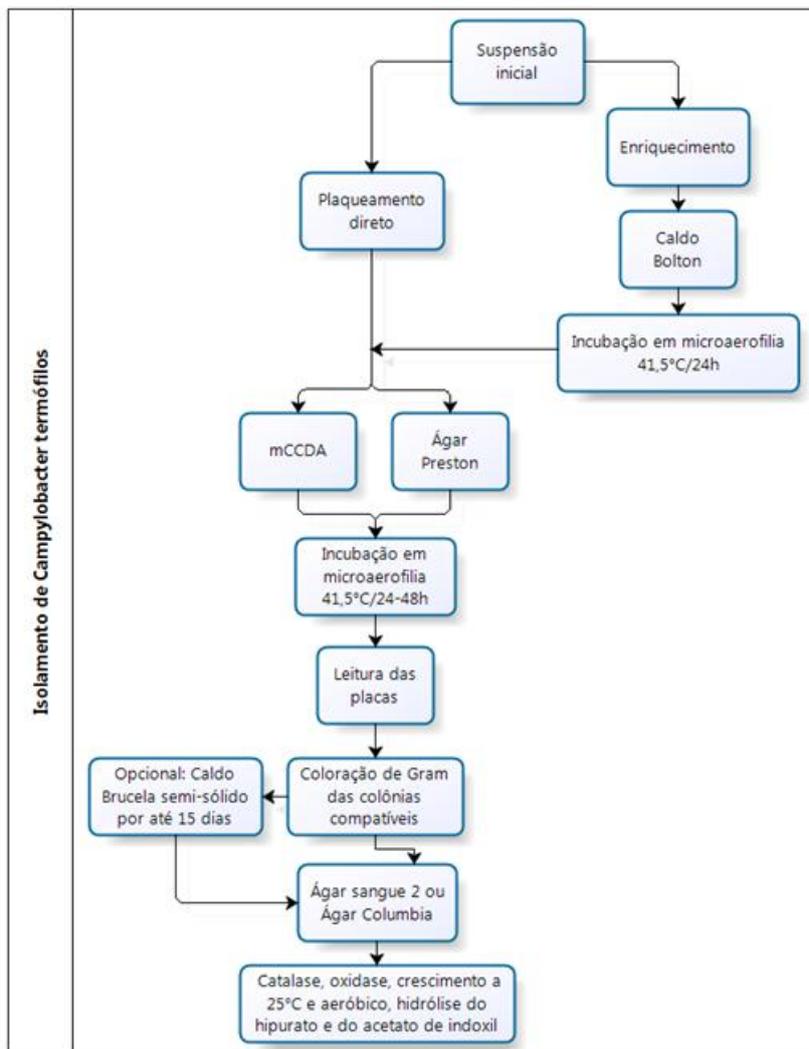


Figura 4. Fluxograma do isolamento de *Campylobacter* termófilos de amostras de origem aviária utilizado pela Embrapa Suínos e Aves

Carcaças e cortes de frango

Em relação a alimentos, existem métodos validados para análise qualitativa de *Campylobacter*, dos quais o mais conhecido é o padronizado pela *International Organization for Standardization* (ISO) (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2006). Porém, alguns autores relatam resultados variáveis com esse protocolo (GRITTI, et al., 2011; MORAN, et al., 2009). O fluxograma deste método está apresentado na Figura 5. Nesse tipo de material é preconizada a pré-incubação em caldo seletivo por 4h a 37°C em microaerofilia (BOLTON, 2000; HUMPHREY, 1989; INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2006;), evitando meios com rifampicina e polimixina, para recuperação das células lesadas que podem tornar-se sensíveis à temperatura de 42°C e a esses antibióticos (ADVISORY COMMITTEE ON THE MICROBIOLOGICAL SAFETY OF FOOD, 2010). O tempo de 4h deve ser limitante para evitar o crescimento exacerbado de contaminantes (ADVISORY COMMITTEE ON THE MICROBIOLOGICAL SAFETY OF FOOD, 2010; GOSENS; BUTZLER, 1992; THEOPHILO; JAKABI, 2008).

O preparo da suspensão inicial é realizado pela rinsagem do produto inteiro ou amostragem a partir de 5-10g de fragmentos da pele do pescoço, os quais são homogêneos em um diluente, como Caldo Peptonado Tamponado, a partir do qual uma parte é retirada e adicionada a nove volumes de Caldo Bolton. A recomendação para os cortes de frangos é utilizar fragmentos da superfície adicionados de nove volumes de Caldo Peptonado Tamponado (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2003).

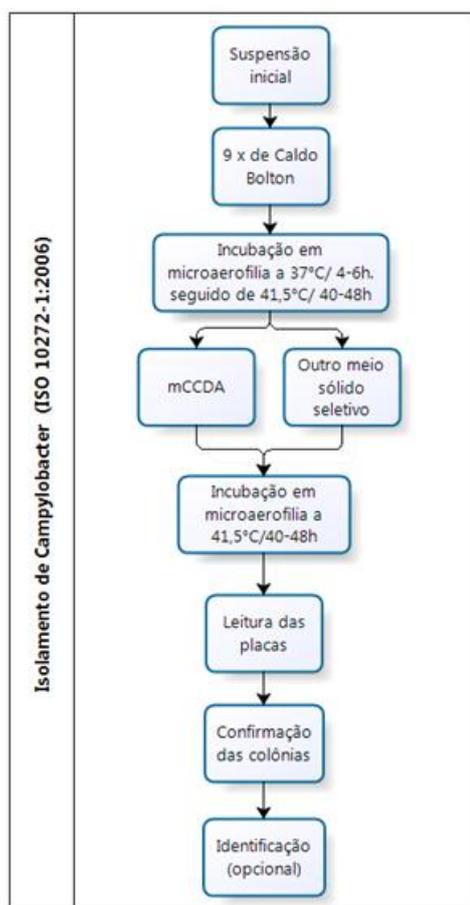


Figura 5. Fluxograma do isolamento de *Campylobacter* termófilos de amostras de alimentos e ração animal, conforme ISO 10272-1:2006. Adaptado de Humphrey et al. (2007).

Identificação das colônias

Colônias de *Campylobacter* não são hemolíticas, podem ser: lisas, convexas, brilhantes e com bordas perfeitas; ou ainda planas, translúcidas e lustrosas, com bordas irregulares e espalhadas. Geralmente são incolores, com tonalidades creme ou acinzentada, e diâmetro de 1-2 mm, podendo ainda ser puntiformes com 4-5 mm.

As células são móveis, Gram negativas, delgadas, curvas ou em forma de "S" ou de asa de gaivota, geralmente formando pequenas cadeias em *zig-zag*. Por esta morfologia particular o exame microscópico é um grande aliado no diagnóstico presuntivo de *Campylobacter*. Células velhas ou injuriadas podem apresentar-se cocóides e de multiplicação mais lenta.

Confirmação das colônias

Campylobacter não metaboliza açúcares, portanto a maioria das provas bioquímicas rotineiramente disponíveis nos laboratórios não são aplicáveis. Colônias com morfologia características devem ser semeadas em ágar sangue nº2 (AS) ou ágar Colúmbia (AC) com ou sem adição de sangue para confirmação pelas provas de catalase, oxidase e motilidade. A morfologia celular associada às provas confirmatórias costuma ser suficiente para diferenciar *Campylobacter* da maioria das espécies contaminantes, sendo recomendável associar os testes de crescimento microaeróbico a 25°C e aeróbico a 41,5°C para diferenciação de bactérias do gênero *Arcobacter*, filogeneticamente relacionado à *Campylobacter*.

Para diferenciar as espécies de *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari* são realizadas as provas de hidrólise do hipurato e acetato de indoxil. O teste de sensibilidade a cefalotina e ácido nalidíxico é descrito como prova diferencial das espécies de *Campylobacter* (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2006), sendo a resistência a cefalotina uma característica do gênero e ao ácido nalidíxico variável conforme a espécie. Na prática, observamos alta frequência de isolados de campo resistentes ao ácido nalidíxico, independente de espécie, o que recomenda cautela no uso e na interpretação desse teste como diferencial.

Outro teste que pode ser útil para a confirmação de colônias é a prova de aglutinação em látex, comercializada em *kit*. *Kits* comerciais para identificação também estão disponíveis (APY CAMPY - Biomeuriex), assim como *kits* de detecção por imunoenensaio enzimático (CAMPY - Meridian Bioscience; ProSpecT - Remel e ImmunoCard - Meridian Bioscience), além de outros. Nestes casos, entretanto, o custo por amostra pode ser um fator limitante ao uso em menor escala.

Manutenção e estoque dos isolados

Campylobacter não tolera a exposição ao oxigênio atmosférico, portanto uma alternativa prática para manter os isolados viáveis em curto prazo, durante a rotina laboratorial, é o Caldo Brucella semi-sólido (CBSS) (HUNT; ABEYTA, 1995). As colônias semeadas em CBSS multiplicam-se lentamente abaixo da superfície do meio, permanecendo viáveis a 37°C por até 15 dias. O meio de congelamento, composto por caldo nutriente, extrato de levedura, soro fetal bovino e FBP (sulfato ferroso, piruvato de sódio e metabisulfito de sódio) é uma alternativa para estocar as amostras em longo prazo à -70°C (HUNT; ABEYTA, 1995).

Conclusão

O estabelecimento da rotina laboratorial para isolamento de *Campylobacter* demanda tempo e perseverança e os resultados obtidos podem variar significativamente de acordo com o método utilizado. Contudo, o diagnóstico laboratorial de *Campylobacter* pode ser feito com segurança quando técnicas e métodos laboratoriais são avaliados e utilizados adequadamente.

Referências bibliográficas

- ADVISORY COMMITTEE ON THE MICROBIOLOGICAL SAFETY OF FOOD. **The isolation of *Campylobacter* spp. from food and environmental samples**. Surveillance Working Group. Discussion Paper ACM/994. 2010.
- BOLTON, F. J. Methods for isolation of *campylobacters* from humans, animals, food and water. In: The increasing incidence of human campylobacteriosis Report and Proceedings of a WHO Consultation of Experts. **Copenhagen Denmark**, p. 87-93. 2000.
- BOLTON, F. J.; HUTCHINSON, D. N.; PARKER, G. Reassessment of selective agars and filtration techniques for isolation of *Campylobacter* species from faeces. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 7, p. 155–160. 1988.
- GOOSENS, H.; BUTZLER, J. P. Isolation and identification of *Campylobacter* spp. In: NACHAMKIN, I., BLASER, M.J., TOMPKINS, L.S. (Ed.). ***Campylobacter jejuni*: current status and future trends**. Washington, DC: ASM, 1992. p. 93–109.
- GRITTI, D.; VAZ, C.S.L.; VOSS-RECH, D.; ALVES, L.; BORTOLINI, F. Thermophilic *Campylobacter* survey in chilled and frozen poultry meat at retail in Concórdia, Santa Catarina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 3, p.1-5. 2011.
- HOLT, J. G. (Ed.) *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th. ed. Maryland: Williams e Wilkins, 1994. 787 p.
- HUMPHREY, T. J. An appraisal of the efficacy of pre-enrichment for the isolation of *Campylobacter jejuni* from water and food. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, p. 119–126, 1989.
- HUMPHREY, T. J.; O'BRIEN, S.; MADSEN, M. *Campylobacters* as zoonotic pathogens: a food production perspective. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, n. 3, p. 237-257, 2007.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **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.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Microbiology of food and animal feeding stuffs** – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. (ISO 6887-2) Geneva: ISO, 2003.
- MÉGRAUD, F. Isolation of *Campylobacter* spp. from pigeon feces by a combined enrichment-filtration technique. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 1394–1395. 1987.
- MORAN L.; KELLY C.; MADDEN R. H. Factors affecting the recovery of *Campylobacter* spp. from retail packs of raw, fresh chicken using ISO 10272-1:2006. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, p. 628-632, 2009.
- SPEEGLE, L.; MILLER, M. E.; BACKERT, S.; OYARZABAL, O. A. Use of cellulose filters to isolate *Campylobacter* spp. from naturally contaminated retail broiler meat. **Journal of Food Protection**, v. 72, p. 2592–2596, 2009.
- STEELE, T. W.; MCDERMOTT, S. N. The use of membrane filters applied directly to the surface of agar plates for the isolation of *Campylobacter jejuni* from feces. **Pathology**, v. 16, p. 263–265. 1984.

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.

USDA/FSIS. **Isolation, identification, and enumeration of *Campylobacter jejuni/coli* from meat and poultry products**. Microbiology Laboratory Guidebook, chapter 6. 1998.

HUNT, J. M.; ABEYTA, C. *Campylobacter*. In: BACTERIOLOGICAL analytical manual. 8. ed. Maryland: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1995.

VAZ, C. S. L.; VOSS-RECH, D.; POZZA, J. S.; SANTOS, F. B. O.; COLDEBELLA, A.; SILVA, V. S. Dynamics of thermophilic *Campylobacter* colonization in broiler flocks reared on reused litter. **World's Poultry Science Journal**, v. 68, n. 1, 2012.

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.