

ENUMERAÇÃO DE *CAMPYLOBACTER* EM CARÇAÇAS, CORTES E MIÚDOS DE FRANGO PRODUZIDOS NO RIO GRANDE DO SUL

Eduardo Luís Mulinari¹, Rosângela Uhrig Salvatori², Cláudia Majolo³

Resumo: Com o objetivo de quantificar a presença de *Campylobacter* em carcaças, cortes e miúdos de frango produzidos no estado do Rio Grande do Sul, 50 amostras foram analisadas por meio da técnica UFC/g (Unidade Formadora de Colônia por grama) SimPlate®. Foram realizadas análises de comparação, equiparando-se a população obtida em meio não seletivo com a população obtida na técnica avaliada, por meio de linhagens ATCC (American type Culture Collection). Os testes aplicados para a avaliação do método UFC apresentaram resultados positivos relativamente superiores aos resultados esperados encontrados em meio não seletivo. Os produtos avícolas analisados apresentaram 34 % de contaminação por *Campylobacter*, os resultados encontrados evidenciam que as empresas produtoras e os órgãos fiscalizadores necessitam desenvolver melhores ferramentas de controle durante o processo produtivo, além de levantar a discussão quanto à exigência de padrões para o patógeno em estudo quando do estabelecimento de novas legislações.

Palavras-chave: *Campylobacter*. Frango. Número mais provável. SimPlate®.

ENUMERATION OF *CAMPYLOBACTER* ON CARCASSES, CUTS AND POULTRY OFFAL PRODUCED IN RIO GRANDE DO SUL

Abstract: In order to enumerate *Campylobacter* on carcasses, cuts and poultry offal produced in the State of Rio Grande do Sul, 50 samples were analysed using CFU/g SimPlate®. Comparison analyses were performed, equating the population obtained in a non-selective medium with the population obtained from the technique evaluated, using ATCC strains. The evaluation of the CFU method showed positive results, relatively higher when compared to the expected results found in a non-selective medium. The poultry products analysed showed 34 % of contamination. This is an indication that production companies and regulatory agencies should come up with more effective actions to control contamination during production. Moreover, it also suggests a discussion on the standards for the pathogen analysed in this study when establishing future legislation.

Keywords: *Campylobacter*. Most Probable Number. Poultry. SimPlate®.

1 Acadêmico do curso de Ciências Biológicas, bacharelado, do Centro Universitário UNIVATES.
E-mail: eduardom@univates.br

2 Bióloga e professora do curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário UNIVATES.

3 Química e colaboradora, Laboratório Unianálises - Centro Universitário UNIVATES.

1 INTRODUÇÃO

Dentre os fatores necessários para o crescimento microbiano, encontram-se os físicos e os químicos. Os fatores físicos incluem temperatura, pH e pressão osmótica. Já os químicos incluem fontes de carbono, nitrogênio, enxofre, fósforo, oxigênio, elementos traços e fatores orgânicos de crescimento (TORTORA, 2012). Dentre os grupos com restrição para crescimento encontra-se o gênero *Campylobacter*, caracterizado por serem espirilos gram-negativos e móveis, sendo, na sua maioria, patogênicos para humanos e outros animais. São considerados microaerófilos, cultivados e incubados em baixas tensões de O₂ (entre 3-15%) e altas tensões de CO₂ (entre 3-10%) (MADIGAN et al., 2010).

O gênero *Campylobacter* é composto por aproximadamente 14 espécies. Antes dos anos 70, as espécies de *Campylobacter* eram conhecidas principalmente por microbiologistas veterinários como organismos causadores de aborto espontâneo em gado e ovelhas, e como causa de outras patologias em animais, sendo classificadas como *Vibrio* sp. Esse gênero tem grande destaque na saúde pública, principalmente por pertencerem a ele várias espécies que podem causar diarreia, sendo *C. jejuni* a mais importante (JAY, 2005). Essas bactérias podem ser encontradas em amostras de água, alimentos e no trato intestinal das aves (CORTEZ et al., 2006).

Espécies de *Campylobacter* são patógenos bacterianos frequentemente associados em todo o mundo com gastroenterite humana. Na América do Norte, Europa e Japão, a campilobacteriose é uma das principais doenças de origem alimentar bacteriana e o consumo de carne de aves e/ou subprodutos é considerada como uma das principais causas da doença (SUZUKI; YAMAMOTO, 2009).

Segundo Brooks et al. (2012), as espécies *C. jejuni* e *C. coli* aparecem como patógenos humanos comuns, provocando enterites e, em alguns casos, infecção sistêmica. Para laboratórios em geral são indistinguíveis, não sendo possível a diferenciação das duas espécies. É provável que 5 a 10% das infecções atribuídas a *C. jejuni* sejam causadas por *C. coli*. Essas bactérias são tão comuns quanto *Salmonella* e *Shigella* como causas de diarreia. Nos EUA, estima-se que ocorram dois milhões de casos anualmente.

A detecção de *Campylobacter* em alimentos torna-se complicada, pois a população presente nos produtos é normalmente baixa, decorrente do não crescimento a temperaturas inferiores a 30 °C e da extrema sensibilidade à concentração de oxigênio no ar (GODOI et al., 2010).

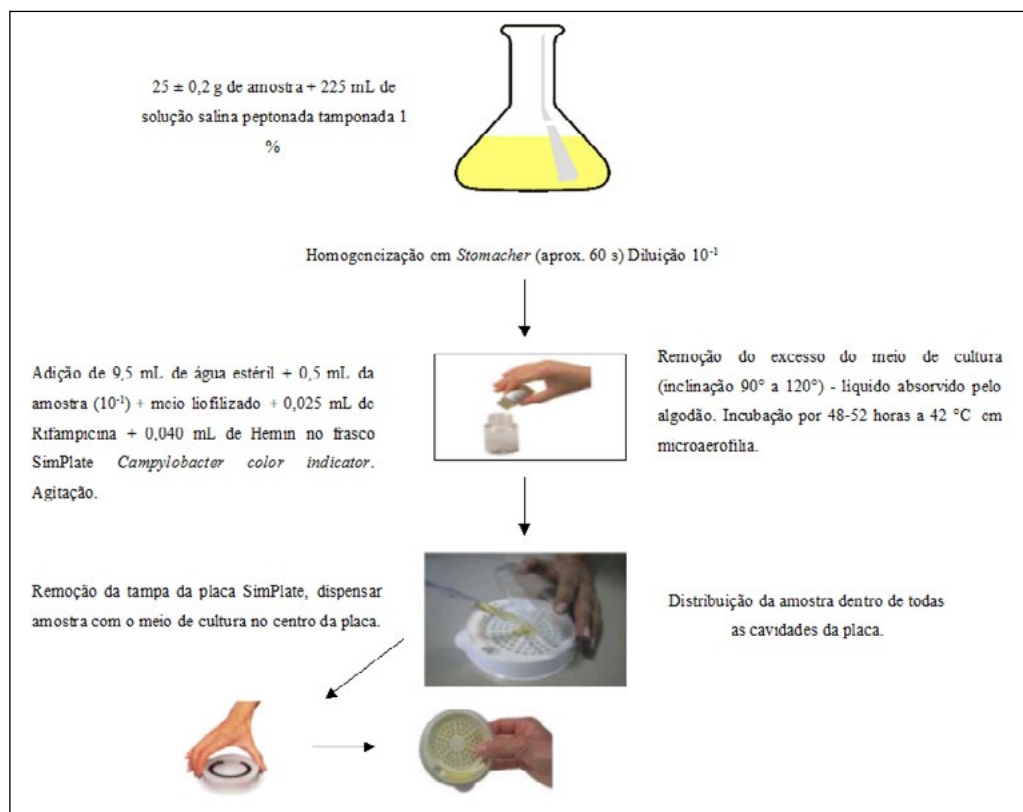
O presente trabalho tem por objetivos ampliar o conhecimento sobre a presença e enumeração de *Campylobacter* em carcaças, cortes e miúdos de frango produzidos no Rio Grande do Sul, e avaliar se há contaminação por meio de metodologia rápida, o método SimPlate® (Biocontrol).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Todas as amostras utilizadas nesta pesquisa são oriundas de abatedouros de diferentes regiões do estado do Rio Grande do Sul, totalizando 50 amostras. (37 de carcaça, nove de cortes e quatro de miúdos de frango), coletadas entre de julho a outubro de 2011.

O procedimento analítico foi baseado em método descrito no Manual *BioControl Latin América* - kit aprovado pelo Ministério da Agricultura, conforme Ofício AUP/DOI/DIPOA n° 1.723/2003, sendo seu processo até a incubação esquematizado na Figura 1.

Figura 1 – Esquema de análise de UFC/g pelo método SimPlate® (Biocontrol)



Fonte: Elaborada pelo autor.

Na etapa da leitura e confirmação, contaram-se todas as cavidades vermelhas na placa, que foram consideradas como resultado positivo presuntivo para *Campylobacter*.

Para a confirmação, após a contagem das cavidades vermelhas, expôs-se a placa sob lâmpada UV (comprimento de onda 366 nm) a uma distância de cerca de 5 cm acima da placa.

A obtenção do Número Mais Provável de *Campylobacter* resume-se na subtração do número de cavidades vermelhas fluorescentes do número total de cavidades vermelhas. Cavidades vermelhas não fluorescentes indicam presença confirmada de *Campylobacter*. Esses resultados foram aplicados à tabela de conversão. Os valores obtidos foram multiplicados pelo fator de diluição “20” e expressos em UFC/g. Se todas as cavidades são negativas e o algodão positivo, o resultado aplicado na tabela é 1. Se todas as cavidades são negativas e o algodão negativo, o resultado é <20 UFC/g.

Para o teste de eficiência do método, utilizou-se como base o micro-organismo *Campylobacter jejuni*, ATCC/33291. Em sua forma de estocagem, o micro-organismo encontrava-se liofilizado e, para reativá-lo, foi utilizado 0,5 mL de Peptona Salina (PS – Difco), com posterior transferência para tubos contendo 5 mL de *Brain Heart Infusion* (BHI - Oxoid) e incubado em jarra de anaerobiose com gerador de microaerofilia (Biomérieux), por 48 horas, a 41,5 °C +/- 1,0 °C, envolto por papel alumínio para obtenção de ambiente escuro.

Após o período de incubação, foram realizadas diluições decimais do caldo BHI em 9 mL de PS. A diluição que possibilitou a contagem em um intervalo preestabelecido de 25 a 250 UFC foi a 10⁻⁴, sendo inoculado 0,1 mL da diluição na placa de ágar sangue de carneiro (Laborclin). A partir dessa diluição, plaqueou-se em superfície de ágar sangue de carneiro (Laborclin), e, após a sua incubação em 41,5 °C por 48 horas, foi realizada a contagem. Em paralelo, adicionou-se 0,5 mL da diluição 10⁻⁵ e 9,5 mL de água estéril a um tubo contendo o meio liofilizado já crescido de rifampicina e Hemin, como mostrado na Figura 1. Essa solução, contendo aproximadamente 10 mL, foi vertida na placa para a técnica de UFC por SimPlate. Compararam-se as contagens obtidas a partir da semeadura em ágar sangue de carneiro e SimPlate para verificação da eficiência de recuperação do método.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No total, foram realizados 50 ensaios, sendo 37 com amostras de carcaça de frango e 13 com amostras compostas por fígado, dorso, coxa e sobrecoxa, moela, asa, filé de peito e coração, todas oriundas do estado do Rio Grande do Sul.

Foi possível enumerar a presença de *Campylobacter* em 17 amostras, resultando em 34 % de amostras positivas do total avaliado; A variação da contagem entre as amostras foi de 40 UFC/g, encontrada na carcaça número 17, e 2.080 UFC/g, presente na carcaça 31, conforme Tabela 1.

Tabela 1 – Presença de *Campylobacter* nas amostras de carcaças, cortes e miúdos de frango analisadas pelo método SimPlate Unidade formador de colônias por grama (UFC/g)

Amostra	UFC/g	Amostra	UFC/g	Amostra	UFC/g
1-Carcaça <1	<20	18-Carcaça	<20	35-Carcaça	40
2-Carcaça <1	<20	19-Carcaça	80	36-Carcaça	120
3-Carcaça 200	200	20-Carcaça	<20	37-Carcaça	160
4-Carcaça	<20	21-Carcaça	<20	38-Corte/dorso	160
5-Carcaça	<20	22-Carcaça	440	39-Corte/dorso	<20
6-Carcaça	40	23-Carcaça	<20	40-Coxa/sobrec.	<20
7-Carcaça	<20	24-Carcaça	760	41-Coxa/sobrec.	<20
8-Carcaça	<20	25-Carcaça	40	42-Coxa/sobrec.	<20
9-Carcaça	<20	26-Carcaça	<20	43-Filé de peito	<20
10-Carcaça	<20	27-Carcaça	<20	44-Filé de peito	<20
11-Carcaça	<20	28-Carcaça	<20	45-Filé de peito	<20
12-Carcaça	<20	29-Carcaça	40	46-Moela	<20
13-Carcaça	<20	30-Carcaça	1360	47-Moela	<20
14-Carcaça	<20	31-Carcaça	2080	48-Asa	<20
15-Carcaça	<20	32-Carcaça	120	49-Fígado	<20
16-Carcaça	120	33-Carcaça	40	50-Coração	<20
17-Carcaça	40	34-Carcaça	<20		

Fonte: Elaborada pelo autor.

Das 37 amostras de carcaça, 16 apresentaram contaminação por *Campylobacter*, correspondendo a 43,2 %. Para as 13 amostras de miúdos e cortes, a contaminação foi relativamente baixa em comparação às carcaças, apresentando apenas uma amostra de dorso contaminada, resultando em 7,7 % de contaminação, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 – Quantidade e porcentagem dos resultados positivos e negativos obtidos nas amostras analisadas pelo método SimPlate

Produto	Quantidade	Amostras positivas	Amostras positivas (%)
Carcaça	37	16	43,3%
Miúdo/corte	13	1	7,7%
Total	50	17	34 %

Fonte: Elaborada pelo autor.

Diversos trabalhos têm mostrado resultados semelhantes, quando utilizados métodos sensíveis para a detecção de *Campylobacter*. Em 2004, na Bulgária, Stoyanchev (2004) comparou métodos fenotípicos (cultivo em meios) e genótipos (empregando

a Reação em Cadeia da Polimerase – PCR) para a detecção de *Campylobacter*, obtendo resultados positivos de 38,3 e 40,8%, respectivamente, revelando resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho para carcaças de frango. Em resultado obtido por Boufleur (2009), que analisou 36 amostras frescas de miúdos, como fígado, moela, coração e *drumete*, oriundos diretamente de três supermercados presentes na cidade de Santa Maria – RS, 22 (61,1%) apresentaram contaminação, e a contaminação no fígado (88,8%) e no coração (77,7%) revelaram uma pequena diferença em relação à contaminação na moela (44,4%) e em *drumetes* (33,3%). Na pesquisa foi utilizado o método de enriquecimento seletivo para *Campylobacter* e estriamento em placas contendo meio seletivo, sendo o resultado final expresso como presença ou ausência. Nesse trabalho o resultado obtido foi consideravelmente maior em relação ao presente trabalho, demonstrando que existe a contaminação de *Campylobacter* nas amostras de origem avícola, mesmo que a referida pesquisa não tenha contemplado amostras de carcaças de frango.

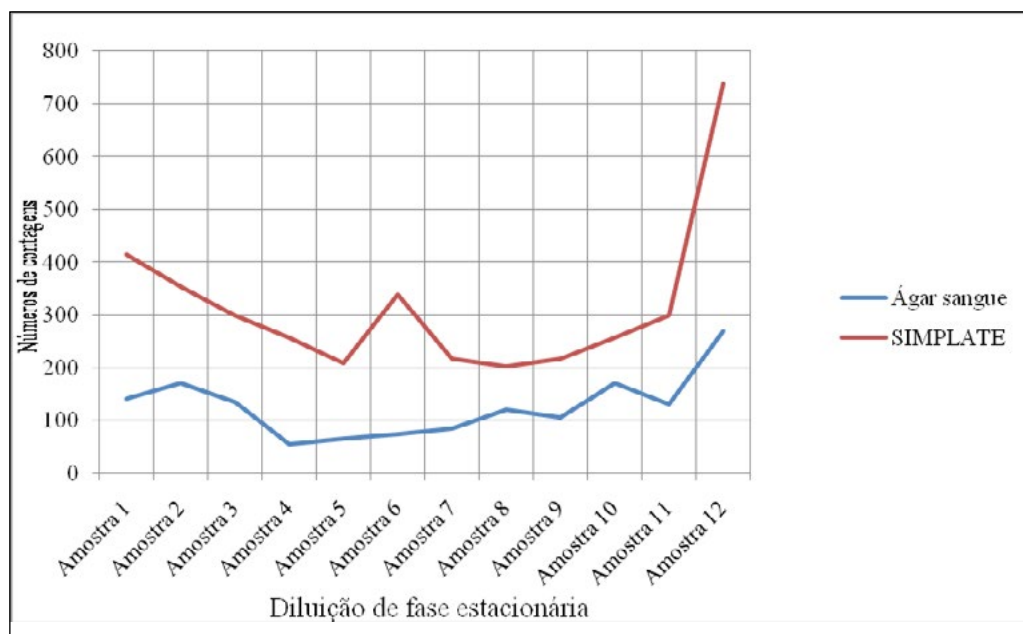
Diferentemente, Mallmann (2007) analisou um total de 50 amostras de carcaças oriundas de uma empresa do Rio Grande do Sul, com o objetivo de verificar a presença ou ausência de *Campylobacter*, por meio de método tradicional, em que todas as amostras apresentaram resultados negativos. Como a quantidade desse micro-organismo não se apresenta em grande escala nos alimentos e por ser muito difícil de ser manipulado, podemos supor que o método utilizado pode não ter apresentado sensibilidade para detectar as baixas quantidades da bactéria.

A contaminação por *Campylobacter* que existe em frangos pode ocorrer antes do abate. Fatores como a falta de controle interno das empresas e a falta de higiene dos estabelecimentos onde os animais permanecem até serem abatidos podem agravar a situação. Em trabalho realizado por Cortez et al. (2006), que tinha como objetivo verificar a presença de *C. jejuni* e *C. coli*, foram analisadas 288 amostras de seis estabelecimentos do estado de São Paulo, que incluía amostras de fezes, penas, água de escaldagem, de evisceração e de resfriamento, água de enxaguadura de carcaça não eviscerada, e água de enxaguadura de carcaça eviscerada e resfriada. A porcentagem de amostras positivas para *Campylobacter* sp. foi de 4,9% (14/288), estando a maior porcentagem presente nas fezes, 22% (8/36), indicando a necessidade de rigorosos controles durante a evisceração. Em trabalho realizado por Chaves et al. (2010), que estudou a presença de *Campylobacter* em abatedouros e granjas avícolas da região metropolitana de Belém – PA, em 120 amostras coletadas de três granjas, sendo 30 de *swab* cloacal, 30 de cama de frango, 30 de ração e 30 de água de abatedouro, isolou-se *Campylobacter* em 40 (33,3%) amostras, observou-se que 29 (96,6 %) amostras de *swab* cloacal, 10 (33,3%) amostras de cama de aviário e uma (3,3 %) amostra de água apresentaram resultados positivos: Dessas 33 (82,5%) foram identificadas por contaminação com *C. jejuni*. Das 126 amostras coletadas em um abatedouro, sendo 36 de água, 30 amostras de pele do conjunto peito/pescoço, 30 de fígado e 30 de moela, foram isoladas e identificadas 11 amostras (8,73%) como presença de *C. jejuni*. As maiores fontes de contaminação nas granjas foram as fezes, a cama e, em menor escala, a água. No abatedouro, a maior

contaminação foi na água da calha de evisceração, seguida pela moela coletada no minitanque de resfriamento, confirmando assim a presença de *Campylobacter*, além de no frango, em águas e em ambientes de abatedouros destinados à avicultura.

Os resultados apresentaram valores maiores para o método em questão, quando comparado ao meio não seletivo (Ágar sangue de carneiro). O *Campylobacter*, por ser um micro-organismo microaerófilo, se multiplica com maior facilidade em meios que permitam a atmosfera gasosa ideal, como é o caso de meios líquidos, representados aqui pelo teste SimPlate® Biocontrol, e não em superfície como realizado em placa de ágar sangue. Os resultados podem ser observados na Figura 2.

Figura 2 – Teste de eficácia do método. Comparação entre resultado obtido no método SimPlate e o resultado esperado pela fase estacionária



Fonte: Elaborada pelo autor.

4 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos foi possível visualizar que existe grande quantidade de produtos cárneos de origem avícola, destinados ao consumo humano, que possui contaminação por *Campylobacter*, principalmente carcaças. Esses resultados apontam para a necessidade de intensificação dos controles das empresas e dos órgãos fiscalizadores, visando a melhorias nos processos, revisão das Boas Práticas de Fabricação adotadas e avaliação dos pontos críticos de controle aplicados durante o processo produtivo na indústria. Podemos verificar ainda que o método SimPlate®

(Biocontrol) apresenta relativa confiabilidade para a enumeração de *Campylobacter*, sendo uma ótima alternativa em relação a de tempo analítico e praticidade, facilitando as práticas laboratoriais e agilizando as tomadas de ações das indústrias produtoras.

REFERÊNCIAS

- BROOKS, G. F.; CARROL, K. C.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A.; MIETZER, T. A. **Microbiologia Médica**, 25. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012, p. 239.
- BOUFLEUR, R. *Campylobacter jejuni* EM FRANGO DE CORTE, CARNE E VÍSCERAS DE FRANGO NO RIO GRANDE DO SUL E EFEITO DO CONGELAMENTO SOBRE A CONAMINAÇÃO NOS CORTES. 2009. p. 28-30. **Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Programa de Pós-Graduação de Ciências Veterinárias**, UFSM. Santa Maria.
- CHAVES, S. O. C.; SOUZA, C. O.; FREITAS, J. A.; SANTOS, D. D.; ARAÚJO, C. V.; SILVA, R. R. Ocorrência de *Campylobacter* em granjas e abatedouros avícolas na mesorregião de Belém, PA, Brasil. **Revista Ciência Animal Brasileira**. v. 11, n. 3, p. 554-560, 2010.
- CORTEZ, A. L. L.; CARVALHO, A. C. F. B.; SCARCELLI, E.; MIYASHIRO, S.; VIDAL-MARTINS, A. M. C.; BÜRGER, K. P., SURVEY OF CHICKEN ABATTOIR FOR THE PRESENCE OF *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **Revista do Instituto Médico Tropical de São Paulo**, v. 48, nº 6, p. 307-310, 2006.
- GODOI, H. S.; GANDRA, T. K. V.; GANDRA, E. A. *Campylobacter* sp. em alimentos. Uma revisão. **Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoológicas UNIPAR**, Umuarama, v. 13, nº 1, p. 37-41, 2010.
- JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, p. 595.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010, p. 365.
- MALLMANN, J. Presença de *Campylobacter* sp. Em cortes e fígado resfriados de frango, 2007, p. 51. **Monografia (Graduação em Ciência Biológicas)** – Centro Universitário – UNIVATES, Lajeado.
- STOYANCHEV, T. T. Detection of *Campylobacter* using Standard Culture and PCR of 16S rRNA gene in freshly chilled poultry and poultry products in a slaughterhouse. **Trakia Journal of Sciences**, v. 2, n. 3, p. 59-64, 2004.
- SUZUKI, H.; YAMAMOTO, S. *Campylobacter* in Retail Poultry Meats and By-Products in the world: A Literature Survey. **Journal of Veterinary Medicine Science**. v. 71, n. 3, p. 255-261, 2009.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012, p.157.