

## COMPARAÇÃO ENTRE AS METODOLOGIAS DE RINSAGEM E ESFREGAÇO DE SUPERFÍCIE NA AMOSTRAGEM DE FRANGOS APÓS CHILLER PARA ISOLAMENTO DE *Campylobacter* TERMÓFILOS

TASSIANA RAMIRES<sup>1</sup>; MAURICÉIA GREICI DE OLIVEIRA<sup>2</sup>; SIMONE DE FÁTIMA RAUBER WÜRFEL<sup>2</sup>; NATALIE RAUBER KLEINUBING<sup>2</sup>; MARCIA MAGALHÃES MATA<sup>2</sup>; VLADIMIR PADILHA DA SILVA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [tassianaramires@gmail.com](mailto:tassianaramires@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas –

[greici\\_sel@yahoo.com.br](mailto:greici_sel@yahoo.com.br); [simone\\_rauber@hotmail.com](mailto:simone_rauber@hotmail.com); [natalierk10@hotmail.com](mailto:natalierk10@hotmail.com);

[marcinha.sul@gmail.com](mailto:marcinha.sul@gmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [vladimir.padilha2011@gmail.com](mailto:vladimir.padilha2011@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

A escolha correta do método de amostragem, independente do micro-organismo pesquisado, é de fundamental importância, levando-se em consideração o tempo de coleta da amostra, representatividade da contaminação total do produto, além de disponibilidade de material e mão de obra. A escolha é dependente dos objetivos desejados pela pesquisa (Cossi, 2011).

Muitos métodos já foram avaliados para a amostragem de bactérias em carcaças de aves, mas apenas dois, rinsagem e esfregaço de superfície (suave), foram indicados para essa finalidade pelo USDA Food Safety Inspection Service (FSIS), nos Estados Unidos. A amostragem por esfregaço de superfície de carcaças é considerada a metodologia não destrutiva mais popular empregada no controle de qualidade em indústrias de alimentos (Capita et al., 2004). Porém, alguns estudos consideram a rinsagem mais eficiente para a remoção de micro-organismos quando estes estão presentes em baixas quantidades (Gill et al. 2005; Werlein, 2001).

As espécies termófilas de *Campylobacter* spp. são consideradas bactérias emergentes como veículos de doenças pela carne de aves e recebem atenção da indústria e do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), principalmente devido à presença natural desse patógeno em frangos, a alta incidência na avicultura e os graves problemas de saúde pública causados pela campilobacteriose (Vaz, 2008).

*Campylobacter jejuni*, entre todas as espécies de *Campylobacter* termófilos, é a que recebe maior atenção, por ser a principal espécie causadora de enterites, seguida por *C. coli* (Zilbauer et al. 2008). Para a identificação desses micro-organismos são utilizadas diversas metodologias, as quais envolvem testes bioquímicos, enzimáticos e métodos de diagnóstico molecular (Biase, 2010).

Frente ao exposto, o objetivo desse estudo foi comparar a eficácia dos métodos de amostragem por rinsagem e por esfregaço de superfície, no isolamento de *Campylobacter* termófilos em frangos após a etapa de *chiller*.

### 2. METODOLOGIA

Foram coletados seis frangos após a etapa de resfriamento por imersão (*chiller*) em um abatedouro localizado na região sul do Rio Grande do Sul.

As amostras foram transportadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos do DCTA/FAEM/UFPel em caixas isotérmicas contendo gelo e mantidas sob refrigeração (entre 2 e 8°C) até o momento das análises.

Os frangos foram amostrados pelos métodos de rinsagem e por esfregaço de superfície (Esponjas 3M™), totalizando 12 amostras, as quais foram submetidas ao isolamento e identificação fenotípica de *Campylobacter* spp., de acordo com a metodologia preconizada pela *International Organization for Standardization* 10272/1 (ISO, 2006), com adaptações. Após, os isolados foram submetidos à confirmação molecular.

Na amostragem por esfregaço de superfície, as esponjas umedecidas em 10 mL de água peptonada tamponada (3M do Brasil®), foram friccionadas na superfície das carcaças e acondicionadas em *bag* estéril tipo ziploc contendo 90 mL de Caldo Bolton (Oxoid®), homogeneizadas e incubadas a 42°C por 24h, em atmosfera de microerofilia (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub>).

Na amostragem por rinsagem, os frangos foram acondicionados em *bags* esterilizados, aos quais foram adicionados 150mL de água peptonada tamponada – APT (Oxoid®), sendo utilizada a técnica de lavagem superficial através de movimentos de fricção com as mãos por, aproximadamente, 2 min. Em seguida, uma alíquota de 10 mL foi transferida para um *bag* estéril tipo ziploc, contendo 90 mL de Caldo Bolton (Oxoid®), homogeneizada e incubada a 42°C por 24h, em atmosfera de microerofilia (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub>).

Posteriormente, uma alíquota de cada amostra foi inoculada em ágar Preston (Oxoid®) e ágar mCCD (Oxoid®), os quais foram incubados a 42°C em microaerofilia, por 48 horas. As colônias típicas ou suspeitas nos meios seletivos foram analisadas através da morfologia microscópica, detecção da atividade das enzimas catalase e oxidase, além da capacidade de hidrolisar o acetato de indoxil e o hipurato de sódio.

A confirmação molecular dos isolados foi realizada através da Polymerase Chain Reaction (PCR), utilizando *primers* e condições previamente descritos (JOSEFSEN et al., 2004), com objetivo de amplificar uma sequência de 287 pares de bases (pb) do gene 16S rRNA de *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari*. Para a diferenciação entre as espécies *C. jejuni* e *C. coli*, utilizou-se um protocolo de Multiplex PCR (mPCR), adaptado de MACKIW et al. (2012), obtendo-se um produto de 773pb para *C. jejuni* e 364pb para *C. coli*.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve diferença entre a eficácia dos dois métodos de amostragem no isolamento de *Campylobacter* termófilos em frangos após a etapa de *chiller*. Foi possível isolar esses micro-organismos em cinco dos seis frangos avaliados, independente da metodologia de amostragem adotada (Tabela 1).

**Tabela 1.** Isolamento e caracterização fenotípica e molecular de *Campylobacter* termófilos a partir dos métodos de amostragem por rinsagem e esfregaço de superfície

	Frango 1	Frango 2	Frango 3	Frango 4	Frango 5	Frango 6
Provas Bioquímicas Rinsagem	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	-	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>
Provas Bioquímicas Esfregaço de Superfície	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	-	<i>C. jejuni</i>
PCR Rinsagem	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	-	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>
PCR Esfregaço de Superfície	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	-	<i>C. jejuni</i>

Pesquisas têm mostrado que o método de esfregaço em superfície apresenta menor eficácia quando comparado com o método de rinsagem

(McEvoyet al., 2005; Cossi, 2011). Porém, outros estudos demonstraram que quanto mais abrasivos os materiais utilizados para amostragem por esfregaço, maior é o número de bactérias recuperadas. Experimentos realizados por Gill e Jones (2006) e Dorsa, Cutter e Siragusa (1996), por exemplo, relataram que suabes de algodão recuperaram menos bactérias do que esponjas ou gazes.

Apesar da grande quantidade de estudos comparando diferentes protocolos de amostragem em carcaças de animais (Cox et al., 2010; Gill & Badoni, 2005; Gill et al., 2005), a confirmação dessas correlações muitas vezes é dificultada pelo grande número de variáveis que interferem nos resultados (Hutchison et al., 2005; Capita et al., 2004; Bolton, 2003).

Foi possível observar, ainda, que um isolado classificado como *C. coli* pelos testes fenotípicos, foi identificado como *C. jejuni* por PCR (Tabela 1). Resultado semelhante foi encontrado por Carvalho (2009) que, através da confirmação por PCR, verificou uma alteração na identidade das espécies de *Campylobacter* previamente identificadas. Segundo o autor, o uso exclusivo de testes fenotípicos para identificação de espécies de *Campylobacter* spp. é limitado devido a ocorrência de isolados com reações atípicas nas provas bioquímicas, sendo necessária a utilização conjunta dos testes genotípicos confirmatórios para a sua correta identificação.

#### 4. CONCLUSÕES

Não houve diferença entre os métodos de amostragem por rinsagem e esfregaço de superfície no isolamento de *Campylobacter* termófilos em carcaças de frangos após a etapa de *chiller*. Além disso, observou-se que para confirmação de espécie, a realização apenas dos testes bioquímicos não é satisfatória e conclusiva, sendo necessário o diagnóstico molecular como auxiliar no processo de identificação.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pelo apoio financeiro (Processo 483807/2012-5) e à CAPES pela concessão de bolsa de estudo.

#### 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIASE, S.R. **Frequência e Caracterização de *Campylobacter* sp. Termofílico na Linha de Abate de Suínos em abatedouros no Sul do Brasil.** Dissertação de Mestrado, São José dos Pinhais, PR, Brasil: Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Centro de Ciências Agrárias Ambientais, 2010.
- BOLTON, D. J. The EC decision of the 8th June 2001 (EC/471/2001): excision versus swabbing. **Food Control**, v.14, p.207-209, 2003.
- GILL, C. O., & JONES, T. H. Setting control limits for *Escherichia coli* counts in samples collected routinely from pig or beef carcasses. **Journal of Food Protection**, v. 69, p.2837-2842, 2006.
- CAPITA, R., PRIETO, M., & ALONSO-CALLEJA, C. Sampling methods for microbiological analysis of red meat and poultry carcasses. **Journal of Food Protection**, v.67, p.1303-1308, 2004.
- CARVALHO, A.F. **Detecção dos genes da Toxina Citoletal Distensiva (CDT) em estirpes de *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* isoladas de frangos de corte e hortaliças.** 2009. 56p. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio). Instituto Biológico, São Paulo, 2009.

- COSSI, M.V.C. **Avaliação de Métodos de Obtenção de Unidades Analíticas de Carcaças de Frango Resfriadas para Enumeração de Micro-organismos Indicadores de Higiene e Detecção de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*.** 2011, Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil.
- COX, N.A.; RICHARDSON, L.J.; CASON, J.A.; BUHR, R.J.; VIZZIER-THAXTON, V.; SMITH, D.P.; FEDORKA-CRAY, P.J.; ROMANENGHI, C. P.; PEREIRA, L.V.B.; DOYLE, M.P. Comparison of neck skin excision and whole carcasses rinse sampling methods for microbiological evaluation of broiler carcasses before and after immersion chilling. **Journal of Food Protection**, v.73, n.5, p.976-980, 2010.
- DORSA, W. J., CUTTER, C. N., & SIRAGUSA, G. R. Evaluation of six sampling methods for recovery of bacteria from beef carcass surfaces. **Letters in Applied Microbiology**, v.22, p.39-41, 1996.
- Gill, C. O., & Jones, T. Microbial sampling of carcasses by excision or swabbing. **Journal of Food Protection**, v.2, 167-173, 2000.
- Gill, C. O., Deslandes, B., Rahn, K., Houde, A., & Bryant, J. Evaluation of the hygienic performances of the processes for beef carcass dressing at 10 packing plants. **Journal of Applied Microbiology**, v.84, p.1050-1058, 1998.
- GILL, C.O.; BADONI, M. Recovery of bacteria from poultry carcasses by rising, swabbing or excision of skin. **Food Microbiology**, v.27, p.101-107, 2005.
- GILL, C.O.; BADONI, M.; MOZA, L.F.; BARBUT, S.; GRIFFITHS, M.W. Microbiological sampling of poultry Carcass portinos by excision, rinsing or swabbing. **Journal of Food Protection**, v. 68, n.12, p.2718-2720, 2005.
- HUTCHISON, M. L., WALTERS, L., D., AVERY, S. M., REID, C. A., WILSON, D., HOWELL, M. Comparison of wet-dry swabbing and excision sampling methods for microbiological testing of Bovine, Porcine, and Ovine carcasses at red meat Slaughterhouses. **Journal of Food Protection**, v. 68, p. 2155-2162, 2005.
- ISO (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARD). **Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. – Part 1: Detection method.** (ISO 10272 1:2006 [E]).16 p, 2006.
- JOSEFSEN, M.H.; LÜBECK, P.S.; HANSEN, F.; HOORFAR, J. Towards an international standard for PCR based detection of foodborne thermotolerant campylobacters: interaction of enrichment media and pre-PCR treatment on carcass rinse samples. **Journal of Microbiological Methods**, v.58, p.39-48, 2004.
- MACKIW, E.; KORSAK, D.; RZEWUSKA, K.; TOMCZUK, K.; ROZYNEK, E. Antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from food in Poland. **Food Control**, v.23, n.2, p.297-301, 2012.
- MCEVOY, J. M., NDE. C. W., SHERWOOD. J. S., AND LOGUE. C. M. An evaluation of sampling methods for the detection of *Escherichia coli* and *Salmonella* on turkey carcasses. **Journal of Food Protection**, v.68, p.34-39, 2005.
- VAZ, C. S. L. *Campylobacter* na segurança dos alimentos e na avicultura. **Revista Avicultura Industrial**, v.99, n. 1165, p. 15-19, 2008.
- WERLEIN, H.D. Comparasion of destructively and rinsing gained samples to determine TVC of pig carcasses by bioluminescence by swab sampling in accordance with EU Decision. **Meat Science**, v.69, p. 559-566, 2005.
- ZILBAUER, M.; DORRELL, N.; WREN, B.W.; BAJAJ-ELLIOTT, M. In: *Campylobacter jejuni* – mediated disease pathogenesis: an update. **Transactions of the Royal of Tropical Medicina and Hygiene**, doi: 10.1016/j.trstmh.2007.09.019, v. 102, p.123-129, 2008.