

SELETIVIDADE E PRODUTIVIDADE DE MEIOS DE CULTURA PARA ISOLAMENTO DE *Campylobacter* spp.

Isabel Cristina Cisco

Universidade de Passo Fundo. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Passo Fundo, RS.

Denise Cristina Tedesco

Universidade de Passo Fundo, Faculdade de Engenharia. Passo Fundo, RS.

Luciane Manto

Luciana Ruschel dos Santos ✉

Universidade de Passo Fundo. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Passo Fundo, RS.

✉ luruschel@upf.br

RESUMO

A campilobacteriose é uma zoonose emergente de origem alimentar causada por bactérias do gênero *Campylobacter*. Vários fatores dificultam o isolamento deste patógeno em amostras naturalmente contaminadas, por isso devem ser utilizadas metodologias normalizadas bem como meios de cultura com desempenho adequado, prevenindo a ocorrência de resultados falso negativos. Assim, avaliou-se a performance de meios de cultura recomendados pelas ISO 10272-1 para detecção de *Campylobacter* spp. com testes de seletividade e produtividade em culturas puras e o desempenho destes meios em amostras de carne de frango artificialmente contaminadas. Cepas ATCC de *C. coli* e *C. jejuni* e dos interferentes *S. aureus*, *E. coli* e

Proteus mirabilis foram inoculadas nos meios indicados pelas normas oficiais e posteriormente inoculados em amostras fortificadas. Os meios testados, tanto em culturas puras quanto em amostras fortificadas, tiveram desempenho satisfatório, mostrando boa seletividade e produtividade, permitindo que os laboratórios optem pela combinação de meios com melhor performance para isolamento e identificação de *Campylobacter* spp. em amostras naturalmente contaminadas.

Palavras-chave: Campilobacteriose. Carne de frango. ISO 10272.

ABSTRACT

Campylobacteriosis is an emerging foodborne zoonotic disease caused by bacteria of the

genus *Campylobacter*. Several factors hinder the isolation of this pathogen in naturally contaminated samples; therefore, standardized methods as well as high performance culture media should be used to avoid false negative results. Thus, the present study assessed the performance of culture media recommended by ISO 10272-1 for the detection of *Campylobacter* spp. using selectivity and productivity testing in pure cultures and the efficiency of these media in artificially contaminated samples. ATCC strains of *C. coli* and *C. jejuni* and of the interfering organisms *S. aureus*, *E. coli* and *Proteus mirabilis* were inoculated into the media indicated by official standards and later inoculated into enriched samples. The media tested both in pure cultures and in enriched samples yielded satisfactory results, with good selectivity

and productivity, thereby allowing laboratories to combine high performance methods for the isolation and identification of *Campylobacter* spp. in naturally contaminated samples.

Keywords: *Campylobacteriosis*.
Chicken meat. ISO 10272-1.

INTRODUÇÃO

A campilobacteriose é uma zoonose emergente de origem alimentar causada por bactérias do gênero *Campylobacter*, sendo as principais espécies envolvidas em surtos alimentares *C. jejuni* e *C. coli* (EFSA, 2011). Os principais fatores que dificultam o isolamento de *Campylobacter* são amostras com alta contaminação pela flora competitiva, baixo número de micro-organismos e células injuriadas por condições ambientais adversas, tais como congelamento, dessecação, aquecimento, acidificação e exposição ao oxigênio (ACMSF, 2010).

Metodologias internacionais recomendadas para isolar e identificar *Campylobacter* spp. são a ISO 10272-1 (International Organization for Standardization, 2006), MLG 41.03 do USDA (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, 2014) e o BAM (Bacteriological Analytical Manual, 2001). Nestas normas os meios de enriquecimento citados como eficazes para recuperação de *Campylobacter* são o caldo Bolton, para vários tipos de amostras e o caldo Preston, amplamente utilizado para isolamento de *Campylobacter* em alimentos (SILVA et al., 2010).

Para o crescimento em placas são indicados meios de cultura seletivos que contenham sangue ou carvão e substâncias que estimulem o crescimento e a conservação de *Campylobacter* tais como sulfato ferroso, metabissulfito de sódio, piruvato de

sódio, heme, sangue e extrato de levedura (BI et al., 2013; INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMIDADES INFECCIOSAS, 2001).

Esses meios de cultura também necessitam da combinação de antibióticos específicos que favoreçam a multiplicação do *Campylobacter* sobre a microbiota acompanhante, como a Vancomicina, que inibe bactérias Gram positivas; a Trimetropina, com ação sobre *Proteus*; Cefoperazona de sódio, que inibe Gram negativas entéricas e algumas Gram positivas, e ainda Anfotericina B e Cicloeximida, com ação sobre fungos (BOLTON et al., 1983; HUNT et al., 2001; SILVA et al., 2010;).

Estabelecer critérios de desempenho para os meios de cultura são um pré-requisito para um trabalho microbiológico confiável e para tanto são utilizados parâmetros como Produtividade, Seletividade e Especificidade. Produtividade é o nível de recuperação de um micro-organismo alvo no meio de cultura sob condições definidas. Seletividade é definida como o grau de inibição de um micro-organismo indesejável num meio de cultura seletivo sob condições definidas e Especificidade é a demonstração, sob condições definidas, que um micro-organismo interferente não apresenta as mesmas características visuais como micro-organismos alvo (ISO 11133, 2014).

Estes parâmetros devem ser testados em culturas puras, mas os meios também devem ser avaliados frente às amostras de campo ou artificialmente contaminadas, ditas amostras fortificadas. O uso de amostras fortificadas nos ensaios da rotina laboratorial tem por objetivo avaliar as etapas envolvidas no processo analítico e verificar a recuperação das bactérias alvo no método preconizado para um dado micro-organismo. Em cada ensaio devem ser analisadas paralelamente amostras fortificadas representando os controles positivo,

negativo e branco de cada ensaio.

As amostras fortificadas usadas como controle positivo devem ser preparadas com a adição do micro-organismo alvo na matriz; o controle negativo com a adição de um micro-organismo considerado interferente e com características similares ao micro-organismo alvo, e para o branco são avaliados os meios de cultura e diluentes utilizados no ensaio, mas sem a adição de micro-organismos ou uso da matriz. A matriz definida para este estudo foi a matriz carne de frango, visto que dados da *European Food Safety Authority*-EFSA (2013) apontam os produtos de origem avícola, em particular, a carne de frango, como responsável por 20-30% dos casos humanos de campilobacteriose.

Assim, os objetivos deste trabalho foram avaliar o desempenho dos meios de cultura recomendados pelas normas oficiais para detecção de *Campylobacter* spp. por meio da seletividade e produtividade e verificar a detecção do agente em amostras artificialmente contaminadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram preparados os meios de cultura utilizados para a detecção de *Campylobacter* spp. conforme a ISO 10272-1 (2006): Caldo Bolton (CM 983 Oxoid) com suplemento seletivo contendo Cefoperazona 20mg/L, Trimetoprim 20mg/L, Vancomicina 20mg/L e Cicloeximida 50mg/L (SR183E, Oxoid) e dos Ágar Ágar arcoal Cefopezarona Desoxicolato Modificado (mCCDA) (CM739, Oxoid), com suplemento seletivo contendo Cefoperazona 32mg/L e Anfotericina B 10mg/L (SR155, Oxoid) e Columbia sangue (CBA) também suplementado (SR155, Oxoid), de acordo com as orientações do fabricante.

Para os testes com o Caldo Bolton utilizou-se o método de controle

qualitativo para meios de cultura líquidos seletivos utilizando micro-organismo alvo, interferentes e os micro-organismo alvo e os interferentes (ISO 11133, 2014). Os micro-organismos alvo utilizados foram *Campylobacter coli* ATCC 33559, *C. jejuni* subsp *jejuni* ATCC 29428, com inóculo de 10^2 UFC e os interferentes *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Proteus mirabilis* ATCC 35659, com inóculo de 10^3 UFC.

Para o teste de produtividade do Agar m-CCDA utilizou-se inóculo de 10^2 UFC de *Campylobacter coli* ATCC 33559 e *C. jejuni* subsp *jejuni* ATCC 29428. Para a seletividade do Agar mCCDA utilizou-se o método qualitativo de estriamento a partir dos micro-organismos interferentes *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, com 10^4 CFU (ISO 11133, 2014).

Quantificação do micro-organismo alvo

As culturas de *C. coli* ATCC 33559 e *C. jejuni* subsp *jejuni* ATCC 29428 foram cultivadas em caldo Brucella (BBL/USA) por 44 + 4 horas de incubação a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$. Após incubação, cada cultura foi diluída até 10^{-9} em solução salina 0,85% e de cada diluição foi retirado 100uL, estriado sobre a superfície do Agar sangue Columbia, em duplicata, para a quantificação da cepa. As placas foram incubadas a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ por 44 + 4 horas em microaerofilia (Microarobac/Probac) e as colônias contadas para quantificação das cepas.

Quantificação dos micro-organismos interferentes

As culturas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus mirabilis* ATCC 35659 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foram cultivadas em caldo BHI (CM1135, Oxoid) por 18/24 horas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$. Após, cada cultura foi diluída até 10^{-9} em solução salina 0,85%. De cada diluição

foi retirado 1mL e realizada a Contagem Padrão em Placas (PCA, Difco), em duplicata, sendo as placas incubadas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas e após realizada a contagem das colônias.

Produtividade e Seletividade do Caldo Bolton

As culturas de *C. coli* ATCC 33559 e *C. jejuni* subsp *jejuni* ATCC 29428 foram cultivadas em caldo Brucella (BBL/USA) por 44 + 4 horas de incubação a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$. Após, foram diluídos até 10^{-9} em solução salina 0,85%. No tubo contendo o caldo Bolton foi inoculado 1 mL da diluição com 10^2 UFC e este foi incubado a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ por 44 + 4 horas em microaerofilia (5 a 15% de O_2) e 10% de CO_2 utilizando gerador (Microarobac/Probac).

As cepas de *E. coli* ATCC 25922 e *P. mirabilis* ATCC 35659 foram cultivadas em caldo BHI (CM1135, Oxoid) por 18 a 24 horas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ e após incubação foram diluídas até 10^{-9} em solução salina 0,85%. Foi inoculado 1 mL da diluição com 10^2 UFC dos micro-organismos alvo e 10^3 UFC dos interferentes. Um mL das cepas alvo, 1 mL das cepas interferentes e 1mL de um pool contendo todas as cepas foi inoculado em caldo Bolton, incubados primeiramente a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 5 ± 1 hora e após transferidos para estufa a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ por 44 + 4 horas em microaerofilia (Microarobac/Probac).

Após, inoculou-se 10uL do tubo contendo o micro-organismo alvo sobre a superfície do meio Tryptic-Soy Agar (TSA) (Difco). Do tubo contendo os micro-organismos interferentes, inoculou-se 10 uL na superfície do meio seletivo Agar m-CCDA, e do tubo contendo o micro-organismo alvo e os interferentes inoculou-se 10 uL na superfície do Agar m-CCDA. Todas as placas foram incubadas a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ por 44 + 4 horas em microaerofilia (Microarobac/Probac)

Produtividade e Seletividade do Agar mCCDA

Para a Produtividade foi inoculado 10uL da diluição com 10^2 UFC das cepas de *C. coli* ATCC 33559 e *C. jejuni* subsp *jejuni* ATCC 29428 na superfície do Agar m-CCDA e na superfície do meio de referência, o Agar Columbia Sangue, conforme definido na norma ISO.

Para a seletividade foram utilizadas as cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 com 10.000 ou 10^4 UFC, sendo inoculado 1 uL de cada uma das cepas sobre a superfície do Agar m-CCDA. Todas as placas foram incubadas em estufa a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ por 44 + 4 horas em microaerofilia (Microarobac/Probac).

Matrizes fortificadas artificialmente

Para o preparo das matrizes, foi esterilizado carne de frango sem osso previamente moída. Após a esterilização, foram pesadas assepticamente alíquotas de 25g em sacos plásticos estéreis específicos para utilização nos homogeneizadores tipo *stomacher*. Foi adicionado assepticamente 225 mL de APT. O micro-organismo alvo *Campylobacter coli* ATCC 33559 e os micro-organismos interferentes *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus mirabilis* ATCC 35659 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, em fase estacionária, foram diluídos até 10^{-9} em solução salina 0,85% e 1 mL de cada diluição foi colocado em cada uma das nove saquetas, resultando na contaminação artificial por micro-organismos alvo e interferentes em todas as diluições.

Todas as amostras foram homogeneizadas em *stomacher* por 60 segundos e utilizada a metodologia para a detecção de *Campylobacter* spp. conforme a ISO 10272-1 (2006). Para o enriquecimento, um mL de cada saqueta foi transferido para tubos contendo 9 mL do caldo

Bolton, em duplicata. Os tubos foram incubados em microaerofilia a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 4 horas e posteriormente transferidos para $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ por $44 \pm 4\text{h}$. Após, de cada cultura do caldo Bolton foi inoculado 100 uL sobre a superfície do mCCDA e sobre o Agar CBA suplementado, com alças de Drigalski. As placas foram incubadas a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ por $44 \pm 4\text{h}$, em microaerofilia.

Após o período de incubação, colônias típicas de *Campylobacter* spp. foram selecionadas e estriadas por esgotamento em Ágar Columbia Sangue (CBA) e incubadas a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 a 48 horas, em microaerofilia. Após a incubação, foram realizados os testes de coloração de Gram, motilidade e oxidase para a confirmação das colônias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os meios de cultura foram avaliados conforme o critério de aceitação descrito na norma ISO (2014) que cita para a produtividade do caldo Bolton o crescimento de mais de 10 UFCs do micro-organismo alvo e a inibição do crescimento/multiplicação dos micro-organismos interferentes. Já para a seletividade, o caldo Bolton é considerado adequado quando houver total inibição do crescimento/multiplicação dos micro-organismos interferentes nas placas de Agar TSA.

Os resultados para a produtividade do Caldo Bolton foram satisfatórios uma vez que se identificou 15 UFCs de *C. coli* e 12 UFCs de *C. jejuni* nas placas de TSA inoculadas com este caldo. Nas placas de m-CCDA semeadas com o caldo Bolton inoculado com os micro-organismos alvo e os micro-organismos interferentes houve crescimento apenas dos micro-organismos alvo, demonstrando também a seletividade deste meio.

O critério de aceitação para a produtividade dos Ágares m-CCDA e

Sangue suplementado deve ser um índice de crescimento $P_R \geq 0,50$. Este índice é dado pela fórmula $P_R = N_S / N_O$, onde N_S é o número de UFCs no meio sob avaliação e N_O é o número de UFCs no meio de referência. O resultado para o mCCDA foi $P_R = 0,90$ e para o Agar sangue suplementado $P_R = 0,83$, evidenciando resultado satisfatório para os meios testados. As UFCs identificadas foram confirmadas pela morfologia das colônias, que no Agar mCCDA são acinzentadas e geralmente com brilho metálico, e no Agar sangue tem tonalidade creme ou acinzentada. Na microscopia apresentam-se Gram negativas, delgadas, curvas em forma de “S” ou de “asa de gaivota”, geralmente formando pequenas cadeias em zig-zag e tem motilidade evidenciada pelos movimentos característicos tipo vai-vém ou saca-rolhas.

A produtividade dos meios de cultura, seletivos ou não, depende de fatores intrínsecos (nutrientes, potencial de oxidação-redução, pH, atividade de água, tipo e atividade dos antimicrobianos e/ou formação destes durante o aquecimento), fatores extrínsecos (temperatura de incubação e suas flutuações, pressão de O_2 e CO_2 do ambiente) e fatores implícitos (dependência nutricional do micro-organismo, os fenômenos antagônicos e sinérgicos entre os componentes da microbiota e da amostra) (GELLI et al., 2003). Conforme os resultados obtidos, os meios de cultura testados foram aprovados para uso.

No teste de seletividade houve inibição do crescimento dos micro-organismos interferentes nos meios seletivos para *Campylobacter*. Meios de cultura para agentes patogênicos de origem alimentar são dependentes da concordância entre a seletividade e inibição de micro-organismos interferentes e a recuperação e crescimento do organismo alvo. A seletividade dos meios é dada pela presença de agentes inibidores em sua

composição que possam, ao mesmo tempo, suprimir, mesmo que parcialmente, a microbiota competidora e promover o desenvolvimento do micro-organismo desejado. Neste sentido, os meios de cultura testados demonstraram estar aptos para o uso, pois houve crescimento de *Campylobacter* e inibição de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

CONCLUSÃO

O resultado dos ensaios nas matrizes artificialmente contaminadas demonstrou o bom desempenho dos meios de cultura. Foram testados os vários níveis de contaminação do micro-organismo alvo e dos micro-organismos interferentes, sendo evidenciado o crescimento do micro-organismo alvo e a inibição dos micro-organismos interferentes em todas as diluições.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, Programa Pesquisador Gaúcho - PqG – Edital FAPERGS nº 004/2012).

REFERÊNCIAS

- ACMSF (Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food Surveillance). **The isolation of *Campylobacter* spp. from food and environmental samples**. Advises the Food Standards Agency on the Microbiological Safety of Food. Annual Reports – Discussion paper, 2010. Disponível em: https://acmsf.food.gov.uk/sites/default/files/mnt/drupal_data/sources/files/multimedia/pdfs/publication/acmsfannualreport2010.pdf. Acessado em: 12 nov 2016.
- BI, S; SHI, L; YAN, H; MENG, H. Comparison of various culture methods (Skirrow medium, a blood-free

- medium and a filtration system enriched in Bolton and Preston broths) for isolation of *Campylobacter* spp. from raw meat samples. **Ann Microbiol.**, v.63, p.179–185, 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s13213-012-0459-y>>. Acessado em: 12 nov 2016.
- BOLTON, FJ; COATES, D; HINCHLIFFE, PM; ROBERTSON, L. Comparison of selective media for isolation of *Campylobacter jejuni/coli*. **Journal of Clinical Pathology**, v.36, p.78–83, jan, 1983. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s13213-012-0459-y>>. Acessado em: 10 jun 2015.
- EFSA (European Food Safety Authority). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and foodborne outbreaks in 2009. **EFSA Journal**, v.9, 2011. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2090>>. Acessado em: 10 jun 2015.
- GELLI, DS; RISTORI, CA; BUZZO, AA. Controle de qualidade em laboratório de microbiologia de alimentos e avaliação de desempenho de meios de cultura no isolamento de *Salmonella* spp. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v.62, n.3, p.159-164, 2003.
- HUNT, JM; ABEYTA, C; TRAN, T. *Campylobacter*. U.S. Food and Drug Administration (FDA), **Bacteriological Analytical Manual Online**. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm072616.htm>>. Chapter 7, revised March 2001.
- Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. **Manual de Procedimientos-Campylobacter**. Buenos Aires, Argentina, 2001.
- ISO 10272-1: **Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp.**, 2006.
- ISO 11133: **Microbiology of food, animal feed and water – Preparation, production, storage and performance testing of culture media**, 2014.
- SILVA, N; JUNQUEIRA, VCA; SILVEIRA, NFA; TANIWAKI, MH; SANTOS, RFS; GOMES, RAR. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 4. ed. São Paulo: Varela, 2010.

LOS MURCIÉLAGOS SON EL PRINCIPAL RESERVORIO DE LOS CORONAVIRUS.

Según un estudio de científicos de la Universidad de Columbia en Nueva York (EE. UU) los murciélagos son el principal reservorio animal para las mortales infecciones por coronavirus en el mundo.

Los coronavirus son una extensa familia de virus, algunos de los cuales puede ser causa de diversas enfermedades humanas, que van desde el resfriado común hasta el SRAS (síndrome respiratorio agudo severo). Los virus de esta familia también pueden causar varias enfermedades en los animales.

Para mapear la distribución de los coronavirus, los investigadores estudiaron durante cinco años aproximadamente 12 300 murciélagos, 3 400 roedores y musarañas, así como 3 500 monos, en un total de 20 países en África, Asia y América Latina. Los investigadores descubrieron que casi el 10% de los murciélagos portaba un coronavirus en comparación con el 0.2% de los otros animales muestreados. Asimismo la diversidad de virus era más alta en lugares donde vivían varias especies de murciélagos, como la selva amazónica.

Las infecciones causadas por los virus coronavirus afectan a la mayoría de las personas alguna vez en su vida. Son comunes alrededor del mundo y pueden infectar a personas y a animales. Existen varios tipos de coronavirus que pueden enfermarlo. Por lo general, causan enfermedades leves a moderadas del tracto respiratorio superior. Sin embargo, algunos coronavirus pueden causar enfermedades graves.

Es probable que los coronavirus se propaguen por el aire al toser o estornudar o por contacto personal. Si usted se infecta, los síntomas pueden incluir: secreción o goteo nasal, tos, dolor de garganta, fiebre. (José Antonio de Jesús Jorge Valera, javalera@infomed.sld.cu. OPS/OMS. Infecciones por coronavirus. Medline Plus, Información de Salud para usted. Murciélagos portan virus que podrían provocar brotes en humanos).