

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**CONTAGEM DE *Campylobacter* spp. EM AMOSTRAS DE DIFERENTES PONTOS
DO FLUXOGRAMA DE ABATE DE FRANGOS POR MÉTODO DE
PLAQUEAMENTO DIRETO EM ÁGAR mCCDA E CAMPY-CEFEX.**

CAMILA CRISTINA GONSALVES

PORTO ALEGRE

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**CONTAGEM DE *Campylobacter* spp. EM AMOSTRAS DE DIFERENTES PONTOS
DO FLUXOGRAMA DE ABATE DE FRANGOS POR MÉTODO DE
PLAQUEAMENTO DIRETO EM ÁGAR mCCDA E CAMPY-CEFEX.**

Autora: Camila Cristina Gonsalves

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de Medicina Veterinária Preventiva, na especialidade de Sanidade Avícola.

Orientador: Prof. Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento

PORTO ALEGRE

2014

CIP - Catalogação na Publicação

Gonsalves, Camila Cristina

CONTAGEM DE *Campylobacter* spp. EM AMOSTRAS DE DIFERENTES PONTOS DO FLUXOGRAMA DE ABATE DE FRANGOS POR MÉTODO DE PLAQUEAMENTO DIRETO EM ÁGAR mCCDA E CAMPY-CEFEX. / Camila Cristina Gonsalves. -- 2014. 83 f.

Orientador: Vladimir Pinheiro do Nascimento.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. *Campylobacter*. 2. Contagem Direta em Placa. 3. mCCDA. 4. Campy-Cefex. 5. Aves. I. Pinheiro do Nascimento, Vladimir, orient. II. Título.

CAMILA CRISTINA GONSALVES

**CONTAGEM DE *Campylobacter* spp. EM AMOSTRAS DE DIFERENTES PONTOS
DO FLUXOGRAMA DE ABATE DE FRANGOS POR MÉTODO DE
PLAQUEAMENTO DIRETO EM ÁGAR mCCDA E CAMPY-CEFEX.**

Aprovado em: 31 de Março de 2014

APROVADO POR:

Prof. Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes
Membro da Comissão

Prof. Dra Anderlise Borsoi
Membro da Comissão

Prof. Dra Laura Beatriz Rodrigues
Membro da Comissão

DEDICATÓRIA

*Dedico esta dissertação aos
meus pais Joacir e Izabel
Gonsalves; e a Professora e
amiga Anderlise Borsoi; os
maiores incentivadores desse
sonho!*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha existência, por guiar meus passos e colocar pessoas tão especiais em minha vida que possibilitaram a realização deste projeto.

A minha família, em especial aos meus pais Joacir e Izabel por ajudarem-me a levar em frente um sonho, por estarem comigo a cada passo dado, incentivando-me e apoiando-me. Toda a conquista dedico a vocês. Aos meus irmãos Fabiano e Igor, e todos os meus familiares que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Ao meu namorado Arthur, pelo amor, carinho, conselhos, compreensão e apoio nos momentos mais difíceis. Amo Vocês!

Ao meu orientador, Professor Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento pela oportunidade oferecida, pelos conhecimentos transmitidos e confiança depositada para o desenvolvimento deste projeto.

A todos os colegas do CDPA, professores, mestrandos, doutorandos e funcionários, obrigada por compartilharem um pouquinho do conhecimento e da experiência de cada um de vocês. À Gabriela Zottis, Rafaela Morgan, Micheli Trindade pela amizade e auxílio na execução deste projeto, e um agradecimento especial ao Gustavo Perdoncini por toda a ajuda recebida, conhecimentos compartilhados e por sempre atender aos meus pedidos prontamente em Porto Alegre ou mesmo do outro lado do oceano. Serei sempre grata pela sua ajuda, paciência e amizade.

Ao meu amigo Guilherme Medeiros Machado que com seu companheirismo e seu bom humor ajudou a tornar a estadia em Porto Alegre mais agradável, obrigada pela ajuda prestada sempre. Amigos como você são presentes de Deus.

A Universidade Tuiuti do Paraná por abrir as portas para que eu pudesse realizar meu projeto de pesquisa em seu laboratório, em especial a coordenadora do Curso de Medicina Veterinária, professora Ana Laura Angeli pela confiança depositada e pela oportunidade cedida. E a todos os funcionários do laboratório de microbiologia da UTP que me auxiliaram nos momentos em que necessitei.

A UFRGS e ao programa de pós-graduação pela oportunidade oferecida.

Em especial,

À Professora Dra Anderlise Borsoi, que a 5 anos atrás me mostrou um mundo novo chamado “Avicultura”, agradeço a Deus por tê-la colocado em meu caminho e pela amizade que construímos. Você sempre será minha referência profissional e pessoal, um exemplo de amor e dedicação ao trabalho que se propõe, e que certamente continuará criando admiradores

ao longo de sua vida. Obrigada por estar ao meu lado e acreditar tanto em mim!

“Aquele que procura segurança no Altíssimo Deus e se abriga na sombra protetora do Todo-poderoso pode dizer ao Deus Eterno: Tu és o meu defensor e o meu protetor. Tu és o meu Deus, e eu confio em Ti.”

Salmo 91

RESUMO

Nas últimas décadas as espécies de *Campylobacter* spp. são reconhecidas como importantes agentes de gastroenterites de origem alimentar em humanos em diversos países, tendo como principal veículo de transmissão a carne de frango. Devido ao aumento da frequência com que é isolada a partir de humanos, animais, alimentos e água, esta bactéria tem sido foco crescente de atenção nos últimos 30 anos. No Brasil, ainda são limitadas as informações sobre esta bactéria na cadeia de produção de aves, não existindo legislação que contemple o controle de *Campylobacter*. A alta incidência na avicultura, a presença natural deste patógeno nos animais e os graves problemas de saúde pública gerados tornam essa bactéria alvo de esforços para prevenção e controle. O objetivo do presente estudo foi avaliar se a metodologia de contagem direta proposta pela normativa MLG 41.02 teria eficiência na monitoria em diferentes amostras avícolas e paralelamente comparar o desempenho de dois ágar (mCCDA e Campy-Cefex) na contagem de *Campylobacter* spp. Foram realizadas quatro tomadas de amostras em um frigorífico da região Sul do país, durante um mês, sendo a amostragem composta por suabes de cloaca, carcaças pré-chiller, carcaças pós-chiller, água pré-chiller, água do chiller, e amostras de água de abastecimento. O ágar Campy-Cefex obteve maior frequência de isolamento de *Campylobacter* spp. em diferentes amostras avícolas quando comparado com o ágar mCCDA. Houve redução significativa de contaminação ao longo da linha de abate, com níveis de $9,8 \times 10^2$ UFC/mL em carcaças pré-chiller e $1,5 \times 10^2$ UFC/mL em carcaças pós-chiller. Do total de amostras em que foram realizadas a PCR, 72% foram positivas para *Campylobacter jejuni* e 38% positivas para *Campylobacter coli*. A metodologia mostrou-se eficiente e possível de ser aplicada na indústria avícola, em diferentes materiais, para monitoria de *Campylobacter*.

Palavras-Chaves: *Campylobacter*, contagem direta em placa, mCCDA, Campy-Cefex, aves.

ABSTRACT

In recent decades the Campylobacter spp. species are recognized as important agents of foodborne gastroenteritis in humans in several countries and the broiler meat as are pointed as the main vehicle of transmission. Due the increase in frequency isolation from humans, animals, food and water, this bacteria has received great attention in the last 30 years. The information about this bacteria are still limited in Brazil and in the poultry production chain, there are no laws to the Campylobacter's control. The high incidence in poultry industry, the natural presence of this pathogen in animals and the serious concern in public health, lead this bacteria as target to prevention and control efforts. The aim of this study was to evaluate whether the direct counting methodology proposed by MLG 41.02 rules would be efficient on monitoring different poultry samples, as well as to compare two agars plate (mCCDA and Campy-Cefex) performance's to Campylobacter cell count. We carried out four samples taken in a slaughterhouse located at southern region of Brazil, during one month. The samples were composed by cloacal swabs, pre-chiller carcasses, post-chiller carcasses, pre-chiller water, chiller water, and water supply samples. The Campy-Cefex agar showed higher Campylobacter spp isolation frequency of among different poultry samples than mCCDA agar. There was a significant reduction in contamination along the slaughter line with levels of 9.8×10^2 CFU/mL in pre- chiller carcasses and 1.5×10^2 CFU/mL in post-chiller carcasses. The samples typified by PCR, showed 72% of the samples as Campylobacter jejuni and 38% as Campylobacter coli. The methodology was efficient and also possible to be used in the poultry's industry for different samples to Campylobacter monitoring program.

Key-Words: *Campylobacter, agar plate count, mCCDA, Campy-Cefex, poultry*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição base do ágar CCD modificado.....	31
Tabela 2: Composição base do ágar Campy-Cefex.....	31
Tabela 3: Gene alvo, <i>primers</i> utilizados, números dos pares de bases dos <i>amplicons</i> (pb).	40
Tabela 4: Teste de sensibilidade na recuperação de <i>Campylobacter ATCC jejuni</i> e <i>coli</i> nos ágares mCCDA, Campy-Cefex e TSA.....	42
Tabela 5: Frequência de isolamento direto de <i>Campylobacter</i> spp. nos ágares mCCDA e Campy-Cefex pareados para a mesma amostra positiva, em diferentes amostras avícolas.....	42
Tabela 6: Médias de contagens direta de células de <i>Campylobacter</i> spp. isoladas de diferentes amostras avícolas nos ágares Campy-Cefex e mCCDA.....	42
Tabela 7: Tipificação das amostras de <i>Campylobacter</i> spp. pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase.....	43
Tabela 8: Percentuais de isolamento de <i>Campylobacter jejuni</i> e <i>Campylobacter coli</i> nos ágares Campy-Cefex e mCCDA.....	44
Tabela 9: Comparativo de valores dos ágares Campy-Cefex e mCCDA por litro cotados em dólares (US\$).....	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Morfologia de <i>Campylobacter</i>	16
Figura 2: <i>Campylobacter jejuni</i> : representação esquemática de infecção.....	19
Figura 3: Fontes de contaminação de <i>Campylobacter jejuni</i> em humanos.....	22
Figura 4: Rinsagem de carcaças de frango em sacos estéreis de polietileno contendo 400 mL de água peptonada tamponada.....	37
Figura 5: Plaqueamento direto com alça de Drigalsky estéril.....	38
Figura 6: Fluxograma da análise quantitativa.....	38
Figura 7: Fluxograma da análise qualitativa.....	39
Figura 8: Colônias características de <i>Campylobacter</i> spp.....	40
Figura 9: Gel de agarose apresentando produtos da amplificação para as cepas de <i>Campylobacter</i>	44

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grau Celsius
%	Porcentagem
µL	Microlitro
µm	Micrometro
®	Marca Registrada
>	Maior
ANOVA	Análise de Variância
APT 1%	Água Peptonada Tamponada 1%
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATR	<i>Adaptive Tolerance Response</i>
<i>C. coli</i>	<i>Campylobacter coli</i>
<i>C. concisus</i>	<i>Campylobacter concisus</i>
<i>C. faecales</i>	<i>Campylobacter faecales</i>
<i>C. fetus</i>	<i>Campylobacter fetus</i>
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
<i>C. lari</i>	<i>Campylobacter lari</i>
<i>C. sputorum</i>	<i>Campylobacter sputorum</i>
CSM	<i>Charcoal-Based Selective Medium</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EUA	Estados Unidos da América
FAO/WHO	<i>Food and Agriculture Organization /World Health Organization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GBS	<i>Guillain-Barré Syndrome</i>
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mCCDA	<i>Modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar</i>
mL	Mililitro
PB	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PIB	Produto Interno Bruto
pH	Potencial Hidrogeniônico
SIF	Serviço de Inspeção Federal
TNTC	<i>Too Numerous To Count</i>
TSA	Ágar Trypticase de Soja
UBABEF	União Brasileira de Avicultura
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFC/g	Unidade Formadora de Colônia por grama
UFC/mL	Unidade Formadora de Colônia por mililitro
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
VNC	<i>Viable and Non-Culturable Forms</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Histórico	15
2.2 O Gênero <i>Campylobacter</i>	15
2.3 <i>Campylobacter jejuni</i> e <i>Campylobacter coli</i>	17
2.4 Patogenia	18
2.5 Epidemiologia	20
2.5.1 Importância do <i>Campylobacter</i> em Saúde Pública.....	20
2.5.2 Campilobacteriose Humana.....	22
2.5.3 Contaminação de Frangos e Produtos Avícolas por <i>Campylobacter</i>	23
2.6 Meios de Isolamento de <i>Campylobacter spp.</i>	25
2.6.1 Metodologia MLG 41.02.....	27
2.6.1.1 Preparação da Cultura Controle.....	27
2.6.1.2 Preparação da Amostra Quantitativa e Plaqueamento.....	28
2.6.1.3 Preparação da Amostra Qualitativa e Plaqueamento.....	28
2.6.1.4 Análise e Seleção das Colônias.....	28
2.6.1.5 Regras Gerais para Interpretação de Leitura das Placas.....	28
2.6.1.6 Análises de Confirmação.....	30
2.6.2 Ágar CCD Modificado.....	30
2.6.3 Ágar Campy-Cefex.....	30
2.6.4 Caldo de Enriquecimento Seletivo.....	30
2.6.5 Plaqueamento Direto.....	32
2.7 Métodos de Identificação de <i>Campylobacter spp.</i>	33
2.7.1 Métodos Bioquímicos e Enzimáticos.....	33
2.7.1.1 Prova da Catalase.....	33
2.7.1.2 Prova da Oxidase.....	33
2.7.1.3 Prova de Aglutinação em Látex.....	33
2.7.1.4 Método Molecular.....	34

3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1 Teste de Sensibilidade de Recuperação de <i>Campylobacter jejuni</i> e <i>Campylobacter coli</i> em Ágar mCCDA, Ágar Campy-Cefex e Ágar TSA.....	35
3.2 Amostragem Utilizada e Local de Realização das Análises.....	35
3.2.1 Obtenção das Amostras.....	35
3.3 Metodologias Utilizadas.....	36
3.3.1 Preparação dos Meios de Cultura.....	36
3.3.2 Caldo de Enriquecimento Seletivo.....	36
3.3.3 Rinsagem das Carcaças.....	36
3.3.4 Suabes de Cloaca.....	39
3.3.5 Amostras de Água.....	39
3.3.6 Seleção e Identificação das Colônias.....	40
3.3.7 Metodologia da PCR.....	40
3.4 Comparativo de Valores dos Ágares Campy-Cefex e mCCDA Por Litro.....	41
3.5 Análise Estatística dos Dados.....	41
4. RESULTADOS.....	42
5. DISCUSSÃO.....	46
CONCLUSÃO.....	52
REFERÊNCIAS.....	53
ANEXO 1.....	61

1 INTRODUÇÃO

O ano de 2012 foi desafiador para a avicultura mundial, com custos de produção extremamente elevados devido à alta de preços de *commodities* agrícolas, milho e soja, principais insumos do setor, e a paralisação de diversas empresas o que resultou em milhares de demissões. Segundo dados da União Brasileira de Avicultura a produção de carne de frango em 2012 foi de 12,65 milhões de toneladas, o que representou uma queda de 3,17% em relação a 2011 (UBABEF, 2012); em 2013 a produção foi de 12,3 milhões de toneladas, resultado 2,6% menor em relação ao mesmo período de 2012. O consumo *per capita* de carne de frango foi de 45 quilos, contra 47,4 quilos em 2011 (AVISITE, 2013) e 41,8 quilos em 2013 (UBABEF, 2014).

Neste contexto, a avicultura brasileira enfrentou a maior crise da sua história, e o impacto só não foi maior devido à solidez do setor, exibindo em 2013 modesta recuperação do ritmo produtivo, ano este, marcado pela reabilitação da avicultura brasileira e de superação aos desafios de 2012. Frente a tudo isso, o Brasil manteve a posição de maior exportador mundial de carne de frango e de terceiro maior produtor, atrás apenas dos Estados Unidos e da China (UBABEF, 2014).

A demanda por alimentos cresce junto com a população e a renda mundial, as projeções indicam 9 bilhões de pessoas no mundo em 2050 e grande parte desse aumento populacional se dará nos países em desenvolvimento da Ásia e África onde ocorrerá um intenso processo de urbanização, com milhares de pessoas passando a viver nas cidades e por consequência deixando de produzir o seu próprio alimento. O cenário que se abre é positivo para o setor avícola, levando em conta também que o tempo produtivo da ave é bem menor em relação a outras espécies, assim como é possível produzir mais em menor espaço físico. Tais fatores devem levar a carne de frango a se tornar a proteína animal mais consumida no mundo nas próximas duas décadas. A avicultura brasileira representa hoje 1,5% do Produto Interno Bruto (PIB), gerando cinco milhões de empregos diretos e indiretos e uma receita anual de US\$ 8 bilhões somente com exportações destinadas para mais de 150 países (COSTA, 2012).

Os excelentes índices de produção atuais só foram possíveis com a expansão da avicultura industrial, sendo que para essa expansão foi necessário dentre outros, concentrar mais aves por metro quadrado e conseqüentemente gerando um maior risco de disseminação de doenças. Na produção avícola, a prevenção e o controle de patógenos são desafios permanentes.

Por um longo período, a imagem da carne de frango e de ovos esteve associada às salmoneloses. Embora este patógeno ainda seja encontrado entre os principais agentes de doenças transmitidas por alimentos, outras bactérias patogênicas que também podem ser veiculadas pela carne de frango configuram neste cenário, como a *Listeria monocytogenes* e principalmente as espécies termófilas de *Campylobacter* (*C*), que vem sendo considerada emergente e recebe atenção da indústria e do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), principalmente devido à presença natural deste patógeno em frangos, a alta incidência na avicultura e os graves problemas de saúde pública gerados como a campilobacteriose (VAZ *et al.*, 2008).

Nos Estados Unidos da América (EUA) o *Campylobacter* é o segundo agente mais isolado em doenças de origem alimentar (CDC, 2009) e dados da EFSA (*European Food Safety Authority*) concluíram que ocorrem anualmente na União Europeia nove milhões de casos de campilobacteriose humana, que resultam em custos totais anuais de 2,4 bilhões de Euros (EFSA, 2011a). Atualmente existe uma comissão internacional, em conjunto do *Codex Alimentarius* e a Organização Mundial da Saúde (FAO/WHO), que desenvolvem propostas de diretrizes para o controle da *Salmonella* e *Campylobacter* em carne de frango, tendo em vista a importância destes agentes em intoxicação alimentar associadas a produtos avícolas e também por representarem barreiras ao livre comércio destes produtos.

A complexa biologia do *Campylobacter*, a falta de conhecimento da interação patógeno-hospedeiro, a escassez de informações epidemiológicas, a ausência de programas de vigilância específicos são alguns fatores que limitam o controle desse microrganismo.

Devido à importância dessa bactéria e a necessidade de informações, foi eleito como objetivo do presente estudo o teste da metodologia de contagem direta de *Campylobacter* - MLG 41.02 do Ministério da Agricultura dos Estados Unidos (USDA), com diferentes tipos de ágar em material de origem avícola. Cita-se, que tal estudo se fez necessário para contribuir com dados a cerca de metodologias para contagem desta bactéria, uma vez que até o presente momento não há no Brasil método específico oficial de contagem de *Campylobacter* spp. em aves e materiais avícolas, e, por não existir um padrão microbiológico para *Campylobacter* em alimentos, poucos são os laboratórios que possuem uma metodologia de detecção da bactéria implantada; soma-se a isso ao aumento do volume de consumo da carne de frango em nosso país e os índices de contaminação desses animais, tornando-se cada vez mais importante a implantação de uma metodologia eficaz na rotina de laboratórios e frigoríficos, que seja rápida, de baixo custo e de fácil execução.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico

Em 1886, Theodor Escherich observou organismos semelhantes ao *Vibrio* ao que hoje denominamos de *Campylobacter* spp. em fezes de crianças e gatos com diarreia e então designou as bactérias observadas apenas microscopicamente de *Vibrio felinus*. McFadyea e Stockmann em 1913 e mais tarde Smith em 1918, identificaram microrganismos microaerófilos espiralados semelhantes morfológicamente às espécies do gênero *Vibrio* em tecidos fetais de ovelhas e vacas que haviam abortado, denominando-as assim de *Vibrio fetus* (FONSECA, 2006) *tr.* Posteriormente em 1931, Jones e Little isolaram a partir de bovinos com distúrbio intestinal, um microrganismo microaerófilo que nomearam de *Vibrio jejuni*. Em 1944, Doyle descreveu um microrganismo isolado no intestino de suínos com diarreia, denominando-os de *Vibrio coli* (FERNANDEZ; FARACE, 2003). Porém, foi somente a partir de 1957 que Elizabeth King começou a identificar no gênero *Campylobacter* às espécies com características termofílicas, chamando-as de *related vibrios* (BALIAN, 2009). Finalmente em 1963, baseados em diferenças bioquímicas e na composição de bases do DNA, Sebald e Veron propuseram a criação do gênero *Campylobacter* incluindo as bactérias antes conhecidas como *Vibrio*, no qual em 1973 Veron e Chatelain listaram *C. fetus*, *C. jejuni*, *C. coli* e *C. sputorum* (FONSECA, 2006).

Em 1972, microbiologistas clínicos na Bélgica isolaram *Campylobacter* spp. em amostras de fezes de pacientes com diarreia. Skirrow em 1977 confirmou os achados dos microbiologistas belgas, descrevendo uma técnica simples para cultivo de *C. jejuni* e *C. coli* de amostras de fezes, o que permitiu uma difusão ainda maior do isolamento de *Campylobacter*. Butzler e Skirrow, Bolton e Robertson, desenvolveram meios seletivos que permitiram isolar estes microrganismos com relativa facilidade e estabelecer sua participação em diferentes quadros infecciosos no homem (FERNANDEZ; FARACE, 2003).

2.2 O Gênero *Campylobacter*

Até 1989 conhecia-se um total de 18 espécies com subespécies, sendo 17 nomes reconhecidos pelo *International Committee on Systematic Bacteriology*.

No presente momento, na “*List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*”, organizada pelo pesquisador J.P. Euzéby, cita-se 32 espécies e 13

subespécies. Encontram-se na literatura diferentes esquemas de classificação para o gênero *Campylobacter* sendo que a taxonomia do gênero é constantemente alterada. Pelo menos nove espécies estão relacionadas com doenças em humanos, entre elas o *Campylobacter pylori*, classificado como *Helicobacter pylori* agente de gastrites e geneticamente diferente do grupo *Campylobacter* (BALIAN, 2009).

O gênero *Campylobacter* (do grego *capilo* = curvo e *bacter* = bastão) pertencente à família *Campylobacteriaceae* é constituído por bactérias em forma de bacilos, Gram negativos, curvos ou espiralados, flagelados, capsulados, não formadoras de esporos, medindo de 0,2 a 0,5 μm de diâmetro por 0,5 a 5 μm de comprimento, porém podem chegar até 8 μm (BOUFLEUR, 2009) e apresentar-se em forma de “S”, “TIL”, “Ç” ou “asa de gaivota” quando aos pares (Figura 1). São móveis por flagelo monotríquio ou politríquio, em uma ou nas duas extremidades (ROSSI JÚNIOR; BERCHIERI JUNIOR, 2009). Pode adquirir morfologia cocóide, correspondente as formas VNC (*viable and non-culturable forms*) principalmente quando em ambientes hostis, cujo potencial patogênico é desconhecido. Em determinadas condições *C. jejuni* gera formas VNC, especialmente na presença de biofilmes de aviários (TRACHOO *et al.*, 2002).

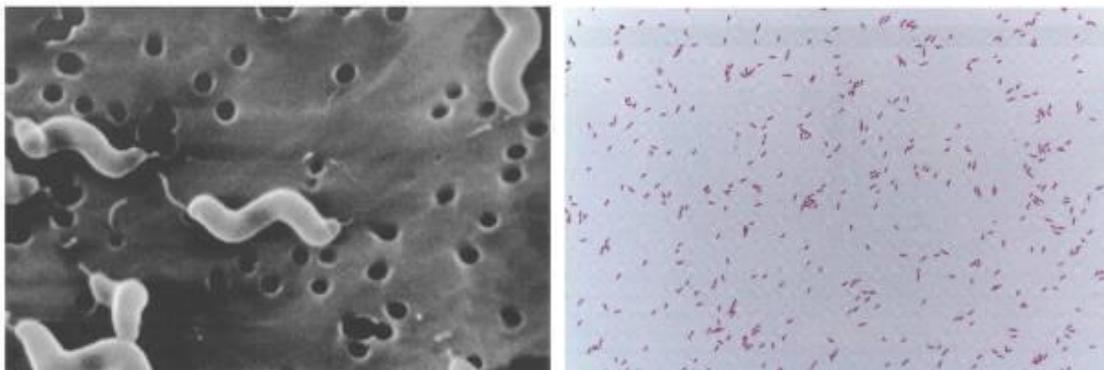


Figura 1: Morfologia de *Campylobacter*.

Esquerda: Morfologia de *Campylobacter jejuni* por microscopia eletrônica: Aparência de saca rolha e flagelo politríquio. Fonte: Altekruse *et al.* (1999).

Direita: Coloração de Gram (aumento 1000 x). Fonte: Vaz *et al.* (2011).

O metabolismo é estritamente respiratório, não fermentam nem oxidam carboidratos, sendo necessários meios ricos em aminoácidos como fonte de energia. São oxidase-positivas e podem ser separados em dois grupos: *Campylobacter* catalase-positiva, no qual estão incluídos *C. jejuni*, *C. fetus*, *C. faecalis* e *C. coli* e o grupo *Campylobacter* catalase-negativa, onde estão incluídos *C. sputorum* e *C. concisus* (MAZIERO, 2007). Algumas espécies se multiplicam bem entre 25°C e 37°C, mas não a 42°C. Outras espécies não se multiplicam a

25°C e sim a 37°C, com temperatura ótima de crescimento entre 42°C e 43°C, sendo estas denominadas termofílicas ou termotolerantes. São microaerófilos estritos, necessitando, como condição ideal para multiplicação de 5 a 6% de oxigênio e também são capnofílicos, requerendo cerca de 10% de dióxido de carbono. São sensíveis à dessecação, não sobrevivendo bem em superfícies secas. Da mesma forma, são mais sensíveis ao estresse osmótico que outras bactérias patogênicas e não crescem em concentrações de cloreto de sódio superiores a 2%. Quando comparados com outros patógenos de origem alimentar, apresentam maior sensibilidade ao pH baixo, sendo incapaz de crescer em pH abaixo de 4,9 e podem ser mortos facilmente a valores inferiores a este, sendo ótimos valores entre 6,5 a 7,5. *C. jejuni* e *C. coli* são também sensíveis à exposição a altas temperaturas, não sobrevivendo assim em alimentos que foram pasteurizados ou adequadamente cozidos (ARRITT, 2000; PARK, 2002).

2.3 *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*

Campylobacter jejuni entre todas as espécies de *Campylobacter* termotolerantes é a que recebe maior atenção, por ser a principal espécie causadora de enterites por campilobacteriose, seguida de *Campylobacter coli* (ZILBAUER *et al.*, 2008). Apresenta como característica bioquímica específica as reações de catalase e oxidase positivas e a maioria dos isolados possui a capacidade de hidrolisar hipurato.

Esta espécie subdivide-se em duas subespécies, *C. jejuni* subs. *jejuni* e *C. jejuni* subs. *doylei*. Sendo *C. jejuni* subs. *jejuni* resistente a cefalotina, com crescimento a 42°C e com capacidade de redução de nitrato, ao contrário de *C. jejuni* subs. *doylei* que caracteriza-se bioquimicamente pela ausência da redução de nitrato, resistência à cefalotina e fraca reação da enzima catalase. Alguns autores têm observado boa adaptação de *C. jejuni* à refrigeração e alta sensibilidade ao congelamento (BALIAN, 2009).

Campylobacter coli quando comparada ao *C. jejuni* não apresentam grandes diferenças entre si, tanto em relação à patogenicidade como na epidemiologia da bactéria no que se refere à forma de transmissão e a distribuição em animais. Quanto às diferenças bioquímicas a capacidade de hidrolisar hipurato, positiva para *C. jejuni*, é o principal critério para diferenciação entre as duas espécies (BIASI, 2010).

Campylobacter coli é a segunda espécie com maior frequência de isolamento e algumas vezes o microrganismo do gênero mais isolado quando associado a amostras de

origem suína (BIASI, 2010), além de suínos pode também ser isolado de bovinos, ovinos e aves.

2.4 Patogenia

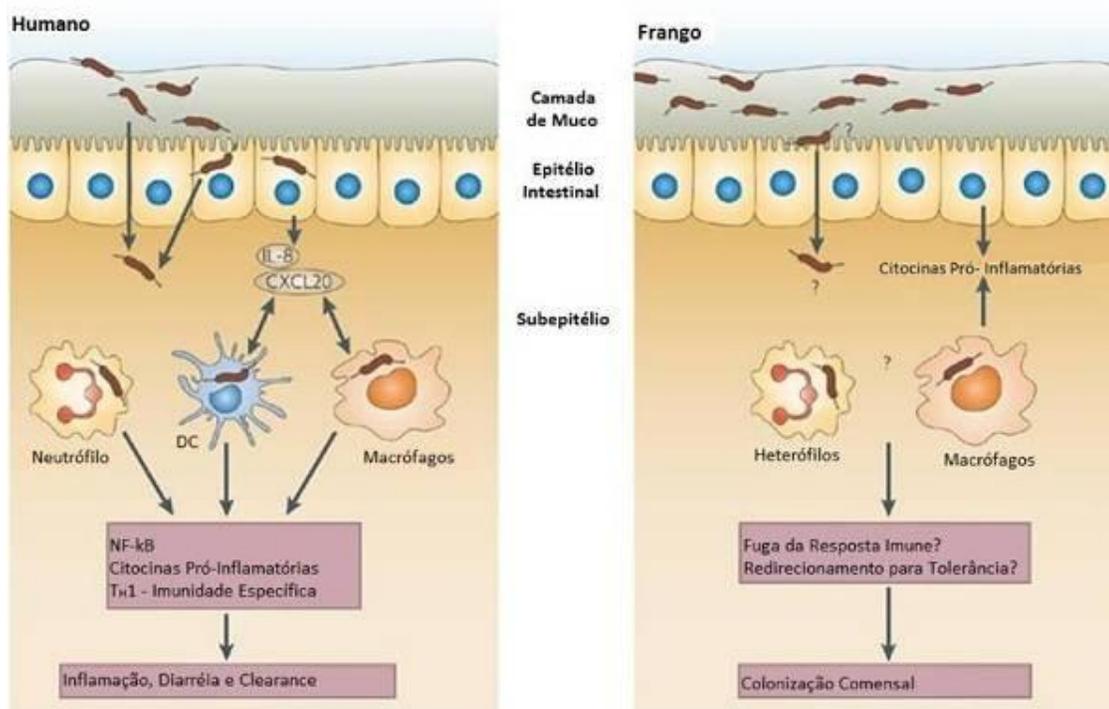
O mecanismo pelo qual esse gênero causa patogenia ainda não foi bem elucidado, sabe-se que a virulência está relacionada com a produção de citotoxinas ou enterotoxinas e suas características de adesão, invasão, presença de flagelos e motilidade (BALIAN, 2009).

Apesar de ser um microrganismo conhecido como um patógeno sensível, por apresentar características e necessidades de crescimento diferentes da maioria dos outros patógenos (PARK *et al.*, 2002) as espécies de *Campylobacter* são capazes de sobreviver ao estresse ambiental e infectar o hospedeiro, utilizando para isso alguns mecanismos necessários à sobrevivência de *C.jejuni* em ambientes estressantes, como a formação de formas VNC, a capacidade de transitar para a forma cocóide e o seu alto grau de variação genética (ROLLINS; COLWELL, 1986). *C. jejuni* também apresenta um mecanismo conhecido como ATR (*Adaptive Tolerance Response*) onde adquire tolerância adaptativa quando induzido por um estresse subletal, fornecendo proteção para posterior exposição aquele estresse letal (MURPHY, 2003).

O microrganismo invade o sistema digestório aderindo à mucosa da porção terminal do intestino delgado, no íleo, multiplicando-se e podendo de acordo com a cepa produzir enterotoxina citotóxica e provocar diarreia aquosa profusa (GERMANO, 2001) como ilustrado na Figura 2. A motilidade de *Campylobacter* spp. é um fator determinante para a colonização, adesão e invasão das células intestinais, para tanto, a motilidade bacteriana requer a presença de flagelo, a combinação entre o flagelo, a forma em espiral da célula e o movimento em saca-rolhas são responsáveis pela motilidade do microrganismo em ambientes viscosos. Ainda, a motilidade quimiotática parece ser essencial para a sobrevivência no intestino e um pré-requisito para causar doença em humanos (DASTI *et al.*, 2010; FEISTEL, 2011).

Segundo Guerry *et al.* (2000) a motilidade de *Campylobacter* spp. é maior e mais rápida em ambientes contendo muco. As mucinas são glicoproteínas complexas que fazem parte da composição do muco, o *Campylobacter jejuni* utiliza a L-fucose, componente da mucina, como fonte de energia e como componente para a multiplicação (MURAOKA; ZHANG, 2011 *apud* FEISTEL, 2011) interagindo com a mucosa intestinal e facilitando a penetração nas criptas (BALIAN, 2009).

Outro importante fator de colonização é a adesão às células epiteliais do trato gastrointestinal do hospedeiro, onde as adesinas, localizadas nos flagelos e nos lipopolissacarídeos (LPS) asseguram essa condição. Após a colonização da célula do hospedeiro e invasão das células intestinais, ocorre apoptose prematura das células epiteliais devido ao efeito citotóxico de *C. jejuni*. Algumas bactérias migram até a lâmina própria e nesse ambiente o *Campylobacter* pode evitar o ataque pelos fagócitos e entrar no sistema circulatório do hospedeiro (WALLIS, 1994) desencadeando um processo inflamatório, com liberação de citocinas que recrutam neutrófilos, macrófagos ao local da lesão e outras células envolvidas na imunidade.



Nature Reviews | Microbiology

Figura 2: *Campylobacter jejuni*: representação esquemática de infecção.
Fonte: Adaptado de YOUNG *et al.*, 2007.

2.5 Epidemiologia

2.5.1 Importância do *Campylobacter* em Saúde Pública

A campilobacteriose foi reconhecida no contexto da saúde pública em 1970, com o surgimento dos meios de cultura seletivos, o que possibilitou demonstrar a participação do *Campylobacter* spp. nas gastroenterites humanas (BALIAN, 2009).

As bactérias do gênero *Campylobacter* são reconhecidas como causa comum de gastroenterite em humanos e estudos epidemiológicos sugerem a relação de produtos de origem avícolas como principais veículos de infecção humana (KUANA *et al.*, 2008a) e devido a sua importância nos países desenvolvidos, os países da América Latina que exportam frangos como o Brasil, começam a se preparar para as novas regras para o controle de *Campylobacter* em carne de frango. Devido ao crescimento acelerado dos casos de toxinfecções alimentares em humanos por *Campylobacter* e o seu controle de tal importância quanto ao da *Salmonella*, órgãos como *Codex Alimentarius* e Organização Mundial da Saúde (FAO/WHO), desenvolvem propostas de diretrizes para o controle de *Salmonella* e *Campylobacter* em carne de frango.

A escassez de informações epidemiológicas em países em desenvolvimento a respeito das infecções causadas em humanos pode ser de modo geral devido a alguns fatores como os poucos laboratórios clínicos que realizam investigação de *Campylobacter* nos exames de rotina, número pequeno de laboratórios de pesquisa desenvolvendo trabalhos com esta bactéria, insuficiência de dados para estimar a real incidência das infecções humanas, falta de notificação compulsória, ausência de programas de vigilância para a campilobacteriose, desconhecimento da etiologia pelos corpos médicos em hospitais, pouca divulgação da campilobacteriose e suas consequências (BORSOI, 2011).

As bactérias do gênero *Campylobacter* são as mais notificadas em relatos de gastroenterite na União Europeia (EFSA, 2009) e o custo da campilobacteriose para os sistemas de saúde pública devido à perda de produtividade são da ordem de 2,4 bilhões de euros por ano, embora parte dos casos não sejam comunicados. No ano de 2009 foram contabilizados 198.252 mil casos em humanos notificados nos países pertencentes a União Europeia (EFSA, 2011b). Nos Estados Unidos *Campylobacter* spp. é o segundo agente bacteriano mais isolado em doenças de origem alimentar (CDC, 2009), segundo Scallan *et al.* (2011) dados mostram que neste país a cada ano ocorrem 9,4 milhões de casos de toxinfecções alimentares, com 55.961 mil hospitalizações e 1.351 mil mortes. Desse total,

11% dos casos têm como agente *Salmonella* spp. e 9% *Campylobacter* spp. e do total de casos relacionados à campilobacteriose, 15% das pessoas são conduzidas para hospitalização.

Na Holanda, são estimados 80.000 mil casos de campilobacteriose por ano, gerando um custo anual de 21 milhões de Euros e que $\frac{3}{4}$ dos custos são referentes a problemas gastrointestinais (HAVELAAR *et al.*, 2005). Um levantamento realizado no Uruguai nos anos de 2001 a 2008 (representando 30 a 40% dos casos das diarreias), destes casos, 49 deles foram submetidos a exames mais completos e nestes *Shigella* e *Campylobacter* apareceram como mais frequentes, com 14,3% de isolamento cada (MOTA *et al.*, 2010).

No Brasil, como em vários outros países, não existem dados com relação à quantificação de custos diretos e indiretos para campilobacteriose, segundo dados de Scarcelli *et al.* (2005) cerca de 25% dos casos de diarreia no Estado de São Paulo estão relacionados a campilobacteriose. Um levantamento oficial do Ministério da Saúde do Brasil mostrou que a bactéria é um dos agentes menos frequentes nas infecções transmitidas por alimentos a humanos e responsável por 0,13% dos surtos notificados, contra 42% da *Salmonella* (SVS, 2009).

Outro foco de atenção crescente está relacionado à resistência antimicrobiana, sendo um dos principais problemas emergentes de importância para saúde pública. O surgimento da multirresistência de patógenos zoonóticos pode ser devido ao extenso uso de antimicrobianos como método terapêutico, profilático e como aditivo na produção avícola (RAHIMI *et al.*, 2010). No entanto, apesar da campilobacteriose ser uma infecção considerada autolimitante, de curso breve, o uso de antimicrobianos se faz necessário nos casos mais graves da doença em humanos. Os macrolídeos, dentre eles a eritromicina e as fluoroquinolonas são os antimicrobianos de escolha para o tratamento da doença. As fluoroquinolonas, em vários países, são os fármacos de eleição para o tratamento de infecções gastrointestinais no homem. Vários estudos em todo o mundo têm documentado um aumento da ocorrência de resistência as fluoroquinolonas entre *Campylobacter* de alimentos de origem animal e seres humanos, após a introdução de fluoroquinolonas para o tratamento de infecções em animais de produção (AARESTRUP, 2005).

Barza e Travers (2002) estimaram que nos EUA as resistências aos agentes antimicrobianos resultam anualmente em um aumento de 29.379 mil infecções por *Salmonella*, levando a 342 internações e 12 mortes, e um aumento de 17.668 mil infecções por *Campylobacter jejuni*, levando a 95 hospitalizações.

2.5.2 Campilobacteriose Humana

Nos países desenvolvidos as infecções por *Campylobacter* ocorrem geralmente por contaminação cruzada durante a manipulação de carne de frango crua ou pelo consumo de carne de frango não preparada corretamente, leite não pasteurizado e água contaminada com a bactéria (Figura 3). Grande variedade de animais alberga a bactéria principalmente no intestino, mas o frango é implicado como maior veículo potencial de transmissão ao homem devido ao consumo de sua carne. O período de incubação varia de 1 a 7 dias, embora 24 a 48 horas sejam o mais comum. Os dados indicam que a maior parte das infecções em humanos ocorre a partir da ingestão de um número relativamente baixo de células bacterianas, 500 a 800 UFC (unidades formadoras de colônias), tornando-se fácil e frequente a ocorrência da campilobacteriose (BORSOI, 2011).

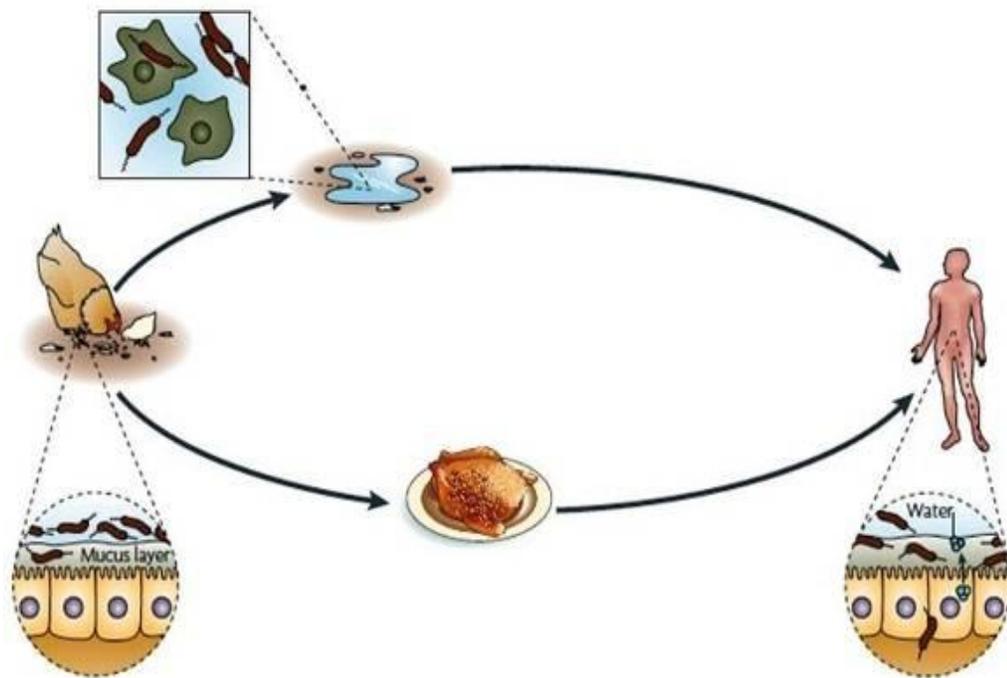


Figura 3: Fontes de contaminação de *Campylobacter jejuni* em humanos.

Fonte: Adaptado de YOUNG *et al.* (2007).

A campilobacteriose é uma forma grave de diarreia que na maioria das pessoas acometidas a recuperação se dá em um período de 2 a 5 dias, embora esta fase possa perdurar por até 10 dias. Dentre as sintomatologias apresentadas podem ser citadas desde diarreia aquosa, moderada e autolimitante até uma disenteria sanguinolenta, com presença de muco e células sanguíneas brancas, podendo ser acompanhada de dores de cabeça e dores

abdominais, febre, indisposição, náusea e vômitos (FEISTEL, 2011). Quando comparada as infecções causadas por *Salmonella* e *Shigella*, a campilobacteriose é menos aguda, porém com maior tendência a recorrência quando não administrado tratamento. As infecções são indistinguíveis clinicamente sem a realização de exames como coprocultura e identificação do agente (MOORE *et al.*, 2005). Os órgãos de predileção das espécies de *Campylobacter* são intestino delgado e intestino grosso (SKIRROW; BLASER, 2000). Em 95% dos casos, a infecção está relacionada com a espécie *Campylobacter jejuni* sendo *Campylobacter coli* responsável por 4% e *Campylobacter lari* por cerca de 1% dos casos. *Campylobacter upsaliensis* tem sido apontado infectando principalmente crianças em países em desenvolvimento (NACHAMKIN, 2008 *apud* FEISTEL, 2011).

As infecções por *Campylobacter* podem levar ao desenvolvimento de doenças autoimunes, como artrite reativa e doenças neurológicas, sendo que a mais importante é a síndrome de *Guillain-Barré* (GBS), que se caracteriza por uma doença autoimune e pós-infecciosa com destruição da bainha de mielina dos nervos periféricos, causando paralisia neuromuscular aguda, podendo comprometer os músculos da respiração e levar o paciente à morte (TAKAHASHI *et al.*, 2005). Calcula-se que a frequência de GBS é de 1 ou 2 casos a cada mil diagnósticos de campilobacteriose e que aproximadamente 30 a 40% dos casos ocorrem em consequência à infecção por *Campylobacter* (JAGUSZTYN-KRYNICKA *et al.*, 2009).

Indivíduos com infecções sistêmicas e prolongadas, imunocomprometidos, idosos e crianças são mais susceptíveis a campilobacteriose e, apesar da doença ser autolimitante, para esses pacientes a terapia com antibióticos pode ser essencial (MOORE *et al.*, 2005).

2.5.3 Contaminação de Frangos e Produtos Avícolas por *Campylobacter*

No Brasil são limitadas e variáveis as informações sobre esta bactéria na cadeia de produção das aves, Kuana (2008a) ao analisar 22 lotes de frangos de corte com idade entre 3-5 semanas, observou 81,8% de positividade para *Campylobacter* spp. para amostras cecais e ao analisar 96 carcaças no frigorífico a contaminação observada foi de 99%. Em outro estudo, Gomes *et al.* (2006) isolaram *C. jejuni* de 5,2% de 404 amostras fecais de frangos provenientes de criação doméstica. No Estado de São Paulo, a prevalência de *C. jejuni* e *C. coli* em carcaças de frango obtidas durante o abate foi de 60% (AQUINO *et al.*, 2002). No mesmo Estado, a pesquisa do patógeno em material obtido em diferentes pontos da linha de abate identificou *C. jejuni* em apenas 4,9% das amostras testadas (CORTEZ *et al.*, 2006). Em

relação a outros países, foi detectado em lotes próximos ao abate, prevalência de 27,4% na Islândia (GUERIN *et al.*, 2007) 46% na Dinamarca (WEDDERKOPP *et al.*, 2000) e de até 100% nos Estados Unidos (GREGORY *et al.*, 1997).

Segundo Humphrey (1999) aproximadamente 75% das aves de corte apresentam *C. jejuni* e/ou *C. coli* e essa contaminação pode estar associada à entrada da bactéria nos galpões a partir do ambiente externo. Quando um lote se torna positivo para *Campylobacter* spp. a prevalência de infecção é alta e pode chegar até 100% das aves testadas. A transmissão horizontal, principalmente a rota fecal-oral, é considerada a principal via de disseminação da doença entre o lote; os frangos iniciam a eliminação fecal de *C. jejuni* com 2-3 semanas de idade, e cerca de 2-4 dias após o início da eliminação bacteriana 90-100% do lote torna-se infectado (BOUFLEUR, 2009).

As aves infectadas geralmente não apresentam sinais clínicos, embora em algumas infecções experimentais, como citado por Corry *et al.* (2001) algumas cepas de *C. jejuni*, a maioria obtidas de casos de campilobacteriose humana, causaram diarreia e mortalidade dos pintinhos. Segundo Evans e Sayers (2000) a infecção nas aves depende da idade da ave e sua frequência aumenta com a idade, persistindo a colonização até o abate. Os principais locais de colonização são ceco, cólon e cloaca das aves, com nível de contaminação de até 10⁹ UFC/g de fezes (MEAD, 2002).

Na infecção de lotes de frangos por *Campylobacter* existem alguns fatores de risco para maior contaminação, entre eles os meses de verão, as criações tipo *free-range* e orgânica, lotes com mais de 15.000 mil aves, presença de outros animais nas propriedades, bandeja de bebedouro tipo *nipple* e as caixas de carregamento para o abate (BORSOI, 2011). Durante o processamento das carcaças, os organismos podem ser disseminados tanto pela alta carga bacteriana presente no trato intestinal, quanto pela carga bacteriana presente na pele e penas das aves, como resultado de uma maior eliminação em função do estresse causado pelo transporte, assim como a contaminação cruzada através da manipulação pelos funcionários, água e equipamentos no abate (BOUFLEUR, 2009).

Na evisceração, pode ocorrer ruptura das vísceras e exposição do conteúdo intestinal, fato esse que não é incomum, uma vez que a maioria das plantas processadoras utiliza evisceração mecânica que, frequentemente, não é ajustada para os diferentes tamanhos de carcaças e também devido a fatores relacionados à fragilidade intestinal, decorrente de infecções causadas principalmente por *Clostridium perfringens*. A integridade intestinal das aves, quando precária, pode acarretar ruptura intensa dos intestinos e também o

extravasamento de conteúdo biliar durante o processo de evisceração, aumentando os índices de condenação sanitária de carcaças contaminadas por fezes e bile, alterações na qualidade do produto e comprometimento da segurança alimentar (FRANÇA, 2013). A carcaça que entrou em contato com o conteúdo intestinal pode contaminar equipamentos, utensílios e comprometendo assim, todas as etapas seguintes de processamento e industrialização, sendo a evisceração apontada como um ponto crítico de controle no abate.

A contaminação em carcaças por *Campylobacter* spp. depende do número de microrganismos inicialmente presentes, das condições higiênico-sanitárias dos abatedouros, do tempo de prateleira e dos cuidados de conservação (CARVALHO; COSTA, 1996 *apud* FONSECA, 2006).

Os ovos de mesa não são considerados importantes na veiculação de *Campylobacter* spp., embora poedeiras comerciais possam albergar a bactéria nos folículos ovarianos, trato reprodutivo, baço e cecos (COX *et al.*, 2009). Indícios de transmissão vertical foram observados por Fonseca (2006) ao isolar a bactéria de mecônios de pintinhos recém-nascidos e cloaca de matrizes contaminadas com *Campylobacter* spp. Em relação a surtos determinados por ovos, um estudo global mostrou que o *Campylobacter* contribuiu com 0,6% dos 584 surtos e 97,4% foram atribuídos a *Salmonella* (GREIG; RAVEL, 2009 *apud* BORSOI, 2011).

No Brasil não existe legislação específica para *Campylobacter* spp. e os dados acerca da real contaminação em aves e produtos avícolas são poucos e antigos e podem não refletir a realidade da situação perante esse microrganismo e a sua presença. A ocorrência de *C. jejuni* é monitorada apenas em países desenvolvidos e naqueles onde houve grandes surtos em humanos. Nesses países existem leis e restrições, e um acompanhamento regular desse patógeno na indústria de carne (BORSOI, 2011). No Brasil, medidas devem ser avaliadas e ações implantadas que visem à redução deste agente na cadeia produtiva, nos alimentos e consequente risco para humanos.

2.6 Meios para isolamento de *Campylobacter* spp.

Os primeiros isolamentos do gênero *Campylobacter* na área da microbiologia veterinária ocorreram em 1909 e 1913. Como já citado anteriormente, a bactéria em questão é extremamente suscetível ao estresse ambiental, oscilação de temperatura, sensível à exposição ao ar, ressecamento, pH ácido e armazenamento por longos períodos. Tendo em vista a característica fastidiosa do *Campylobacter*, são necessários alguns mecanismos que ampliem

as chances de isolamento, como o enriquecimento da amostra para seu cultivo e diminuição da flora competitiva. Geralmente os meios seletivos sólidos são ricos em aminoácidos, com adição ou não de sangue, antimicrobianos e antifúngicos. A seletividade do meio é determinada muitas vezes pelo uso de antimicrobianos e antifúngicos na composição destes, de forma a inibir bactérias Gram negativas (cefalosporinas, trimetoprim, polimixina e novobiocina), bactérias Gram positivas (vancomicina, teicoplanina, bacitracina, rifampicina e deoxicolato de sódio) e fungos (ciclohexamida e anfotericina), sendo a seletividade determinada pelo uso destes, e a grande diferença entre os diversos meios de cultura é determinada pela quantidade e tipo de antibióticos usados, assim como pela capacidade de inibição da flora contaminante.

Os meios de cultura para *Campylobacter* podem ser divididos em dois grupos principais: os meios contendo sangue e os meios contendo carvão. Os meios contendo sangue habitualmente usados incluem 5% de sangue, como o ágar de Skirrow, Blaser, Butzler, Preston ou Campy-Cefex, e os meios com carvão são o mCCDA, (*Modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar*) e o CSM (*Charcoal-Based Selective Medium*).

A metodologia recomendada pela ISO 10272-1 (*International Organization for Standardization*), utiliza caldos para diluição com água peptonada tamponada (APT) 1%, o enriquecimento seletivo com caldo Bolton (*Bolton Broth*), inoculação em ágar mCCDA e mais um ágar com características diferentes do mCCDA, com incubação sob microaerofilia a 41,5°C por 24-48 horas e, após seleção de colônias, para confirmação das amostras, o plaqueamento em ágar sangue Columbia (*Columbia Blood Agar*).

As recomendações para isolamento sugeridas pela Comissão das Comunidades Europeias por meio da Diretiva 2007/516/CE, FDA (*Food and Drug Administration*) e pelo USDA são metodologicamente semelhantes (BIASI, 2010).

Diversos estudos têm avaliado a eficácia de diferentes meios de cultura e sua capacidade de isolamento de *Campylobacter* em várias fontes. Bolton e Robertson (1982) demonstraram a eficácia do meio Skirrow-Preston no isolamento de *Campylobacter* de fezes humanas, onde o meio Preston mostrou-se mais seletivo para isolamento da bactéria em amostras animais e ambientais, do que o meio Skirrow. Siragusa *et al.* (2004) avaliaram a eficácia do ágar Campy-Line e do ágar Campy-Cefex no isolamento de *Campylobacter* de carcaças de frango e, embora o ágar Campy-Cefex tenha obtido capacidade de isolamento numericamente maior que o ágar Campy-Line, estes não apresentaram diferenças estatísticas.

Potturi-Venkata *et al.* (2007) demonstraram a eficácia de 5 diferentes ágares (*Campylobacter* agar base, *Campylobacter* agar plates, Campy-Line, Campy-Cefex modified

e mCCDA) para isolamento de *Campylobacter* em frangos vivos, concluindo que os ágares *Campylobacter* ágar base, *Campylobacter* ágar plates, Campy-Cefex modified e mCCDA demonstraram taxas de isolamento semelhantes enquanto o ágar Campy-Line demonstrou capacidade de isolamento inferior. O ágar Campy-Cefex modified foi mais eficaz no isolamento de *Campylobacter* de amostras de origem fecal e, quando comparado ao ágar mCCDA, para amostras de origem cecal, os dois ágares apresentaram taxas de isolamento semelhantes.

Kiess *et al.* (2010) avaliaram 5 diferentes ágaros (Campy-Line, Campy-Cefex, Campy-Cefex modified, *Campylobacter* agar plates e mCCDA) e 2 técnicas de cultivo para determinar o melhor meio para quantificar *Campylobacter* de amostras de cama de frango, e os resultados indicaram que não houve diferença significativa entre os ágaros testados para isolar a bactéria em amostras de cama.

Com relação ao ágar Campy-Cefex, utilizado como ágar padrão na normativa da MLG 41.02 USDA para isolamento de *Campylobacter* spp., poucos estudos estão disponíveis com relação a sua eficácia no isolamento da bactéria em questão.

2.6.1 Metodologia MLG 41.02

A metodologia MLG 41.02 da USDA consiste em um método de plaqueamento direto qualitativo e quantitativo para isolamento em ágar Campy-Cefex, identificação e enumeração de *Campylobacter* spp. presente em amostras de rinsagem de carcaças de aves, esponjas e produtos de aves crus.

No presente estudo a metodologia foi testada como tal em carcaças e seguindo o mesmo conceito também foi testada em amostras de suabe de cloaca, água do pré-chiller, água do chiller, água de abastecimento, ainda foi avaliada a capacidade de recuperação da bactéria em ágar mCCDA, diferente em comparação com o ágar Campy-Cefex proposto na normativa.

2.6.1.1 Preparação da Cultura Controle

Para preparação da cultura controle utiliza-se ágar TSA (Ágar Trypticase de Soja) com 5% de sangue ovino e incubação por 21 ± 3 horas a $42 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ em microaerofilia (85% de nitrogênio, 10% de dióxido de carbono e 5% de oxigênio). Para análise quantitativa, o plaqueamento direto deve ser realizado em ágar Campy-Cefex a partir do padrão 0,5 da escala

McFarland. Para a análise qualitativa, a partir do padrão 0,5 da escala *McFarland*, deve ser acrescentado 30 mL de APT 1% em 30 mL de Bolton 2x e incubado a $42,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ por 48 ± 2 horas nas mesmas condições relatadas anteriormente.

2.6.1.2 Preparação da Amostra Quantitativa e Plaqueamento

Para cada carcaça deve ser adicionado 400 mL de APT 1% e rinsado. Do volume total da solução de rinsagem pipeta-se 250 μL e plaqueia-se em 4 placas de ágar Campy-Cefex; ainda, 100 μL devem ser plaqueados em 2 placas de ágar Campy-Cefex. As amostras devem ser incubadas por 48 ± 2 horas a $42 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ nas condições anteriores de microaerofilia.

2.6.1.3 Preparação da Amostra Qualitativa e Plaqueamento

Para amostra qualitativa, da solução de rinsagem de carcaças, 30 mL deve ser adicionado em 30 mL de Bolton 2x. Incuba-se cada amostra por 48 ± 2 horas a $42 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ aplicando as condições adequadas de microaerofilia. Após a incubação as amostras devem ser plaqueadas em ágar Campy-Cefex e incubadas em microaerofilia.

2.6.1.4 Análise e Seleção das Colônias

Após a incubação, todas as placas são examinadas para determinar a proporção relativa de colônias típicas. Para os resultados quantitativos selecionam-se cinco colônias representativas de todos os tipos de colônias típicas de uma ou mais placas para a confirmação. Caso 80% das colônias típicas apresentem a mesma característica e 20% outro tipo, escolhe-se quatro colônias do tipo de colônia que predomina e uma colônia da outra.

Para os resultados qualitativos são escolhidos cinco colônias a partir de uma ou mais placas para confirmação.

2.6.1.5 Regras Gerais para Interpretação de Leitura das Placas

O cálculo de UFC visando o resultado quantitativo, contam-se todas as colônias típicas de *Campylobacter*. A faixa contável para cada uma das placas de Campy-Cefex é 15-300

colônias. Para os resultados qualitativos é registrado como positivo ou negativo com base na presença ou ausência de *Campylobacter* spp.

Quando as placas contáveis são as quatro placas de 250 µL, obtém-se a soma destas quatro placas, a soma é o UFC/mL da amostra de rinsagem das carcaças. Se as placas contáveis são as duas placas de 100 µL, realiza-se uma média destas duas placas e multiplica por 10 para ter em conta a diluição.

Caso só existam colônias contáveis na diluição de 100 µL, obtém-se a média destas duas placas, multiplicando por 10 para dar conta da diluição e depois se divide por 2. Quando só houver colônias contáveis na diluição 250 µL, calcula-se a contagem estimada para amostras, tomando-se a soma das quatro placas de 250 µL.

Quando ambas as diluições estão dentro do intervalo contável, tomar a soma das quatro placas de 250 µL e a média das duas placas de 100 µL, multiplicado por 10 para ter em conta a diluição e calcular a média dos dois resultados. Este resultado é o UFC/mL para a amostra.

Quando o resultado for >300 UFC em cada uma das seis placas, registrar "TNTC" (*To Numerous To Count*) ou como uma contagem estimada de > 2.100 UFC/mL para a amostra de rinsagem.

Quando as placas apresentam colônias dispersas e acumuladas (*spread*) calculam-se os resultados como segue:

1- se as colônias *spread* estão localizadas em uma ou mais das quatro placas de 250 µL, determinar o total de UFC/mL para a amostra de rinsagem usando o resultado das duas placas de 100 µL. Toma-se uma média destas duas placas, multiplicando por 10 para dar conta da diluição.

2- se as colônias *spread* estão localizadas em uma ou ambas as placas de 100 µL, determinar do total de UFC/ml para a amostra de rinsagem usando o resultado da soma das quatro placas de 250 µL.

3- se as colônias *spread* estão localizadas em ambos os 250 µL e 100 µL, contam-se apenas as colônias isoladas. Registra-se a contagem estimada como a contagem calculada de colônias isoladas. Para calcular o total estimado para a amostra de rinsagem, toma-se a soma das quatro placas de 250 µL e a média das duas placas de 100 µL, multiplicado por 10 para ter em conta a diluição e calcular a média dos dois resultados.

2.6.1.6 Análises de Confirmação

Deve ser realizado exame microscópico após a 48 ± 2 horas de incubação. Com utilização de alça estéril, suspende-se uma colônia suspeita em uma gota de solução salina estéril a 0,85% em uma lâmina para microscópio. Cobre-se com uma lamínula de vidro e examina imediatamente sob imersão em aumento de 1000 vezes usando microscopia de contraste de fase.

Outro teste de confirmação recomendado é o imunoenensaio de aglutinação em látex.

2.6.2 Ágar CCD Modificado

O ágar CCD modificado ou mCCDA foi formulado de acordo com a norma ISO 10272 -1:2006 (Tabela 1) e é o ágar de maior frequência a ser utilizado para o isolamento de *Campylobacter* spp. Sua composição inicial apresenta carvão bacteriológico, caseína hidrolisada, deoxicolato de sódio, sulfato ferroso, piruvato de sódio e cefazolina. Hutchinson e Bolton (1984) substituíram o antimicrobiano cefazolina por cefoperazona, limitando assim o crescimento de contaminantes no meio.

O uso de suplementos no ágar como sulfato ferroso, metabissulfito de sódio e piruvato de sódio, tem a característica de aumentar a aerotolerância do microrganismo por meio da redução dos componentes tóxicos derivados do oxigênio, como peróxido de hidrogênio, oxigênio simples e íons superóxido (MEDEIROS *et al.*, 2012).

As colônias de *C. jejuni* em ágar mCCDA possuem aspecto liso, úmido, e coloração acinzentada, e as colônias de *C. coli* possuem aspecto cremoso, úmido, coloração acinzentada e frequentemente produzem um tipo menor de colônia.

Ocasionalmente organismos contaminantes podem crescer neste meio, estes incluem *Pseudomonas* spp. resistente a cefoperazona, *Enterobacteriaceae*, e alguns *Streptococcus* e leveduras.

Tabela 1: Composição base do ágar CCD modificado.

Ágar CCD	Quantidade
Extrato de Carne	10g
Digestão enzimática de tecido animal	5g
Cloreto de Sódio (NaCl)	5g
Carvão Bacteriológico	4g
Caseína hidrolisada	3g
Deoxicolato de Sódio	1g
Sulfato Ferroso	0,25g
Piruvato de Sódio	0,25g
Ágar bacteriológico	Até 18g
Água destilada (q.s.p)	1000mL
pH	7,4 ± 0.2
Cefoperazona	0,032g
Anfotericina B	0,01g

Fonte: *International Organization for Standardization*, 2006.

2.6.3 Ágar Campy-Cefex

O ágar Campy-Cefex é um meio sólido seletivo para isolamento de *Campylobacter* spp. acrescido de sangue desfibrinado de equino, lisado e estéril (Tabela 2). Muitos meios contêm sangue (5%-7%) com objetivo de capturar e neutralizar os componentes tóxicos do oxigênio que são formados na exposição à luz. O sangue equino tem se mostrado mais eficaz nesse processo para isolamento de *Campylobacter* spp. (THEOPILO *et al.*, 2008).

As colônias de *Campylobacter* no meio Campy-Cefex podem apresentar aspecto mucoide com colônias discretas, acinzentadas, planas, com bordas irregulares e não hemolíticas. Podem ocorrer também colônias de coloração rosa ou amarelo, acinzentado e, dependendo das espécies, as colônias podem ser redondas, convexas e brilhantes (NEOGEN, 2009).

Tabela 2: Composição base do ágar Campy-Cefex.

Ágar Campy-Cefex	Quantidade
Digestão enzimática de caseína	10g
Digestão enzimática de tecido animal	10g
Cloreto de Sódio (NaCl)	5g
Extrato de Levedura	2g
Dextrose	1g
Sulfato Ferroso	0,5g
Piruvato de Sódio	0,5g
Bissulfito de Sódio	0,3g
Cicloheximida	0,2g
Ágar bacteriológico	15g
pH	7,0 ± 0.2
Cefoperazona	0,0333g
Sangue equino lisado estéril	5%

Fonte: Neogen, 2009.

2.6.4 Caldo de Enriquecimento Seletivo

Os caldos de enriquecimento seletivo para *Campylobacter* geralmente descritos são o caldo Preston, caldo Exeter, caldo Bolton, caldo CEB e caldo Park & Sanders. A maioria desses meios possui uma composição rica em nutrientes, antibióticos e substâncias que amenizam os efeitos tóxicos do oxigênio. O caldo Bolton é reconhecido como um caldo de enriquecimento de escolha para a recuperação de *Campylobacter* (LINE 2006), sendo um dos meios de enriquecimento mais utilizados, contendo em sua composição sulfato ferroso, metabissulfito de sódio e piruvato de sódio, podendo ser utilizado sem adição de sangue (PAULSEN *et al.*, 2005). O *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* recomenda a utilização do plaqueamento direto e do enriquecimento seletivo com o caldo Bolton em concentração dupla (Bolton 2x), o *Bacteriological Analytical Manual* e a Norma ISO 10.272-1:2006 recomendam a utilização do caldo Bolton em concentração simples. Paulsen *et al.* (2005) compararam o enriquecimento seletivo da amostra com a utilização do caldo Bolton e o caldo Preston e concluíram que o caldo Bolton apresenta maior sensibilidade e maior capacidade de isolamento de *Campylobacter*. Quanto a adição de sangue ao caldo de enriquecimento, Chon *et al.* (2012), compararam o caldo Bolton com adição de sangue e sem adição de sangue para isolamento da bactéria de carcaças de frango, não sendo observada diferença estatística entre a taxa de isolamento e a seletividade nos dois tipos de caldo Bolton utilizados. Em outro estudo, Line (2006) não relatou nenhuma diferença estatística entre as amostras de carcaças coletadas a partir do processamento e cultivadas com caldo Bolton com suplementação de sangue e sem suplementação.

2.6.5 Plaqueamento Direto

O método de plaqueamento direto consiste em adicionar uma alíquota da amostra e/ou suas diluições diretamente a superfície do meio sólido e com auxílio de alça de Drigalsky realizar a semeadura por toda a superfície da placa de Petri até sua completa absorção. O plaqueamento direto é considerado vantajoso sob alguns aspectos quando comparado ao plaqueamento em profundidade, como, por exemplo: não expõe o microrganismo ao calor do meio fundido, permite a visualização das características morfológicas das colônias, permite a transferência de colônias, não exige que o meio sólido seja translúcido, entre outros. Quando comparado ao método de enriquecimento seletivo, o plaqueamento direto é mais fácil, rápido, de menor custo para os laboratórios, segundo MEDEIROS *et al.* (2012) que avaliaram o

plaqueamento direto e o enriquecimento seletivo para isolamento de *Campylobacter* em amostras de frango resfriadas na cidade do Rio de Janeiro. POTTURI-VENKATA *et al.* (2007) também concluíram que o plaqueamento direto de amostras pode ser utilizado com sucesso no isolamento de *Campylobacter* de amostras de frangos de corte.

2.7 Métodos de Identificação de *Campylobacter* spp.

A identificação desta bactéria fastidiosa tem sido objeto de muitos estudos, sendo que desde a década de oitenta foram desenvolvidos numerosos métodos que permitiram identificar as diferentes cepas de *Campylobacter*. Para sua identificação são utilizadas diversas metodologias, as mais constantes são os testes bioquímicos e enzimáticos e os métodos de diagnóstico molecular (BIASE, 2010).

2.7.1 Métodos Bioquímicos e Enzimáticos

2.7.1.1 Prova da Catalase

A catalase é uma enzima que decompõe o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a prova da catalase consiste em adicionar uma gota de H_2O_2 a uma cultura densa e verificar a produção de bolhas (O_2). Se ocorrer a formação de bolhas de gás o teste é positivo, pois a enzima catalase cliva o peróxido de hidrogênio liberando assim o oxigênio (MADIGAN *et al.*, 2010).

O teste não deve ser realizado em meio de cultura contendo sangue, pois a presença de oxigênio poderá gerar um resultado falso-positivo.

2.7.1.2 Prova da Oxidase

O teste de oxidase é baseado na produção intracelular da enzima oxidase pela bactéria. As colônias são transferidas em papel impregnado com o reagente (comercial, pronto para uso). Colônias oxidase positivas produzem coloração púrpura-negra (MADIGAN *et al.*, 2010).

2.7.1.3 Prova de Aglutinação em Látex

A aglutinação de esferas de látex revestidas por antígenos correspondem a um método

de identificação rápido. Pequenas esferas de látex são revestidas por um antígeno específico e nela é adicionada uma pequena quantidade da colônia bacteriana a ser testada. Se os anticorpos da bactéria ligam-se ao antígeno acoplado a esfera, haverá formação de um agregado visível (grumos), indicando uma reação positiva de aglutinação (MADIGAN *et al.*, 2010).

2.7.1.4 Método Molecular

Atualmente, técnicas moleculares de diagnóstico, baseadas em análise de DNA vêm sendo bastante utilizadas no estudo epidemiológico de *Campylobacter*, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), principalmente pelo fato das técnicas de isolamento da bactéria *Campylobacter* serem laboriosas. A PCR vem ao encontro da solução destes problemas, com a facilitação da identificação do agente e possibilitando ainda a análise de diferentes amostras avícolas, com rapidez na detecção (CORTEZ *et al.*, 2006).

A PCR convencional se baseia em um método de amplificação exponencial de DNA, criando múltiplas cópias *in vitro*. Seu objetivo principal é, em vários ciclos de replicação, produzir inúmeras cópias de um fragmento de DNA alvo. Com este intuito, pode-se detectar a presença de certos genes e microrganismos em uma amostra, detectar polimorfismos na região do DNA amplificado (*amplicon*), produzir quantidades necessárias para outras técnicas moleculares, entre outros (CATTANI, 2012).

Na primeira etapa da PCR é realizada a extração do DNA da amostra, o material genético extraído é adicionado a uma mistura de reagentes (*mix*) que contém: desoxirribonucleotídeos trifosfatos (dNTPs), bases nitrogenadas ligadas a um fosfato, *primers* (oligonucleotídeos ou iniciadores), solução tampão, cloreto de magnésio (MgCl₂) e a enzima DNA-Polimerase. O *mix* é colocado em um termociclador onde as amostras são submetidas primeiramente a ciclos de desnaturação, onde ocorre a separação da dupla cadeia de DNA em alta temperatura. Em sequência, a temperatura é reduzida para que ocorra o anelamento que consiste no pareamento dos *primers* com a fita molde de DNA. Na última etapa a temperatura é novamente elevada para que ocorra a extensão, síntese de uma nova fita de DNA realizada pela enzima DNA-Polimerase. Após a reação, os produtos de amplificação são separados e visualizados por eletroforese. Ou seja, os fragmentos de DNA gerados (*amplicons*) são aplicados em géis de agarose ou poliacrilamida, corados e visualizados sob radiação ultravioleta no formato de “bandas”(CATTANI, 2012).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Teste de Sensibilidade de Recuperação de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* em Ágar mCCDA, Ágar Campy-Cefex e Ágar TSA.

As cepas ATCC (*American Type Culture Collection*) *C. jejuni* 33291 e *C. coli* 43478 armazenadas sob refrigeração a -18°C em *ependorfs* contendo 0,7mL de caldo Brucella (BD[®]) e 0,3mL de glicerol foram recuperadas do estoque, e plaqueadas em meio de cultura ágar TSA (Oxoid[®]) com 5% de sangue desfibrinado ovino (Ebfarma[®]) seguido de incubação em microaerofilia (Probac[®]) à temperatura de 42°C por 48 horas.

A partir das colônias foi padronizado o inóculo a 0,5 na escala *McFarland* (aprox. 10^8UFC/mL), seguido de diluições decimais de 1 mL em solução salina (0,85%) até 10^{-8} . A partir de cada diluição foi pipetado 1 mL e plaqueado com alça Drigalsky estéril nos ágares mCCDA (Oxoid[®]), ágar Campy-Cefex (Acumedia[®]) e ágar TSA (Oxoid[®]) com 5% de sangue desfibrinado ovino (Ebfarma[®]), incubando-as nas mesmas condições anteriormente descritas.

3.2 Amostragem Utilizada e Local de Realização das Análises

O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia da Universidade Tuiuti do Paraná (UTP), localizado em Curitiba-Paraná, Brasil.

O total de amostras utilizadas no presente estudo foram coletadas de um matadouro-frigorífico com capacidade de abate diário de 185 mil aves, sob Serviço de Inspeção Federal (SIF), localizado no Sul do Brasil.

3.2.1 Obtenção das Amostras

Foram realizadas 4 tomadas de amostras no frigorífico durante um mês. As coletas eram procedidas às segundas-feiras no turno da manhã, sendo composta por 3 amostras de suabe de cloaca, 3 amostras de carcaças pré-*chiller*, 3 amostras de carcaças pós-*chiller*, 3 amostras de água do pré-*chiller*, 3 amostras de água do *chiller* e 3 amostras de água de abastecimento por semana.

As amostras de suabe de cloaca foram coletadas individualmente na recepção das aves no frigorífico. Para o procedimento foram utilizados suabes estéreis inoculados individualmente e armazenados em tubos de ensaio contendo 10 mL de APT 1% (Oxoid[®]).

As carcaças foram removidas a partir da nórea utilizando um par de luvas de látex para cada carcaça. As carcaças coletadas após evisceração foram denominadas carcaças pré-chiller e carcaças após a passagem pelas etapas de resfriamento, denominadas carcaças pós-chiller. As amostras foram coletadas e armazenadas em sacos plásticos estéreis (polietileno, capacidade 7 litros).

A coleta da água do pré-chiller, chiller e água de abastecimento foram realizadas em frascos coletor universal estéril de 50 mL.

Todas as amostras imediatamente após a coleta foram armazenadas em caixas isotérmicas com gelo reciclável e imediatamente levadas ao laboratório para processamento das análises microbiológicas.

3.3 METODOLOGIAS UTILIZADAS

3.3.1 Preparação dos Meios de Cultura

Para preparação do meio de cultura ágar mCCDA (Oxoid®) foram seguidas as recomendações do fabricante e após atingir a temperatura de 50°C foi acrescentado o suplemento seletivo CCDA (SR0155, Oxoid®).

Para preparação do meio de cultura ágar Campy-Cefex (Acumedia®) foram seguidas as recomendações do fabricante e após atingir a temperatura de 50°C foi acrescentado o suplemento antimicrobiano Cefoperazone, suplemento antifúngico Anfotericina B e 5% de sangue desfibrinado equino (Ebfarma®).

3.3.2 Caldo de Enriquecimento Seletivo

O caldo de enriquecimento seletivo utilizado foi o caldo Bolton (*Bolton Broth*, Oxoid®) com suplemento seletivo (SRE183, Oxoid®) e seguido às instruções da MLG 41.02 USDA, onde se trabalhou com caldo Bolton dupla concentração (Bolton 2x) Após atingir a temperatura de 50°C foi acrescentado o suplemento seletivo e homogeneizado.

3.3.3 Rinsagem das Carcaças

Para o procedimento de rinsagem, as carcaças foram retiradas da embalagem primária da coleta no frigorífico e transferidas para sacos plásticos (polietileno, capacidade 7 litros),

onde foram acrescentados 400 mL de APT 1% e durante 3 minutos realizou-se a rinsagem e massagem das mesmas (Figura 4).

Do volume total de 400 mL da solução de rinsagem foi pipetado 250µL com pipetador automático e ponteiros estéreis, e plaqueados em 4 placas de ágar mCCDA e 4 placas de ágar Campy-Cefex e 100µL plaqueados em 2 placas de ágar mCCDA e 2 placas de ágar Campy-Cefex. O plaqueamento foi realizado com alça de Drigalsky estéril (Figura 5). Subsequentemente as placas foram incubadas com geradores de microaerofilia (Probac®) por 48 ± 2 horas a 42°C. O fluxograma da análise quantitativa está representado na Figura 6.

Paralelamente foi realizado o enriquecimento seletivo, com 30 mL da amostra de enxágue adicionada a 30 mL de caldo Bolton 2x, em frascos de vidro *Erlenmeyer* estéreis de 60 mL, homogeneizada e incubada nas condições apropriadas de microaerofilia por 48 ± 2 horas a 42°C. Após a incubação realizou-se o plaqueamento das amostras em ágar Campy-Cefex e ágar mCCDA (Figura 7).



Figura 4: Rinsagem de carcaças de frango em sacos estéreis de polietileno contendo 400 mL de água peptonada tamponada.

Fonte: O Autor

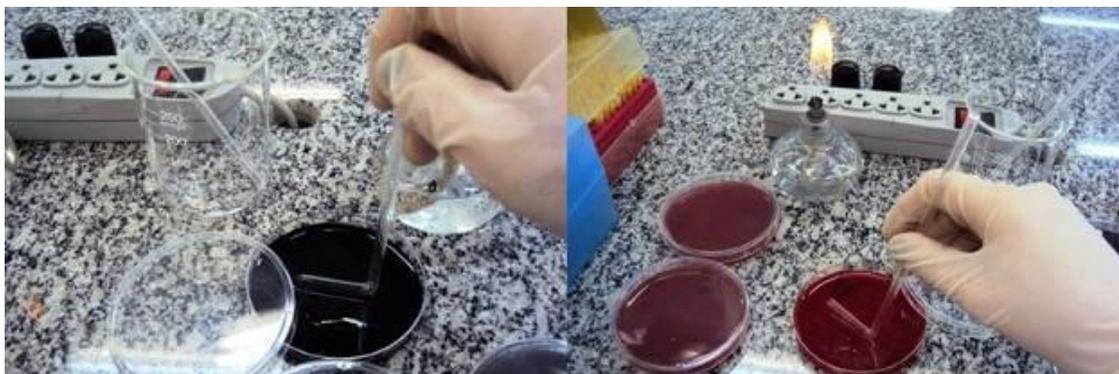


Figura 5: Plaqueamento direto com alça de Drigalsky estéril, ágar mCCDA (esquerda) e ágar Campy-Cefex (direita).

Fonte: O Autor

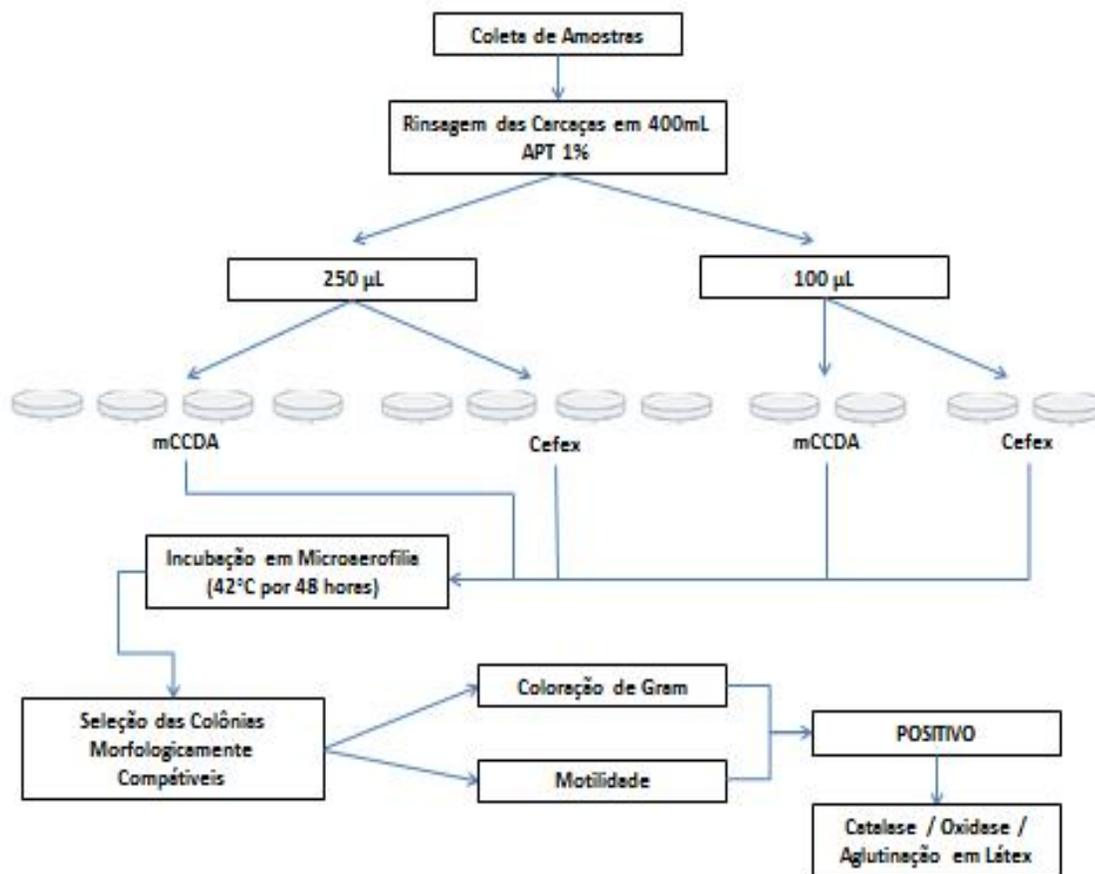


Figura 6: Fluxograma de análise quantitativa.

Fonte: O Autor

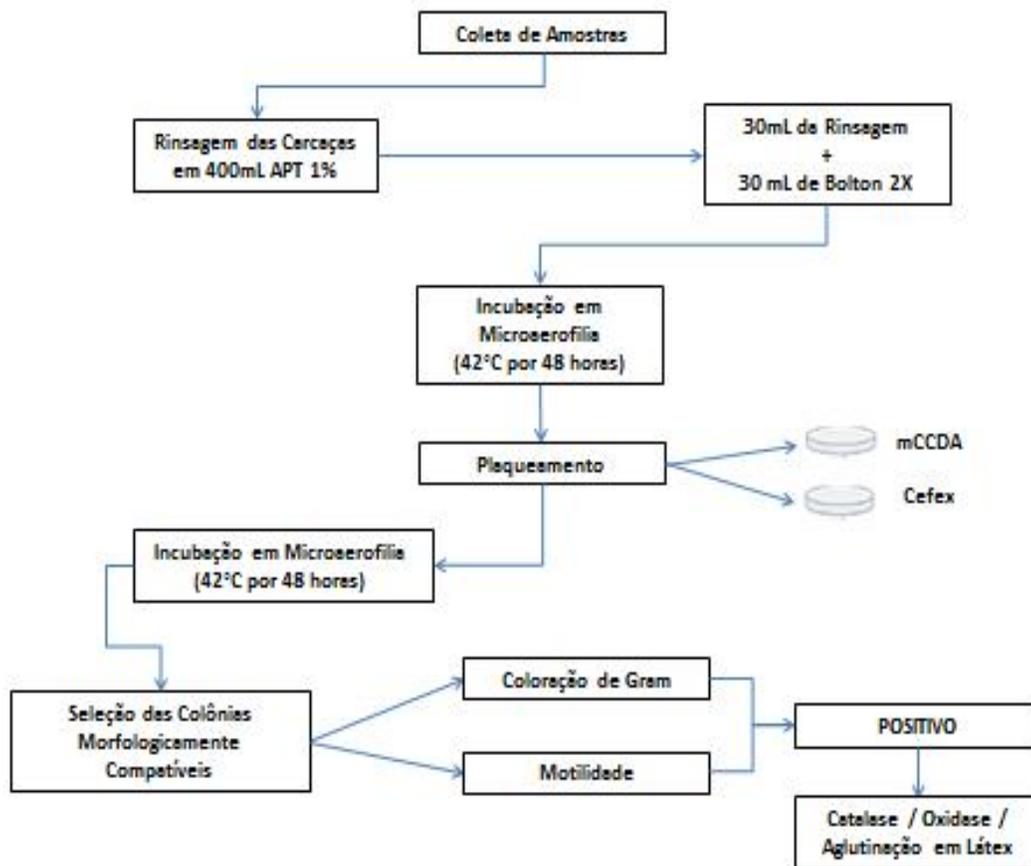


Figura 7: Fluxograma de análise qualitativa.

Fonte: O Autor

3.3.4 Suabes de Cloaca

Os tubos de ensaio contendo os suabes de cloaca foram homogeneizados com agitador tipo *vortex* e pipetado com pipetador automático e ponteiros estéreis. Os procedimentos de plaqueamento e incubação foram os mesmos descritos para as carcaças, incluindo o enriquecimento seletivo descrito.

3.3.5 Amostras de Água

Os frascos contendo amostras de água pura foram homogeneizados e pipetados com auxílio de pipetador automático e ponteiros estéreis. Os procedimentos de plaqueamento e incubação foram os mesmos descritos para as carcaças, incluindo o enriquecimento seletivo descrito anteriormente.

3.3.6 Seleção e Identificação das Colônias

As colônias típicas (Figura 8) foram selecionadas para realização de teste de motilidade e morfologia, oxidase, catalase e teste de aglutinação em látex.

As colônias que apresentaram crescimento típico, motilidade característica em movimento de “saca rolhas”, morfologia característica de formato de asa de gaivota ao microscópio e catalase e oxidase positivas foram consideradas pertencentes ao gênero *Campylobacter*.



Figura 8: Colônias características de *Campylobacter* spp. Cultivadas em ágar mCCDA (esquerda) e ágar Campy-Cefex (direita).

Fonte: O Autor

3.3.7 Metodologia da PCR

A confirmação molecular dos isolados foi realizada conforme protocolo de *multiplex-PCR* utilizado por Perdoncini *et al.* (2012) para identificar *C. jejuni* e *C. coli* a partir de três regiões alvo específico, como apresentado na tabela 3.

Tabela 3: genes alvo, *primers* utilizados, números dos pares de bases dos *amplicons* (pb).

Gene	Sequência (5' → 3')	Amplificação
16S rRNA	Fa – ATCTAATGGCTTAACCATTAAAC Rb – GGACGGTAACTAGTTTAGTATT	857 pb – região comum entre <i>C. coli</i> e <i>C. jejuni</i>
<i>mapA</i>	Fa – CTATTTTATTTTGGAGTGCTTGTG Rb – GCTTTATTTGCCATTTGTTTTATTA	589 pb – <i>C. jejuni</i>
<i>ceuE</i>	Fa – AATTGAAAATTGCTCCAACATG Rb – TGATTTTATTATTTGTAGCAGCG	462 pb – <i>C. coli</i>

F^a – Primer Forward; R^b – Primer Reverse.

Para realização das reações de amplificação foi preparado um *mix* de reagentes: água ultrapura, solução tampão, dNTPs, um par de genes específicos para cada gene alvo e *Taq DNA polimerase*. A reação final foi composta por tampão 10X, 1,5mM de MgCl₂, *mix* de 5mM de dNTP's, 4pmol/μL de prime 16S rRNA, 2 pmol/μL dos primes *mapA* e *ceuE*, 2 unidades de Taq polimerase, DNA e água ultrapura, totalizando 30μl. Ao *mix* de cada amostras a ser testada foi adicionado o DNA extraído das amostras. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (Esco-Swift MaxPro®) com as seguintes condições: desnaturação por 10 minutos 95°C, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 59°C por 1 minuto e 30 segundos e extensão final a 72°C por 10 minutos. O controle negativo utilizado foi amostra clínica da bactéria *Arcobacter* spp. Utilizou-se como controle positivo *C. jejuni* ATCC 332901 e *C. coli* ATCC 4347. A amplificação dos produtos foi realizada em gel de agarose a 1,5% com brometo de etídio e corrido em uma voltagem de 85V, observado e fotografado em luz ultravioleta do transiluminador e fotodocumentador respectivamente.

3.4 Comparativo de Valores dos Ágares Campy-Cefex e mCCDA por Litro

Após a aquisição dos ágares e suplementos, calculou-se o custo em dólares dos ágares por litro. Para tal foram utilizadas as notas fiscais e recuperado o dado da cotação do dólar do dia da compra dos materiais. Para a cotação do dólar foi utilizado o site: <http://economia.uol.com.br/cotacoes/cambio/dolar-comercial-estados-unidos/?historico>.

3.5 Análise Estatística dos Dados

Os dados foram submetidos à análise ANOVA (um fator completo com variável de grupo) com o programa BioStat (versão 2009) Analyst Soft. Inc. Utilizou-se os testes de Tukey-Kramer, Bonferroni e Fisher LSD.

4 RESULTADOS

O teste de sensibilidade de recuperação de *Campylobacter jejuni* ATCC 33291 e *Campylobacter coli* ATCC 43478 em ágar mCCDA, ágar Campy-Cefex e ágar TSA, resultou em uma maior recuperação de *C. jejuni* no ágar Campy-Cefex e maior recuperação de *C. coli* no ágar TSA, como demonstrado na tabela 4.

Tabela 4: Teste de sensibilidade na recuperação de *Campylobacter jejuni* e *C. coli* nos ágares mCCDA, Campy-Cefex e TSA.

Ágar	<i>C. jejuni</i> (UFC/mL)	<i>C. coli</i> (UFC/mL)
mCCDA	$5,25 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$
Cefex	$1,3 \times 10^9$	nt*
TSA com sangue	$3,5 \times 10^7$	$2,8 \times 10^9$

nt* não testado

O ágar Campy-Cefex obteve uma frequência maior de isolamento de *Campylobacter* spp. em diferentes amostras avícolas que o ágar mCCDA, apresentados na tabela 5.

Tabela 5: Frequência de isolamento direto de *Campylobacter* spp. nos ágares mCCDA e Campy-Cefex pareados para mesma amostra positiva, em diferentes amostras avícolas.

Amostras	Ágar mCCDA %	Ágar Campy-Cefex %
Suabes	100	100
Carcças pré-chiller	25	100
Água pré-chiller	75	100
Água chiller	66	100
Carcças pós-chiller	67	83
Água Abastecimento	50	100

A média de contagem de células de *Campylobacter* spp. isoladas de diferentes amostras avícolas no ágares Campy-Cefex e mCCDA, estão representadas na tabela 6.

Tabela 6: Médias de contagens direta de células de *Campylobacter* spp. isoladas de diferentes amostras avícolas nos ágares Campy-Cefex e mCCDA.

Amostras	Ágar Campy-Cefex Média (UFC/mL)	Ágar mCCDA Média (UFC/mL)	p*
Suabes	$1,3 \times 10^3$	$9,5 \times 10^2$	0,307
Carcças pré-chiller	$9,8 \times 10^2$	$8,3 \times 10^1$	0,005
Água pré-chiller	$1,7 \times 10^2$	$5,4 \times 10^2$	0,502
Água chiller	$8,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^1$	0,139
Carcças pós-chiller	$1,5 \times 10^2$	$3,8 \times 10^1$	0,194
Água Abastecimento	$7,3 \times 10^1$	$4,7 \times 10^0$	0,318

*p<0.005 indica diferença estatística.

A leitura das placas e as contagens de colônias foram realizadas às 48 horas e 72 horas. Em 72 horas foi possível realizar contagens em amostras que não apresentaram crescimento às 48 horas. Os percentuais de recuperação de *Campylobacter* spp. às 72 horas foram, 17% em carcaças antes do *chiller*, 58% em carcaças pós-*chiller* e 25% das amostras de água de abastecimento. Tal fato ocorreu para amostras com menos de 9×10^1 UFC/mL.

Todas as amostras coletadas foram submetidas simultaneamente ao enriquecimento seletivo e posterior plaqueamento. A partir do enriquecimento, 100% das amostras foram positivas.

A tabela 7 apresenta os resultados das amostras submetidas à técnica de PCR, sendo que *Campylobacter jejuni* foi o sorovar mais isolado e a maior porcentagem foi encontrada em suabes de cloaca, seguido por carcaças pré-*chiller*. A maior porcentagem de *Campylobacter coli* foi detectada em suabes de cloaca seguido por carcaças pós-*chiller*. Do total de amostras, 2% foram classificados como *Campylobacter* spp, não apresentando os genes específicos para *C. jejuni* ou *C. coli* utilizados.

Tabela 7: Tipificação das amostras de *Campylobacter* spp. pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase.

Amostras	Sorovar	
	<i>Campylobacter jejuni</i> (%)	<i>Campylobacter coli</i> (%)
Suabes	20%	18%
Carcaças pré- <i>chiller</i>	14%	2%
Água <i>chiller</i>	12%	0%
Água pós- <i>chiller</i>	6%	2%
Carcaças pós <i>chiller</i>	10%	6%
Água Abastecimento	4%	4%
TOTAL	98%	

2% das amostras foram positivas para *Campylobacter* spp.

Na tipificação das cepas de *Campylobacter* foram determinadas em 18% de amostras com a presença de *C. jejuni* e *C. coli* concomitantes.

A tabela 8 apresenta os resultados de isolamento dos dois sorovares (*C.jejuni* e *C.coli*) frente aos dois ágares avaliados no estudo, ágar Campy-Cefex e ágar mCCDA. Os dois ágaros demonstraram resultados semelhantes quanto ao isolamento.

Tabela 8: Percentuais de isolamento de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* nos ágares Campy-Cefex e mCCDA.

Sorovar	<i>Campylobacter jejuni</i>		<i>Campylobacter coli</i>	
	Campy-Cefex	mCCDA	Campy-Cefex	Mccda
Suabes	12%	8%	10%	8%
Carcaças pré-chiller	8%	6%	-	2%
Água chiller	6%	6%	-	-
Água pós-chiller	6%	2%	2%	-
Carcaças pós-chiller	4%	6%	-	6%
Água Abastecimento	4%	-	4%	-

Na tabela acima, pode ser notado que para *C. coli*, os isolamentos nos diferentes ágaros foram alternados para a mesma amostra, ou seja, na mesma amostra quando um ágar apresentava isolamento o outro não apresentava.

A figura 9 apresenta a eletroforese em gel de agarose com os produtos de amplificação.

Para os ensaios da PCR foram utilizados dois controles positivos (*C. coli* ATCC 43478; *C. jejuni* ATCC 29428), controle negativo (*Arcobacter* sp.) e o controle da reação.

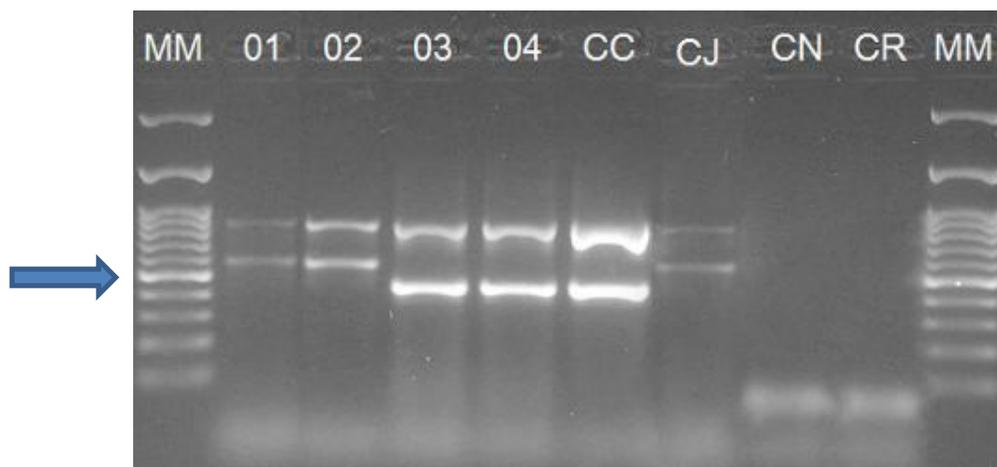


Figura 9: Gel de agarose apresentando produtos da amplificação para as cepas de *C. coli* e *C. jejuni*.

Legenda: Seta apontando 500 pb; MM – Marcador Molecular (100pb); 1,2 amostras positivas para *C. jejuni* (589pb); 3,4 amostras positivas para *C. coli* (462pb); CC – ATCC 43478 *Campylobacter coli*; CJ – ATCC 29428 *Campylobacter jejuni* subsp *jejuni*; CN – Controle Negativo – *Arcobacter* sp.; CR – Controle da Reação. Amostras positivas para ambas as espécies apresentam região em comum na região 16S com 857pb.

O comparativo entre os valores dos meios de cultura por litro para o isolamento de *Campylobacter* spp. estão representados na tabela 9.

Tabela 9: Comparativo de valores dos ágaros Campy-Cefex e mCCDA por litro cotados em dólares (US\$).

	Ágar Campy-Cefex (\$/L)	Ágar mCCDA (\$/L)
Sangue Equino	\$107,00	0
Suplemento	\$357,76	\$357,76
Ágar Base	\$46,03	\$159,19
Geradores Microaerofilia	\$79,40	\$79,40
Placas de Petri	\$13,98	\$13,97
Total/L	\$604,17	\$610,32

5 DISCUSSÃO

As bactérias do gênero *Campylobacter* spp. têm recebido atenção crescente nos últimos 30 anos por serem reconhecidas como importantes patógenos de origem alimentar e uma das principais responsáveis por enterites em humanos em países desenvolvidos e em países em desenvolvimento (GOMES *et al.*, 2006). O Brasil apesar de ser o maior exportador mundial de carne de frango, ainda apresenta informações limitadas sobre esta bactéria na cadeia de produção avícola e não possui legislação vigente que contemple o controle desta bactéria (BORSOI, 2011). Os dados limitados a respeito de *Campylobacter* têm como um dos fatores as metodologias de isolamento que são laboriosas. Diversos estudos têm avaliado a eficácia de diferentes meios de cultura e sua capacidade de isolamento de *Campylobacter* em várias fontes a fim de buscar metodologias eficientes e de baixo custo.

No presente estudo dois meios de cultura foram testados e avaliados a sensibilidade de recuperação de cepas padrão após o descongelamento (Tabela 4) e o ágar Campy-Cefex mostrou melhor recuperação de *C. jejuni*. Para *C. coli*, o ágar TSA mostrou melhor recuperação de células. Ainda, cabe salientar que para um mesmo ágar a recuperação e contagem de *C. coli* foi numericamente menor que para *C. jejuni*. O ágar TSA não é seletivo para *Campylobacter* spp. porém como citado na metodologia MLG 41.02, sua utilização é recomendada para culturas puras (USDA, 2013).

Um dos objetivos iniciais do estudo foi avaliar se a metodologia de contagem direta proposta pela normativa MLG 41.02 teria eficiência na monitoria de diferentes pontos de um processamento de abate em frigoríficos. Notou-se que as contagens de *Campylobacter* spp. desde a recepção das aves (suabe de cloaca) até a carcaça pós-chiller diminuíram, refletindo que a passagem pela linha de processamento reduziu as contagens da bactéria pesquisada. Provavelmente, a redução poderia ser maior, caso não houvesse contaminação da água de abastecimento (Tabela 6).

Com relação à água de abastecimento, pode-se salientar que o *Campylobacter* é capaz de estar presente em biofilmes, e a formação destes, tem sido proposta como um mecanismo de sobrevivência fora do hospedeiro, possibilitando proteção contra a ação de produtos químicos, antibióticos, processos físicos de limpeza, estresses ambientais, entre outros (HANNING *et al.*, 2008), possivelmente explicando sua presença neste tipo de amostra.

Os altos níveis de contaminação por *Campylobacter* spp. na água dos tanques de pré-chiller e chiller encontrados, podem ter interferência do nível de contaminação da água de abastecimento, além do inadequado nível de cloro livre e tempo de troca da água dos tanques

realizado pela empresa, fatores que se somam à contaminação. Perko-Makela *et al.* (2009) corroboram com a hipótese, pois em seus estudos com perus a contaminação por *Campylobacter*, demonstraram a água de refrigeração como uma importante fonte de contaminação das carcaças.

No que concerne a contaminação das carcaças pela bactéria, uma exigência imposta à empresa de onde foram feitas as coletas das amostras para o presente estudo, pela União Europeia, é o nível de cloro livre na água estar abaixo de 1 ppm, o que difere da exigência da legislação brasileira (BRASIL, 1998) que é de 2 ppm de cloro livre na água do tanque de resfriamento. Importante lembrar deste dado uma vez que as prevalências e contagens de *Campylobacter* em carcaças, anteriormente citadas diferem entre as pesquisas no Brasil. Também deve-se avaliar com cautela os resultados de contaminação nos Estados Unidos, uma vez que é permitido um limite de 50 ppm de cloro, segundo a *International Meat and Poultry HACCP Alliance* (1996).

A prevalência de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango é variável. Na União Europeia, segundo a EFSA (2010) a prevalência média é de 75,8%, com variação entre 4,9% e 100%. Kuana *et al.* (2008b) avaliaram a contaminação por *Campylobacter* spp. em lotes de frango durante a criação e nas carcaças correspondentes após o abate, a contaminação de frangos na granja foi de 81,8%, no entanto, das 96 carcaças coletadas, a frequência de contaminação foi de 98,3% após o *chiller*. Contagens menos elevadas foram relatadas por Oliveira *et al.* (2013) onde as amostras avaliadas apresentaram *Campylobacter* spp. em 56% das carcaças pré-*chiller* e 44% pós-*chiller*.

Line *et al.* (2008) citam que as aves podem ser colonizadas por *Campylobacter* com uma baixa concentração de células, seja 35 UFC e 104 UFC; e, uma vez que a ave passa a excreta-la, a disseminação é muito rápida, contaminando praticamente 100% do lote. Em um estudo realizado no Brasil entre lotes comerciais de frangos de corte em Santa Catarina a prevalência de *Campylobacter* spp. foi de 81,8% (KUANA, 2004). Diferentes amostras de frango coletadas em granjas de diferentes produtores em uma mesma integração no sul do Brasil indicaram 91,7% de lotes positivos antes do abate (FRANCHIN, 2005). Porém nos Estados Unidos, a prevalência é de até 100% dos lotes (GREGORY, 1997).

De acordo com Berrang *et al.* (2007) a contaminação das carcaças está relacionada com a condição sanitária do lote de origem. O *status* do lote na chegada ao abatedouro influencia o *status* de contaminação da carcaça ao final do processamento. Qualquer processo de intervenção, assim como coleta de amostragem de carcaças, devem ser realizadas com o mesmo lote de frangos, tanto antes como após a etapa de processamento a ser avaliada e ser

levado em consideração a condição sanitária inicial desse lote. Durante o processamento, o conteúdo gastrointestinal pode extravasar e contaminar a superfície das carcaças, tais pontos de contaminação devem ser removidos antes que a carcaça entre no tanque de resfriamento para evitar a contaminação de outras carcaças. Ainda, segundo Borsoi *et al.* (2013), a matéria orgânica na água interfere na disponibilidade de cloro e na sua eficiência para eliminar microrganismos, além de por exemplo, a gordura servir de proteção as bactérias frente ao cloro.

De acordo com Azeredo *et al.* (2010) o pré-resfriamento e o resfriamento são considerados etapas críticas para a contaminação cruzada, tida como uma grande desvantagem desse processo, principalmente, a contaminação por patógenos como a *Salmonella* e *Campylobacter*, embora a água hiperclorada dos tanques de resfriamento previna o acúmulo de microrganismos. Entretanto, o autor ressalta que o resfriamento das carcaças não pode ser considerado como uma etapa de redução da carga microbiológica, tendo com finalidade exclusiva de redução da temperatura das carcaças.

No presente trabalho a partir do isolamento bacteriano em suabes de cloaca, demonstrou-se elevada prevalência da bactéria (Tabela 5). Resultado este semelhante ao obtido por Chaves (2003), que encontrou 96,66% de positividade nas amostras de suabe cloacal, não sendo descrito em seu trabalho a utilização do enriquecimento seletivo das amostras. Elevados índices de isolamento foram detectados também por Evans e Sayers (2000), que isolaram o microrganismo em 91% das 20 amostras de suabe cloacal de frangos na Grã-Bretanha. Franchin *et al.* (2005) relataram positividade de 75% em amostras de suabe em lotes de frangos da região Sul do Brasil, utilizando o enriquecimento seletivo nas suas amostras. Uma taxa menos elevada foi relatada por Carvalho *et al.* (2000), em que a positividade foi de 42%. Na Holanda, Jacobs- Reitsma (1995) encontrou 67% de positividade para *Campylobacter* spp., os suabes foram semeados diretamente em meio seletivo sem sangue. Segundo Doyle (1988), 30 a 100% das aves albergam este agente no intestino, sendo possível afirmar que esta é uma das principais fontes de contaminação de *Campylobacter* em frangos. Este trabalho demonstrou que o conteúdo fecal é uma importante via de disseminação da bactéria do gênero *Campylobacter* spp. na linha de abate, enfatizando a importância do controle das aves no campo. No presente estudo, ao longo da linha de processamento, houve redução de contaminação das carcaças e deste modo, pode-se afirmar que os procedimentos utilizados no processo de abate podem interferir positivamente no *status* microbiológico da carcaça ao final da linha.

Na comparação entre os dois ágar, o ágar Campy-Cefex mostrou-se mais sensível, estatisticamente, para o isolamento de *Campylobacter* spp. que o ágar mCCDA nas amostras de carcaça pré-chiller. Oyarzabel *et al.* (2005) relatam que ao isolar *Campylobacter* de amostras de rinsagem de carcaças o ágar Campy-Cefex mostrou-se mais eficaz que o ágar Karmali e o ágar mCCDA, embora estatisticamente semelhantes. Os autores concluíram que em questão de tempo de preparo, desempenho, custos, a combinação dos dois ágar Campy-Cefex e mCCDA demonstrou melhores resultados para contagem de *Campylobacter* spp. a partir de rinsagem de carcaças. Em outro estudo, Potturi-Venkata *et al.* (2007) relataram que o ágar Campy-Cefex quando comparado ao ágar mCCDA, no isolamento de *Campylobacter* de amostras de carcaças, mostrou-se mais seletivo e o ágar mCCA foi capaz de recuperar a bactéria de amostras cecais e fecais mais satisfatoriamente do que os ágar mCCDA, CLA, CAP (*Campylobacter agar plates*) e *Campylobacter* ágar base.

O plaqueamento direto foi à metodologia recomendada pela normativa MLG 41.02, ao invés do enriquecimento seletivo. Pesquisas têm indicado que o enriquecimento da amostra não aumenta a recuperação de *Campylobacter* de fezes de frango, cecos e carcaças (Martin *et al.*, 1983; Musgrove *et al.*, 2001), resultados que diferem do presente estudo, onde 100% das amostras enriquecidas foram positivas para *Campylobacter* spp. Kiess *et al.* (2010) demonstraram em sua pesquisa quando analisaram amostras de cama de frango, que o plaqueamento direto foi mais eficiente no isolamento de *Campylobacter* quando comparado ao enriquecimento seletivo, onde 37% do total de crescimento bacteriano nas amostras foram positivas para *Campylobacter* e nas amostras enriquecidas somente 2%. Os mesmos autores concluíram que a diferença de isolamento entre as duas técnicas utilizadas, indicam que o enriquecimento de amostras de cama de frango usando CEB (*Campylobacter enrichment broth*) não recuperou células estressadas e/ou viável e não cultivável.

Ainda para Kiess *et al.* (2010) o nível de bactérias contaminantes na placa faz com que o isolamento e identificação de colônias suspeitas de *Campylobacter* se tornem mais difícil, permitindo assim omitir as colônias de *Campylobacter* que estão presentes nas placas. Em seu trabalho com cama de frango, concluíram que plaqueamento direto fornece um número significativamente maior de colônias de *Campylobacter* quando comparado ao enriquecimento das amostras.

Segundo Oyarzabel *et al.* (2005) o plaqueamento direto é uma técnica valiosa para estudar *Campylobacter* spp. em carcaças de aves e têm sido utilizada com sucesso para enumerar *Campylobacter* spp. em rinsagem de carcaça pós-chiller. Caracterizando-se como uma técnica fácil de executar, rápida e de baixo custo.

Durante o abate de um lote positivo para *Campylobacter* spp., mesmo após limpeza e desinfecção da planta de abate, a bactéria pode persistir e contaminar lotes negativos (PERKOMAKELA, 2009). O aprimoramento do processo de abate e bem como avaliações constantes no que tange a higienização da indústria, possibilita a redução do número de *Campylobacter* spp. antes da entrega do produto ao mercado, uma vez que o número de bactérias em carcaças provenientes de lotes infectados pode ser significativamente reduzido durante o processamento no abatedouro (BERRANG, *et al.*, 2007), assim como demonstrado no presente trabalho.

Com relação aos custos, no presente estudo foi calculado o preço por litro dos ágares utilizados. Pode-se notar na tabela 9 que os custos são semelhantes e que o suplemento de antimicrobianos é o item de maior influência no custo dos dois ágares, assim como a adição de sangue equino, elevando o custo do meio de cultura. Oyarzabel *et al.* (2005) relataram que o sangue lisado e desfibrinado equino, ao ser substituído pelo sangue lisado, não afeta a recuperação da bactéria e diminui consideravelmente o preço deste meio.

O uso de técnicas moleculares tem mostrado ser uma alternativa válida, precisa e de rápido diagnóstico. No presente estudo, após o isolamento microbiológico de *Campylobacter* spp., foi realizada a técnica de PCR *multiplex*, sendo encontrado 72% de amostras tipificadas como *C. jejuni*, com maior ocorrência em amostras de suabes de cloaca, *C. coli* foi detectada em 38% das amostras, com maior ocorrência também em suabes de cloaca (Tabela 7). Resultados semelhantes são demonstrados no EFSA *Journal* (2010), onde em 2008 na União Europeia, a frequência de distribuição de espécies de *Campylobacter* em amostras cecais foi de 60,8% para *C. jejuni* e 41,5% para *C. coli*. A prevalência de *Campylobacter* na UE em lotes de frangos no mesmo ano foi de 40,6% para *C. jejuni* e 31,9% para *C. coli*. Em um recente estudo realizado no Rio Grande do Sul, foram tomadas amostras de 8 pontos diferentes da linha de abate de aves e do total de amostras submetidas ao ensaio PCR, 75% foram positivas para *Campylobacter jejuni* e 10% para *Campylobacter coli* sendo 15% positiva para ambas as espécies (PERDONCINI *et al.*, 2012). No Brasil no ano de 2012, também na região sul foram avaliadas 200 amostras de conteúdo cecal de frangos e a positividade confirmada foi de 44% para *Campylobacter coli* e 2% para *Campylobacter jejuni* (BIOTECSUR, 2013), o que corrobora com os resultados encontrados no presente trabalho, em que a positividade de *C. coli* apesar de não ser maior que *C. jejuni* demonstrou índices significativos. Tais dados demonstram relevante variabilidade de contaminação com *C. jejuni* e *C. coli* e sugerem a necessidade de pesquisas que avaliem diferentes pontos na cadeia de

produção em nosso país, para obter o conhecimento da real situação de contaminação com os diferentes sorovares.

No isolamento dos sorovares pelos diferentes ágar testados, não houve diferença significativa no que se refere à capacidade de recuperação, sendo possível sugerir que a associação dos dois ágar testados aumentariam as chances para o isolamento de *C.coli* (Tabela 8). Oyarzabel *et al.* (2005) também sugerem que a combinação de dois ou mais ágar aumentaria a probabilidade de detecção de amostras de *Campylobacter* quando comparado apenas a um ágar.

Nos dias atuais, a produção de frango livre de *Campylobacter* não é possível, requerendo para o controle um trabalho combinado e multidisciplinar. Processo esse que necessita da motivação do governo, das indústrias, dos pesquisadores da área avícola e do conhecimento da população a respeito do assunto, porém o controle efetivo só será alcançado se todas as ações necessárias forem praticadas em conjunto durante todo o processo de produção.

Os resultados aqui expostos enfatizam a necessidade de implantação da análise de perigos e pontos críticos de controle na linha de abate e os procedimentos padrões de higiene operacional para auxiliar na redução da contaminação do produto final. A contagem de *Campylobacter* em amostras dos diferentes elos da cadeia de produção de aves pode ser ferramenta útil para direcionar as ações em pontos críticos que resultem em redução deste patógeno nos produtos avícolas com consequente redução do risco ao consumidor.

CONCLUSÃO

- O ágar Campy-Cefex recuperou estatisticamente maior número de células que o ágar mCCDA na contagem direta de *Campylobacter* nas amostras de carcaça pré-chiller.
- A partir do enriquecimento seletivo das amostras, 100% das amostras foram positivas para *Campylobacter* spp.
- Pode ser sugerida a associação de mais de um ágar seletivo para o isolamento de *Campylobacter coli*, pois aumentam as chances de recuperação da bactéria.
- A partir da análise de água do Chiller, água do pós-chiller e água de abastecimento foi possível recuperar amostras de *Campylobacter jejuni* e *C. coli* com a metodologia de plaqueamento direto nos ágar mCCDA e Campy-Cefex.
- Através dos resultados da PCR foi verificada a identificação de *C. jejuni* e *C. coli* em mesma amostra.
- A metodologia de plaqueamento direto testada pode ser utilizada em diferentes amostras avícolas como suabes de cloaca, água de chiller, água de abastecimento, além das carcaças.
- A metodologia de plaqueamento direto utilizadas no presente estudo pode ser empregada na implementação de programas de monitoramento e redução de *Campylobacter* spp. na indústria de alimentos.

REFERÊNCIAS

- ALTEKRUSE, S.F., *et al.* In: *Campylobacter jejuni: An Emerging Foodborne Pathogen. Emerging Infectious Diseases*, v.5, n. 1, p.28 - 35, 1999.
- AARESTRUP, F.M. In: Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 96, p. 271-281, 2005.
- AQUINO, M.H.C. *et al.* In: Frequency of isolation and identification of thermophilic *Campylobacters* from animals in Brazil. **The Veterinary Journal**, v.164, p.159- 161, 2002.
- ARRITT, F.M. 2000. In: Efficacy of selected chemicals on the attachment and survival of *Campylobacter jejuni* on chicken breast skin. Disponível em: <http://scholar.lib.vt.edu/theses/available/etd-01312001-193806/unrestricted/arritt.etd.pdf> Acesso em: 21 de Março de 2013.
- AVISITE – O Portal da Avicultura na Internet. Disponível em: <http://www.avisite.com.br/clipping/index.php?codclipping=20205>. Acesso em: 12 de Março de 2013.
- AZEREDO, L. I.; LUCHESE, R. H.; LAURIA-FILGUEIRAS, A. L. *Campylobacter* spp. em carne de ave crua: avaliação da etapa de resfriamento. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, p. 518-524, 2010.
- BALIAN, S.C.; Campilobacteriose. In: REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A.J.P. (Ed.). **Patologia Aviária**. 1 ed., Editora Manole, p.34-47, 2009.
- BARZA, M.; TRAVERS, K. In: Excess infections due to antimicrobial resistance: the “Attributable Fraction”. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, p. 126–130, 2002.
- BERRANG, M.E; BAILEY, J. S; ALTEKRUSE, S. F; PATEL, B; SHAW, W. K; JR; MEINERSMANN, R. J; FEDORKA-CRAY, P. J. In: Prevalence and Numbers of *Campylobacter* on Broiler Carcasses Collected at Rehag and Postchill in 20 U.S. Processing Plants. **Journal of Food Protection**, vol. 70, n. 7, p. 1556-1560, 2007
- BIASE, S. R. **Dissertação de Mestrado**: Frequência e Caracterização de *Campylobacter* sp. Termofílico na Linha de Abate de Suínos em Abatedouros no Sul do Brasil. São José dos Pinhais, PR, Brasil: Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Centro de Ciências Agrárias e Ambientais, 2010.
- BIOTECSUR. Informe Descriptivo Final. 2013. Disponível em: http://www.biotecsur.org/proyectos-regionales/informe_final_pi_atecnica_internacional.pdf . Acesso em: 30 de março de 2013.
- BOLTON, F. J.; ROBERTSON, L. In: A selective medium for isolating *Campylobacter jejuni/coli*. **Journal of Clinical Pathology**, v. 35, p. 462–467, 1982.
- BORSOI, A.; NASCIMENTO, V.P. 2011. In: *Campylobacter* em produtos avícolas e sua importância na saúde pública. Disponível em: <http://pt.engormix.com/MA-avicultura/>

administracao/artigos/campylobacter-produtos-avicolas-sua-t777/124-p0.htm. Acesso em: 03 de Abril de 2013.

BORSOI, A.; FRANÇA, J.M.; MERLIN, L.S. In: Sistema de resfriamento de carcaças com o uso de trocador de calor: tecnologia e sustentabilidade. **Revista Avicultura Industrial**, ed. 1220, n. 03, p 34-37, 2013.

BOUFLEUR, R. **Dissertação de Mestrado: *Campylobacter jejuni* em Frangos de Corte, Carne e Vísceras de Frango no Rio Grande do Sul e Efeito do Congelamento sobre a Contaminação nos Cortes.** Santa Maria, RS, Brasil: Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, 2009.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 210, de 10 de Novembro de 1998. Regulamento técnico de inspeção tecnológica e higiênico sanitária de carne de aves. **Diário Oficial da União** de 26/11/1998. seção 1. p. 226. Brasil, 1998.

CARVALHO, A.C.F.B.; LIMA, V.H.C.; PEREIRA, G.T. In: Determinação dos principais pontos de contaminação de frangos por *Campylobacter* durante o abate industrial. **Higiene Alimentar**, v. 16, p. 89-93, 2000.

CATTANI, F. BARTH, C. V. In: PCR em Tempo Real: Uma Nova Ferramenta para Análises Moleculares. Porto Alegre, 2012. (Apostila do Curso PCR Real Time – Pontifícia Universidade Católica de Porto Alegre), 2012.

CDC. Preliminary FoodNet Data on the Incidence of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food - 10 States, 2009. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.19, n.14, 2010, p. 418-422. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/pdf/wk/mm5914.pdf>. Acesso em: 15 de Março de 2013

CHAVES, S. O. C. **Dissertação de Mestrado.** Pesquisa de *Campylobacter* spp. em granjas e abatedouro avícolas na mesorregião metropolitana de Belém – PA. Belém, Universidade Federal do Pará, 2003.

CHON, J.W. *et al.* In: Comparison of 2 types of broths and 3 selective agars for the detection of *Campylobacter* species in whole-chicken carcass-rinse samples. **Poultry Science**, v. 59, p. 2382–2385, 2012.

CORRY, J.E.L.; ATABAY, H.I. In: Poultry as a source of *Campylobacter* and related organisms. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 90, n.1, p.96-114. 2001.

CORTEZ, A.L.L. *et al.* In: Survey of chicken abattoir for the presence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 6, p. 307-310, 2006.

COSTA, A.C. In: O papel do Brasil no futuro da Avicultura. **Revista Avicultura Industrial**, ed.1213, n.07, p.32-44, 2012.

COX, N.A.; RICHARDSON, J.L.; BUHR, R.J.; FEDORKA CRAY, P.J. *Campylobacter* species occurrence within internal organs and tissues of commercial caged Leghorn laying hens. **Poultry Science**, v. 88, p. 2449–2456, 2009.

DASTI, J. I.; TAREEN A. M.; LUGERT, R.; ZAUTNER, A. E.; GROSS, U. *Campylobacter jejuni*: Abrief over view on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, p. 205–211, 2010

DOYLE, M. P. *Campylobacter jejuni*. In: Oblinger, J. L. ed. Bacteria associated with foodborne disease – A scientific stratus summary. Chicago: IFT, p. 1-18, 1988.

EFSA - European Food Safety Authority. Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007. **EFSA Journal**, p. 310, 2009.

EFSA - European Food Safety Authority. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* on broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses in the EU, 2008. Part A: *Campylobacter* and *Salmonella* prevalence estimates. **EFSA Journal**, v. 8, n. 3, p. 1503, 2010.

EFSA - European Food Safety Authority. 2011a. Scientific opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. **EFSA Journal**, v. 9, n. 4, p. 2105. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2105.htm>. Acesso em: 12 de Março de 2013.

EFSA- European Food Safety Authority. 2011b. Reducing *Campylobacter* in EU chickens. Disponível em: <http://www.foodprocessing.com.au/articles/46692-Reducing-Campylobacter-in-EU-chickens> Acesso em: 10 de Março de 2013.

EVANS, S. J., SAYERS, A. R. In: A longitudinal study of *Campylobacter* infection of broiler flocks in Great Britain. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 46, p. 209-223, 2000.

FEISTEL, J.C. Mecanismos de patogenicidade de *campylobacter* spp. isoladas em alimentos. Goiânia, 2011. Disponível em: http://portais.ufg.br/uploads/67/original_semi2011_Janaina_Costa_1.pdf. Acesso em: 22 de Março de 2013.

FERNANDEZ, H.; FARACE, M. I. **Manual de Procedimientos**. Diagnóstico de *Campylobacter* en muestras clínicas y de alimentos. Universidad Austral de Chile e Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas Argentina, p. 22, 2003.

FONSECA, B.B. **Dissertação de Mestrado**: Transmissão vertical de *Campylobacter* sp em um sistema de produção avícola. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 80 f. 2006.

FRANCHIN, P.R. *et al.* In: Sources of poultry meat contamination with thermophilic *Campylobacter* before slaughter. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p.157- 162, 2005.

FRANÇA, J.M. In: Impacto da Saúde Intestinal das Aves no Processamento. Disponível em: <http://www.avisite.com.br/materias/processamento.html>. Acesso em: 10 de Janeiro de 2014.

GERMANO, P.M.L. Higiene e vigilância sanitária de alimentos. São Paulo: Livraria Varela, 2001.

- GOMES, F.R.; *et al.* *Campylobacter jejuni* occurrence in chicken fecal samples from small properties in Pelotas, southern of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 375-378, 2006.
- GREGORY, E. *et al.* Epidemiological study of *Campylobacter* spp. in broilers: source, time of colonization and prevalence. **Avian Diseases**, v. 41, p. 890-8, 1997.
- GUERIN, M.T. *et al.* House-level risk factors associated with the colonization of broiler flocks with *Campylobacter* spp. in Iceland, 2001-2004. **BMC Veterinary Research**, v. 3, n. 30, 2007.
- GUERRY, P.; ALM, R. A.; SZYMANSKI, C.; TRUST, T. J. Structure, Function, and Antigenicity of *Campylobacter* Flagella. In: NACHAMKIN, I.; BLASER, M. J. (Ed.). *Campylobacter*. 2 ed. **American Society for Microbiology**, Washington, p. 405-421, 2000.
- HANNING.; JARQUIN, R.; SLAVIK, M. In: *Campylobacter jejuni* as a secondary colonizer of poultry biofilms. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, p. 1199–1208, 2008.
- HAVELAAR, A.H.; NAUTA, M.J.; MANGEN, M.-J.J. *et al.* Costs and benefits of controlling, *Campylobacter* in the Netherlands: Integrating risk analysis, epidemiology and economics, **RIVM**, p. 53, 2005.
- HUMPHREY, T.; The significance of *Campylobacter* species as foodborne pathogens. **PHLS Food Microbiology Research Unit**, United Kingdom 1999. 5p. Disponível em: <http://www.probe.br/science.html>. Acesso em: 06 de Maio de 2013.
- HUTCHINSON, D.N.; BOLTON, F.J. In: Improved blood-free selective medium for the isolation of *Campylobacter jejuni* from faecal specimens. **Journal of Clinical Pathology**, v. 37, p. 956-957, 1984.
- International Meat and Poultry HACCP Alliance, 1996. In: Poultry Slaughter Model. Disponível em: <http://www.haccpalliance.org/sub/haccpmodels/poultryslaughter.pdf>. Acesso em: 20 de Março de 2014.
- ISO 10272-1:2006 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. 2006.
- JACOBS-REITSMA, W.F. In: *Campylobacter* bacteria in breeder flocks. **Avian Diseases**, v. 39, p. 355-359, 1995.
- JAGUSZTYN-KRYNICKA, E.K.; LANIEWSKI, P.; WYSZYNSKA, A. In: Update on *Campylobacter jejuni* vaccine development for preventing human campylobacteriosis. **Expert Review of Vaccines**, v. 8, n. 5, p. 625-645, 2009.
- KIESS, A.S.; PARKER, H.M.; McDANIEL, C.D. In: Evaluation of different selective media and culturing techniques for the quantification of *Campylobacter* spp. from broiler litter. **Poultry Science**, v. 89, p. 1755-1762, 2010.

- KUANA, S.L. **Dissertação de Mestrado:** *Campylobacter* na produção e processamento de frangos de corte: prevalência, contagem, fatores de risco e perfil de resistência antimicrobiana. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 107f, 2004.
- KUANA, S.L.; SANTOS, L.R.; RODRIGUES, L.B.; BORSOI, A.; MORAIS, H.L.S.; SALLE, S.T.P.; NASCIMENTO, V.P. In: Occurrence and characterization of *Campylobacter* in the brazilian production and processing of broilers. **Avian Diseases**, v. 52, n. 4, p. 680–684, 2008a.
- KUANA, S.L. *et al.* Ocorrência de *Campylobacter* em lotes de frangos de corte e nas carcaças correspondentes. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 2, p. 480-486, 2008b.
- LINE, J. E. In: Comparison of enrichment vessels for recovery of *Campylobacter* spp. from broiler rinse samples. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, v. 14, p. 110–117, 2006.
- LINE, J. E.; HIETT, K.; COLAN, A. In: Comparison of challenge models for determining the colonization dose of *Campylobacter jejuni* in broiler chicks. **Poultry Science**, v. 87, p. 1700-1706, 2008.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. (Ed.). In: Microbiologia e Imunologia Diagnósticas. **Microbiologia de Brock**. 12 ed., Editora Artmed, p. 901-963, 2010.
- MARTIN, W. T.; PATTON, M. C.; MORRIS, G. K.; POTTER, M. E.; PUHR, N. D. In: Selective enrichment broth medium for isolation of *Campylobacter jejuni*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 17, n. 5, p. 853–855. 1983.
- MAZIERO, T.M. **Dissertação de Mestrado:** Contaminação de Carcaças de Frango por *Campylobacter jejuni* antes e após armazenamento sob-resfriamento ou congelamento. Londrina: UEL, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, PPGCA, 2007.
- MEAD, G. C. In: Factors affecting intestinal colonization of poultry by *Campylobacter* and role of microflora in control. **World's Poultry Science Journal**, Ithaca, v. 58, n. 2, p. 169-178, 2002.
- MEDEIROS, V.M., BRICIO, S.M.L., FILGUEIRAS, A.A.L., CLEMENTINO, M.B.M. In: Utilização de caldo Bolton no enriquecimento seletivo em comparação ao plaqueamento direto na pesquisa de *Campylobacter* spp. em carcaças resfriadas de frango. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, v. 71, p. 456-461, 2012.
- MOORE, J. E.; CORCORAN, D.; DOOLEY, J. S. G; FANNING, S.; LUCEY, B.; MATSUDDA, M.; MCDOWELL, D. A.; MÉGRAUD, F.; MILLAR, B. C.; O'MAHONY, R.; O'RIORDAN, L.; O'ROURKE, M.; RAO, J. R.; ROONEY, P. J.; SSAIS, A.; WHYTE, P. *Campylobacter*. **Veterinary Researhe**, Les Ulis, v. 36, n. 3, p. 351-382, 2005.
- MOTA, M.I.; GADEA, M.P.; GONZÁLEZ, S.; GONZÁLEZ, G.; PARDO, L.; SIROK, A.; RIVAS, M.; ALGORTA, G.; SCHELOTTO, F.; VARELA, G. In: Bacterial pathogens associated with bloody diarrhea in Uruguayan children. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 42, p. 114-117, 2010.

MURPHY, C.; CARROLL, C.; JORDAN, K. N. In: Induction of an adaptive tolerance response in the foodborne pathogen, *Campylobacter jejuni*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 223, p. 89-93, 2003.

MUSGROVE, M. T.; BERRANG, M.E.; BYRD, J.A.; STERN, N.J.; COX. N.A. In: Detection of *Campylobacter* spp. in ceca and crops with and without enrichment. **Poultry Science**, v. 80, p. 825–828, 2001.

NEOGEN, 2009. CAMPY-CEFEX AGAR. Disponível em: http://www.neogen.com/Acu/media/pdf/ProdInfo/7718_PI.pdf Acesso em: 16/08/2013.

OLIVEIRA, A. L.; OLIVEIRA, R. B. P. In: Enumeração de *Campylobacter* spp. e presença de *Campylobacter jejuni* em carcaças de frango no Estado de Minas Gerais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 3, p. 480-484, 2013.

OYARZABAL A. O. *et al.* In: Evaluation of Agar Plates for Direct Enumeration of *Campylobacter* spp. from Poultry Carcass Rinses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 3351-3354, 2005.

PARK, S.F.; PURDY, D.; LEACH, S. In: The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. **International Journal Food Microbiology**, v. 74, p. 177-188, 2002.

PERDONCINI, G.; TEJKOWSKI, T.; SIERRA-ARGUELLO, Y.; LIMA, L.; ÁVILA, J.; GONSALVES, C.; NASCIMENTO, V. In: Identificação de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* de origem avícola através do ensaio multiplex PCR. **III Congresso Sul Brasileiro de Avicultura, Suinocultura e Laticínios**. Bento Gonçalves, RS. Anais... Bento Gonçalves: AVISULAT, 2012.

PERKO-MAKELA, P.; ISOHANNI, P.; KATZAV, M.; LUND, M.; HANNINEN, ML.; LYHS, U. In: A longitudinal study of *Campylobacter* distribution in a turkey production chain. **Acta Veterinaria Scandinavica**, 51:18, 2009.

POTTURI-VENKATA, L. P; S. BACKERT, A. J; LASTOVICA, S. L; VIEIRA, R. A; NORTON, R. S; MILLER, S; OYARZABAL, O.A. In: Evaluation of different plate media for direct cultivation of *Campylobacter* species from live broilers. **Poultry Science**. v. 86, p. 1304–1311, 2007.

PAULSEN, P.; KANZLER, P.; HILBERT, F., MAYRHOFER, S., BAUMGARTNER, S., SMULDERS, F. In: Comparison of three methods for detecting *Campylobacter* spp. in chilled or frozen meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 103, p. 229– 233, 2005.

RAHIMI, E.; MOMTAZ, H.; AMERI, M.; GHASEMIAN-SAFAEI, H.; ALI-KASEMI, M. In: Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* species isolated from chicken carcasses during processing in Iran. **Poultry Science**, Champaign, v. 89, n. 5, p. 1015-1020, 2010.

ROLLINS, D.M.; COLWELL, R.R. In: Viable but non-culturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the aquatic environment. **Applied Environmental Microbiology**, v. 52, p. 531-538, 1986.

ROSSI JÚNIOR, O.D.; BERCHIERI JÚNIOR, A. Agentes de enfermidades de interesse em saúde pública associados a produtos de origem avícola. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, E.N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M.A.F. (Ed.). **Doença das Aves**. 2. ed. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, p.1039-1054, 2009.

SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R.M.; ANGULO, F.J. *et al.* In: Foodborne illness acquired in the United States - major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, p. 7-15, 2011.

SCARCELLI, E.; PIATTI, R.M.; HARAKAVA, R.; MIYASHIRO, S.; FERNANDES, F.M.C.; CAMPOS, F.R.; FRANCISCO, W.; GENOVEZ, M.E.; RICHTZENHAIN, L.R. In: Molecular subtyping of *Campylobacter jejuni subsp. Jejuni* strains isolated from different animal species in the state of São Paulo Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 378-382, 2005.

SIRAGUSA, G. R.; LINE, J. E.; BROOKS, L. L.; HUTCHINSON, T.; LASTER, J. D.; APLE, R. O. In: Serological methods and selective agars to enumerate *Campylobacter* from broiler carcasses: Data from inter- and intralaboratory analyses. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 901-907, 2004.

SKIRROW, M.B.; BLASER, M.J. In: Clinical aspects of *Campylobacter* infection. **Campylobacter**, Washington, 2 ed, cap 4, p. 69-88, 2000.

SVS. 2009. Análise epidemiológica de surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/surtos_dta_15.pdf. Acesso em: 13 de Abril de 2013.

TAKAHASHI, M.; KOGA, M.; YOKOYAMA, K.; YUKI, N. In: Epidemiology of *Campylobacter jejuni* Isolated from Patients with Guillain-Barré and Fisher Syndromes in Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, Japan, v. 43, n. 1, p. 335-339, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC540119>. Acesso em: 30 de Abril de 2013.

THEOPHILO GRACE, N.D.; JAKABI, M. In: *Campylobacter* spp.: Diagnóstico Laboratorial, Métodos clássicos e moleculares. Who Global Salm-Surv Nível III, Capacitação Integrada. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. 2008.

TRACHOO, N.; FRANK, J.F.; STERN, N.J. In: Survival of *Campylobacter jejuni* biofilms isolated from chicken houses. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 65, p. 1110 - 1116, 2002.

UBABEF – União Brasileira de Avicultura. **Relatório Anual, 2012**. São Paulo: UBABEF, 2012.

UBABEF – União Brasileira de Avicultura. **Informe UBABEF, 2013**. São Paulo: UBABEF, 2014.

USDA – MLG 41.02. In: Isolation, Identification and Enumeration of *Campylobacter jejuni/coli/lari* from Poultry Rinse, Sponge and Raw Product Samples. Disponível em:

<http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/0273bc3d-2363-45b3-befb-1190c25f3c8b/MLG-41.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 14 de Junho de 2013.

VAZ, C.S.L *et al.* In: *Campylobacter* na segurança dos alimentos e na avicultura. **Revista Avicultura Industrial**, v. 99, n. 1165, p. 15-19, 2008.

WALLIS, M.R. In: The pathogenesis of *Campylobacter jejuni*. **British Journal of Biomedical Science**. London, v. 51, p. 54-64, 1994.

WEDDERKOPP, A. *et al.* In: National surveillance of *Campylobacter* in broilers at slaughter in Denmark in 1998. **Avian Diseases**, v. 44, n. 4, p. 993-9, 2000.

YOUNG, T.K.; LINDSAY, M.; DIRITA, J. D.V. In: *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 665-679, 2007.

ZILBAUER, M.; DORRELL, N.; WREN, B.W.; BAJAJ-ELLIOTT, M. In: *Campylobacter jejuni* – mediated disease pathogenesis: an update. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, doi: 10.1016/j.trstmh.2007.09.019, vol: 102, p. 123-129, 2008.

ANEXO 1



Laboratory Guidebook Notice of Change

Chapter new, **revised**, or archived: MLG 41.02

Title: Isolation, Identification and Enumeration of *Campylobacter jejuni/coli/lari* from Poultry Rinse, Sponge and Raw Product Samples

Effective Date: 05/01/13

Description and purpose of change(s):

This MLG chapter has been revised to incorporate the following:

- The title of the MLG was changed to include analysis of raw poultry product samples.
- Changed the term “microaerophilic” to “microaerobic” where appropriate throughout the chapter.
- Section 41.1 was revised to provide a clearer understanding of the purpose of the method.
- In Sections 41.3.1 and 41.7.3.a.vi, changed the term “spreading” growth to “swarming” growth.
- Section 41.3.1 was revised to provide a clearer understanding of the quality control procedures.
- In Section 41.3.3, provided instructions for inoculating a poultry product control.
- In Section 41.4.1, added a 10 ml centrifuge tube, transfer pipet paddle blender and sterile, filtered bags.
- In Section 41.4.2, added Brucella Broth and centrifuge capable of achieving 5000 rcf.
- In Section 41.5.1c, added how to prepare raw poultry products for quantitative analysis.
- Revised Section 41.7.3 to provide clarity when calculating CFU.
- In Section 41.8.2, clarified that the same colony taken from the Campy-cefex plate shall be used to perform both microscopic and latex agglutination analyses.
- In Sections 41.9.1.a, 41.9.3.a.i and 41.9.3.a.iii, the number of SBA plates used for streaking a pure culture was changed from “three to four” plates to “one to four” plates.
- Section 41.9.3.b was added to provide instructions of how to prepare an isolate for shipping using Brucella Broth.

The methods described in this guidebook are for use by the FSIS laboratories. FSIS does not specifically endorse any of the mentioned test products and acknowledges that equivalent products may be available for laboratory use. Method validation is necessary to demonstrate the equivalence of alternative tests. FSIS provides guidance at:

http://www.fsis.usda.gov/PDF/Validation_Studies_Pathogen_Detection_Methods.pdf

**United States Department of Agriculture
Food Safety And Inspection Service, Office of Public Health Science**

MLG 41.02	Page 1 of 19	
Title: Isolation, Identification and Enumeration of <i>Campylobacter jejuni/coli/lari</i> from Poultry Rinse, Sponge and Raw Product Samples		
Revision: .02	Replaces: .01	Effective: 05/01/13

Procedure Outline

- 41.1 Introduction
- 41.2 Safety Precautions
- 41.3 Quality Control
 - 41.3.1 Quality Control Procedures
 - 41.3.2 Controls
 - 41.3.3 Control Culture Preparation
- 41.4 Equipment, Reagents and Media
 - 41.4.1 Equipment and Supplies
 - 41.4.2 Reagents, Media and Cultures
- 41.5 Quantitative Analysis: Obtaining and Plating the Sample
 - 41.5.1 Obtaining Sample
 - 41.5.2 Plating
- 41.6 Qualitative Analysis: Sample Preparation and Plating
 - 41.6.1 Poultry Rinse
 - 41.6.2 Poultry Carcass and Environmental Sponge
- 41.7 Examination of Colonies, Picking Colonies, Calculating Colony Forming Units (CFU) and Recording Results
 - 41.7.1 Examination of Colonies
 - 41.7.2 Picking Colonies from Plating Medium
 - 41.7.3 Calculating CFU and Results
- 41.8 Confirmation Analyses
 - 41.8.1 Microscopic Examination
 - 41.8.2 Latex Agglutination Immunoassay
- 41.9 Culture Storage, Recovery and Shipment
 - 41.9.1 Maintenance and Storage of *Campylobacter* Culture Using Wang's Freezing/Storage Medium
 - 41.9.2 Recovering *Campylobacter* Cultures from \leq minus 70°C Freezer
 - 41.9.3 Transport of *Campylobacter* Using Wang's Semisolid (Transport) Medium
- 41.10 Selected References

41.1 Introduction

Campylobacter are gram-negative, spiral, uniflagellate, microaerophilic bacteria that cause foodborne illness. The two most frequently occurring *Campylobacter* species of clinical significance/concern for human consumption of meat and meat products are *C. jejuni* and *C. coli*. *C. jejuni* and *C. coli* are the most common causes of

**United States Department of Agriculture
Food Safety And Inspection Service, Office of Public Health Science**

MLG 41.02	Page 2 of 19	
Title: Isolation, Identification and Enumeration of <i>Campylobacter jejuni/coli/lari</i> from Poultry Rinse, Sponge and Raw Product Samples		
Revision: .02	Replaces: .01	Effective: 05/01/13

Campylobacteriosis in the United States (Butzler, J.P.). These two *Campylobacter* species are mainly isolated in the intestinal tract of poultry and poultry products. This method describes the qualitative and/or direct plating quantitative analytical procedures for isolation, identification and enumeration of *Campylobacter jejuni/coli/lari* (*Campylobacter j/c/l*) from poultry rinsate, poultry, carcass and environmental sponges. Isolates are confirmed as *Campylobacter j/c/l* by microscopy (typical cellular morphology and motility) and immunological testing.

Unless otherwise stated all measurements cited in this method have a tolerance range of $\pm 2\%$.

41.2 Safety Precautions

Campylobacter are categorized as Biosafety Level 2 (BSL-2) pathogens. CDC guidelines for manipulating BSL-2 pathogens shall be followed whenever live cultures of *Campylobacter* are used. A Class II laminar flow biosafety cabinet is recommended for procedures in which infectious aerosols or splashes may be created. All available Material Safety Data Sheets (MSDS) should be obtained from the manufacturer for the media, chemicals, reagents and microorganisms used in the analysis.

41.3 Quality Control

41.3.1 Quality Control Procedures

- a. Campy-Cefex plates should be sufficiently dry prior to use. If the Campy-Cefex plates are not dry, to avoid swarming growth and to quickly dry the plates, spread the plates out (do not stack) across the counter.
- b. Incubate Campy-Cefex plates in an area that minimizes light exposure since light can possibly affect the growth of *Campylobacter j/c/l*.
- c. Excess moisture in the microaerobic incubation chamber can lead to undesirable confluent or swarming growth of *Campylobacter j/c/l*. If the chamber does not have a system to avoid excess moisture, 4 – 5 drops of a humectant, such as glycerol, can be added to a piece of filter paper in an uncovered petri dish along with the plates in the chamber. Incubation shall occur at the appropriate microaerobic conditions.

**United States Department of Agriculture
Food Safety And Inspection Service, Office of Public Health Science**

MLG 41.02	Page 3 of 19	
Title: Isolation, Identification and Enumeration of <i>Campylobacter jejuni/coli/lari</i> from Poultry Rinse, Sponge and Raw Product Samples		
Revision: .02	Replaces: .01	Effective: 05/01/13

- d. When using the AnaeroPack™ System (Mitsubishi Pack-MicroAero gas pack), to obtain and maintain microaerobic conditions during incubation for a 7.0 liter jar container, use two sachets (gas packs); for a 2.5 liter jar container, use one sachet.
- e. To obtain and maintain microaerobic conditions using gas tanks during incubation, use the appropriate gas mixture (85% nitrogen, 10% carbon dioxide, and 5% oxygen).
- f. Maintaining a microaerobic atmosphere throughout testing activities is critical to avoid *Campylobacter j/c/l* die-off. Move quickly to provide the proper growing environment and when reading prepared slides.

41.3.2 Controls

Analyze a positive *Campylobacter* control (a *Campylobacter jejuni* or *Campylobacter coli* ATCC strain) and an un-inoculated media control with each sample set. Confirm at least one isolate from the positive control sample. In the absence of a positive test sample, control cultures may be terminated at the same point as the sample analysis.

41.3.3 Control Culture Preparation

- a. On the day prior to analysis, streak the positive control for isolation onto a Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood Agar (SBA) plate. Incubate the plate in a sealed container for 21 ± 3 hours at $42 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$. To obtain the desired microaerobic conditions necessary for growth of *Campylobacter j/c/l*, place plates in a sealed container containing the appropriate number of gas pack(s) or a gas mixture consisting of 85% nitrogen, 10% carbon dioxide, and 5% oxygen.
- b. Prepare a control culture in 0.85% saline at a concentration of approx. 10^8 CFU/ml (0.5 McFarland standard). Use of a colorimeter at 80 – 88% transmittance or a Dade Microscan® Turbidity Meter at a cell concentration of 0.08 ± 0.02 corresponds to the 0.5 McFarland standard and may be substituted.

Note: Mix tubes gently avoiding vigorous vortexing as introduction of excess oxygen could kill the *Campylobacter j/c/l*.

- c. For quantitative analysis, streak for isolation using a sterile, non-metal 1 μL loopful of the control culture onto a Campy-Cefex plate. Alternatively, prepare

**United States Department of Agriculture
Food Safety And Inspection Service, Office of Public Health Science**

MLG 41.02	Page 4 of 19	
Title: Isolation, Identification and Enumeration of <i>Campylobacter jejuni/coli/lari</i> from Poultry Rinse, Sponge and Raw Product Samples		
Revision: .02	Replaces: .01	Effective: 05/01/13

spread plates with growth in the countable range of 15 – 300 CFU/ml. For the raw poultry product analysis, use a sterile, non-metal 1 μ L loopful of the control culture to inoculate a 1:6 dilution of the poultry product control. An example of a 1:6 dilution is 125 ml of BPW added to 25 g of poultry product.

- d. For qualitative analysis, use a sterile, non-metal 1 μ L loopful of the control culture to inoculate either 30 ml of BPW plus 30 ml of 2X BF-BEB for the rinsate analysis or 25 ml of BPW plus 25 ml of 2X BF-BEB for the sponge analysis.

Note: If multiple matrices are analyzed, a single positive control may be used.

- e. Incubate the controls along with the samples at $42 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ for 48 ± 2 hours applying the desired microaerobic conditions. Controls shall be analyzed in the same manner as the samples.

41.4 Equipment, Reagents and Media

All materials listed may not be needed.

41.4.1 Equipment and Supplies

- a. Sterile petri dishes, (15 x 100 mm)
- b. Balance, sensitivity of 0.1 g
- c. Colorimeter, Dade Microscan[®] Turbidity Meter or equivalent instrumentation
- d. Sealed container: Vented culture flask (T-75 cm²) or bag (zip-top, Whirl-Pak[®], or equivalent product)
- e. Incubator, $42 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- f. P-100, P-200 – P-1000 or equivalent microliter pipettor with sterile disposable filtered micropipette tips
- g. Plastic or non-metal inoculating loops
- h. Bent glass or plastic rods (“hockey sticks”)
- i. Anaerobic jar or equivalent container
- j. AnaeroPack[™] System (Mitsubishi Pack-MicroAero gas pak) or equivalent product
- k. Filter paper
- l. Glass slides with cover slips, glass plate marked off in one-inch squares or agglutination ring slides
- m. Phase Contrast Microscope

**United States Department of Agriculture
Food Safety And Inspection Service, Office of Public Health Science**

MLG 41.02	Page 5 of 19	
Title: Isolation, Identification and Enumeration of <i>Campylobacter jejuni/coli/lari</i> from Poultry Rinse, Sponge and Raw Product Samples		
Revision: .02	Replaces: .01	Effective: 05/01/13

- n. 2 ml Cryostor™ cyrovial or equivalent product
- o. Refrigerator (2 - 8°C)
- p. 10 ml centrifuge tube (glass or plastic)
- q. Transfer pipet (plastic)
- r. Paddle blender
- s. Sterile, filtered bag with mesh capable of holding 2000 grams.

41.4.2 Reagents, Media and Cultures

- a. Immersion oil
- b. Saline, 0.85%
- c. Humectant such as glycerol
- d. PanBio-Campy (jcl) (Scimedx Corp., Denville, NJ)
- e. F46 Microgen *Campylobacter* (Microgen Bioproduct Ltd., Surrey UK)
- f. Buffered peptone water (BPW)
- g. Campy-Cefex plating medium
- h. Trypticase Soy with 5% Sheep Blood Agar (SBA) or equivalent product
- i. Double strength blood free Bolton enrichment broth (2XBF-BEB) and Bolton broth selective supplements (follow manufacturer instructions for correct use)
- j. Ethyl alcohol (USP grade only; non-denatured) to dissolve Bolton broth selective supplements
- k. *Campylobacter jejuni* or *Campylobacter coli* ATCC strain (positive control)
- l. Wang's Freezing/Storage Medium
- m. Wang's Transport Medium
- n. Brucella Broth
- o. Centrifuge capable of achieving 5000 rcf

41.5 Quantitative Analysis: Obtaining and Plating the Sample

41.5.1 Obtaining Sample

- a. To obtain a chicken rinsate sample, a portion of the rinsate from a chicken rinsed in 400 ml BPW is submitted to the laboratory for analysis.
- b. To obtain a carcass sponge sample, carcass sponges arrive to the laboratory containing 25 ml of BPW. To ensure an even distribution of organisms, the sponge is mix thoroughly by gently shaking the rinsate or squeezing the sponge several times.

**United States Department of Agriculture
Food Safety And Inspection Service, Office of Public Health Science**

MLG 41.02	Page 6 of 19	
Title: Isolation, Identification and Enumeration of <i>Campylobacter jejuni/coli/lari</i> from Poultry Rinse, Sponge and Raw Product Samples		
Revision: .02	Replaces: .01	Effective: 05/01/13

- c. To prepare the raw poultry sample for analysis, add 1625 ± 32.5 ml of BPW to 325 ± 32.5 g of raw poultry product. To disperse clumps, mix thoroughly by briefly stomaching or hand massaging.

41.5.2 Plating

- a. Use an appropriate P-1000 pipettor with a sterile, filtered pipette tip to dispense 1 ml of the sample preparation onto four Campy-Cefex plates (~ 250 μ L per plate).
- b. Use an appropriate P-100 pipettor with a sterile, filtered pipette tip to dispense 100 μ L of the sample preparation onto two Campy-Cefex plates.
- c. Use a sterile, non-metal loop, needle or hockey stick to spread the inoculum evenly over the entire surface of the agar avoiding contact with the plate wall.
- d. Incubate plates for 48 ± 2 hours at $42 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ applying the appropriate microaerobic conditions.

41.6 Qualitative Analysis: Sample Preparation and Plating

41.6.1 Poultry Rinse

- a. Add 30 ml of 2X BF-BEB and 30 ml of the poultry rinse sample to a vented culture flask. To ensure an even distribution of the carcass rinsate sample and broth, mix thoroughly by gently shaking.
- b. Incubate each sample for 48 ± 2 hours at $42 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ applying the appropriate microaerobic conditions.
- c. After 48 ± 2 hours, streak each sample and control onto a Campy-Cefex plate for isolation.
- d. Place all Campy-Cefex plates into a sealed container applying the appropriate microaerobic conditions. Incubate plates at $42 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ for 48 ± 2 hours.

**United States Department of Agriculture
Food Safety And Inspection Service, Office of Public Health Science**

MLG 41.02	Page 7 of 19	
Title: Isolation, Identification and Enumeration of <i>Campylobacter jejuni/coli/lari</i> from Poultry Rinse, Sponge and Raw Product Samples		
Revision: .02	Replaces: .01	Effective: 05/01/13

41.6.2 Poultry Carcass and Environmental Sponge

- a. Add 25 ml of 2X BF-BEB to the carcass sponge sample (that contains 25 ml of BPW). For the environmental sponge, add 20 ml of BPW and then add 30 ml of 2X BF-BEB to the bag containing the sponge. To ensure an even distribution of the sponge sample and broth, mix thoroughly by squeezing by hand several times.
- b. Incubate 48 ± 2 hours at $42 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ applying the appropriate microaerobic conditions.
- c. After 48 ± 2 hours, streak each sample and control onto a Campy-Cefex plate for isolation.
- d. Place the plates into a sealed container applying the appropriate microaerobic conditions. Incubate plates at $42 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ for 48 ± 2 hours.

41.7 Examination of Colonies, Picking Colonies, Calculating Colony Forming Units (CFU) and Recording Results

41.7.1 Examination of Colonies

After incubation, examine all plates to determine the relative proportion of various typical colony types. Typical colonies are translucent or mucoid, glistening and pink in color, flat or slightly raised, and may vary significantly in size.

41.7.2 Picking Colonies from Plating Medium

- a. Quantitative Results
 - i. When typical *Campylobacter* colonies are found, pick five colonies (if available) proportionally representative of all typical colony types from one or more plates for confirmation. For example, if about 80% of typical colonies are of one type and about 20% are of another type, pick four colonies of the predominate colony type and one colony of the other type.
 - ii. If there are mixed confirmation results among the colonies of one perceived colony type (i.e., the colonies look the same but some confirm

**United States Department of Agriculture
Food Safety And Inspection Service, Office of Public Health Science**

MLG 41.02	Page 8 of 19	
Title: Isolation, Identification and Enumeration of <i>Campylobacter jejuni/coli/lari</i> from Poultry Rinse, Sponge and Raw Product Samples		
Revision: .02	Replaces: .01	Effective: 05/01/13

and others do not), pick up to a maximum of 10 colonies representing that type (if available).

- iii. If the last dilution has an average of > 50 suspect colonies per plate, pick 10% of the average number of colonies up to a maximum of 10 colonies from that dilution for confirmatory testing.

b. **Qualitative Results**

When typical *Campylobacter* colonies are found, pick up to five colonies from one or more plates for confirmation.

41.7.3 Calculating CFU and Results

a. **Quantitative Results**

For sponge samples, convert CFU/ml to CFU/cm² to reflect the surface area sampled. To convert CFU/ml to CFU/cm², take the CFU/ml, multiply by 25 ml and divide by 100 cm². For raw poultry product, convert CFU/ml to CFU/g. To adjust for the 1:6 dilution ratio, multiply the CFU/ml result by 6 ml/g.

Count all typical types of *Campylobacter j/c/l* colonies according to the previous description in section 41.7.1. The countable range for each of the Campy-Cefex plates is 15 – 300 CFU. Plates containing more than 300 colonies shall be recorded as “Too Numerous To Count” (TNTC). Plates containing no colonies on any of the six plates shall be recorded as 0 CFU/ml for a rinsate sample, 0 CFU/cm² for a sponge sample or 0 CFU/g for a raw poultry product.

If all colony types of specific morphology confirm, 100% of the colonies with that morphology are included in the count. If there are mixed confirmation results among colonies representing one specific colony type and 10 colonies representing that type were picked for confirmation, the total count for that colony type must be multiplied by the percentage of colonies of that type that confirmed.

i. **All Plates in the Countable Range are from the Same Dilution**

- 1. The countable plates are the four 250 µL plates.

**United States Department of Agriculture
Food Safety And Inspection Service, Office of Public Health Science**

MLG 41.02	Page 9 of 19	
Title: Isolation, Identification and Enumeration of <i>Campylobacter jejuni/coli/lari</i> from Poultry Rinse, Sponge and Raw Product Samples		
Revision: .02	Replaces: .01	Effective: 05/01/13

The CFU is calculated by adding the total number of colonies from these four plates.

Example: Countable plates are the four 250 µL plates.

	Dilution (colonies per plate)					
	1 ml (250 µL ea)				100 µL	100 µL
No. of colonies	100	115	75	50	6	10

Calculation for CFU/ml: $100 + 115 + 75 + 50 = 340$ CFU/ml

Calculation for CFU/cm²: $(340 \times 25 \text{ ml}) / 100 \text{ cm}^2 = 85$ CFU/cm²

Calculation for CFU/g: $340 \text{ CFU/ml} \times 6 \text{ ml/g} = 2040$ CFU/g

2. The countable plates are the two 100 µL plates.
The CFU is calculated by taking an average of the two 100 µL plates and multiplying by 10 to account for the dilution.

Example: The countable plates are the 100 µL plates.

	Dilution (colonies per plate)					
	1 ml (250 µL ea)				100 µL	100 µL
No. of colonies	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	50	115

Calculation for CFU/ml: $[(50 + 115) / 2] \times 10 = 825$ CFU/ml

Calculation for CFU/cm²: $(825 \times 25 \text{ ml}) / 100 \text{ cm}^2 = 206$ CFU/cm²

Calculation for CFU/g: $825 \text{ CFU/ml} \times 6 \text{ ml/g} = 4950$ CFU/g

ii. Plates in the Countable Range are from Different Dilutions.

If plates have colonies within the countable range at more than one dilution, calculate the CFU/ml by taking the sum of the four 250 µL plates, the average of the two 100 µL plates and multiplying this average by 10 to account for the dilution, and then calculate the average of the two dilution results.

Example: Colonies within the countable range at more than one dilution.

**United States Department of Agriculture
Food Safety And Inspection Service, Office of Public Health Science**

MLG 41.02		Page 10 of 19
Title: Isolation, Identification and Enumeration of <i>Campylobacter jejuni/coli/lari</i> from Poultry Rinse, Sponge and Raw Product Samples		
Revision: .02	Replaces: .01	Effective: 05/01/13

	Dilution (colonies per plate)					
	1 ml (250 µL ea)				100 µL	100 µL
No. of colonies	150	100	75	80	30	19

Calculation for CFU/ml: $150 + 100 + 75 + 80 = 405$
 $[(30 + 19) / 2] \times 10 = 245$
 $(405 + 245) / 2 = 325 \text{ CFU/ml}$

Calculation for CFU/cm²: $(325 \times 25 \text{ ml}) / 100 \text{ cm}^2 = 81 \text{ CFU/cm}^2$

Calculation for CFU/g: $325 \text{ CFU/ml} \times 6 \text{ ml/g} = 1950 \text{ CFU/g}$

Example: All plates within the countable range for the 250 µL, one plate for the 100 µL.

	Dilution (colonies per plate)					
	1 ml (250 µL ea)				100 µL	100 µL
No. of colonies	150	100	75	80	15	14

Calculation for CFU/ml: $150 + 100 + 75 + 80 = 405 \text{ CFU/ml}$

Calculation for CFU/cm²: $(405 \times 25 \text{ ml}) / 100 \text{ cm}^2 = 101.25 \text{ CFU/cm}^2$

Calculation for CFU/g: $405 \text{ CFU/ml} \times 6 \text{ ml/g} = 2430 \text{ CFU/g}$

Note: The exception is if one calculated value is more than twice the other, use the result from the lower dilution.

Example: Colonies within the countable range at more than one dilution.

	Dilution (colonies per plate)					
	1 ml (250 µL ea)				100 µL	100 µL
No. of colonies	63	67	60	65	55	53

Calculation for CFU/ml: $63 + 67 + 60 + 65 = 255$
 $[(55 + 53) / 2] \times 10 = 540$
 Result = 255 CFU/ml

Calculation for CFU/cm²: $(255 \times 25 \text{ ml}) / 100 \text{ cm}^2 = 63.75 \text{ CFU/cm}^2$

Calculation for CFU/g: $255 \text{ CFU/ml} \times 6 \text{ ml/g} = 1530 \text{ CFU/g}$

**United States Department of Agriculture
Food Safety And Inspection Service, Office of Public Health Science**

MLG 41.02		Page 11 of 19
Title: Isolation, Identification and Enumeration of <i>Campylobacter jejuni/coli/lari</i> from Poultry Rinse, Sponge and Raw Product Samples		
Revision: .02	Replaces: .01	Effective: 05/01/13

iii. All Plates Have Fewer Colonies than the Minimum Countable Range (< 15 CFU/ml).

If there are countable plates less than the countable range, calculate an estimated result.

Example: Fewer Colonies than the Minimum at Both Dilutions.

	Dilution (colonies per plate)					
	1 ml (250 µL ea)				100 µL	100 µL
No. of colonies	3	10	6	1	1	2

Calculation for CFU/ml: $3 + 10 + 6 + 1 = 20$
 $[(1 + 2) / 2] \times 10 = 15$
 $(20 + 15) / 2 = 17.5 \text{ CFU/ml (estimated result)}$

Calculation for CFU/cm²: $(17.5 \times 25 \text{ ml}) / 100 \text{ cm}^2 = 4 \text{ CFU/cm}^2$
 (estimated result)

Calculation for CFU/g: $17.5 \text{ CFU/ml} \times 6 \text{ ml/g} = 105 \text{ CFU/g (estimated result)}$

Example: Fewer Colonies than the Minimum at 250 µL, no colonies at 100 µL.

	Dilution (colonies per plate)					
	1 ml (250 µL ea)				100 µL	100 µL
No. of colonies	5	7	3	0	0	0

Calculation for CFU/ml: $5 + 7 + 3 + 0 = 15 \text{ CFU/ml (estimated result)}$

Calculation for CFU/cm²: $(15 \times 25 \text{ ml}) / 100 \text{ cm}^2 = 4 \text{ CFU/cm}^2$ (estimated result)

Calculation for CFU/g: $15 \text{ CFU/ml} \times 6 \text{ ml/g} = 90 \text{ CFU/g (estimated result)}$

Example: Fewer colonies than the minimum at 100 µL, no colonies at 250 µL

**United States Department of Agriculture
Food Safety And Inspection Service, Office of Public Health Science**

MLG 41.02		Page 12 of 19
Title: Isolation, Identification and Enumeration of <i>Campylobacter jejuni/coli/lari</i> from Poultry Rinse, Sponge and Raw Product Samples		
Revision: .02	Replaces: .01	Effective: 05/01/13

	Dilution (colonies per plate)					
	1 ml (250 µL ea)				100 µL	100 µL
No. of colonies	0	0	0	0	0	1

Note: For this example, to account for colonies obtained at the higher dilution and not at the lower dilution, calculate the CFU/ml for each dilution and then average the result of both dilutions.

$$\begin{aligned} \text{Calculation for CFU/ml: } & 0 + 0 + 0 + 0 = 0 \text{ CFU/ml} \\ & [(1 + 0) / 2] \times 10 = 5 \\ & 5 / 2 = 2.5 \text{ CFU/ml (estimated result)} \end{aligned}$$

$$\text{Calculation for CFU/cm}^2: (2.5 \times 25 \text{ ml}) / 100 \text{ cm}^2 = 1 \text{ CFU/cm}^2 \text{ (estimated result)}$$

$$\text{Calculation for CFU/g: } 2.5 \text{ CFU/ml} \times 6 \text{ ml/g} = 15 \text{ CFU/g (estimated result)}$$

iv. One or More Plates have Fewer Colonies than the Countable Range (< 15 CFU/ml).

If one (or more) plate has colonies in the countable range for each dilution, count all plates with countable colonies and calculate an estimated result.

Example: At least one of the 250 µL plates is in the countable range.

	Dilution (colonies per plate)					
	1 ml (250 µL ea)				100 µL	100 µL
No. of colonies	10	12	30	47	1	7

$$\begin{aligned} \text{Calculation for CFU/ml: } & 10 + 12 + 30 + 47 = 99 \\ & [(1 + 7) / 2] \times 10 = 40 \\ & (99 + 40) / 2 = 69.5 \text{ CFU/ml (estimated result)} \end{aligned}$$

$$\text{Calculation for CFU/cm}^2: (69.5 \times 25 \text{ ml}) / 100 \text{ cm}^2 = 17 \text{ CFU/cm}^2 \text{ (estimated result)}$$

$$\text{Calculation for CFU/g: } 69.5 \text{ CFU/ml} \times 6 \text{ ml/g} = 417 \text{ CFU/g (estimated result)}$$

**United States Department of Agriculture
Food Safety And Inspection Service, Office of Public Health Science**

MLG 41.02		Page 13 of 19
Title: Isolation, Identification and Enumeration of <i>Campylobacter jejuni/coli/lari</i> from Poultry Rinse, Sponge and Raw Product Samples		
Revision: .02	Replaces: .01	Effective: 05/01/13

Example: At least one of the 100 µL plates is in the countable range.

	Dilution (colonies per plate)					
	1 ml (250 µL ea)				100 µL	100 µL
No. of colonies	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	25	10

Calculation for CFU/ml: $[(25 + 10) / 2] \times 10 = 175$ CFU/ml (estimated result)

Calculation for CFU/cm²: $(175 \times 25 \text{ ml}) / 100 \text{ cm}^2 = 44$ CFU/cm² (estimated result)

Calculation for CFU/g: $175 \text{ CFU/ml} \times 6 \text{ ml/g} = 1050$ CFU/g (estimated result)

Example: At least one plate from both of the 250 µL and 100 µL plates is in the countable range.

	Dilution (colonies per plate)					
	1 ml (250 µL ea)				100 µL	100 µL
No. of colonies	10	12	30	48	25	10

Calculation for CFU/ml: $10 + 12 + 30 + 48 = 100$
 $[(25 + 10) / 2] \times 10 = 175$
 $(100 + 175) / 2 = 137.5$ CFU/ml (estimated result)

Calculation for CFU/cm²: $(137.5 \times 25 \text{ ml}) / 100 \text{ cm}^2 = 34.375$ CFU/cm² (estimated result)

Calculation for CFU/g: $137.5 \text{ CFU/ml} \times 6 \text{ ml/g} = 825$ CFU/g (estimated result)

v. All Plates Have More Colonies than the Maximum of the Countable Range (> 300 CFU/ml)

If all six plates have more than the countable range, record “TNTC” and report as an estimated count of > (greater than) the maximum countable range.

**United States Department of Agriculture
Food Safety And Inspection Service, Office of Public Health Science**

MLG 41.02		Page 14 of 19
Title: Isolation, Identification and Enumeration of <i>Campylobacter jejuni/coli/lari</i> from Poultry Rinse, Sponge and Raw Product Samples		
Revision: .02	Replaces: .01	Effective: 05/01/13

Estimated calculation for rinsate: > 2100 CFU/ml (estimated result)
 Estimated calculation for sponge: > 525 CFU/cm² (estimated result)

vi. Colony Swarming Growth

Campylobacter has the ability to swarm on agar plates. This can be problematic when determining the total number of colonies. When colony swarming occurs, determining the total number of *Campylobacter j/c/l* colonies on a plate shall be calculated as an estimated result.

1. If colony swarming is located on either the 250 µL plates, or the 100 µL plates, but not on both, calculate by using plates at the dilution that was not affected by the colony swarming.

Example: Colony swarming on the 250 µL plates; the 100 µL plates are not affected.

	Dilution (colonies per plate)					
	1 ml (250 µL ea)			100 µL	100 µL	
No. of colonies	**75	150	200	**50	25	45

** = number of estimated colonies on a plate with swarmers.

Calculation for CFU/ml: $[(25 + 45) / 2] \times 10 = 350$ CFU/ml (estimated result)

Calculation for CFU/cm²: $(350 \times 25 \text{ ml}) / 100 \text{ cm}^2 = 88$ CFU/cm² (estimated result)

Calculation for CFU/g: $350 \text{ CFU/ml} \times 6 \text{ ml/g} = 2100$ CFU/g (estimated result)

**United States Department of Agriculture
Food Safety And Inspection Service, Office of Public Health Science**

MLG 41.02	Page 15 of 19
Title: Isolation, Identification and Enumeration of <i>Campylobacter jejuni/coli/lari</i> from Poultry Rinse, Sponge and Raw Product Samples	
Revision: .02	Effective: 05/01/13
Replaces: .01	

Example: Colony swarming on the 100 µL plates; the 250 µL plates are not affected.

	Dilution (colonies per plate)					
	1 ml (250 µL ea)				100 µL	100 µL
No. of colonies	153	284	108	138	**57	**30

** = total estimated number with swarmers on a plate

Calculation for CFU/ml: $153 + 284 + 108 + 138 = 683$ CFU/ml
(estimated result)

Calculation for CFU/cm²: $(683 \times 25 \text{ ml}) / 100 \text{ cm}^2 = 171$ CFU/cm²
(estimated result)

Calculation for CFU/g: $683 \text{ CFU/ml} \times 6 \text{ ml/g} = 4098$ CFU/g (estimated result)

- If colony swarming is located on both the 250 µL and 100 µL plates, count only the isolated colonies on those plates. Calculate the estimated CFU for each dilution by taking the sum of the four 250 µL plates and the average of the two 100 µL plates multiplying by 10 to account for the dilution, and then calculating the average of the two dilution's results.

Example: Colony swarming on both the 250 µL and 100 µL plates.

	Dilution (colonies per plate)					
	1 ml (250 µL ea)				100 µL	100 µL
No. of colonies	143	**50	93	102	15	**37

** = total number with spreaders on plate

Calculation for CFU/ml: $143 + 50 + 93 + 102 = 388$
 $[(15 + 37) / 2] \times 10 = 260$
 $(388 + 260) / 2 = 324$ CFU/ml (estimated result)

Calculation for CFU/cm²: $(324 \times 25 \text{ ml}) / 100 \text{ cm}^2 = 81$ CFU/cm²
(estimated result)

Calculation for CFU/g: $324 \text{ CFU/ml} \times 6 \text{ ml/g} = 1944$ CFU/g (estimated result)

**United States Department of Agriculture
Food Safety And Inspection Service, Office of Public Health Science**

MLG 41.02	Page 16 of 19	
Title: Isolation, Identification and Enumeration of <i>Campylobacter jejuni/coli/lari</i> from Poultry Rinse, Sponge and Raw Product Samples		
Revision: .02	Replaces: .01	Effective: 05/01/13

b. Qualitative Results

Qualitative results for *Campylobacter j/c/l* is recorded as either positive or negative based on the presence or absence of confirmed *Campylobacter j/c/l*.

41.8 Confirmation Analyses

If the sample is positive for the quantitative analysis, it is optional to perform confirmatory testing for the same sample when conducting the qualitative analysis.

If an FSIS Laboratory encounters an isolate that demonstrates typical morphology and motility by microscopic examination, but results in a negative latex agglutination reaction, then the FSIS laboratory will transfer the isolate to the Outbreaks Section of Eastern Laboratory, or current FSIS reference laboratory, for further analysis (e.g. PCR testing) prior to reporting.

41.8.1 Microscopic Examination

After the 48 ± 2 hours incubation, examine plates.

Using a sterile, non-metal needle, loop, or equivalent product, touch a portion of the suspect colony and suspend in a drop of sterile 0.85% saline on a microscope slide. Cover with a glass cover slip and examine immediately under oil immersion using phase contrast microscopy. Suspensions demonstrating typical *Campylobacter j/c/l* corkscrew morphology and darting motility are presumptive positive.

Note: Do not delay slide examination. If plates are held longer than 48 ± 2 hours, there is a high probability that cells would appear spherical or coccoid because the culture is either old or has also been exposed to air (inappropriate growth conditions) for an extended time.

41.8.2 Latex Agglutination Immunoassay

Using the same suspect colony from the microscopic examination, confirm the presumptive positive colony by using the PanBio-Campy (jcl) (Scimedx Corp., Denville, NJ) or F46 Microgen *Campylobacter* (Microgen Bioproduct Ltd.,

**United States Department of Agriculture
Food Safety And Inspection Service, Office of Public Health Science**

MLG 41.02	Page 17 of 19	
Title: Isolation, Identification and Enumeration of <i>Campylobacter jejuni/coli/lari</i> from Poultry Rinse, Sponge and Raw Product Samples		
Revision: .02	Replaces: .01	Effective: 05/01/13

Surrey UK) procedure. Follow the manufacturer's instructions for performing either test.

Note: When using either latex agglutination kit, the colony can be taken from the Campy-Cefex plate; microscopy and agglutination results can be obtained on the same day.

41.9 Culture Storage, Recovery and Shipment

41.9.1 Maintenance and Storage of *Campylobacter* Culture Using Wang's Freezing/Storage Medium

- a. When a pure culture is obtained, streak the culture onto one to four SBA plates to completely cover each plate with a lawn of growth. Place the agar plate(s) in a bag or sealed container applying desired microaerobic conditions for 21 ± 3 hours at $42 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$.
- b. Using a sterile cotton swab, plastic loop or equivalent product, collect the entire lawn of bacteria from each of the SBA plates into a single 2 ml cryovial, i.e. Cryostor™, containing Wang's freezing/storage medium.
- c. Vortex the mixture until the bacterial cells are dispersed. This mixture will be thick due to the amount of bacteria in the cryovial.
- d. Initially, place the cryovials containing Wang's freezing/storage medium and the *Campylobacter* cultures in a $2 - 8^{\circ}\text{C}$ refrigerator for about 20 minutes, and then transfer to a \leq minus 70°C freezer for permanent (long-term) storage.

Note: Isolates are initially placed in the refrigerator to avoid sudden shock to the \leq minus 70°C freezer temperature.

- e. For "working" *Campylobacter* stock cultures, store on Wang's storage medium broth. Cultures should be made in bulk to maintain viability of the isolate when the container is opened and closed daily; this also reduces opportunity for contamination. On the day of testing, use one 2 ml cryovial containing a "working" *Campylobacter* stock culture.

**United States Department of Agriculture
Food Safety And Inspection Service, Office of Public Health Science**

MLG 41.02	Page 18 of 19	
Title: Isolation, Identification and Enumeration of <i>Campylobacter jejuni/coli/lari</i> from Poultry Rinse, Sponge and Raw Product Samples		
Revision: .02	Replaces: .01	Effective: 05/01/13

41.9.2 Recovering *Campylobacter* Cultures from \leq minus 70°C Freezer

- a. After removing a cryovial containing a mixture of the Wang's freezing/storage medium and *Campylobacter* culture from \leq minus 70°C freezer, immediately scrape a small amount of the inoculum, transfer and streak to a SBA plate for isolation.
- b. Immediately return the cryovial to the \leq minus 70°C freezer. Do not allow the culture to thaw.
- c. The streaked plate should be placed in a sealed container applying desired microaerobic conditions and placed in a $42 \pm 1.0^\circ\text{C}$ incubator for 24 – 48 hours.

41.9.3 Transport of *Campylobacter* Using Wang's Semisolid (Transport) Medium

- a. Isolate Preparation Using SBA Plate
 - i. When preparing for shipping, streak a pure culture onto one to four SBA plates. Streak the plate whereby the culture completely covers the plate. Place the agar plate in a sealed container applying the desired microaerobic conditions for 21 ± 3 hours at $42 \pm 1.0^\circ\text{C}$.
 - ii. On the day of shipping, remove the cryovial containing the Wang's transport medium from the $2 - 8^\circ\text{C}$ refrigerator and allow the cryovial to come to room temperature.
 - iii. Using a sterile cotton swab, plastic loop or equivalent product, dispense the entire lawn of bacteria from the one to four SBA plates into a single, appropriately labeled cryovial containing the Wang's transport medium.
 - iv. Ship isolates to destination with ice packs to keep cool within 24 – 48 hours of packing. Shipping shall comply with Department of Transportation IATA regulations. Typically, isolates shipped in Wang's transport medium remain viable for 7 days.
 - v. The recipient laboratory should immediately recover the cultures, store and freeze following the procedures in section 41.9.1.

United States Department of Agriculture
Food Safety And Inspection Service, Office of Public Health Science

MLG 41.02	Page 19 of 19	
Title: Isolation, Identification and Enumeration of <i>Campylobacter jejuni/coli/lari</i> from Poultry Rinse, Sponge and Raw Product Samples		
Revision: .02	Replaces: .01	Effective: 05/01/13

b. Isolate Preparation Using Brucella Broth

- i. When preparing for shipping, ensure the isolate is a pure culture. From the agar plate used to obtain a pure culture, transfer a loopful of the pure culture to one 10 ml (glass or plastic) tube of Brucella Broth.
- ii. Incubate the Brucella Broth containing the *Campylobacter* culture applying the appropriate microaerobic conditions at $42 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ for 24 up to 72 hours, depending on the next opportunity for shipping the isolate.
- iii. On the day of shipping, remove the 10 ml centrifuge tube containing the inoculated broth from the incubator. Centrifuge for 3 minutes at 5,000 ref.
- iv. Remove the supernatant being careful not to disrupt the pellet of culture.
- v. Using a transfer pipet or a sterile filtered pipette tip, add 1 ml of Wang's Semisolid Transport Medium, pre-warmed to room temperature, to the centrifuge tube. Gently mix by drawing the suspension up and down to re-suspend the pellet.
- vi. Transfer the entire amount to a sterile cryovial tube.
- vii. Continue preparation for shipping isolates following Section 41.9.3.a. iv and v.

41.10 Selected References

Aerobic/Microaerophilic, Motile, Helical/Vibrioid Gram-Negative Bacteria: Section 2. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol.1, pg. 111

Butzler, J. P. 2004. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. Clin. Microbiol. Infect. 10:868-876.

Campylobacter and Arcobacter. 2003. Manual of Clinical Microbiology 8th edition. Ch. 57, Vol. 1, pg. 902

Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin P. M., Tauxe, R. V. 1999. Food-related illness and death in the United States. Emerg. Infect. Dis. 5:607-625.