

**Valéria de Mello Medeiros**

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DAS  
ESPÉCIES TERMOFÍLICAS DE *CAMPYLOBACTER*  
A PARTIR DE FRANGO RESFRIADO

PPGVS/INCQS

FIOCRUZ

2011

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DAS  
ESPÉCIES TERMOFÍLICAS DE *CAMPYLOBACTER*  
A PARTIR DE FRANGO RESFRIADO

Valéria de Mello Medeiros

Mestrado Profissional  
Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Maysa Beatriz Mandetta Clementino

Rio de Janeiro  
2011

Valéria de Mello Medeiros

Isolamento e Identificação Fenotípica e Molecular das Espécies Termofílicas de  
*Campylobacter* a partir de Frango Resfriado

Dissertação submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Vigilância Sanitária.

Aprovado:

---

Dr. Ivano R. V. de Filippis Capasso(INCQS/FIOCRUZ)

---

Dr. Celio Mauro Viana (UFF)

---

Dr<sup>a</sup>. Maria Helena Cosendey de Aquino (UFF)

---

Orientador: Dr<sup>a</sup> Maysa Beatriz Mandetta Clementino (INCQS/FIOCRUZ)

Rio de Janeiro

2011

Medeiros, Valéria de Mello

Isolamento e Identificação Fenotípica e Molecular das Espécies Termofílicas de *Campylobacter* a partir de Frango Resfriado/ Valéria de Mello Medeiros. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2011.

xv, 78 f., il., tab.

Dissertação (Mestrado Profissional) – Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2011.  
Orientador: Dra. Maysa Beatriz Mandetta Clementino

1. *Campylobacter*. 2. Frango. 3. Identificação Fenotípica. 4. PCR.

Isolation and Phenotypic and Molecular Identification of thermophilic species of  
*Campylobacter* from chilled chicken carcasses

Aos meus pais  
Catharina (in memoriam) e Victor

Nunca deixe que lhe digam que não vale à pena acreditar nos sonhos que se têm ou que os seus planos nunca vão dar certo ou que você nunca vai ser alguém...

Renato Russo (1960-1996)

## AGRADECIMENTOS

A Deus por dar-me forças em um momento em que eu já não as tinha;

Ao Nelson Luiz da S. Pedreira, pela força, coragem, companheirismo e por ter cuidado de meu bem maior: minha filha;

A minha filha Renata Catharina, pela compreensão de minha ausência em vários momentos importantes de sua vida;

Aos meus pais, por terem feito de mim uma pessoa de coragem e especialmente a minha mãe, minha maior incentivadora, que deve estar que não se aguenta de tanto orgulho;

À minha querida irmã Andréa, que tirou forças não sei de onde e segurou todas as barras para que eu pudesse me dedicar a este trabalho;

A chefia de Departamento de Microbiologia, Dra. Suely Fracalanza pelo apoio e compreensão nos momentos em que solicitei sua ajuda;

À orientadora Professora Doutora Maysa Beatriz Mandetta Clementino pela confiança, carinho e estímulo em mim depositado. Aos ensinamentos, principalmente em Biologia Molecular e aos momentos de descontração que compartilhamos até tarde da noite;

À Silvia Maria Lopes Bricio, não tenho palavras pra agradecer a ajuda e a incansável correção deste trabalho, o qual sem ela seria difícil a elaboração, só tenho a agradecer;

Aos amigos de Setor e aos que nele estiveram presentes, Carla, Márcia, Juliana, Mariana, Luziane, Fernanda e Davi, pelas dicas e otimismo transmitidos durante a realização deste trabalho. Ao Marcelo, quero agradecer a especial atenção e contribuição de tudo que eu pedi e fui prontamente atendida;

Aos companheiros dos Setores de Meio de Cultura e Esterilização pela atenção e eficiência ao atendimento dos pedidos para elaboração deste trabalho;

Ao Dr. Ivano R. V. Filippis Capasso, pela gentileza e ajuda nos momentos de dúvidas e a todos do Setor de Micro-organismo de Referência pela contribuição neste trabalho: Catia, Aninha, Claudia Ferreira, Cláudia Paula, Jandira e Carlos;

Ao Sergio Alves da Silva pela colaboração nas análises estatísticas;

À querida amiga Anna Maria Barreto Fust, por caminharmos juntas na alegria e na tristeza sem jamais permitir o meu desânimo;

À equipe do IOC, especialmente à Doutora Ana Luzia Lauria Filgueiras, pela gentil acolhida em seu Laboratório e pelos ensinamentos, que foram à base de tudo que foi realizado posteriormente.

À Marília Martins Nishikawa, grande amiga, que tanto me incentivou a participar do curso de Pós-Graduação;

Aos colegas de turma, pelos belos momentos compartilhados e a todos os professores;

À equipe da Pós-Graduação, pelo pronto atendimento às solicitações feitas;

Aos integrantes da Biblioteca do INCQS, Vinicius pela ajuda a mim dispensada, Alexandre pela formatação geral deste trabalho;

A todos do INCQS pela força e atenção durante a realização deste trabalho;

Ao INCQS por mais esta oportunidade.

## RESUMO

Nas últimas quatro décadas espécies de *Campylobacter* spp. têm sido reconhecidas como patógenos emergentes e despontaram como importantes agentes de gastroenterites de origem alimentar em várias partes do mundo. No Brasil, cabe aos órgãos normatizadores e à Vigilância Sanitária assegurar o cumprimento das legislações a fim de garantir a segurança dos alimentos comercializados e preservar a saúde do consumidor. O objetivo deste estudo foi verificar a ocorrência das espécies termofílicas de *Campylobacter* em 30 amostras de carcaças resfriadas de frango adquiridas no comércio do Município do Rio de Janeiro. A preparação das amostras e o isolamento de colônias suspeitas de *Campylobacter* spp. foram realizados de acordo com os protocolos descritos no Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, APHA. A confirmação de *Campylobacter* spp. foi feita pelo teste de aglutinação em látex e a diferenciação das espécies foi realizada pela bioquímica convencional e pela abordagem molecular. Foi proposto, neste estudo, a utilização da Duplex PCR para amplificar os genes 16S rRNA e o gene da oxirredutase, para a detecção das espécies do gênero *Campylobacter* e da espécie *C. jejuni* respectivamente. O plaqueamento direto das amostras, utilizando meios de cultivo seletivos, foi mais eficiente no isolamento de *Campylobacter* spp. do que a etapa de enriquecimento seletivo. Foi detectada a presença de *Campylobacter* spp. em 21 amostras (70%) analisadas, seis (28,57%) provenientes de abatedouros, oito (38,10%) em supermercados e sete (33,33%) em feiras livres. Dos 21 isolados dois (9,52%) foram identificados como *C. coli*, 18 (85,71%) como *C. jejuni* e um isolado teve, no período de sete dias, resultado inconclusivo pela bioquímica. A Duplex PCR confirmou, no período de 4 horas, os resultados da bioquímica para *C. coli* e identificou 19 (90,48%) *C. jejuni*. Os resultados obtidos permitem concluir que a implementação de métodos seguros e rápidos na detecção desse patógeno alimentar em carne de frango poderá contribuir para o aprimoramento de sistemas de segurança alimentares, devido ao seu impacto na saúde pública.

## ABSTRACT

During the last four decades, different species of *Campylobacter* spp. have been recognized as emerging pathogens and important agents of gastroenteritis from food source worldwide. In Brazil, health authorities are responsible for the surveillance of foods in order to preserve the health of the population. The aim of this study was to determine the proportion of thermophilic *Campylobacter* species among 30 chilled chicken carcasses samples purchased in the Rio de Janeiro City. Sample preparation and isolation of suspected *Campylobacter* spp. colonies were performed according to the protocols described in the Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, APHA. *Campylobacter* spp. confirmation was performed with the latex agglutination test and species differentiation was carried out through biochemistry tests and molecular approach. A Duplex-PCR approach has been proposed through amplification of 16S rRNA and oxidoreductase genes, for the detection of the genera *Campylobacter* and *C. jejuni* respectively. Direct plating of samples using selective culture media, was more efficient for the isolation of *Campylobacter* spp. than the selective enrichment step. We detected the presence of *Campylobacter* spp. in 21 samples (70%), six (28,6%) from slaughterhouses, eight (38,1%) from supermarkets and seven (33,3%) from street markets. Two (9,6%) out of 21 isolates were identified as *C. coli*, 18 (85,7%) as *C. jejuni* and one isolate showed after 7 days an ambiguous result by biochemical tests. Duplex PCR confirmed the biochemical results for *C. coli* and detected 19 (90,48%) *C. jejuni* after 4 hours. Our results suggest that the implementation of rapid and reliable methods for the detection of this food pathogen in poultry may contribute for the improvement of food surveillance systems and public health surveillance.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABEF - Associação Brasileira de Produtores e Exportadores de Frango  
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
APHA - American Public Health Association  
APT - Água Peptonada Tamponada  
ATCC - American Type Culture Collection  
BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*  
C – Citosina  
cAMP – Adenosina Mono Fosfato cíclico  
CARMA - Campylobacter Risk Management and Assessment  
CDC - Centro de Controle e Prevenção de Doenças  
CDT - Toxina Citoletal Distensiva  
CECAL - Centro de Criação de Animais de Laboratório  
CLO - *Campylobacter-like-organisms*  
CT - Toxina Colérica  
DNA - Ácido Desoxirribonucleico  
DNAc - DNA complementar  
DTA - Doenças Transmitidas por Alimentos  
EUA - Estados Unidos da América  
FAO - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura  
FBP - Sulfato Ferroso, Metabissulfito de Sódio e Piruvato de Sódio  
FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz  
*FoodNet* - Rede de Vigilância Ativa de Doenças Transmitidas por Alimentos  
G - Guanina  
fg - Fentograma  
*hip* - gene hipuricase  
INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
kDa - kilo Dalton  
kg - Kilograma  
LACEN - Laboratório Central de Saúde Pública  
Mb - Mega base  
mCCDA - Ágar Carvão Cefoperazone Desoxicolato modificado  
μL - Microlitro

mL - Mililitro  
mPCR - multiplex PCR  
NCBI - *National Center for Biotechnology Information*  
NCTC - National of Culture Type Collection  
ng - nanograma  
nt - Nucleotídeo  
OMS - Organização Mundial da Saúde  
ONU - Organização das Nações Unidas  
OPAS - Organização Pan-ameriacana de Saúde  
pb - Pares de bases  
PCR - Reação em cadeia pela polimerase  
pg - picograma  
pH - Potencial Hidrogeniônico  
PREBAF - Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frangos  
RDC - Resolução da Diretoria Colegiada  
rpm - rotação por minuto  
RNA - Ácido Ribonucléico  
rRNA - RNA ribossomal  
RT-PCR - *Reverse Transcriptase* - PCR  
SGB - Síndrome de Guillain Barré  
RT - transcriptase reversa  
UBABEF - União Brasileira de Avicultura/ Associação Brasileira de Produtores e Exportadores de Frango  
VNC - Viável, mas não cultivável  
WHO - World Health Organization

## LISTA DE FIGURAS, TABELAS E QUADROS

Figura 1.	Microscopia ótica de <i>Campylobacter</i> spp	6
Figura 2.	Nomenclatura de <i>Campylobacter</i>	7
Figura 3.	Representação esquemática dos genes de flagelina	16
Figura 4.	Representação esquemática do gene 16S rRNA	17
Figura 5.	Sequências dos “primers” C-1, C-3 e C-4	18
Figura 6.	Países exportadores de carne de frango	20
Figura 7.	Produção da catalase	26
Figura 8.	Produção da oxidase	26
Figura 9.	Aglutinação em Látex	27
Figura 10.	Hidrólise do Hipurato	28
Tabela 1.	Identificação Bioquímica	29
Quadro 1 .	Oligonucleotídeos e programas de amplificação	33
Figura 11.	Percentual de amostras positivas de acordo com a procedência.	36
Tabela 2.	Resultado da recuperação de <i>Campylobacter</i> spp.	37
Tabela 3.	Identificação bioquímica e molecular dos isolados	38
Figura 12.	DNA genômico das cepas de referência <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> e dos isolados	39
Figura 13.	DNA genômico da água de enxaguadura	39
Figura 14.	Amplificação pela PCR do gene <i>flaA</i>	40
Figura 15.	Amplificação pela PCR do gene <i>flaA</i>	40
Figura 16.	Amplificação pela PCR do gene <i>flaA</i>	41
Figura 17.	Amplificação pela PCR do gene <i>flaA</i>	42
Figura 18.	Amplificação pela PCR do gene <i>flaA</i> com DNA das cepas Padrão	42
Figura 19.	Amplificação por PCR do gene oxirredutase	43
Figura 20.	Duplex PCR para amplificação dos genes <i>flaA</i> e oxirredutase	43
Figura 21.	Duplex PCR com reação para amplificação dos genes <i>flaA</i> e oxirredutase	44
Figura 22.	Amplificação por PCR do gene <i>flaA</i> e do gene oxirredutase	45
Figura 23.	Amplificação por PCR dos genes 16S rRNA do gene <i>ceuE</i> e gene	45

*hipO*

Figura 24.	Duplex PCR - amplificação por PCR dos genes 16S rRNA e do gene Oxirredutase	46
Figura 25.	Especificidade da Duplex PCR - amplificação por PCR dos genes 16S rRNA e do gene Oxirredutase	47
Tabela 4.	Amplificação por PCR In sílico	48
Figura 26.	Sensibilidade da Duplex PCR	49
Figura 27.	Duplex PCR dos 21 isolados (DNA extraído por Kit)	50
Figura 28.	Duplex PCR dos 21 isolados (DNA extraído pela lise térmica)	50
Figura 29.	Confirmação da espécie das amostras 22 e 26	51

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA)</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2. <i>Campylobacter</i> spp.</b> .....	<b>4</b>
1.2.1. Histórico .....	4
1.2.2. Características do gênero <i>Campylobacter</i> .....	5
1.2.3. Campilobacteriose .....	8
1.2.4. Patogenicidade e Epidemiologia .....	10
1.2.5. Isolamento e identificação .....	12
<b>1.3. Dados da Produção Avícola</b> .....	<b>19</b>
<b>1.4. Relevância da Pesquisa para a Vigilância Sanitária</b> .....	<b>20</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
<b>2.1. Objetivo Geral</b> .....	<b>22</b>
<b>2.2. Objetivos específicos</b> .....	<b>22</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
<b>3.1. Obtenção das amostras</b> .....	<b>23</b>
<b>3.2. Recuperação de <i>Campylobacter</i> spp.</b> .....	<b>23</b>
<b>3.3. Testes presuntivos</b> .....	<b>25</b>
3.3.1. Morfologia por coloração de Gram .....	25
3.3.2. Produção de Catalase .....	25
3.3.3. Produção de Oxidase .....	26
<b>3.4. Teste Confirmativo</b> .....	<b>26</b>
3.4.1. Teste de Aglutinação em Látex .....	26
<b>3.5. Identificação bioquímica</b> .....	<b>28</b>
3.5.1. Teste da Hidrólise do Hipurato .....	28
3.5.2. Teste de susceptibilidade ao Ácido Nalidíxico e Cefalotina .....	29
3.5.3. Teste da Hidrólise do indoxil acetato .....	29
3.5.4. Interpretação das provas Bioquímicas .....	29
<b>3.6. Preservação dos isolados de <i>Campylobacter</i> spp.</b> .....	<b>30</b>
<b>3.7. Identificação Molecular</b> .....	<b>30</b>
3.7.1. Extração do DNA .....	30
3.7.2. Reações da PCR .....	32
<b>3.8. Análise Estatística</b> .....	<b>35</b>
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>36</b>
<b>4.1. Pesquisa de <i>Campylobacter</i> spp</b> .....	<b>36</b>
<b>4.2 Identificação fenotípica</b> .....	<b>37</b>
4.2.1 Testes presuntivos .....	37
4.2.2 Teste Confirmativo .....	38
4.2.3 Provas bioquímicas .....	38
<b>4.3 Identificação Molecular</b> .....	<b>39</b>
4.3.1 Extração do DNA .....	39
4.3.2 Amplificação pela PCR .....	40

<b>4.4. Análise Estatística .....</b>	<b>51</b>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>52</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>60</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>61</b>
<b>ANEXO 2 – SOLUÇÕES, REAGENTES E PRESERVAÇÃO .....</b>	<b>74</b>
<b>ANEXO 3 – ESQUEMA DE ANÁLISE .....</b>	<b>76</b>
<b>ANEXO 4 – ESPÉCIES E SUBESPÉCIES DE <i>Campylobacter</i> .....</b>	<b>78</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

Conforme expresso na Declaração Universal dos Direitos Humanos, a saúde é um direito inalienável de todo cidadão (ONU, 1948). Sendo assim, é fundamental a qualidade dos alimentos para manter o equilíbrio orgânico que representa um fator de resistência às doenças (GERMANO & GERMANO, 2001).

As doenças e os danos provocados por alimentos são, na melhor das hipóteses, desagradáveis e, na pior das hipóteses, fatais. Os surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) podem prejudicar o comércio e o turismo, gerando perdas econômicas, desemprego e conflitos (OPAS, 2006).

As mudanças nos hábitos alimentares, a diminuição do tempo para alimentação, o aumento populacional nas grandes cidades, dentre outros fatores, acarretaram um aumento na demanda dos alimentos, e conseqüentemente uma variedade cada vez maior de alimentos disponíveis no comércio (GERMANO & GERMANO, 2001). Como resultado, o número de DTA, tem aumentado consideravelmente em todo o mundo (FORSYTHE, 2002).

### **1.1. Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA)**

Somente no século XIX, obteve-se conhecimento das doenças alimentares produzidas por germes. Antigamente, relacionavam-se os alimentos contaminados com o seu estado de putrefação. Hoje, sabe-se que os alimentos contaminados com micro-organismos patogênicos podem ter aspecto, odor e sabor normais (BRASIL, 2005). O consumidor não está devidamente esclarecido ou consciente dos perigos envolvidos com os alimentos e não consegue identificar o que poderia estar contaminado em suas últimas refeições, tornando difícil rastrear os alimentos responsáveis por intoxicações alimentares ocorridas (FORSYTHE, 2002).

Doença transmitida por alimento é um termo genérico, aplicado a uma síndrome geralmente constituída de anorexia, náuseas, vômitos e/ou diarreia. As DTA são atribuídas à ingestão de água ou alimentos contaminados por bactérias, vírus, parasitas, toxinas, príons, agrotóxicos, produtos químicos e metais pesados. O quadro clínico das DTA depende, portanto, do agente etiológico envolvido podendo variar de um leve desconforto intestinal até quadros extremamente sérios, com desidratação grave, diarreia sanguinolenta, insuficiência renal aguda (síndrome hemolítica urêmica) e insuficiência respiratória (BRASIL, 2005).

A Resolução da Diretoria Colegiada número 12 de 02 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, que estabelece os padrões microbiológicos para alimentos destinados ao consumo humano, define doença transmitida por alimento, como sendo, aquela “causada pela ingestão de um alimento contaminado por um agente infeccioso específico, ou pela toxina por ele produzida, por meio da transmissão desse agente ou de seu produto tóxico” (BRASIL, 2001).

Mais de 250 diferentes tipos de DTA têm sido descritas e as mais conhecidas são: cólera; febre tifóide; botulismo; salmonelose; estafilococose; e colibacilose, sendo a campilobacteriose considerada uma DTA emergente (BRASIL, 2005).

As doenças microbianas de origem alimentar podem ser subdivididas em duas grandes categorias: intoxicações e infecções. As intoxicações alimentares são causadas pela ingestão de alimentos contendo toxinas microbianas pré-elaboradas. Estas toxinas são produzidas durante a intensa proliferação dos micro-organismos patogênicos, presentes no alimento. As infecções alimentares são causadas pela ingestão de alimentos contendo células viáveis de micro-organismos patogênicos que aderem à mucosa do intestino. Dependendo do patógeno envolvido, pode ocorrer a invasão da mucosa e penetração nos tecidos ou a multiplicação no trato intestinal com produção de toxinas que alteram o funcionamento das células intestinais. Entre as bactérias toxigênicas, incluem-se *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* enterotoxigênica, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens* entre outras (FRANCO & LANDGRAF, 2002).

Surtos de doenças causadas por bactérias patogênicas como *Salmonella*, *Campylobacter*, *E. coli*, *Listeria* e outras, têm um enorme impacto na Saúde Pública (HAGENS & LOESSNER, 2007). Nas últimas décadas tem sido descrito o aparecimento de novos patógenos, a reemergência de bactérias patogênicas antigas, assim como o aumento da resistência desses micro-organismos a agentes antimicrobianos. Esses fatos podem ser explicados pelas mudanças ocorridas nos procedimentos de produção de alimentos que atualmente apresentam consideráveis alterações, como mudanças nas práticas agrícolas, na criação de animais, nas novas tecnologias de produção e em novas técnicas de conservação de alimentos (SKOVGAARD, 2007).

Outros fatores comumente associados às DTA são: as mudanças das características demográficas de certas regiões, o crescente aumento das populações, a existência de grupos populacionais vulneráveis ou mais expostos, o

processo de urbanização desordenado, a necessidade de produção de alimentos em grande escala, os hábitos culturais, a exposição das populações a alimentos do tipo *fast-food*, o consumo de alimentos em vias públicas, o aumento no uso de aditivos, a mudança de hábitos alimentares, as mudanças ambientais, além do deficiente controle dos órgãos públicos e privados para manter a qualidade dos alimentos ofertados às populações (BRASIL, 2005). Segundo Skovgaard (2007), o surgimento de patógenos e a deterioração dos alimentos são resultados da soma de alterações na produção, práticas e manejos “do campo à mesa”.

De acordo com registros da OMS, 70% dos casos de diarreias se devem ao consumo de alimentos contaminados, causando doenças e até a morte. Essas doenças representam uma grave ameaça para a saúde, afetando principalmente as crianças, as mulheres grávidas e as pessoas da terceira idade. A cada ano milhões de crianças morrem por doenças diarreicas e muitas mais sofrem episódios frequentes de diarreia com efeitos de deterioração de seu estado nutricional (De WAAL, 2008).

A incidência global de DTA é de difícil estimativa, porém no ano de 2005 cerca de 1.8 milhões de pessoas morreram em consequência de doenças diarreicas atribuídas à contaminação de alimentos e água. Em países desenvolvidos cerca de 30% da população é afetada por DTA. Nos Estados Unidos, por exemplo, ocorrem cerca de 76 milhões de casos de DTA, resultando em 325.000 hospitalizações e 5.000 mortes a cada ano. Nos países em desenvolvimento existe uma sub-notificação de casos de DTA, o que torna difícil estimar o número de casos (WHO, 2002; BRASIL, 2005).

O perfil epidemiológico das doenças transmitidas por alimentos no Brasil ainda é pouco conhecido e carente, apenas alguns estados e/ ou municípios dispõem de estatísticas e dados sobre os agentes causadores das DTA, alimentos mais frequentemente envolvidos e fatores contribuintes (AMSON et al., 2006).

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), nos Estados Unidos, é o órgão responsável por gerir a Rede de Vigilância Ativa de Doenças Transmitidas por Alimentos (*FoodNet*). Esta Rede analisa as tendências nas notificações laboratoriais ao longo do tempo, usando como ponto de comparação os relatórios laboratoriais recebidos nos dois primeiros anos de operações, 1996–1998. A *FoodNet* realiza a vigilância de dez agentes patogênicos transmitidos por alimentos em dez estados americanos através de casos confirmados em laboratórios. Em

2009, foi identificado um total de 17.468 casos de infecções de origem alimentar confirmados em laboratório. Análises comparativas demonstraram um declínio na incidência de infecções causadas por *Campylobacter*, *Listeria*, *Salmonella*, *Escherichia coli* O157, *Shigella*, *Yersinia* e um aumento na incidência de infecções por vibrio (CDC, 2010a).

Segundo Germano & Germano (2001) os alimentos mais frequentemente relacionados com DTA são a carne bovina e de frango, responsáveis pela veiculação de clostrídios, estafilococos e enterobactérias. Isso porque os organismos que habitam os animais podem contaminar a carne durante o abate. Outro fator a ser considerado é o de que esses alimentos representam excelentes meios para o crescimento bacteriano, devido à variedade de nutrientes, à alta atividade de água, à baixa acidez (pH entre 5,5 e 7,0) e, muitas vezes, à estocagem em temperaturas inadequadas (FORSYTE, 2002).

Dados de países desenvolvidos apontam que dentre os patógenos alimentares em evidência, *Campylobacter* spp. tem sido o principal na maioria dos países europeus e nos Estados Unidos sendo as espécies *C. jejuni* e *C. coli* as mais frequentes. Na Inglaterra, *Campylobacter* spp. foi o micro-organismo detectado com maior frequência em infecções intestinais (FORSYTHE, 2002; MOORE et al., 2005; HAGENS & LOESSNER, 2007).

## **1.2. *Campylobacter* spp.**

### 1.2.1. Histórico

Em 1886 Escherich observou organismos em forma de espiral em amostras de fezes de crianças com diarreia, que ele chamou de “cholera infantum”. Em 1913, McFaydean & Stockman identificaram micro-organismos semelhantes a vibrios em episódios de aborto em ovelhas, posteriormente Smith (1918) identificou esses mesmos organismos semelhantes a vibrios também em tecido fetal de ovino e o denominou de *Vibrio fetus*. Jones et al. (1931) identificaram um vibrião microaerófilo, como o agente causal da disenteria invernal do bovino e o denominaram de *Vibrio jejuni*. Em 1944 Doyley descreveu um vibrião isolado do intestino de suínos com diarreia e o denominou *Vibrio coli*. Em humanos, Levy (1946) associou a diarreia no homem com a bactéria. Em 1947 o *Vibrio fetus* foi isolado do sangue de mulheres grávidas que apresentaram febre e aborto (Vinzent et al., 1947). As pesquisas

continuaram e em 1957, Elizabeth King descreveu o isolamento de um grupo de micro-organismos curvos, móveis e microaerófilos que a autora denominou “relacionados a vibriões” em amostras de sangue de crianças com diarreia aguda. Sébald e Veron (1963) propuseram a criação do gênero *Campylobacter* para incluir as bactérias antes denominadas *Vibrio*.

Na década de 70, com o desenvolvimento de técnicas apropriadas foi possível o isolamento de *Campylobacter*. Dekeyser et al. (1972) conseguiram isolar *Campylobacter* a partir de fezes de pacientes com enterite aguda, pela primeira vez em laboratório, através de um método de filtração com posterior inoculação em meios de cultura. Em 1977, Skirrow descreveu um meio de cultura seletivo com três antimicrobianos (vancomicina, trimetoprim e polimixina) que favoreceu o crescimento de *Campylobacter*. Em pouco tempo *Campylobacter* spp. foi estabelecido como um patógeno humano (ALTEKRUSE, et al.,1999), principalmente pela capacidade de produzir diarreia no homem (FERNANDEZ, 1992).

Nos anos 1980 houve uma explosão de informações sobre esta bactéria. Na edição de 1984 do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, o gênero *Campylobacter* era composto de apenas oito espécies e subespécies. A partir de então, os estudos de taxonomia e da importância clínica desse grupo têm aumentado o número de espécies associadas (NACHAMKIN, 2001).

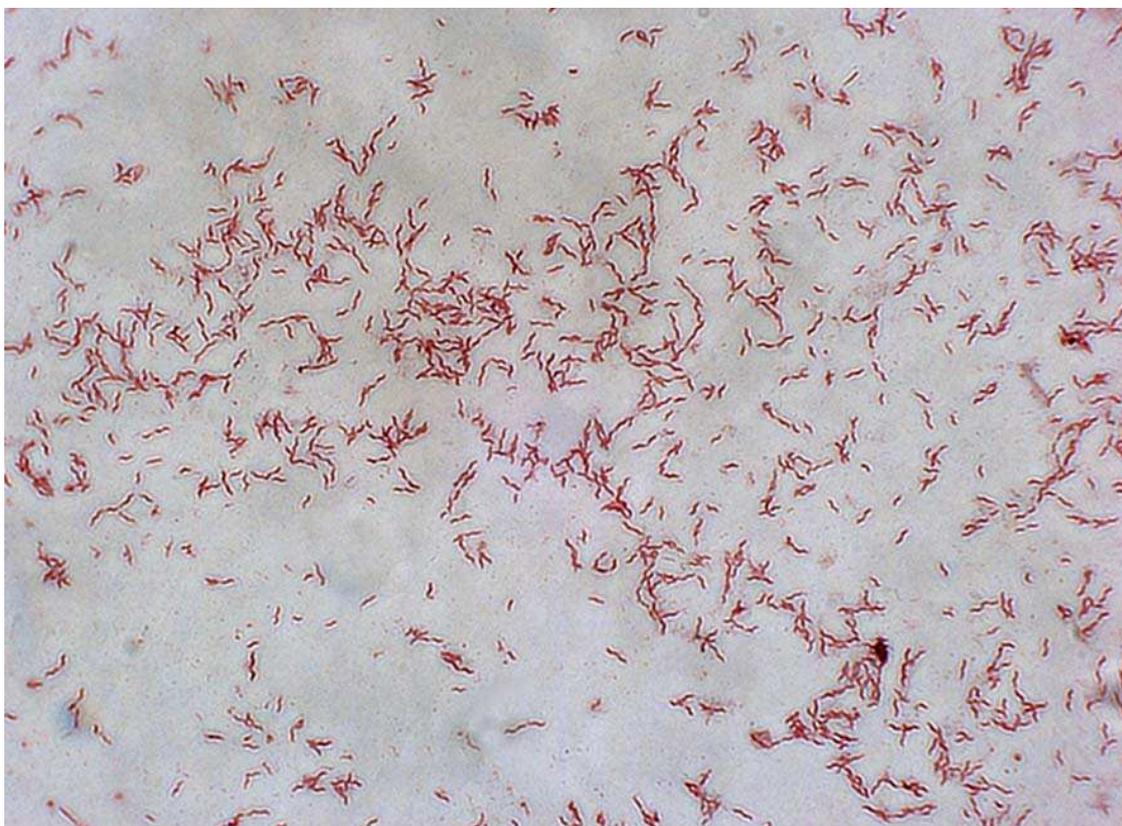
De acordo com atualizações de Euzéby, em 2008 o gênero *Campylobacter* era constituído de 26 espécies e 11 subespécies, aumentando em 2009 para 29 espécies e 13 subespécies, fechando em 2010 com 32 espécies e 13 subespécies, listados na tabela do anexo 4 (EUZEBY, 2008, 2009 e 2010).

### 1.2.2. Características do gênero *Campylobacter*

O gênero *Campylobacter* pertence à ordem *Campylobacterales* e à família *Campylobacteraceae*. É constituído de bastonetes delgados, curvos espiralados, gram-negativos, medindo 0,2 a 0,9 µm de largura e 0,5 a 5 µm de comprimento (Figura 1). Não formam esporos, não são hemolíticos, e possuem uma motilidade característica em forma de saca-rolha, produzida por um flagelo polar em uma ou ambas as extremidades da célula, que pode ser observado claramente em microscópio de contraste de fase ou campo escuro (NACHAMKIN, 2001). Produzem a enzima oxidase e não fermentam nem oxidam carboidratos, sua energia é obtida

pela utilização de aminoácidos e intermediários de quatro e seis carbonos do ciclo de Krebs. Podem ou não produzir a enzima catalase e por isso se dividem em dois grupos: catalase positiva e negativa (STERN, et al, 2001).

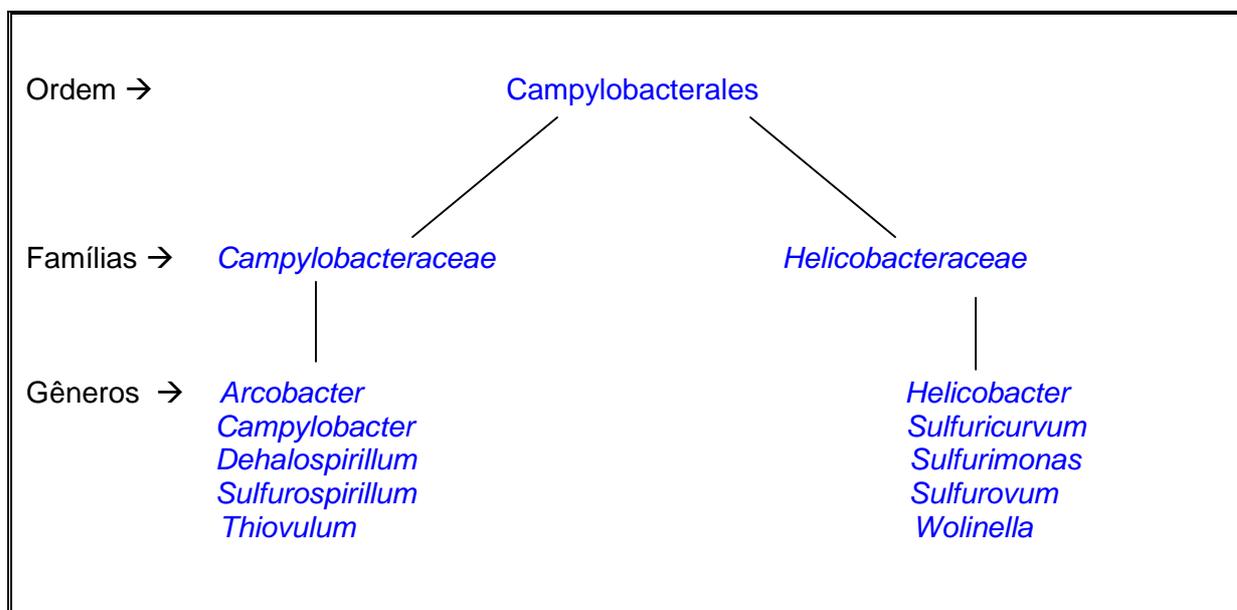
As espécies catalase-positiva estão mais associadas às doenças em humanos, entretanto, as espécies catalase-negativa como *C. upsaliensis* também podem causar patologias. A temperatura de crescimento de *Campylobacter* varia entre 25°C 43°C (STERN et al., 2001). *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* e *C. upsaliensis* representam o grupo de bactérias denominadas termofílicas, devido à temperatura ótima de crescimento oscilar entre 42°C e 43°C, sendo que *C. jejuni* e *C. coli* constituem as espécies mais frequentemente isoladas de enterites humanas (REES et al. 1995, MOORE et al. 2001).



**Figura 1.** Microscopia óptica de *Campylobacter* spp. Coloração de Gram: Bastonetes delgados Gram-negativos com formas típicas de *Campylobacter* spp. Aumento: 1000X. Fonte: [www.ensp.fiocruz.br/eventos\\_novo/dados/arq1518.ppt](http://www.ensp.fiocruz.br/eventos_novo/dados/arq1518.ppt)

Uma grande diversidade genotípica e fenotípica é observada entre as espécies. Todas as espécies de *Campylobacter* e os grupos taxonômicos relacionados pertencem ao mesmo grupo filogenético, nomeado superfamília VI de rRNA. Na atualidade, essa superfamília contém cinco gêneros: *Campylobacter*,

*Arcobacter*, *Helicobacter*, *Wolinella* e *Flexispira* (KONEMAM, 2001). Segundo Euzéby (2010) a família *Campylobacteraceae* contém os gêneros: *Arcobacter*, *Campylobacter*, *Dehalospirillum* e *Sulfurospirillum* e a família *Helicobacteraceae* os gêneros: *Helicobacter*, *Sulfuricurvum*, *Sulfurimonas*, *Sulfurovum*, *Thiovulum* e *Wolinella* (Figura 2).



**Figura 2.** Nomenclatura de *Campylobacter* spp. Fonte: Adaptado de J. P. Euzéby <http://www.bacterio.cict.fr/c/campylobacter.html>, Acesso em dez 2010.

*Campylobacter* é microaerófilo, porém algumas espécies podem crescer em anaerobiose e na presença de alguns substratos como nitrato, fumarato e alguns requerem a presença de hidrogênio (VARNAM, 1991). São sensíveis à dessecação, a altas condições de oxigênio e baixo pH (NACHAMKIN, 2001). São eliminados a 60°C por 10 minutos e inativados a 4°C. São sensíveis ao congelamento de alimentos, entretanto, através do congelamento rápido, as células sobreviventes podem permanecer viáveis por muitas semanas (FRANCO & LANDGRAF, 2002).

As células de *Campylobacter* respondem ao estresse causado pela presença de oxigênio, temperatura baixa ou falta de nutrientes, mudando a sua morfologia para formas cocóides, entrando num estado de viável, mas não cultivável (VNC) sendo incapazes de crescer em meios seletivos de isolamento, mas podendo ser transmitidas e causar infecção em humanos (CORRY et al., 1995; ALTEKRUSE, et al., 1999; FORSYTHE, 2002; LEE & NEWELL, 2006). Esta característica representa um perigo potencial à saúde pública e é de grande importância em microbiologia de alimentos, uma vez que um alimento depois de analisado pode ser classificado como

próprio para o consumo apesar de apresentar células desse patógeno que não foram previamente detectadas (FORSYTHE, 2002).

Hazeleger et al. (1994), conduziram um estudo para verificar se as formas VNC poderiam ser detectadas pela técnica da PCR. Eles concluíram que esta técnica foi capaz de confirmar células viáveis e não cultiváveis, provenientes de carne de frango, embora em diferentes níveis de detecção.

Análises moleculares de eletroforese em campo pulsado determinaram que o tamanho do genoma de *C. jejuni* e *C. coli* tem cerca de 1.7 Mb, correspondendo a um terço do tamanho do genoma da bactéria *E. coli*. A sequência genômica de *C. jejuni* NCTC 11168 foi completada, confirmando o tamanho de 1.642.481 pb, sendo 30,6% de Guanina (G) e Citosina (C) (NACHAMKIN, 2001).

### 1.2.3. Campilobacteriose

*Campylobacter* spp. foi reconhecido na década de 1970 como a principal causa de diarreia em humanos e o número de casos de gastroenterites causadas por *Campylobacter* spp. supera os casos de salmonelose na Inglaterra e nos Estados Unidos (ALTEKRUSE et al., 1999, STERN et al., 2001, SKOVGAARD, 2007).

A campilobacteriose no homem é causada por espécies termofílicas de *Campylobacter*, ou seja, aquelas que crescem a 42°C. A doença é caracterizada por diarreia aguda, dor abdominal e cólica podendo ocasionalmente ocorrer diarreia sanguinolenta contendo leucócitos e muco. Calafrios, náuseas e febre também representam uma sintomatologia da doença, mas os vômitos são raros (KONEMAM et al., 2001; FRANCO & LANDGRAF, 2002).

O desenvolvimento dos sintomas pode variar de acordo com a idade, o estado de saúde de cada indivíduo e da quantidade de alimento ingerida, portanto algumas pessoas infectadas podem não apresentar sintomas. O período de incubação varia de dois a cinco dias. Pessoas de todas as idades podem ser acometidas pela doença, porém a severidade é maior em crianças e jovens, assim como as hospitalizações são mais comuns nesta faixa etária (VARNAM & EVANS, 1991; KONEMAM et al., 2001 e FRANCO & LANDGRAF, 2002).

Um fator agravante na transmissão da doença é que pacientes convalescentes podem continuar excretando o micro-organismo nas fezes no período de duas semanas a um mês (KONEMAM et al., 2001).

Dados do CDC indicam que, pessoas do sexo masculino são mais acometidas pela doença do que as do sexo feminino e que essa patologia ocorre mais frequentemente nos meses de verão do que no inverno (CDC, 2010b). No Brasil, onde as estações do ano não são tão diferenciadas como nos Estados Unidos, o estudo conduzido por Oliveira et al. (2008) verificou que a estação do ano não interferiu no grau de contaminação por *Campylobacter* no ambiente de criação de frango de corte, mas que ela ocorre, principalmente, devido à adoção de padrões higiênico-sanitários deficientes nas diferentes fases de criação. Em pacientes com sistema imunológico comprometido, *Campylobacter*, ocasionalmente, se espalha pela corrente sanguínea e causa uma infecção grave com risco de vida, devido a sua capacidade invasiva (CDC, 2010b).

*Campylobacter jejuni* e *C. coli* são as espécies de maior importância como agentes de enfermidades em humanos e estão associadas a quadros de diarreia em decorrência da ingestão de alimentos imprópriamente manipulados ou mal cozidos. A grande maioria dos casos ocorre de forma isolada, com eventos esporádicos, não caracterizando um surto (NACHAMKIN, 2001, VARNAM & EVANS, 1991, CDC, 2010b).

A dose infectante de *C. jejuni* é baixa, podendo uma quantidade menor que 1000 células (a partir de 400 células) causar um quadro de campilobacteriose. A doença normalmente é autolimitante e tem a duração de dois a cinco dias, porém em alguns indivíduos os sintomas podem perdurar até o décimo dia de infecção. O quadro de campilobacteriose pode simular apendicite, devido às dores abdominais e levar indivíduos a cirurgias desnecessárias (NACHAMKIN, 2001, MOORE et al. 2005).

Infecções por *C. jejuni* podem levar a sérias consequências pós-infecciosas, dentre as quais se destaca a Síndrome de Guillain-Barré (SGB), que consiste em uma polineuropatia inflamatória desmielinizante, resultando em paralisia neuromuscular aguda (FERNANDEZ, 2005).

Estima-se que ocorra um caso de SGB em cada 1000 casos de campilobacteriose. Mais de 40% dos pacientes com SGB têm evidência de infecção recente por *Campylobacter* spp., podendo 5% chegar ao óbito. A Síndrome de Reiter é outra consequência decorrente da infecção por essa bactéria, que ocorre em cerca de 1% dos pacientes, 7 a 10 dias após o início da diarreia e se caracteriza por dor nas articulações que pode durar vários meses ou se tornar crônica (ALTEKRUSE et

al, 1999, STERN et al., 2001).

A vigilância ativa por meio da *FoodNet* indica que cerca de 13 casos de campilobacteriose para cada 100.000 habitantes são diagnosticados a cada ano nos Estados Unidos. Muitos casos não são diagnosticados ou não são notificados e a estimativa do CDC é de que a doença afete mais de 800 mil pessoas a cada ano com 119 mortes (CDC, 2010b; SCALLAN et al., 2011).

Após diagnosticada a infecção por *Campylobacter*, através de cultura de uma amostra de fezes com células do organismo, as pessoas infectadas se recuperam com hidratação, enquanto a diarreia persistir. Alguns antibióticos são administrados nos casos em que os sintomas perdurem por mais de uma semana em pacientes imunodeprimidos e em casos de septicemia. Geralmente são utilizados ciprofloxacina (fluoroquinolona), ácido nalidíxico (quinolona), azitromicina e eritromicina (macrolídeo) (ALTERKRUSE et al., 1999, CDC, 2010b). As tetraciclinas, particularmente, minociclina, também são eficazes, porém, o controle laboratorial se torna necessário, devido ao elevado número de cepas resistentes (VARNAM & EVANS, 1991).

#### 1.2.4. Patogenicidade e Epidemiologia

Bactérias do gênero *Campylobacter* são amplamente distribuídas na natureza e a maioria está apta a viver no trato intestinal de animais de sangue quente, sendo encontradas frequentemente em aves domésticas, bovinos, suínos, ovinos, roedores, pássaros, cães e gatos. Podem ser isoladas de água, leite, carnes, vegetais e moluscos (NACHAMKIN, 2001). Maier et al. (2003) relataram a presença de *C. jejuni* nas areias das praias da Urca e Vermelha no Rio de Janeiro, proveniente de material identificado como restos de fezes.

Os frangos são os maiores reservatórios dessas bactérias, sendo as espécies termofílicas mais associadas à doença em humanos, por suportar a temperatura do trato intestinal das aves, que é em torno de 41°C. A contaminação da carne de frango pode ocorrer durante o abate, sendo mais comum no escaldamento e na evisceração, quando há a possibilidade da transmissão de micro-organismos dos intestinos para a superfície das carcaças (CORTEZ et al., 2006). A maioria dos casos de infecção por *Campylobacter* é devido à ingestão de alimentos à base de frango mal cozido ou através da contaminação cruzada durante a manipulação de

alimentos crus contaminados (STERN et al., 2001; FORSYTHE, 2002, SKOVGAARD, 2007; RIZAL, 2010).

Alguns países têm desenvolvido projetos que visam estudos da avaliação de risco e meios para a redução de *Campylobacter*. O projeto *Campylobacter* Risk Management and Assessment (CARMA) desenvolvido na Holanda integra vários órgãos governamentais e indústrias (HAVELAAR, 2005). Considera-se que na Holanda ocorram 80.000 casos de campilobacteriose por ano (HUMPHREY et al., 2007).

No Reino Unido, dos pacientes hospitalizados devido a doenças de origem alimentar, 82% foram devido a quadros de campilobacteriose (ADAK et al., 2002). Em 2000 ocorreram aproximadamente 360.000 casos de infecções por *Campylobacter* spp. na Inglaterra e região de Gales (ADAK et al., 2002).

No Brasil, a ANVISA organizou em 2002 o Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frangos (PREBAF I), onde foram pesquisados *Salmonella* e *Enterococcus*. Está previsto para 2011 o início do PREBAF II onde será incluída a pesquisa de *Campylobacter* spp.

Acredita-se que a patogenicidade de *Campylobacter* seja multifatorial, a produção de toxinas é um desses fatores. *C. jejuni* produz uma enterotoxina termolábil, semelhante à toxina colérica (CT) e citotoxinas. *C. jejuni* também produz a toxina citoletal distensiva (CDT), que afeta as camadas das células epiteliais, causando progressiva distensão e morte em várias linhagens celulares (CHO, Vero, HeLa e HEp-2) pelo acúmulo intracelular dos níveis de Adenosina Mono Fosfato cíclico (cAMP). A atividade da toxina CDT é codificada pelos genes *cdt*, que, no caso de *C. jejuni*, consistem em três genes adjacentes denominados *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* (MARTINEZ et al., 2006). No estudo de Carvalho et al. (2010), quatro (4/11; 36,4%) estirpes de *C. jejuni* apresentaram os três genes (*cdtA*, *cdtB* e *cdtC*) codificantes da toxina citoletal distensiva (CDT) na multiplex-PCR, sendo três estirpes provenientes de frangos de hipermercados e uma de feira livre no município de São Paulo, SP. Diversos genes de virulência de *Campylobacter* já foram identificados, dentre eles estão os genes *flaA*, *cadF* e *racR* que são responsáveis pela expressão de aderência e colonização e *virB11* e *pldA* que ajudam na invasão (RIZAL, 2010)

Após a penetração na mucosa intestinal *C. jejuni* multiplica-se na lâmina própria (FRANCO & LANDGRAF, 2002). Ele coloniza a porção distal do íleo e cólon do trato intestinal humano. (FORSYTHE, 2002). A motilidade e quimiotaxia, processo

de locomoção de células em direção a um gradiente químico, são os principais fatores envolvidos no sucesso da colonização (VARNAM & EVANS, 1991). Após a colonização da mucosa e a aderência à superfície das células intestinais o micro-organismo altera o mecanismo de absorção das células epiteliais, por ação direta, pela invasão e produção de toxina, ou por ação indireta devido à resposta inflamatória. A produção da enzima catalase favorece a permanência da bactéria dentro da célula do hospedeiro protegendo-a do estresse oxidativo causado pelos lisossomos (FORSYTHE, 2002).

#### 1.2.5. Isolamento e identificação

O isolamento de *Campylobacter* melhorou significativamente desde a primeira técnica de membrana filtrante, no início dos anos 70, que utilizava meios ainda não seletivos (MOORE et al., 2005).

Estes organismos microaerófilos são mais exigentes e possuem crescimento mais lento do que outros enteropatógenos bacterianos e requerem condições especiais de crescimento, uma vez que são sensíveis ao oxigênio, característica que dificulta o seu cultivo (OYOFO et al., 1992). Três fatores são fundamentais para o seu isolamento: o uso de meios seletivos, a incubação em atmosfera de microaerofilia e a temperatura de 42°C no isolamento primário (TOTTEN et al., 1987, KUANA et al., 2008a).

O uso de suplementos como sulfato ferroso, metabissulfito de sódio e piruvato de sódio (FBP), aumenta a aerotolerância do micro-organismo através da redução dos componentes tóxicos derivados do oxigênio como peróxido de hidrogênio, oxigênio simples e íons superóxido. Muitos meios seletivos contêm alguns ou todos estes compostos em concentrações variadas (GEORGE et. al., 1978; CORRY et. al., 1995; KUANA et al., 2008a).

A adição de antibióticos aos meios de cultura é necessária para inibir a microbiota fecal competidora e favorecer o crescimento das bactérias do gênero *Campylobacter* (KUANA et al., 2008a).

A confirmação do gênero pode ser obtida submetendo colônias típicas a ensaios imunológicos como o teste de aglutinação em látex, que além da fácil execução, é considerado muito eficiente na caracterização de isolados de *Campylobacter* (STERN et al., 2001). Miller et al. (2008) avaliaram três kits de aglutinação em látex: o Pan-Bio-Campy, o Dryspot da Oxioid e o Microgem. Todos

eles apresentaram alta sensibilidade, porém o único kit que não reagiu com nenhuma bactéria de outros gêneros foi o Dryspot da Oxoid, apresentando maior especificidade.

Problemas com os métodos convencionais utilizados no isolamento clínico de *Campylobacter* muitas vezes resultam em incapacidade de recuperar e identificar esses organismos. Esta é uma preocupação especialmente durante investigações epidemiológicas que precisam de rápido diagnóstico para determinar a origem do surto (OYOFO et al., 1992; MARSHAL, et al., 1999, WANG, et al., 2002).

A identificação de bactérias isoladas de alimentos é feita através de suas características bioquímicas como atividades enzimáticas e utilização de carboidratos (OYOFO et al., 1992). Algumas dificuldades podem surgir devido à existência de linhagens atípicas bioquimicamente o que gera interpretações subjetivas em análises fenotípicas convencionais de *Campylobacter* (LINTON et al., 1996).

A diferenciação bioquímica de *Campylobacter jejuni* e *C. coli* é baseada na hidrólise do hipurato, uma vez que apenas o *C. jejuni* possui a enzima hipuricase. Apesar do gene que codifica esta enzima estar presente em *C. jejuni* existem algumas cepas que não expressam a enzima para esta reação, que tem como produtos finais o ácido benzóico e glicina. Portanto, o uso de técnicas moleculares se faz necessário para confirmação das espécies (TOTTEN et al., 1987, MILLER et al., 2009).

Em um estudo realizado por Totten et al. (1987), foram analisadas 593 amostras de carne de frango e de fezes de pessoas com diarreia. Os autores isolaram 98 cepas de *Campylobacter* sendo 52 hipurato positivo e 46 hipurato negativo. Destas 46 cepas hipurato negativo, 20% foram confirmadas como *C. jejuni*, 78% como *C. coli* e 2% como *C. lari* por caracterização genotípica.

#### 1.2.5.1. Técnicas moleculares

Os avanços da biologia molecular e genética têm revolucionado a microbiologia de alimentos (HARTMAN, 2001). Ensaio baseado em ácidos nucléicos como, por exemplo, a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) tem sido desenvolvida para detecção de patógenos em alimentos, inclusive para espécies de *Campylobacter*. A PCR foi desenvolvida por Kary Mullins em 1985, esta técnica consiste na amplificação de pequenos fragmentos de DNA (*primers*) através da

hibridização de uma sequência alvo (molde) utilizando a enzima *Taq* polimerase em um aparelho denominado termociclador. A PCR é uma poderosa ferramenta que permite amplificar uma única cópia de DNA em milhões de vezes em menos de duas horas (OYOFO et al., 1992; FENG, 2001, KREUZER & MASSEY, 2002).

O emprego da PCR oferece uma alternativa aos métodos bioquímicos tradicionais na identificação e diferenciação de espécies de *Campylobacter*, sendo um método preciso e simples de executar, diminuindo o tempo de diagnóstico e aumentando a sensibilidade na detecção de sequências específicas de DNA. Esta técnica permite o diagnóstico rápido de *Campylobacter* em alimentos contaminados, possibilitando que medidas de controle possam ser tomadas em um tempo menor (KIRK & ROWE, 1994; WINTERS et al,1995; LINTON, 1996, HARMON, 1997, MOORE et al, 2005; AÇIK & ÇETINKAYA, 2006).

Andrade et al., (2010) em seu estudo sobre comparação de métodos de diagnóstico para patógenos em alimentos, concluiu que, técnicas mais precisas são cada vez mais necessárias para melhor elucidação de surtos. As metodologias convencionais, envolvendo os métodos analíticos oficiais, são bastante utilizadas. Entretanto, as técnicas moleculares estão sendo cada vez mais adotadas em complementação as técnicas tradicionais com o objetivo de proporcionar resultados precisos em menor tempo na detecção de patógenos alimentares, bem como em laboratórios de pesquisas e de análises clínicas.

Dentre as técnicas moleculares fundamentadas na PCR podemos destacar a RT-PCR (*Reverse Transcriptase - PCR*), desenvolvida para amplificar DNA obtido por meio da transcrição reversa de RNA. Para isto, primeiramente, o RNA é convertido em DNA complementar (DNAc) pela ação da enzima transcriptase reversa (RT) e o DNAc é amplificado por PCR. Esta técnica pode ser utilizada na análise de expressão de genes (de virulência e/ou produção de toxinas) em alimentos, possui ampla aplicação para o estudo de RNA viral, sendo utilizado para detecção de norovírus em alimentos (GANDRA et al., 2008).

Outra técnica molecular de interesse para o diagnóstico de micro-organismos de importância em alimentos é a multiplex PCR (mPCR), que utiliza mais de um par de *primers* na mesma reação, possibilitando a amplificação simultânea de diferentes sequências de DNA. Esta técnica pode ser utilizada para amplificar, de modo simultâneo sequências alvo de diferentes micro-organismos patogênicos em uma única reação, tendo potencial para ser utilizada na rotina laboratorial (KONEMAN et

al., 2001; GANDRA et al., 2008).

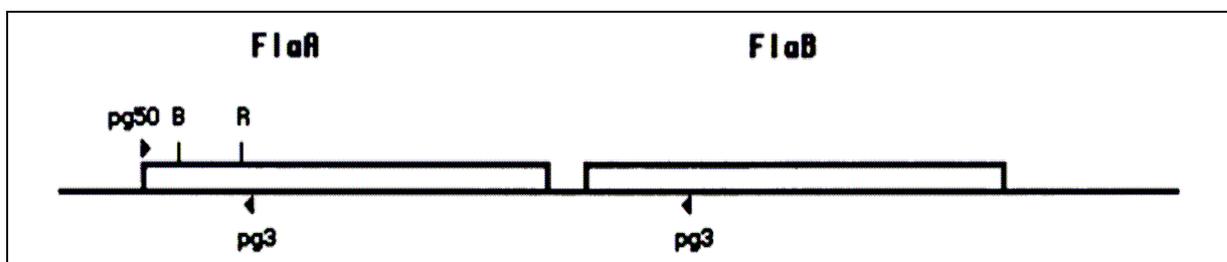
Uma limitação da PCR tradicional está na característica qualitativa desta técnica limitando-a para estudos quantitativos. Uma alternativa para essa limitação é a utilização da PCR em tempo real (*Real Time PCR*). Esta metodologia possibilita monitorar a síntese dos produtos da amplificação no decorrer da reação utilizando sondas químicas fluorescentes. A PCR em tempo real elimina riscos de contaminação, pois esta reação ocorre em um sistema fechado, não havendo também a necessidade de eletroforese para visualização das amplificações (RODRÍGUEZ-LÁZARO et al., 2007; GANDRA et al., 2008).

Pesquisas direcionadas para melhorar a segurança dos alimentos explorando novos métodos e tecnologias têm sido desenvolvidas. Hagens e Loessner (2007) desenvolveram uma técnica que utiliza bacteriófagos para eliminar bactérias específicas em alimentos. A especificidade dos bacteriófagos os torna candidatos ideais destinados a aumentar a segurança alimentar durante o processo de produção, já que são inimigos naturais das bactérias, e podem ser utilizados como controle biológico sem interferir na microbiota natural. Além disso, os fagos também podem ser usados para detectar a presença de patógenos indesejáveis nos alimentos ou ambientes de produção, permitindo a identificação rápida e específica de células viáveis (HAGENS E LOESSNER, 2007).

### **Gene *flaA***

Um dos genes muito utilizados em análises de detecção e identificação de *C. coli* e *C. jejuni* é o gene *flaA* que codifica a proteína flagelina. O flagelo é um fator de virulência na adesão e subsequente colonização do *Campylobacter* no trato gastrointestinal. Mutações nos genes flagelares podem impedir a habilidade de *Campylobacter* de localizar o trato intestinal dificultando a adesão e colonização dos mesmos (HARMON et al, 1997). O flagelo de *C. jejuni* e *C. coli* é formado por duas subunidades de flagelina codificadas pelos genes *flaA* e *flaB*. Estes genes foram clonados e sequenciados, e foi verificada a presença de regiões variáveis e outras altamente conservadas entre *C. jejuni* e *C. coli*, o que possibilitou a identificação das duas espécies (THORNTON et al., 1990). Oyofe et al. (1992) desenvolveram um método baseado na PCR para detecção de *C. coli* e *C. jejuni* em espécimens clínicos ensaios de rotina. Para isso, eles utilizaram os iniciadores Pg3 e Pg50 complementares a regiões conservadas do gene *flaA* dessas duas espécies. O

iniciador Pg50 também possui região complementar no gene *flaB*. Com isso, uma única reação é capaz de detectar a presença dos genes *flaA* e *flaB*. A especificidade dos iniciadores foi avaliada frente a outros CLO (*Campylobacter-like-organisms*) que não apresentaram amplificação e foram considerados específicos para detecção de *C. coli* e *C. jejuni* (Figura 3).



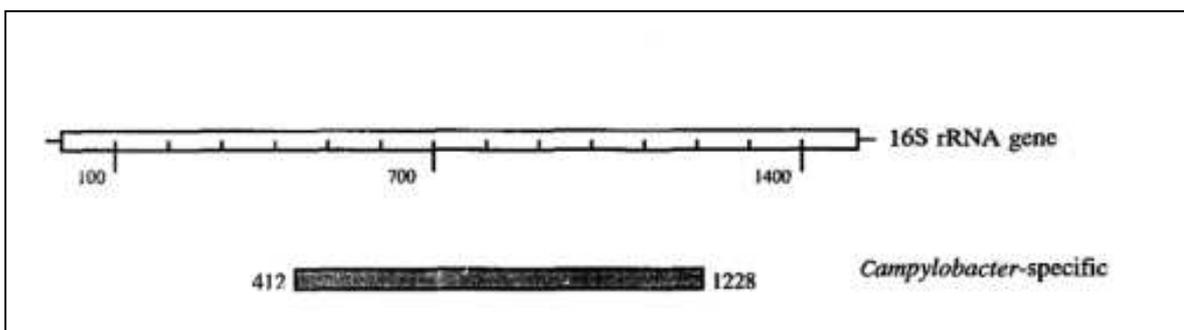
**Figura 3.** Representação esquemática dos genes de flagelina (*flaA* e *flaB*) de *C. coli* VC167. As posições de ligação dos *primers* estão indicadas. Sítios de restrição indicados são: **B**, *Bg*/II; **R**, *Eco*RI. A região entre este 2 sítios de restrição representa um fragmento de 273 pb. **Fonte:** OYOFO et al, 1992.

Harmon et. al. (1997) desenvolveram um estudo onde foram utilizados os iniciadores Pg3 e Pg50, desenhados por Oyoyo et. al. (1992), para amplificar o gene *flaA* presente em *C. jejuni* e *C. coli*. O produto da PCR resultou em uma banda de 460 pb presente em *C. jejuni* e *C. coli*. Para testar a especificidade destes iniciadores, foi realizada a amplificação por PCR com DNA de 70 cepas de referência. Foram observados no gel fragmentos para *C. coli* e *C. jejuni*, bem como para uma cepa de *C. curvus*, uma cepa de *C. helveticus* e uma cepa de *C. hyoilei*, que não são termofílicas e não se relacionam com as doenças diarreicas em humanos. Não foram observados fragmentos das outras cepas testadas, o que comprovou a especificidade dos iniciadores.

### Gene 16S rRNA

Análises baseadas no gene 16S rRNA (RNA ribossomal) oferece uma alternativa na identificação das espécies de *Campylobacter* (GORKIEWICZ et al., 2003). Linton et al (1996) desenvolveram uma técnica de PCR específica para *Campylobacter*, onde as sequências de nucleotídeos do gene 16S rRNA foram testadas com *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Arcobacter* e *Wolinella*. Simultaneamente, regiões específicas de cinco espécies do gênero *Campylobacter* (*C. upsaliensis*, *C. helveticus*, *C. fetus*, *C. hyointestinalis* e *C. lari*) de importância em

alimentos foram identificadas a partir de iniciadores específicos, validados contra outras estirpes representantes de organismos relacionados com *Campylobacter* (CLO). As regiões conservadas e identificadas em todas as espécies de *Campylobacter* ocorreram entre os nucleotídeos 412-430 e 1211-1128, regiões onde foram desenhados os iniciadores denominados de C412F com 19nt (nucleotídeo) e uma sequência reversa complementar C1228R com 18nt, respectivamente (Figura 4).

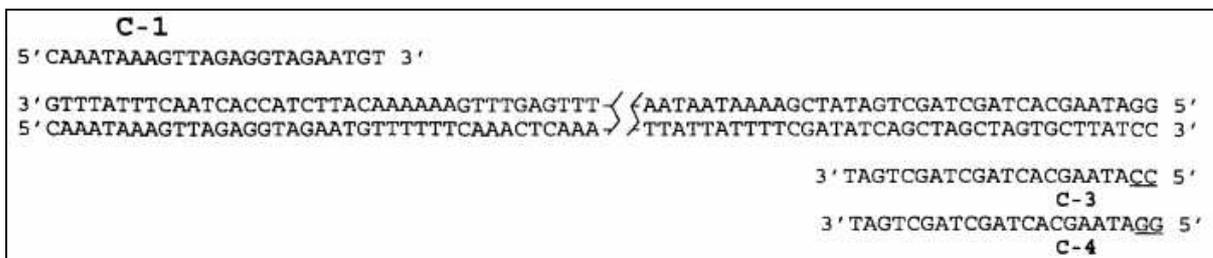


**Figura 4.** Representação esquemática do gene 16S rRNA e do amplicon específico para *Campylobacter* spp. Fonte: Linton et al., 1996.

### Gene da Oxirredutase

O gene da Oxirredutase tem sido utilizado na confirmação de *C. jejuni* através da Reação em Cadeia pela Polimerase. Muitos pesquisadores se referem a este gene como “não definido” específico para *C. jejuni* (HARMON et al., 1997, MISAWA et al., 2002, VILARDO et al., 2006, MILLER et. al., 2009). Em 2005 Nayak et al sequenciaram este gene “não definido” específico para *C. jejuni* e a sequência de nucleotídeos obtida foi comparada em banco de dados utilizando o programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) do *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*. Os autores verificaram 72% de similaridade com o gene que codifica uma subunidade da oxirredutase de *C. jejuni*.

Os iniciadores para a amplificação do gene da oxiredutase foram primeiramente desenhados por Wang et al. (1992) sendo denominados de C1 e C3. Winters & Slavik (1995), ao realizarem um estudo sobre a avaliação de método para detecção rápida de *C. jejuni* fizeram uma modificação nos dois últimos nucleotídeos da extremidade 5' do iniciador C-3 que originalmente continha duas citosinas (CC) colocando em seu lugar duas guaninas (GG). Eles então chamaram este iniciador de C4 (Figura 5).



**Figura 5.** Sequências dos “primers” C-1, C-3 e C-4 usados para amplificar o gene da oxirredutase de *C. jejuni*. Os nucleotídeos CC na região 5' no C-3 substituídos por GG em C-4 estão sublinhados. Fonte: Winters & Slavik, 1995.

No estudo de Harmon et al, (1997) foram utilizados os iniciadores C1 e C4 que geraram fragmentos de 160 pb presente em *C. jejuni*. Foi comprovada a especificidade destes iniciadores, frente à amplificação do DNA de 70 cepas de referência de *Campylobacter*, *Arcobacter* e *Helicobacter*. Os iniciadores C1 e C4 amplificaram fragmentos de 160 pb somente com cepas de referência de *C. jejuni*.

### Gene *ceuE*

O gene *ceuE* codifica uma lipoproteína de 34,5 a 36,2 kDa envolvida no sistema de transporte de sideróforos, uma vez que a aquisição de ferro é um aspecto crucial na infectividade, esse sistema parece ser importante na virulência de *C. jejuni* e *C. coli* (GONZALEZ et. al., 1997). As sequencias do gene *ceuE* de *C. coli* e *C. jejuni* possuem 86,9% de similaridade o que permitiu o desenho de iniciadores espécie específicos. A especificidade dos iniciadores foi determinada frente as seguintes espécies: *C. fetus* subespécie *fetus*, *C. fetus* subespécie *veneralis*, *C. lari*, *C. consisus*, *C. hyointestinalis*, *C. upsaliensis* e *C. sputorum*, que não apresentaram produtos de amplificação. Desta forma, os autores concluíram que o método proposto é uma boa alternativa para identificação e diferenciação *C. jejuni* e *C. coli* em ensaios clínicos de rotina e estudos epidemiológicos.

Cuomo et al. (2007) utilizaram os iniciadores COL1 e COL2 para avaliar a presença de *Campylobacter* termotolerantes em avestruzes e obtiveram um isolamento de 40 % em amostras de *swabs* cloacais.

### Gene da Hippuricase (*hip*)

A enzima hippuricase (N-benzoylglycine amidohidrolase) está presente apenas em *C. jejuni*, embora algumas variantes não expressem esta enzima. A hippuricase atua clivando o ácido hipúrico (N-benzoylglycine) produzindo glicina e

ácido benzóico (HANI & CHAN,1995).

Hani & Chan (1995) desenvolveram uma sonda de DNA a partir da clonagem do gene *hip* que codifica a enzima hippuricase. Esta sonda hibridizou com o DNA genômico de todas as cepas de *C. jejuni* testadas, incluindo 11 cepas que apresentaram resultado negativo no teste do hipurato. Foi verificado que o gene da hippuricase consiste de um único fragmento de 1149 pb que codifica um polipeptídeo de 383 aminoácidos.

Linton et al., (1997) desenharam um iniciador denominado HIP 400F para anelar nos nucleotídeos 400 a 418 da sequência do gene *hip* e um outro “reverse” denominado HIP1134R para anelar aos nucleotídeos 1112 a 1134. Um fragmento de 735 pb foi gerado apenas nas cepas de *C. jejuni* analisadas.

### **1.3. Dados da Produção Avícola**

A carne de frango é rica em proteínas e aminoácidos essenciais, sendo o peito sem pele, o corte que apresenta o maior índice dessas substâncias. Além disso, também é fonte importante de vitaminas do complexo B e minerais, como ferro, potássio, zinco e magnésio (UBABEF, 2010).

De acordo com estudo da FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura – a carne de frango custa, em geral, menos da metade do preço da carne bovina. Em 2008, a média de preço da carne de frango era de US\$ 1,8/kg, enquanto a carne suína era de US\$ 3,1/ kg e a bovina chegava a custar mais de US\$ 4,5/kg (UBABEF, 2006).

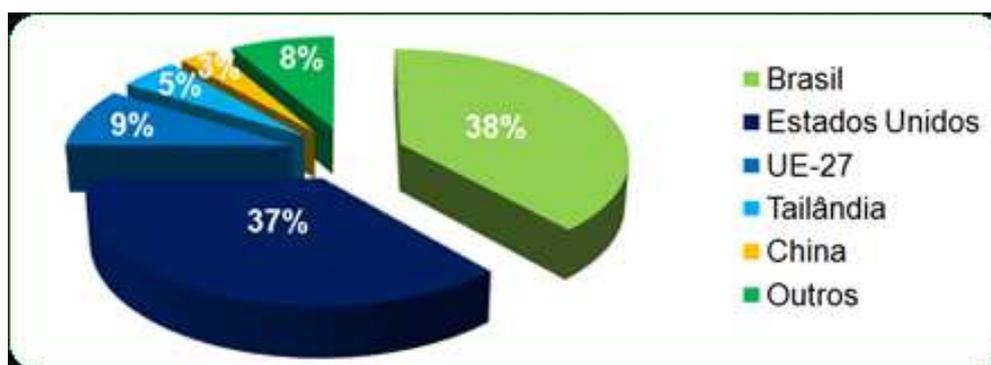
O Brasil é uma potência mundial na criação de frangos de corte e na exportação de carne de aves e, ainda, possui um status sanitário de excelência por ser um país livre de doenças como Newcastle e influenza aviária (FONSECA, 2006). A média per capita de consumo de carne de frango no Brasil foi de 44 kg em 2010. Isso equivale à média de países desenvolvidos como os EUA e União Européia, contribuindo para uma alimentação rica e saudável para o povo brasileiro (UBABEF, 2010).

A produção brasileira de carne de frango chegou a 12,230 milhões de toneladas em 2010, com um crescimento de 11,38% em relação a 2009, quando foram produzidas 10,980 milhões de toneladas. Com este desempenho o Brasil se aproxima da China, hoje o segundo maior produtor mundial, cuja produção de 2010 teria somado 12,550 milhões de toneladas, abaixo apenas dos Estados Unidos, com

16,648 milhões de toneladas, conforme projeções do Departamento de Agricultura dos EUA (UBABEF, 2010).

A avicultura brasileira representa hoje 1,5% do PIB, gerando cinco milhões de empregos diretos e indiretos e mais de US\$ 7 bilhões apenas em exportações. Do total de carne de frango produzida, 70% são destinadas ao mercado doméstico e os 30% restantes são embarcados para mais de 150 países (UBA, 2009).

As exportações de carne de aves (frango, peru, pato, ganso e outras) totalizaram 3,981 milhões de toneladas, correspondendo a uma receita de US\$ 7,244 bilhões. No caso da carne de frango foi registrado um novo recorde histórico nos volumes, com embarques de 3,819 milhões de toneladas. Com esse resultado o Brasil permanece na posição, conquistada em 2004, de maior exportador mundial de carne de frango (UBABEF, 2010). A figura 6 ilustra os maiores exportadores de carne de frango.



**Figura 6.** Países exportadores de carne de frango.  
Fonte: USDA, 2009

#### 1.4. Relevância da Pesquisa para a Vigilância Sanitária

É de competência dos órgãos normatizadores e dos serviços de Vigilância Sanitária assegurar os direitos do consumidor, cumprindo as determinações legais e garantindo que os alimentos à venda sejam seguros em todos os aspectos, de forma a preservar a saúde do consumidor (MARINS, 2004).

Sendo assim, a Vigilância Sanitária visa minimizar os riscos e assegurar a saúde da população através de ações tais como: controle na fonte; controle do desenvolvimento e do processo dos produtos; boas práticas higiênicas durante a

produção, processamento, manipulação, distribuição, estocagem, venda, preparação, utilização e abordagem preventiva, uma vez que a efetividade dos testes microbiológicos de produtos finais é limitada (FORSYTHE, 2002).

A legislação brasileira que determina os padrões microbiológicos para alimentos, Resolução RDC Nº 12 de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), não contempla *Campylobacter* spp. como critério microbiológico. Diante da não obrigatoriedade, poucos são os laboratórios brasileiros envolvidos no controle microbiológico de alimentos que possuem metodologia de detecção de *Campylobacter* spp. implantada na sua rotina.

Neste contexto, o INCQS tem como função assessorar os laboratórios da Rede Nacional de Laboratórios Oficiais de Controle de Qualidade em Saúde (LACEN), na implantação de metodologias, auxiliando assim no aprimoramento da capacidade analítica desses laboratórios.

A capacitação do INCQS na pesquisa e identificação de *Campylobacter* na área de Microbiologia de Alimentos não só permitirá o assessoramento aos LACEN, na implantação desta metodologia, como auxiliará no suporte às ações de controle e fiscalização sanitária de alimentos no país.

Os resultados obtidos neste estudo poderão subsidiar propostas da inclusão de pesquisa de *Campylobacter* em futuras revisões da Legislação que estabelece os padrões microbiológicos para o controle de qualidade de alimentos no Brasil.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Pesquisar a presença de *Campylobacter* spp. em amostras de frango resfriado e identificar as espécies termofílicas por técnicas fenotípicas e moleculares

### 2.2. Objetivos específicos

- Comparar a eficiência de isolamento de *Campylobacter* spp. em meio de cultura Bolton nas concentrações simples e dupla e por plaqueamento direto em mCCDA e C. Cefex;
- Identificar fenotipicamente os isolados termofílicos de *Campylobacter* spp. através de caracterização bioquímica convencional;
- Comparar a extração de DNA genômico dos isolados por kit comercial e pelo método da lise-térmica;
- Certificar a identificação bioquímica dos isolados através da amplificação pela PCR utilizando os genes *flaA* e Oxirredutase;
- Desenvolver a duplex PCR para detecção simultânea de *C.jejuni* e *C. coli* isoladas de carne de frango resfriada;
- Verificar diferenças entre as amostras analisadas a partir de três locais de coleta através de análise estatística.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Obtenção das amostras

Foram adquiridas trinta amostras de carcaças resfriadas de frango, de diferentes marcas comerciais oferecidas para consumo no Município do Rio de Janeiro, no período de julho de 2009 a julho de 2010. A coleta foi realizada no dia anterior ou no mesmo dia da análise, em três tipos de estabelecimentos comerciais: supermercados ( $n=10$ ), feiras livres ( $n=10$ ), abatedouros com inspeção estadual ( $n=4$ ) e sem inspeção ( $n=6$ ). As amostras encontravam-se, no momento da coleta, dentro das especificações (temperatura, validade, embalagem) estabelecidas pela legislação vigente para este tipo de produto, Resolução RDC nº 259 de 20/09/2002 (BRASIL, 2002), com exceção das amostras de abatedouros sem inspeção que eram abatidas na hora e as adquiridas em feiras livres, que não possuíam rotulagem nem refrigeração no momento da coleta.

As amostras foram transportadas em recipiente isotérmico contendo gelo e mantidas entre 2 - 8°C até o momento da análise.

O processamento das amostras e a identificação fenotípica foram realizados no Setor de Alimentos e a identificação genotípica foi realizada no Setor de Bactérias de Referência, pertencentes ao Departamento de Microbiologia do INCQS/FIOCRUZ.

A pesquisa de *Campylobacter* spp. foi realizada de acordo com a metodologia descrita no capítulo 31 do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* – APHA (STERN et al., 2001).

#### 3.2. Recuperação de *Campylobacter* spp.

**Enxaguadura da amostra:** Após a assepsia da embalagem com gaze embebida em solução de álcool a 70 %, foi realizada a pesagem em balança Mettler Mod. PB 3001 ( $e=0,1g$ ,  $d=10mg$ ,  $mín=0,5g$  e  $Max=3100g$ ). A amostra foi transferida para saco plástico estéril e foi adicionado um volume de 400 mL de Água Peptonada Tamponada-APT (Anexo 2). Foi utilizada a técnica da enxaguadura através de movimentos de fricção com as mãos por aproximadamente 1 minuto. O caldo da enxaguadura foi transferido para um erlenmeyer estéril com capacidade de 500 mL.

**Plaqueamento direto:** Para o plaqueamento direto uma alçada do caldo da enxaguadura foi semeada na superfície de duas placas de agar carvão cefoperazone desoxicolato modificado - mCCDA (OXOID®) com suplemento (SR0155E-OXOID®) e agar Campy cefex suplementados (Anexo 2), em forma de “T” (GEORGE et al.,1978). Foi transferido 1 mL do caldo da enxaguadura e adicionado em 9 mL de APT em tubo de ensaio estéril para o preparo da diluição  $10^{-1}$ . Alíquotas de 100  $\mu$ L do caldo da enxaguadura e do tubo da diluição  $10^{-1}$  foram dispensadas na superfície de duas placas de cada meio descritos acima e espalhadas com auxílio de alça de Drigalsky caracterizando as diluições  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$  respectivamente.

**Enriquecimento seletivo:** Para esta etapa um volume de 25 mL do caldo da enxaguadura foi transferido para uma garrafa de vidro temperado com tampa de rosca com capacidade de 100 mL contendo 25 mL de caldo Bolton (OXOID®) em dupla concentração. Outro volume de 5 mL foi transferido para um volume de 45 mL de caldo Bolton (OXOID®) em concentração simples. Os meios citados foram previamente enriquecidos com 0,5 mL e 0,45 mL, do suplemento para caldo Bolton (Anexo 1) e 2,5 mL e 2,25 mL de sangue lisado de cavalo (Anexo 2), respectivamente.

**Incubação:** As placas semeadas foram colocadas em posição invertida em jarra de anaerobiose juntamente com as garrafas contendo os meios de cultura, com as tampas levemente afrouxadas. Foi utilizado o gerador de microaerofilia CampyGen™ (OXOID®) ou Anaerocult C (MERCK®). A incubação foi a  $42^{\circ}\text{C} \pm 2$  por 48 horas.

**Plaqueamento após enriquecimento seletivo:** Após o período de incubação, sem homogeneizar, uma alçada das garrafas contendo caldo Bolton simples e em dupla concentração foi semeada, por esgotamento em “T”, na superfície de duas placas de agar mCCDA e agar Campy Cefex. A incubação foi feita nas mesmas condições descritas no item anterior.

Todas as etapas foram realizadas com as cepas de *Campylobacter jejuni* INCQS 00262 (ATCC 33560) - controle positivo e *Escherichia coli* INCQS 00033 (ATCC 25922) - controle negativo, obtidos da coleção de microrganismos do INCQS.

**Seleção das colônias.** O aspecto das colônias foi comparado com o crescimento da cepa de referência de *C. jejuni* INCQS 00262 (ATCC 33560) semeada. As colônias de *Campylobacter* apresentam um brilho d'água de aspecto espreado.

Nota: Na ausência de pureza, uma alçada do crescimento foi semeada por esgotamento na superfície de gar Columbia contendo 5% de sangue desfibrinado de carneiro, solução de antibióticos (cefalotina, lactato de trimetoprim, vancomicina, cicloheximida e colistina), solução de sulfato ferroso, metabissulfito de sódio e piruvato de sódio (FBP), obedecendo à forma "T", incubada a 42°C ± 2 por 48 horas em atmosfera de microaerofilia na tentativa de obtenção de um crescimento puro.

### 3.3. Testes presuntivos

#### 3.3.1. Morfologia por coloração de Gram

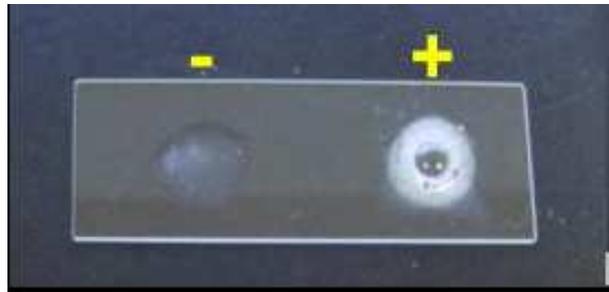
De cada crescimento suspeito ou colônia isolada foi preparado esfregaço em lâmina e corado pelo método de Gram. A característica morfotintorial das células foi observada ao microscópio ótico. As bactérias do Gênero *Campylobacter* aparecem como bastonetes Gram negativos delgados e extremamente pequenos, em forma de vírgula, de "S" ou lembrando asas de gaivotas (Figura 1).

Nota: Do crescimento em que se confirmou a morfologia celular na coloração de Gram, uma alçada foi repicada por estriamento para outra placa de agar mCCDA ou Campy Cefex, a fim de se obter um maior crescimento para a realização das provas da catalase e oxidase, testes confirmativos e identificação bioquímica.

#### 3.3.2. Produção de Catalase

Com o auxílio de uma alça bacteriológica foi transferida uma porção do crescimento da cultura para a superfície de uma lâmina de vidro limpa e seca, foi adicionada ao crescimento uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%. A produção de bolhas de gás no período de até 30 segundos, caracterizou o teste como positivo (Figura 7). De acordo com a Norma Internacional de Procedimentos ISO 10272-1:2006.

Obs: este teste não deve ser realizado a partir de meio de cultura contendo sangue, pois pode dar resultado falso positivo, pela presença de oxigênio.



**Figura 7.** Produção da catalase.

### 3.3.3. Produção de Oxidase

Um pedaço de papel de filtro foi colocado em uma placa de Petri estéril e com o auxílio de um palito de madeira também estéril foi colocada uma porção do crescimento bacteriano e adicionadas duas gotas da solução a 1% do reagente oxalato de para-amino-dimetilanilina (MERCK®). O aparecimento de uma coloração púrpura em 10 a 20 segundos foi considerado positivo (Figura 8). Bactérias do Gênero *Campylobacter* produzem a enzima oxidase. (Norma Internacional de Procedimentos ISO 10272-1:2006).



**Figura 8.** Produção da oxidase

## 3.4. Teste Confirmativo

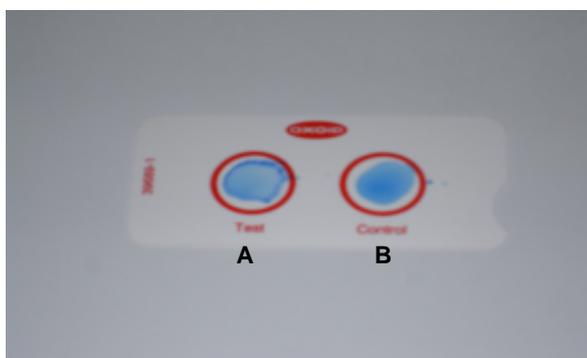
### 3.4.1. Teste de Aglutinação em Látex

Do crescimento que confirmou a morfologia celular no Gram e nas provas da

catalase e oxidase, foi realizado o teste de aglutinação em látex com o objetivo de verificar se o crescimento bacteriano suspeito de *Campylobacter* spp. seria capaz de aglutinar partículas de látex azul sensibilizadas com anticorpos de coelho presentes no cartão do kit Dryspot Campylobacter (OXOID®). O teste foi realizado de acordo com instruções do fabricante.

Em um tubo foi adicionada uma gota do reagente de extração nº 1 (solução de ácido acético 1,2 M). Da placa de reisolamento de agar Columbia, agar mCCDA ou Campy Cefex foi retirado um número de colônias suficiente para preencher o diâmetro interno de uma alça descartável de 5 µL. A alça com o crescimento foi colocada em contato com a gota do reagente nº 1 e homogeneizado cuidadosamente. A alça foi deixada no reagente nº 1 durante três minutos. Após esse período, foram adicionadas duas gotas do reagente de extração nº 2 (tampão Tris contendo 0,09 % de azida sódica) ao extrato e misturado com a alça utilizada anteriormente. Com a espátula do Kit foi colocada uma gota (50 µL) do extrato neutralizado no círculo teste e uma gota no círculo controle. Foi misturado o extrato no látex desidratado do círculo controle até ficar completamente suspenso. O procedimento foi repetido no círculo teste procurando sinais de aglutinação em até 3 minutos em condições normais de iluminação. O resultado foi considerado positivo nas reações de aglutinação das partículas de látex que ocorreram em até 3 minutos (Figura 9). A ausência de aglutinação neste intervalo indicou resultado negativo.

Em paralelo ao ensaio foi utilizada uma cepa de *C. jejuni* INCQS 00262 (ATCC 33560) como controle positivo e uma cepa de *E. coli* INCQS 00033(ATCC 25922) como controle negativo, da coleção de cultura do INCQS.



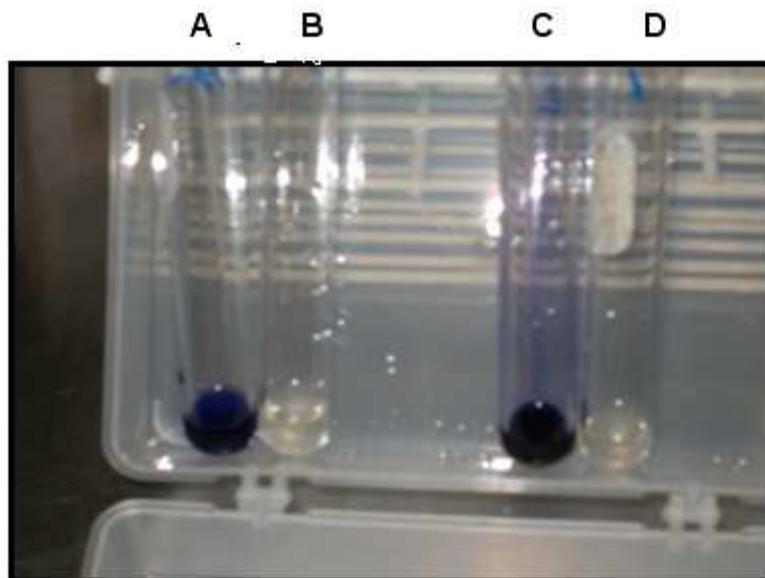
**Figura 9.** Aglutinação em Látex - kit Dryspot Campylobacter (OXOID®). (A) reação positiva; (B) Reação controle.

### 3.5. Identificação bioquímica

#### 3.5.1. Teste da Hidrólise do Hipurato

A hidrólise do hipurato foi verificada segundo metodologia descrita na ISO 10272-1:2006. Foram preparadas duas soluções, uma de hipurato de sódio (Anexo 2) e outra de ninhidrina a 3,5 % (Anexo 2). Uma alçada do crescimento em placa foi inoculada em tubo de ensaio 13 x 100 mm contendo 0,4 mL da solução de hipurato e incubada em banho-maria a 37°C durante 2 horas, sob agitação. Após este período foi adicionado 0,2 mL da solução de ninhidrina ao tubo e incubado por mais 10 minutos em banho-maria, sem agitação. A positividade do teste foi verificada pela formação de coloração violeta no tubo (Figura 10). Somente a espécie *C. jejuni* hidrolisa o hipurato.

Os produtos finais da hidrólise do hipurato de sódio pela enzima hipuricase incluem a glicina e ácido benzóico. A glicina é desaminada através do reagente ninhidrina, que fica reduzido durante o processo. Os produtos finais da oxidação pela ninhidrina reagem para formar uma coloração púrpura.



**Figura 10.** Hidrólise do Hipurato. A e C (*C. jejuni* INCQS 00262) B e D (*C.coli* INCQS 00263).

### 3.5.2 Teste de susceptibilidade ao Ácido Nalidíxico e Cefalotina

A susceptibilidade ao ácido Nalidíxico e à cefalotina foi verificada pelo método de difusão em disco segundo ISO 10272-1:2006. Foi preparada uma suspensão na escala 0,5 de MacFarland, a partir do crescimento bacteriano em caldo Brucella (Anexo 1). Com auxílio de swab estéril foi semeada toda a superfície de uma placa de agar sangue. Foram dispensados na placa um disco de ácido nalidíxico 30 µg e um de cefalotina 30 µg. A placa foi incubada a 37°C por 22 ± 2 h em microaerofilia. A sensibilidade foi verificada pela formação de qualquer halo de inibição.

### 3.5.3. Teste da Hidrólise do indoxil acetato

Para verificar a hidrólise do indoxil acetato foi adotado o método descrito na ISO 10272-1:2006. Foi preparada uma solução de indoxil acetato em acetona (Anexo 2). Um disco de 6 mm de diâmetro foi impregnado com 50 µL da solução. Depois de seco foi adicionada ao disco uma porção do crescimento suspeito e uma gota de água destilada estéril. Após 10 a 15 minutos foi observado o aparecimento de coloração azul indicando a hidrólise do composto.

### 3.5.4. Interpretação das provas Bioquímicas

A interpretação das provas bioquímicas foi realizada de acordo com os resultados apresentados na tabela 1.

**Tabela 1.** Identificação Bioquímica das Espécies Termofílicas de *Campylobacter* (Adaptado de Stern e colaboradores, 2001)

Espécie	Catalase	Oxidase	Hipurato	Indoxila	Ác.nalidíxico	Cefalotina
<i>C.jejuni</i>	+ <sup>1</sup>	+	+	+	S <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>
<i>C.coli</i>	+	+	- <sup>2</sup>	+	S	R
<i>C.lari</i>	+	+	-	-	R	R
<i>C.upsaliensis</i>	-	+	-	+	S	S

<sup>1</sup>- 90% ou mais das amostras são positivas; <sup>2</sup>- 90% ou mais são negativas; <sup>3</sup>- Susceptível; <sup>4</sup>- Resistente.

### 3.6. Preservação dos isolados de *Campylobacter* spp.

Os isolados confirmados como *Campylobacter* spp. foram preservados em glicerol a 20 % a -70 °C e por liofilização (Anexo 2). Após a preservação os isolados foram armazenados na Coleção de micro-organismos do INCQS/FIOCRUZ sob os números: P3768, P3769, P3770, P3771, P3772, P3779, P3780, P3781, P3782, P3783, P3818, P3819, P3820, P3821, P3825, P3826, P3835, P3836, P3837, P3838 e P3853.

### 3.7. Identificação Molecular

Os 21 isolados identificados por provas bioquímicas convencionais foram submetidos a PCR para confirmar os resultados obtidos. Foram utilizadas as seguintes cepas de referência como controle nas reações da PCR:

- *Campylobacter jejuni* INCQS 00262 (ATCC 33560);
- *Campylobacter coli* INCQS 00263 (ATCC 33559);
- *Escherichia coli* INCQS 00033 (ATCC 25922).

#### 3.7.1. Extração do DNA

Para a extração do DNA genômico dos isolados foram aplicados os métodos de extração pelo kit comercial QUIAGEN® e por lise-térmica com a finalidade de realizar análise comparativa.

**Extração por Kit.** A extração do DNA genômico dos isolados foi realizada utilizando o Kit comercial QUIAGEN. Foi utilizado o protocolo recomendado para bactérias Gram negativas “Pretreatment for Gram-Negative Bactéria” do kit comercial DNeasy® Blood & Tissue Handbook 07/2006 (QUIAGEN®) (QUIAGEN Companies - Uniscience do Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. Quinhentos µL de cultura foi centrifugada por 10 min a 5000 x g (7500 rpm) (Centrifuge 5415 C Eppendorf). O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspensionado em 180 µL do tampão de lise ATL. Foi adicionado 20 µL de proteinase K, homogeneizado em vortex (Vortex genie 2 -Scientific Industries) e incubado a 56°C ± 1 °C por 1-3 horas em

banho seco (VWR Scientific Products), sendo homogeneizado ocasionalmente. Após a incubação foi adicionado 200 µL de tampão AL, homogeneizado em vortex seguido de 200 µL de etanol (96-100%) e centrifugação ligeira para eliminar gotas do lado interno da tampa. A mistura (incluindo o precipitado) foi cuidadosamente dispensada na coluna Dneasy Mini acoplada ao tubo coletor de 2 mL. Foi centrifugado a  $\geq 6000 \times g$  (8.000 rpm) por 1 minuto. A coluna foi transferida para um novo tubo coletor e a seguir foi adicionado 500 µL de tampão AW1 e centrifugado a  $\geq 6000 \times g$  (8.000 rpm) por 1 minuto. A coluna foi transferida para um novo tubo coletor onde foi adicionado 500 µL de tampão AW2 e centrifugado a  $20,000 \times g$  (14.000 rpm) por 3 minutos. A coluna foi transferida para um tubo de 1,5 mL onde foi adicionado 100 µL de tampão AE e incubado a temperatura ambiente por 1 minuto. Após esse período foi centrifugado a  $\geq 6000 \times g$  (8.000 rpm) por 1 minuto; o tubo Eppendorf foi armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Extração por lise-térmica.** Quinhentos µL da cultura em caldo Brucella foram utilizados para a extração pela técnica de fervura, que consistiu em centrifugar a cultura a  $20,000 \times g$  (14.000 rpm) por 14 minutos, desprezar o sobrenadante, acrescentar 1 mL de água ultrapura (GIBCO) e ferver por dez minutos. (NISHIMURA et al., 1996).

Os tubos contendo os DNA extraídos pelos dois métodos foram identificados com o número da amostra, método utilizado e data de extração e foram armazenados em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior realização das técnicas moleculares.

**Integridade do DNA genômico.** A integridade do DNA genômico extraído pelos 2 métodos foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose (SIGMA®A-0169) 0,7% em solução-tampão TBE-USB® 0,5x (Tris-Borato EDTA-0,0445 M de Tris, 0,0445 M de ácido bórico e 0,001 M de EDTA,pH 8,4) acrescido de 1,5 µL de uma solução de brometo de etídio (3mg/ml). Os DNA foram submetidos à eletroforese a 50V por 1 hora. As imagens foram digitalizadas e analisadas pelo sistema de vídeo documentação Transillumination GE ImageQuant 300®.

### 3.7.2. Reações da PCR

**Genes amplificados.** Inicialmente foram amplificados os DNA das cepas de referência, dos genes: *flaA* (460 pb) específico para o gênero *Campylobacter* (OYOFO et al., 1992 e HARMON et al. 1997), e o gene da oxirredutase (160 pb) específico para *C. jejuni* (WINTERS & SLAVIK,1995, ACIK & ÇETINKAYA, 2006). Posteriormente foi realizada a reação para amplificação simultânea destes dois genes, para estabelecer a Duplex PCR, proposta por Vilaro et al. (2006).

A seguir foram realizadas reações da PCR para amplificar o gene 16S rRNA utilizando iniciadores específicos para o gênero *Campylobacter* (816 pb) (Linton et al. 1996); o gene *ceuE* para *C. coli* (894 pb) (Gonzáles et al 1997) e o gene da hipuricase para *C. jejuni* (735 pb) (Linton et al 1997).

**Duplex PCR - genes 16S rRNA e oxirredutase** - a duplex foi realizada a utilizando iniciadores para os genes 16S rRNA (816 pb) e oxirredutase (160 bp). Inicialmente a reação foi realizada com cepas de referência (*C. jejuni* e *C. coli*) e posteriormente com os isolados de *Campylobacter* spp.

**Iniciadores e ciclos utilizados.** Todos os iniciadores e os programas de amplificação utilizados nas reações da PCR estão apresentados no quadro 1.

### 3.7.3. Especificidade e Sensibilidade - 16S rRNA e oxirredutase

Inicialmente a especificidade das reações foi verificada através de ampliações separadas dos genes 16S rRNA e oxirredutase com DNA genômico de *C. jejuni*, *C. coli* e *E. Coli*. Foi realizada também a avaliação *in silico* no programa “In Silico PCR amplification” (<http://insilico.ehu.es/PCR/>) para checar a especificidade dos iniciadores frente a outras espécies do gênero *Campylobacter*. A sensibilidade da Duplex PCR foi analisada através da PCR utilizando DNA de *C. jejuni* e *C. coli* diluídos serialmente a 1:10 de 200 ng a 2 pg. Cada diluição foi amplificada com os quatro iniciadores.

**Quadro 1 . Oligonucleotídeos e programas de amplificação usados neste estudo**

Primers	Programa	Gene Alvo	Tamanho	Referência
<b>Pg3</b> 5'-GAACTTGAACCGATTG-3' <b>Pg50</b> 5'-ATGGGATTTTCGTATTAAC-3'	94°C - 4min 94°C - 1min 45°C - 1min } 25x 72°C - 1min 72°C - 7min	<i>flaA</i> ( <i>C.jejuni</i> e <i>C. coli</i> )	460-pb	Oyofó et al., 1992 Harmon et al., 1997
<b>C1</b> 5'-CAAATAAAGTTAGAGGTAGAATGT-3' <b>C4</b> 5'-TAGTCGATCGATCACGAATAGG -3'	94°C - 4min 94°C - 1min 45°C - 1min } 25x 72°C - 1min 72°C - 7min	Oxirreduta se ( <i>C.jejuni</i> )	160-pb	Winters and Slavik.,1995  Açık and Çetinkaya, 2006
<b>C412_F</b> 5'-GGATGACACTTTTCGGAGC-3' <b>C1288_R</b> 5'-CATTGTAGCACGTGTGTC-3'	94°C - 3min 94°C - 1min 55°C - 1min } 25x 72°C - 1min 72°C - 5min	16S rRNA (UPTC)*	816-pb	Linton et al., 1996
<b>Col_1</b> 5'-ATGAAAAAATATTTAGTTTTTGC-3' <b>Col_2</b> 5'-ATTTTATTTGTAGCAGCG-3'	94°C - 3min 94°C - 30s } 30x 57°C - 30s 72°C - 1min 72°C - 5min	<i>ceuE</i> ( <i>C.coli</i> )	894-pb	Gonzales et al., 1996
<b>HIP400_F</b> 5'-GAAGAGGGTTTGGGTGGTG-3' <b>HIP1134R</b> 5'-AGCTAGCTTCGCATAATAACTTG-3'	94°C - 3min 94°C - 30s } 30x 66°C - 30s 72°C - 1min 72°C - 5min	<i>hipO</i> hipuricase ( <i>C.jejuni</i> )	735-bp	Linton et al., 1997
<b>C1</b> 5'-CAAATAAAGTTAGAGGTAGAATGT-3' <b>C4</b> 5'-GGATAAGCACTAGCTAGCTGAT-3'  <b>C412_F</b> 5'-GGATGACACTTTTCGGAGC-3' <b>C1288_R</b> 5'-CATTGTAGCACGTGTGTC-3'	94°C - 3min 94°C - 1min 50°C - 1min } 25x 72°C - 1min 72°C - 5min	Oxirreduta se ( <i>C.jejuni</i> )  16S rRNA (UPTC)*	160-pb  816-pb	Winters and Slavik.,1995 Açık and Çetinkaya, 2006  Linton et al., 1996

\* UPTC – *Campylobacter* Termotolerante Urease Positiva

**Condições da PCR.** As misturas da PCR tiveram o volume final de 50  $\mu$ L contendo os seguintes reagentes da Invitrogen: 1X PCR Tampão (500 mM KCl, 100 mM Tris HCl [pH 9.0]); 1  $\mu$ L (200  $\mu$ M cada) dATP, dCTP, dGTP e dTTP; 40 pmol de cada *primer*; 2,5 U *Taq* DNA polimerase; 2 mM MgCl<sub>2</sub> (gene *flaA*), 5,5 mM MgCl<sub>2</sub> (gene oxirredutase), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> (gene 16S rRNA), 3,5 mM MgCl<sub>2</sub> (gene *ceuE*) e 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> (gene *hip*) e água deionizada estéril q.s.p 50  $\mu$ L. Na Duplex-PCR foi usado o Kit Invitrogen nas seguintes concentrações: 1X PCR Tampão (500 mM KCl, 100 mM Tris HCl [pH 9.0]); 1  $\mu$ L (200  $\mu$ M cada) dATP, dCTP, dGTP e dTTP; 40 pmol de cada *primer*: C412\_F, C1288\_R (gene 16SrRNA); C1 e C4 (gene oxirredutase); 2,5 U *Taq* DNA polimerase e 3 mM MgCl<sub>2</sub>.

A mistura foi adicionado ~50 ng (3  $\mu$ L) do DNA genômico. As amplificações foram realizadas nos termocicladores *Peltier Thermal Cycler*, modelo: PTC-200 marca: MJ Research e Eppendorf EP Master Cycler utilizando programas específicos para cada gene (Quadro 1). Todos os iniciadores utilizados foram sintetizados pela Invitrogen, Carrlsbad, CA. Adicionalmente foram utilizados os Kits de amplificação da Promega e da Qiagen de acordo com instruções dos fabricantes.

Foram utilizados *Campylobacter jejuni* INCQS 00262 (ATCC 33560) e *Campylobacter coli* INCQS 00263 (ATCC 33559) como controles positivos e um tubo de reação com água ultrapura (GIBCO) como controle negativo.

**Visualização dos produtos da PCR.** Dez microlitros dos produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE [1,0M tris, 0,01M ácido bórico, 0,01M EDTA pH 8,2 (Invitrogen)] acrescido de brometo de etídio (3mg/mL). Utilizou-se o marcador de peso molecular 100 pb da Invitrogen. A eletroforese foi realizada em cuba horizontal Eletrophoresis Cell (BioAmérica) contendo TBE 0,5X por 60 minutos a 60 V em fonte Power Pac 300 (Bio-Rad). As imagens foram digitalizadas pelo sistema de vídeo documentação Transillumination GE ImageQuant 300®.

### **3.8. Análise Estatística**

Para a análise estatística das amostras foi utilizado o programa Bioestat 5.0 (2007). O teste de Cochran (bilateral) ao nível de significância de 0,05 foi aplicado para verificar diferenças estatisticamente significativas entre as amostras de supermercados (n=10), feiras livres (n=10) e abatedouros (n=10). Para avaliar se houve diferença entre as amostras obtidas em abatedouros com inspeção estadual (n=4) e sem inspeção (n=6) foi aplicado o teste de Mann-Whitney (bilateral) ao nível de significância de 0,05.

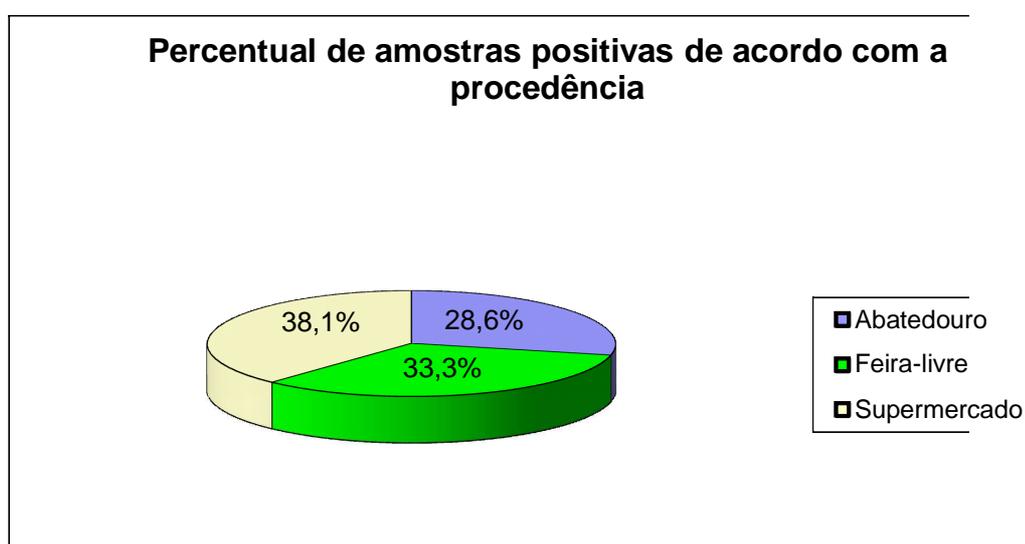
## 4. RESULTADOS

### 4.1. Pesquisa de *Campylobacter* spp

Das 30 amostras de carcaças de frango analisadas 21 (70%) confirmaram a presença de *Campylobacter* spp. Desses 21 isolados seis (28,6%) foram provenientes de carcaças coletadas em abatedouros, oito (38,1%) de supermercados e sete (33,3%) de feiras livres (Figura 11).

Na etapa de enriquecimento seletivo para o isolamento de *Campylobacter* spp. utilizando caldo Bolton em dupla e em simples concentrações, após semeadura por esgotamento em agar C. Cefex e mCCDA apresentaram abundante crescimento de microbiota acompanhante. Esse crescimento provavelmente se sobrepôs ao crescimento característico de *Campylobacter* spp., dificultando a visualização de colônias típicas. A semeadura direta nos meios de cultura mCCDA e C. Cefex apresentou maior seletividade na recuperação de *Campylobacter* spp.

O isolamento de *Campylobacter* spp. das 21 amostras positivas foi obtido na etapa de plaqueamento direto nos meios seletivos agar Campy-Cefex e mCCDA sendo que duas (9,5%) foram isoladas pelo enriquecimento seletivo utilizando caldo Bolton em concentração simples e também pelo plaqueamento direto e 19 (90,5%) foram isoladas apenas pelo plaqueamento direto, destas, 13 foram obtidas no agar C. Cefex e mCCDA concomitantemente, três somente do C. Cefex e cinco somente do mCCDA. Nenhuma amostra foi isolada utilizando o caldo Bolton em concentração dupla (Tabela 2).



**Figura 11.** Percentual de amostras positivas de acordo com a procedência

**Tabela 2.** Resultado da pesquisa de *Campylobacter* spp. em amostras de carcaças resfriadas de frango de diferentes procedências com os respectivos meios de isolamento

Amostra	Procedência	Resultado	Meio de cultura
1	Abatedouro*	Positiva	BS + CC
2	Mercado	Positiva	CC
3	Feira livre	Negativa	
4	Abatedouro*	Negativa	
5	Mercado	Positiva	BS+ CC + Mccda
6	Feira livre	Positiva	CC + mCCDA
7	Mercado	Positiva	CC + mCCDA
8	Abatedouro**	Positiva	CC + mCCDA
9	Feira livre	Negativa	
10	Abatedouro*	Positiva	CC + mCCDA
11	Mercado	Positiva	CC + mCCDA
12	Feira livre	Positiva	CC + mCCDA
13	Abatedouro**	Negativa	
14	Mercado	Positiva	mCCDA
15	Feira livre	Positiva	mCCDA
16	Abatedouro**	Positiva	CC + mCCDA
17	Mercado	Positiva	CC + mCCDA
18	Feira livre	Positiva	CC
19	Abatedouro**	Negativa	
20	Mercado	Positiva	mCCDA
21	Mercado	Negativa	
22	Feira livre	Positiva	CC + mCCDA
23	Abatedouro*	Positiva	mCCDA
24	Mercado	Positiva	CC + mCCDA
25	Abatedouro**	Negativa	
26	Abatedouro**	Positiva	mCCDA
27	Feira livre	Positiva	CC + mCCDA
28	Feira	Negativa	
29	Feira livre	Positiva	CC + mCCDA
30	Mercado	Negativo	

CC= agar Campy-Cefex; BS=caldo Bolton Simples

\*Abatedouro com inspeção Estadual

\*\*Abatedouro sem inspeção

## 4.2 Identificação fenotípica

### 4.2.1 Testes presuntivos

**Coloração de Gram** - das 30 amostras de carcaças de frango analisadas 21 apresentaram isolados com formas de “S” ou asa de gaivota, compatíveis com o gênero *Campylobacter* (Figura 1).

**Produção da Catalase e Oxidase** - os 21 isolados apresentaram as enzimas

catalase e oxidase.

#### 4.2.2 Teste Confirmativo

**Aglutinação em Látex** - os 21 isolados apresentaram a capacidade de aglutinar partículas de látex azul sensibilizadas com anticorpos de coelho, confirmando os testes presuntivos.

#### 4.2.3 Provas bioquímicas

Dos resultados obtidos nas provas bioquímicas, seis isolados do abatedouro (100%) e sete do mercado (87,5%) foram identificados como *C. jejuni*, um isolado (amostra número 2) do mercado apresentou resultado duvidoso em relação à hidrólise do hipurato e não teve sua identificação fenotípica concluída. Dos sete isolados da feira livre seis foram *C. jejuni* (85,7%) e um *C. coli* (14,3 %). Dos 21 isolados analisados dez (47,62%) foram sensíveis ao ácido nalidíxico e 11 (52,38%) foram resistentes. Cinco (23,81%) apresentaram sensibilidade à cefalotina e 16 (79,19%) foram resistentes (Tabela 3).

**Tabela 3.** Identificação bioquímica e molecular dos 21 isolados deste estudo.

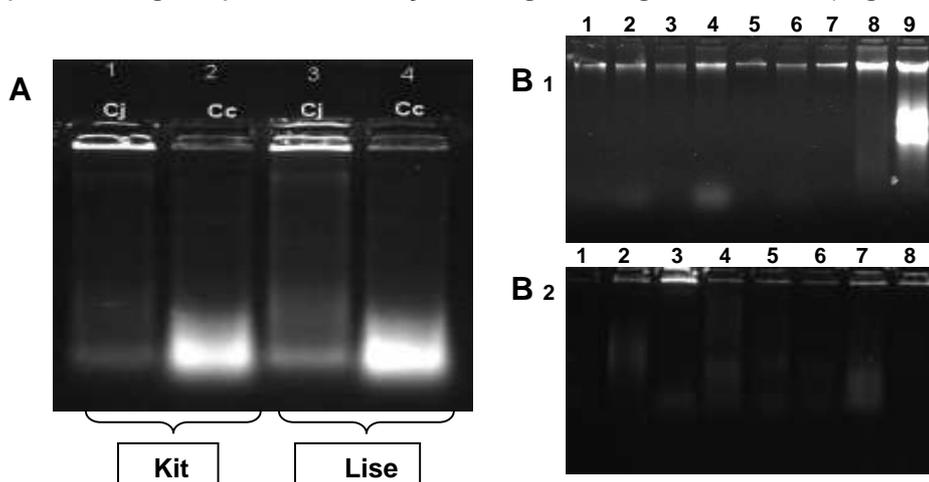
Nº Amostra/Fonte	Hipurato	Indoxila	Ác.nalid.	Cefalotina	Fenotípico	Molecular
1 (A)	+	+	S	S	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>
2 (M)	+/-	+	S	R	<i>C. jejuni/coli</i>	<i>C. jejuni</i>
5 (M)	+	+	S	R	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>
6(F)	+	+	S	R	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>
7(M)	+	+	S	S	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>
8(A)	+	+	S	R	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>
10(A)	+	+	S	S	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>
11(M)	+	+	S	S	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>
12(F)	+	+	R	R	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>
14(M)	+	+	S	S	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>
15(F)	+	+	R	R	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>
16(A)	+	+	R	R	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>
17(M)	+	+	R	R	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>
18(F)	+	+	R	R	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>
20(M)	+	+	R	R	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>
22(F)	-	+	S	R	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>
23(A)	+	+	R	R	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>
24(M)	+	+	R	R	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>
26(A)	-	+	R	R	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>
27(F)	+	+	R	R	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>
29(F)	+	+	R	R	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>

(+/-) Coloração violeta muito fraco. (A) Abatedouro. (F) Feira. (M) Mercado

## 4.3 Identificação Molecular

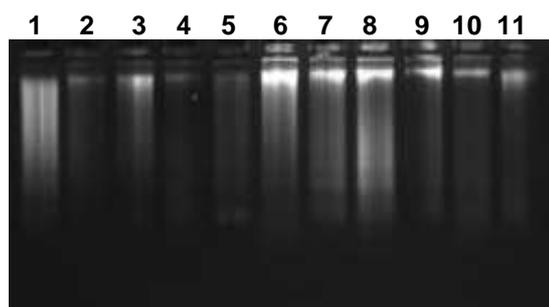
### 4.3.1 Extração do DNA

O DNA genômico das cepas de referência *C. jejuni*, *C. coli* e dos 21 isolados extraídos por kit QIAGEN e por lise térmica apresentaram bom rendimento de aspecto íntegro após visualização em gel de agarose 0,7% (Figura 12).



**Figura 12.** DNA genômico das cepas de referência *C. jejuni* e *C. coli* e dos isolados. **(A)** 1. *C. jejuni* (Kit) 2. *C. coli* (Kit), 3. *C. jejuni* (Lise), 4. *C. coli*. (Lise). **(B1)** 1-9 gel representativo dos isolados (Kit), **(B2)** 1-8 gel representativo dos isolados (Lise).

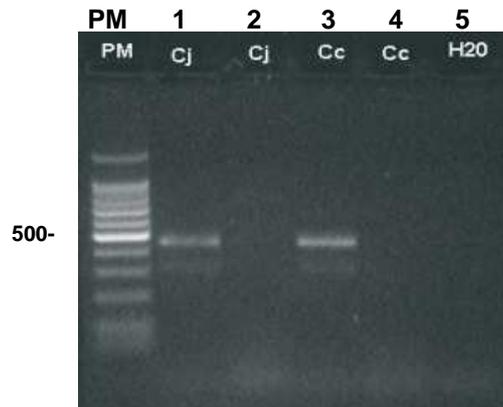
A partir do processamento da segunda amostra foi realizada a extração do DNA diretamente da água de enxaguadura, logo após o processamento. Essa idéia surgiu para verificar a possibilidade de utilizar a técnica como uma triagem. Após extração feita com kit QIAGEN, das 29 amostras, 10 $\mu$ L foram aplicados em gel de agarose 1,5% e submetido à eletroforese. Na visualização do gel representativo da extração do DNA diretamente da água de enxaguadura percebeu-se a existência de DNA em todas as amostras, porém com aspecto degradado (Figura 13). Como esse não foi um dos objetivos deste estudo, não foi realizado a Duplex PCR com o DNA extraído dessa etapa.



**Figura 13.** Gel representativo da extração do DNA diretamente da água de enxaguadura (Kit).

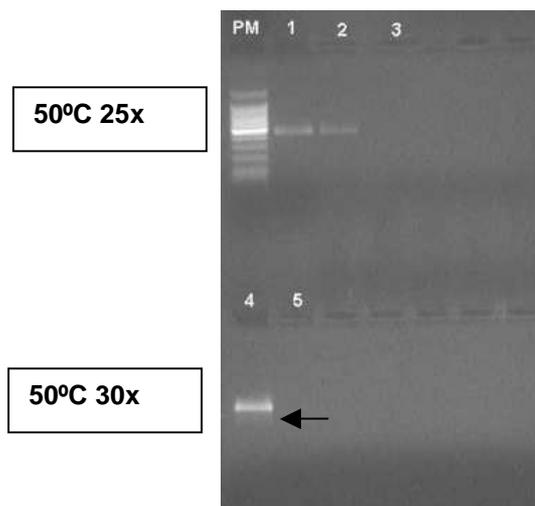
### 4.3.2 Amplificação pela PCR

**Gene *fla A*** – A amplificação do gene *flaA* na presença de DNA (Kit) das cepas de referência (*C. jejuni* e *C. coli*) apresentaram o fragmento esperado de 460 pb e um outro fragmento inespecífico de ~320 pb. As reações na presença de DNA (lise) não apresentaram amplificação do gene *flaA* (Figura 14).



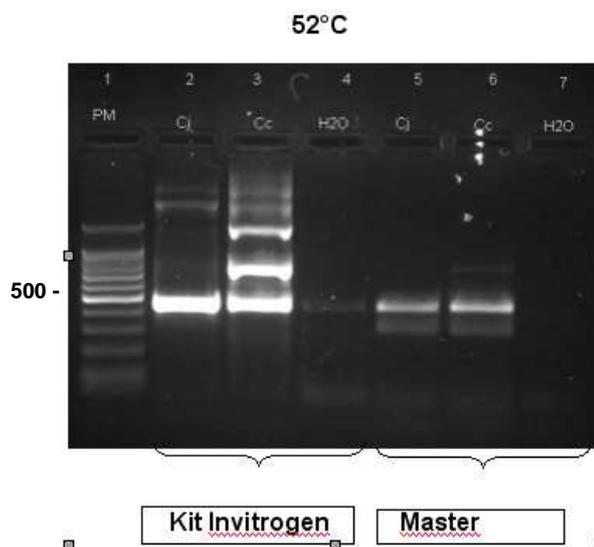
**Figura 14.** Amplificação pela PCR do gene *flaA* *C.coli* e *C.jejuni* de referência. PM. 100 bp (Promega), 1. *C. jejuni* (Kit), 2. *C. jejuni* (lise), 3. *C. coli* (Kit), 4. *C. coli* (lise), 5. H<sub>2</sub>O.

**Otimização da PCR para o gene *fla A*.** Devido a presença do fragmento inespecífico de ~320 pb (Figura 14) foram realizadas novas reações da PCR utilizando anelamento a 50°C com 25 e 30 ciclos. As reações com anelamento a 50°C com 25 ciclos apresentaram o fragmento esperado de 460 pb e com 30 ciclos voltou a apresentar inespecificidade indicada com uma seta (Figura15).



**Figura 15.** Amplificação pela PCR do gene *flaA* de *C.coli* e *C.jejuni* de referência. PM 100 bp (Promega), 1. *C.jejuni* (kit), 2. *C. coli* (kit), 3. H<sub>2</sub>O, 4. *C. jejuni* (kit), 5. *C.coli* (kit), 6. H<sub>2</sub>O.

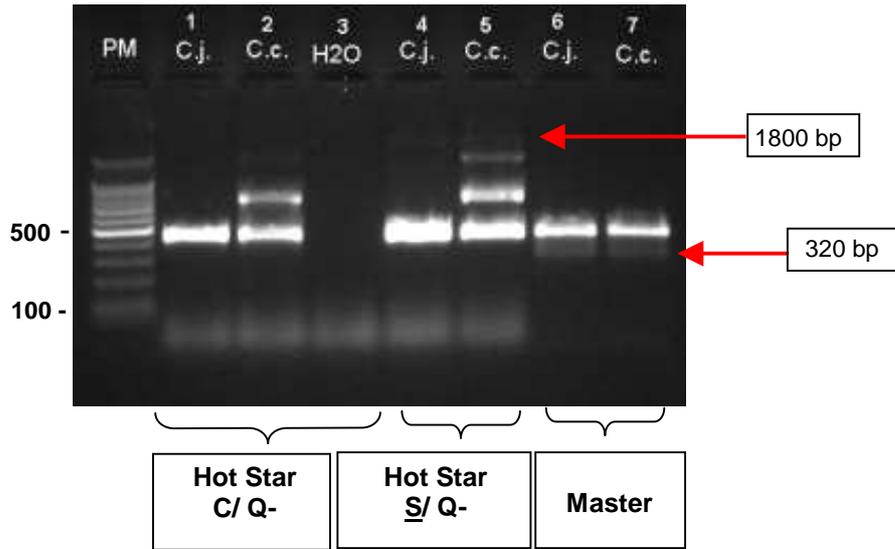
Foram realizadas duas reações da PCR utilizando o kit Invitrogen e o kit Master Mix com anelamento a 52°C e 35 ciclos. Tanto o kit Invitrogen quanto com o Master Mix apresentaram inespecificidade, principalmente com *C. coli* ATCC 33559 (Figura 16).



**Figura 16.** Amplificação pela PCR do gene *flaA* de *C.coli* e *C.jejuni* de referência 1. PM 100 pb (Promega), 2. *C.jejuni* (kit), 3. *C. coli* (kit), 4. H<sub>2</sub>O, 5. *C. jejuni* (kit), 6. *C.coli* (kit), 7. H<sub>2</sub>O.

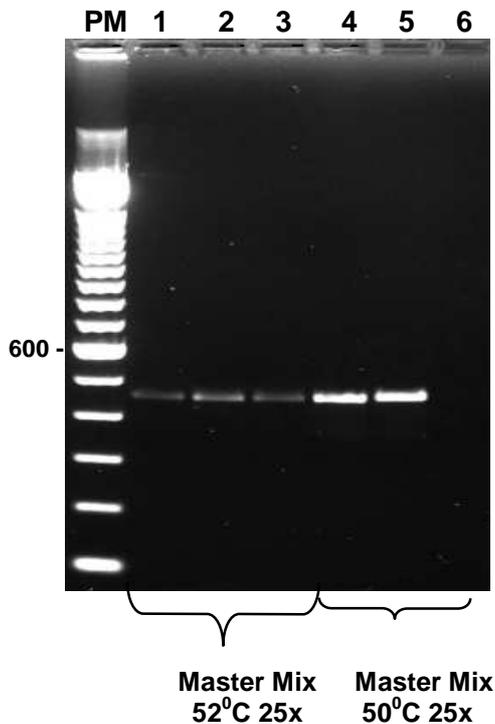
Foram realizadas reações da PCR com 52°C e 30 ciclos utilizando os kits: Hot Star com Q-solution, Hot Star sem Q-solution e Master Mix. A reação com o kit Hot Star com Q-solution apresentou um fragmento de 460 pb para o *C. jejuni* e três fragmentos de 460, 800 e 1500 pb para *C. coli*, enquanto a reação com o kit Hot Star sem Q-solution apresentou fragmentos de 460 e 1800 pb para o *C. jejuni* e quatro fragmentos de 460, 800, 1500 e 1800 pb para o *C. coli*. A reação com o kit Master Mix apresentou o fragmento de 460 pb e um outro fraco de ~320 pb para *C. jejuni* e *C. coli* (Figura 17).

52°C 30x



**Figura 17.** Amplificação pela PCR do gene *flaA* de *C.coli* e *C.jejuni* de referência. PM 100 bp (Promega), 1. *C.jejuni* (kit), 2. *C. coli* (kit) 3. H<sub>2</sub>O, 4. *C. jejuni* 5. *C. coli* (kit), 6. *C. jejuni* (kit), 7. *C.coli* (kit).

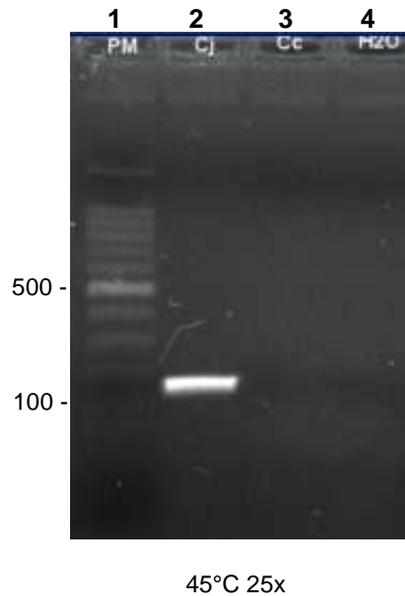
Para confirmar o resultado obtido com o kit Master Mix e verificar a reprodutibilidade do ensaio, foi realizada a amplificação do gene *flaA* com anelamentos a 50°C e 52°C e 25 ciclos. As duas condições apresentaram o fragmento esperado de 460 pb (Figura 18).



**Figura 18.** Amplificação do gene *flaA* em *C. coli* e *C. jejuni* de referência. PM 100bp (Invitrogen), 1. *C.*

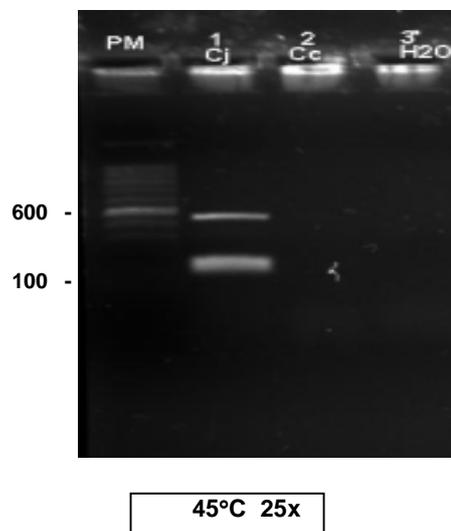
*jejuni* (kit), 2. *C. jejuni* (kit), 3. *C. coli* (kit), 4. *C. jejuni* (kit), 5. *C. coli* (kit) e 6. H<sub>2</sub>O.

**Gene oxirredutase** – A amplificação do gene da oxirredutase na presença de DNA (Kit) das cepas de referência (*C. jejuni* e *C. coli*) apresentou o fragmento esperado de 160 pb somente para o *C. jejuni*. (Figura19).



**Figura 19.** Amplificação por PCR do gene oxirredutase em *C. coli* e *C. jejuni* de referência.1. PM, 100bp (Promega), 2. *C. jejuni*, 3. *C. coli*, 4. H<sub>2</sub>O.

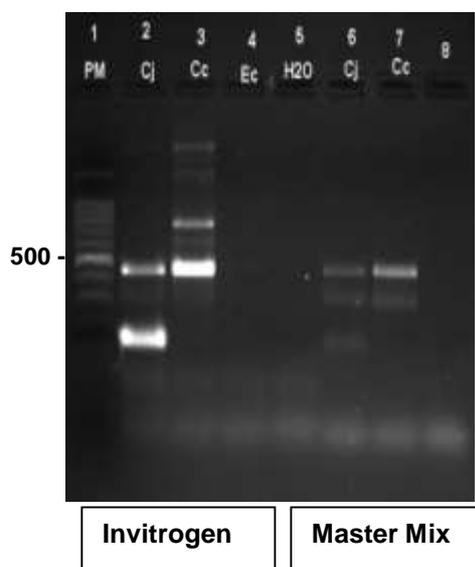
**Duplex PCR - genes *flaA* e oxirredutase** - Foi realizada a Duplex PCR com os iniciadores Pg3, Pg50 (gene *flaA*) , C1 e C4 (oxirredutase) com o DNA de *C. jejuni* e *C. coli* de referência. O *C. jejuni* apresentou fragmentos de 460 e 160 pb. E o *C. coli* não apresentou nenhuma amplificação (Figura 20).



**Figura 20:** Duplex PCR para amplificação dos genes *flaA* e oxirredutase em *C. coli* e *C. jejuni* de

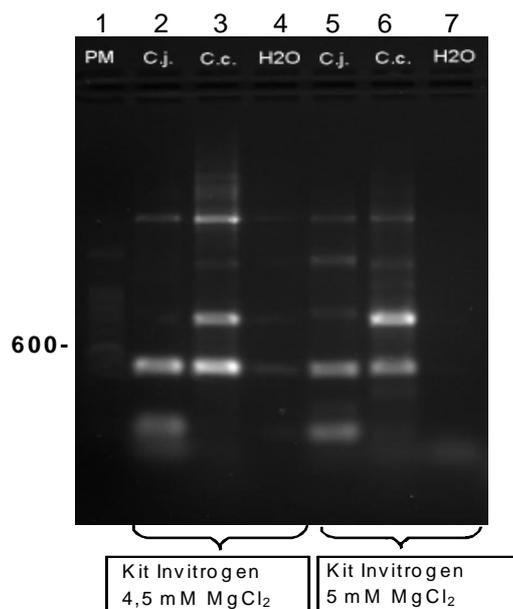
referência PM (Invitrogen), 1. *C. jejuni* (kit), 2. *C. coli* (kit) e 3. H<sub>2</sub>O.

Como não houve amplificação de *C. coli*, a reação foi repetida nas mesmas condições da figura 20 e foi realizada uma outra reação usando o kit Master Mix a 52<sup>o</sup>C por 25x, uma vez que este kit demonstrou resultado satisfatório anteriormente. O resultado da PCR utilizando o kit Invitrogen apresentou os fragmentos esperados de 460 e 160 bp para o *C. jejuni*, no entanto apresentou fragmentos inespecíficos de ~600, 800, 1500 e 1800 pb para *C. coli*. O Kit Máster Mix apresentou os fragmentos esperados para *C. jejuni* e *C. coli*, além de um fragmento inespecífico de ~ 300 pb para as duas cepas analisadas (Figura 21).



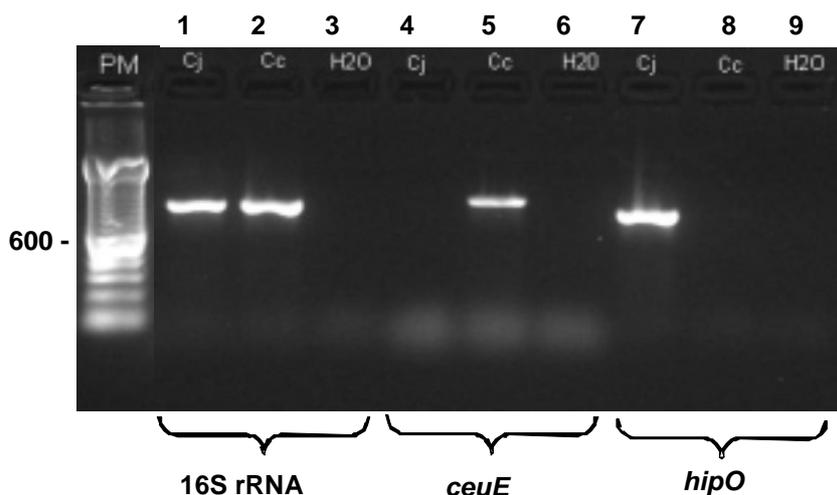
**Figura 21.** Duplex PCR com reação para amplificação dos genes *flaA* e oxirredutase. 1. PM (Promega) 2. *C. jejuni*, 3. *C. coli*, 4. *E. coli*, 5. H<sub>2</sub>O, 6. *C. jejuni*, 7. *C. coli* e 8. H<sub>2</sub>O. Todos extraídos por kit.

Foram realizadas outras duas reações para amplificação dos genes *flaA* e oxirredutase utilizando o kit Invitrogen com duas concentrações de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>). De acordo com a figura 22 as amplificações dos genes *flaA* e oxirredutase apresentaram inespecificidade tanto para *C. jejuni* quanto para *C. coli* nas concentrações de 4,5 e 5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Figura 22).



**Figura 22.** Amplificação por PCR do gene *flaA* e do gene oxidredutase. PM, 100pb (Invitrogen), 1. *C. jejuni*, 2. *C. coli*, 3. H<sub>2</sub>O 4. *C. jejuni* 5. *C. coli* 6. H<sub>2</sub>O.

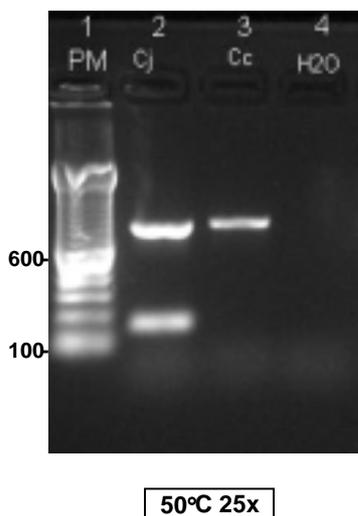
Com base em dados da literatura selecionamos novos genes alvos para detectar *C. jejuni* e *C. coli* nas amostras analisadas. Foram selecionados os genes: 16S rRNA, *ceuE* e *hipO* que foram amplificados de acordo com as condições descritas do Quadro 1. Inicialmente estes genes foram amplificados separadamente e apresentaram fragmentos de 816, 894 e 735 pb respectivamente (Figura 23).



**Figura 23.** Amplificação por PCR dos genes 16S rRNA, do gene *ceuE* e gene *hipO* em *C. coli* e *C. jejuni* de referência. PM, 100pb (Invitrogen), 1. *C. jejuni*, 2. *C. coli*, 3. H<sub>2</sub>O 4. *C. jejuni* 5. *C. coli* 6. H<sub>2</sub>O 7. *C. jejuni* 8. *C. coli* 9 H<sub>2</sub>O.

**Duplex PCR - genes 16S rRNA e oxirredutase** – A seleção dos genes a serem amplificados na Duplex PCR foi feita com base no tamanho dos fragmentos amplificados, de modo a possibilitar a sua distinção no gel de agarose, após a eletroforese. Deste modo, a Duplex PCR foi realizada com utilização do gene 16S rRNA (816 pb) específico para o Gênero *Campylobacter* e o gene da Oxirredutase presente em *C. jejuni* (160 pb). As condições da reação encontram-se descritas no quadro 1.

Inicialmente a Duplex PCR foi realizada com as cepas de referência *C. jejuni* e *C. coli* (kit) e apresentou dois fragmentos (816 e 160 bp) em *C.jejuni* e apenas um (160bp) em *C. coli*, conforme o esperado (Figura 24).



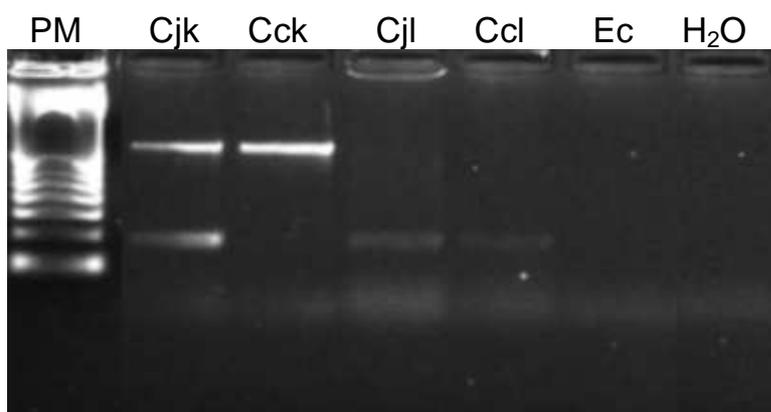
**Figura 24.** Duplex PCR - amplificação por PCR dos genes 16S rRNA e do gene Oxirredutase -. 1. PM, 100pb (Invitrogen), 2. *C. jejuni*, 3. *C. coli*, 4. H<sub>2</sub>O

### Especificidade e Sensibilidade

A especificidade da Duplex PCR foi verificada através de amplificação simultânea dos genes 16S rRNA e oxirredutase com DNA genômico de *C. jejuni*, *C. coli* e *E. coli* extraídos pelo kit e pela lise térmica (Figura 25). A análise *in silico* para checar a especificidade para o gene 16S rRNA demonstrou a presença do fragmento de 816 pb para *C. jejuni*, *C. fetus*, *C. hominis*, *C. curvus*, *C. concisus*, *C. lari* e ausência para *Arcobacter*, *Helicobacter*, *Sulfuricurvum*, *Sulfurimonas*, *Sulfurovum* e *Wolinella*. A análise da especificidade (*in silico*) para o gene da

oxirredutase demonstrou presença de fragmento de 160 pb somente para *C. jejuni*. As espécies *fetus*, *hominis*, *curvus*, *concisus* e *lari*, bem como espécies dos gêneros *Arcobacter*, *Helicobacter*, *Sulfuricurvum*, *Sulfurimonas*, *Sulfurovum* e *Wolinella* não apresentaram amplificação (Tabela 4).

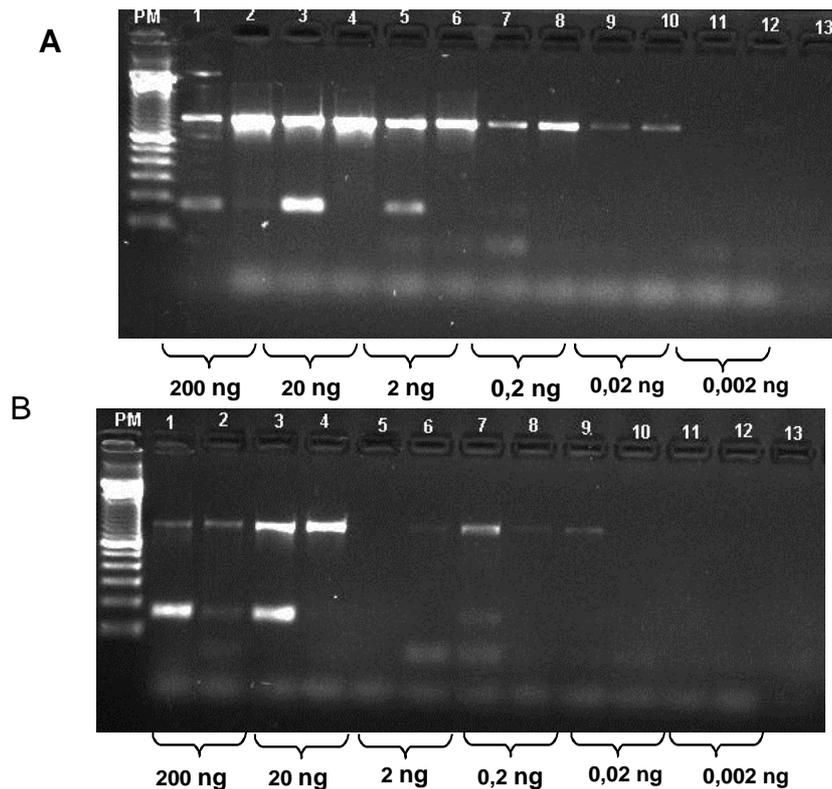
A sensibilidade da Duplex PCR foi analisada através da PCR utilizando DNA de *C. jejuni* e *C. coli* diluídos serialmente a 1:10 de 200 ng a 2 pg. Cada diluição foi amplificada com os quatro iniciadores. A duplex PCR realizada com o DNA extraído pelo kit apresentou sensibilidade até 0,2 ng de DNA. Enquanto o gene 16S rRNA foi amplificado até 0,02 ng de DNA para *C.j* e *C.c* o gene da oxirredutase foi amplificado até 0,2 ng (Figura 26 A). A duplex PCR com o DNA extraído pela lise também apresentou sensibilidade até 0,2 ng de DNA. Porém o gene 16S rRNA foi amplificado até 0,02 ng somente para *C.j* e o gene da oxirredutase só foi amplificado até 0,2ng (Figura 26 B).



**Figura 25.** Especificidade da Duplex PCR - amplificação por PCR dos genes 16S rRNA e do gene Oxirredutase. PM, 100pb (Invitrogen), *C. jejuni* (kit), *C. coli* (kit), *C. jejuni* (lise), *C. coli* (lise), *E. coli* e H<sub>2</sub>O.

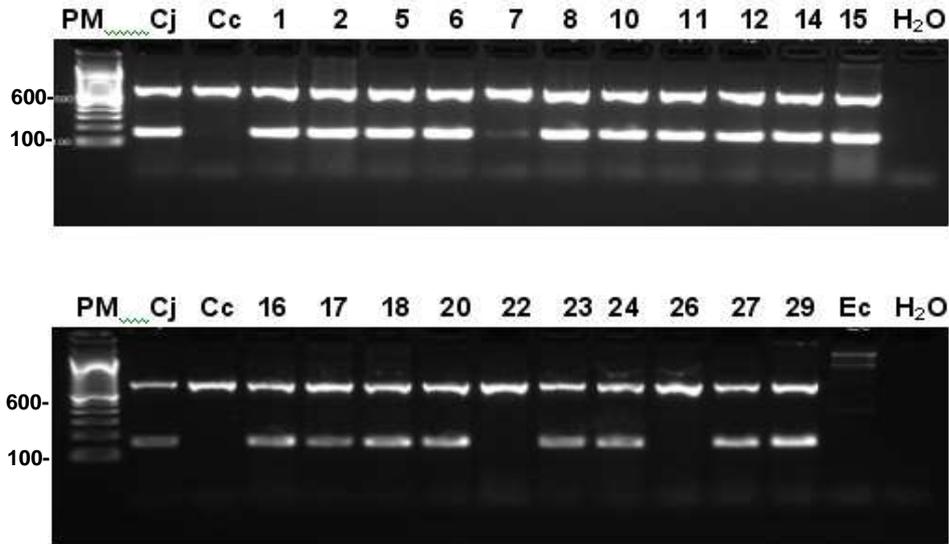
**Tabela 4. Amplificação por PCR In silico**

<b>Família Campylobacteriaceae</b>	<b>16S rRNA pb</b>	<b>Oxirredutase PB</b>
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> NCTC 11168	816	160
<i>C. jejuni</i> RM 1221	816	160
<i>C. fetus</i> subsp. <i>Fetus</i> 82-40	816	-
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>Jejuni</i> 81-176	816	160
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>Doylei</i> 269.97	816	160
<i>C. hominis</i> ATCC BAA-381	816	-
<i>C. curvus</i> 525.92	816	-
<i>C. curvus</i>	816	-
<i>C. concisus</i> 13.826	816	-
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>Jejuni</i> 81.116	816	160
<i>C. lari</i> RM2100	816	-
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>Jejuni</i> ICDCCJ07001	816	160
<i>Arcobacter butzleri</i> RM4018	-	-
<i>Arcobacter nitrofigilis</i> DSM 7299	-	-
<b>Família Helicobacteriaceae</b>		
<i>Helicobacter pylori</i> 26695	-	-
<i>Helicobacter pylori</i> , strain J99	-	-
<i>Helicobacter hepaticus</i> ATCC 51449	-	-
<i>Helicobacter pylori</i> HPAG1	-	-
<i>Helicobacter acinonychis</i> str. Sheeba	-	-
<i>Helicobacter pylori</i> Shi470	-	-
<i>Helicobacter pylori</i> G27	-	-
<i>Helicobacter pylori</i> P12	-	-
<i>Helicobacter pylori</i> B38	-	-
<i>Helicobacter mustelae</i> 12198	-	-
<i>Helicobacter pylori</i> B8	-	-
<i>Helicobacter pylori</i> PeCan4	-	-
<i>Helicobacter pylori</i> SJM180	-	-
<i>Helicobacter felis</i> ATCC 49179	-	-
<i>Sulfuricurvum kujiense</i> DSM 16994	-	-
<i>Sulfurimonas autotrophica</i> DSM 16294	-	-
<i>Sulfurovum</i> sp. NBC37-1	-	-
<i>Wolinella succinogenes</i>	-	-

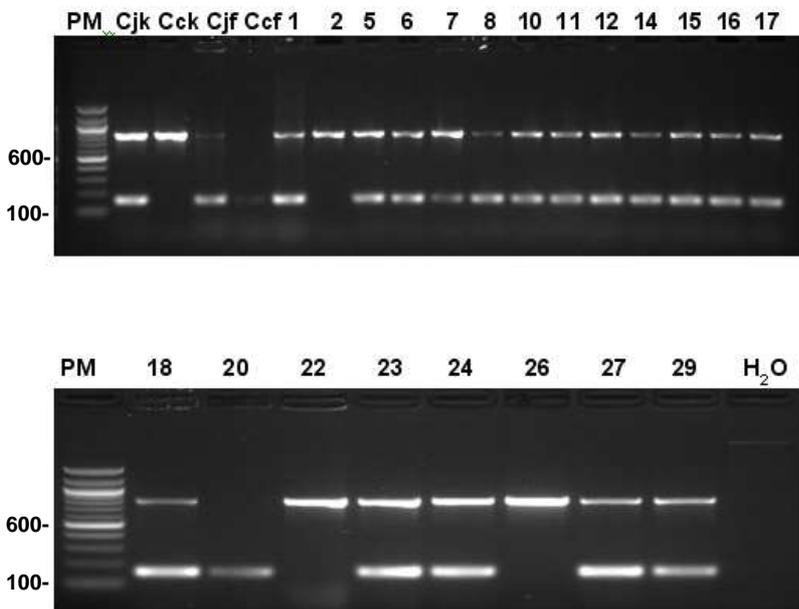


**Figura 26.** Sensibilidade da Duplex PCR com DNA diluídos serialmente a 1:10 de 200 ng a 0,002 ng (2 pg). **(A)** DNA genômico extraído com kit. Linhas 1 e 2 C.j e C.c 200 ng; Linhas 3 e 4 C.j e C.c 20 ng; Linhas 5 e 6 C.j e C.c 2ng; Linhas 7 e 8 C.j e C.c 0,2ng; Linhas 9 e 10 C.j e C.c 0,02 ng; ; Linhas 11 e 12 C.j e C.c 0,002 ng; Linha 13 H<sub>2</sub>O. **(B)** DNA genômico extraído por lise térmica. Linhas 1 e 2 C.j e C.c 200ng; Linhas 3 e 4 C.j e C.c 20ng; Linhas 5 e 6 C.j e C.c 2ng; Linhas 7 e 8 C.j e C.c 0,2 ng; ; Linhas 9 e 10 C.j e C.c 0,02 ng; ; Linhas 11 e 12 C.j e C.c 0,002 ng; Linha 13 H<sub>2</sub>O.

**Duplex PCR dos isolados** - a Duplex PCR foi realizada nas 21 cepas isoladas utilizando o DNA genômico extraído pelo kit Qiagen e pela lise térmica. A amplificação utilizando o DNA do kit apresentou 2 fragmentos com tamanhos de 816 e 160 pb compatíveis com o perfil de *C. jejuni* em 19 (90,5%) isolados e 1 fragmento de 816 pb compatível com perfil de *C. coli* em 2 (9,5 %) isolados (Figura 27). A PCR com DNA da lise térmica apresentou 17 (80,9 %) isolados com perfil compatível com *C. jejuni*, 3 (14,3%) isolados com perfil compatível com *C. coli* e 1 isolado (amostra 20) não foi identificado pois apresentou apenas o fragmento de 160 pb. Este fato pode ser observado com a cepa padrão de *C. coli* com extração de DNA por fervura. (Figura 28).

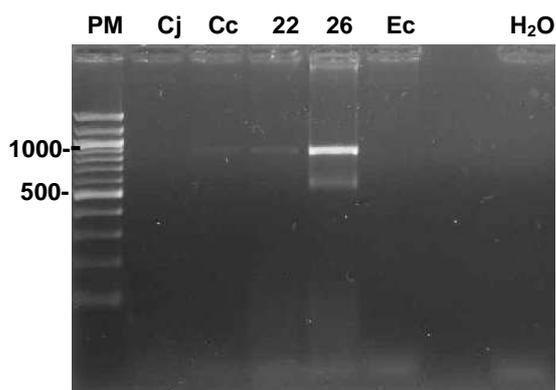


**Figura 27.** Duplex PCR dos 21 isolados (DNA genômico extraído por Kit) PM. Peso Molecular 100 pb. *Cj* (*C. jejuni*), *Cc* (*C. coli*). Amostras: 1, 2, 5, 6, 7, 8, 10, 11,12, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 22, 23, 24, 26, 27, 29 (conforme tabela 2).



**Figura 28.** Duplex PCR DNA genômico, dos 21 isolados (DNA extraído pela lise térmica). Cjk. (*C. jejuni*) Cck. (*C. coli*) extração de DNA por Kit. Cjf. (*C. jejuni*) e Ccf. (*C. coli*) extração de DNA por lise. PM. Peso Molecular 100 pb. Amostras: 1, 2, 5, 6, 7, 8, 10, 11,12, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 22, 23, 24, 26, 27, 29 (conforme tabela 2).

**Confirmação *C. coli*.** – As amostras 22 e 26, identificadas como *C. coli* pela bioquímica convencional, foram submetidas a amplificação do gene *ceuE*, específico de *C. coli*, uma vez que o fragmento de 816 pb (16S rRNA), utilizado na duplex PCR, é comum as espécies do gênero *Campylobacter*. A cepa *C. coli* de referência e as amostras 22 e 26 apresentaram fragmento de 894 pb confirmando a identificação de *C. coli* (Figura 28).



**Figura 29.** Confirmação da espécie para os isolados das amostras 22 e 26 por amplificação do gene *ceuE*, específico para *C. coli*.

#### 4.4. Análise Estatística

O teste de Cochran (bilateral) ao nível de significância de 0,05 ( $p < 0,05$ ) verificou que não houve diferenças estatisticamente significativas entre as amostras de supermercados ( $n=10$ ), feiras livres ( $n=10$ ) e abatedouros ( $n=10$ ). Também não houve diferença entre as amostras obtidas em abatedouros com inspeção estadual ( $n=4$ ) e sem inspeção ( $n=6$ ) quando aplicado o teste de Mann-Whitney (bilateral) ao nível de significância de 0,05.

## 5. DISCUSSÃO

Nas últimas quatro décadas as espécies de *Campylobacter* spp. têm sido reconhecidas como patógenos emergentes e despontaram como importantes agentes de gastroenterites de origem alimentar em várias partes do mundo (BUTZLER, 2004). A contaminação de carcaças de frangos em abatedouros e o consumo de alimentos à base de frango mal cozido além da contaminação cruzada durante a manipulação de alimentos crus são considerados os principais fatores de risco para infecções (STERN et al., 2001, ROZYNEK et al., 2005).

Nas trinta amostras de carcaças resfriadas de frango analisadas neste estudo, 21 (70%) demonstraram a presença de *Campylobacter* spp. Em um estudo anterior, no município do Rio de Janeiro, onde foram analisadas dez amostras de sobrecoxas de frango, também foi verificado *Campylobacter* spp. em 70% das amostras (MEDEIROS, 2009). Resultados similares foram obtidos por Granic et al. (2009) que isolaram *Campylobacter* spp. em 66,6% das amostras de carcaças de frango adquiridas em pontos de processamento na Croácia e por Kassa et al. (2005) que encontraram 68,1% de *Campylobacter* termotolerantes em amostras de frango na Etiópia. Resultados superiores foram obtidos por Zorman & Mozina (2002) que analisaram 33 amostras de coxas e fígado de frango na Eslovênia e 81,8% das amostras continham *Campylobacter* termotolerantes. Em Lisboa, Simões (2010) constatou que 100% das 21 amostras de peito de frango resfriado e embalado para consumo estavam contaminadas com *Campylobacter* spp. Índices menores foram encontrados por Habib et al. (2008) que analisaram 656 amostras de cortes de frango temperados, expostos ao consumo na Bélgica e detectaram *Campylobacter* spp em 315 (48,0%) amostras.

Vários estudos no Brasil têm demonstrado a presença de *Campylobacter* spp. em carne de frango, como Kuana (2005) que analisou 22 lotes de frango de corte na região sul do Brasil e encontrou *Campylobacter* spp. em 81,8% das amostras, assim como Franchin et al. (2005) que isolaram *Campylobacter* termofílicos em 22 dos 24 lotes de aves destinados ao abate (91,7%) na região Sul do Brasil. Freitas e Noronha (2007) analisaram carnes e miúdos de frango expostos ao consumo em Belém do Pará e das 16 amostras, 93,7% estavam contaminadas por *Campylobacter* spp.

O percentual observado no presente estudo para *Campylobacter* spp. (70%) foi mais alto que o verificado por Cortez et al. (2006) onde a porcentagem de

amostras contendo *Campylobacter* spp. foi de 4,9% (14/288) em abatedouro de aves no Estado de São Paulo e por Carvalho et al. (2002) que analisaram 50 amostras de carcaça de frango após a evisceração em um abatedouro industrial, também em São Paulo, e encontraram apenas 18 (36%) amostras contaminadas por *Campylobacter jejuni*. Dados mostrados por Carvalho et al. (2010) revelaram positividade de 12,5% nas 80 amostras de sobrecoxas resfriadas de frango comercializadas neste mesmo município ao passo que Scarcelli et al. (2005) não detectaram a presença de *Campylobacter* spp. em 74 amostras de carcaças e cortes de frango provenientes de um abatedouro de São Paulo. Índices de contaminação de apenas 5,2% foram observados por Gomes et al. (2006), em swabs cloacais de 404 aves domésticas no município de Pelotas – RS.

Das 21 amostras deste estudo que apresentaram *Campylobacter* spp. seis (28,5%) foram provenientes de carcaças adquiridas em abatedouros, sendo três com Serviço de Inspeção Estadual (SIE) e três de abatedouros sem inspeção, oito (38%) amostras de supermercados e sete (33%) de feiras livres. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os resultados dos diferentes estabelecimentos ao nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

Os dados obtidos estão em concordância com Freitas e Noronha (2007) que analisaram carcaças e miúdos de frango em abatedouros sob inspeção e clandestinos em Belém do Pará e verificaram que 93,7% das amostras estavam contaminadas com *Campylobacter* spp. independente da procedência. Em São Paulo, Carvalho et al. (2010) analisaram 80 amostras de sobrecoxas resfriadas de frangos e isolaram *Campylobacter* spp. em 10 (12,5%), sendo cinco amostras originárias de feiras livres e cinco de hipermercados. No estudo conduzido por Cortez et al. (2006), não houve diferença significativa na presença de *Campylobacter* spp. nos produtos avaliados de abatedouros de aves com Serviço de Inspeção Federal (SIF) e Inspeção Estadual (SISP), em São Paulo.

Boas condições de higiene em abatedouros com serviço de inspeção foram verificadas por Dias et al. (1990) ao analisarem 100 amostras de carcaças de frango, sendo 50 em abatedouros com serviço de inspeção e 50 em estabelecimentos sem inspeção em Belo Horizonte. Os autores observaram índices maiores de contaminação por *C. jejuni* em abatedouros sem inspeção, com 19 (38,0%) amostras positivas enquanto nos abatedouros com inspeção apenas uma (2,0%) amostra estava positiva.

No presente estudo o isolamento de *Campylobacter* spp. foi obtido da etapa de plaqueamento direto nos meios seletivos mCCDA e Campy Cefex. A utilização da etapa de enriquecimento seletivo em caldo Bolton simples e em dupla concentração não se mostrou eficiente no isolamento de *Campylobacter* spp. Talvez a concentração de vancomicina, antibiótico capaz de inibir bactérias Gram positivas, tenha sido insuficiente, já que foram observados ao microscópio óptico microorganismos desse grupo. Resultado semelhante foi obtido por Medeiros (2009) que só isolou *Campylobacter* spp. através do plaqueamento direto da água da enxaguadura. Habib et al. (2008) compararam a recuperação de *Campylobacter* spp. por meio das técnicas de enriquecimento seletivo em caldo Bolton e plaqueamento direto em agar mCCDA na Bélgica. Para a pesquisa foram utilizadas amostras de carne de frango cortada e temperada. Foi verificado que a recuperação por plaqueamento direto foi significativamente maior (41,0%) comparado com o enriquecimento seletivo (24,2%). Jasson et al. (2009) avaliaram a recuperação de *C. jejuni* no caldo de enriquecimento Bolton com posterior plaqueamento no mCCDA e verificaram que em amostras contaminadas com números elevados de *Escherichia coli*, ocorria um crescimento excessivo desse contaminante mascarando a visualização de colônias características de *Campylobacter* nas placas de mCCDA. Esse grupo de pesquisadores levantou a hipótese de que este meio de cultura contém quantidades limitadas de compostos seletivos sendo insuficiente para inibir a microbiota acompanhante em amostras muito contaminadas o que poderia explicar a dificuldade para a detecção de *C. jejuni*.

Resultados diferentes foram encontrados por Franchin et al. (2005) que não encontraram dificuldades na etapa de enriquecimento com o caldo Bolton e isolaram grande número de *Campylobacter* spp. (91,7%) em lotes de aves destinados ao abate na região Sul do Brasil, assim como Johnsen et al. (2006) que isolaram 100% de *Campylobacter* termotolerantes em 14 amostras de frango de corte utilizando o enriquecimento com caldo Bolton e o isolamento no mCCDA. Kuana et al. (2008a) isolaram 97,9% (94/96) de *Campylobacter* em carcaças de frango utilizando o pré-enriquecimento com caldo Bolton e o plaqueamento direto com mCCDA. Os autores verificaram que o método de isolamento direto em placas de mCCDA não detectou *Campylobacter* em duas carcaças, sendo o isolamento conseguido com pré-enriquecimento em caldo Bolton. Em outro estudo, Kuana et al. (2008b), compararam o pré-enriquecimento em caldo Bolton (PE) com o isolamento direto

(ID) em placas de mCCDA, e concluíram que os dois métodos foram homogêneos e sensíveis para detecção de *Campylobacter* em amostras de swabs cloacais e de carcaças de frango, entretanto, devido à antecipação dos resultados em 24 horas os autores recomendam a utilização do plaqueamento direto.

Oyarzabal et al. (2005) avaliaram seis tipos de meios seletivos para o isolamento de *Campylobacter* e constataram que o Campy Cefex e o mCampy Cefex apresentaram melhores resultados, apesar desses dois meios terem sido estatisticamente similares ao CAMPY, mCCDA e Karmali. Apenas o Campy-Line conseguiu baixa recuperação de *Campylobacter* em amostras proveniente de água de enxaguadura de frango.

Os testes presuntivos de coloração de Gram, catalase e oxidase compõem os padrões mínimos para identificação do gênero *Campylobacter* depois do isolamento primário, desta forma são necessários e empregados por muitos autores (DIAS et al. 1990, HARMON et al. 1997, KASSA et al. 2005, GRANIC et al. 2009, CARVALHO et al. 2010). No presente estudo estes testes foram utilizados e apresentaram resultados compatíveis quanto à caracterização do gênero.

Todos os 21 isolados submetidos ao teste confirmativo de aglutinação em látex foram positivos para o gênero *Campylobacter* spp., em concordância com os resultados obtidos por Harmon et al. (1997) e Miller et al. (2009). Desta forma o ensaio imunológico utilizado neste estudo, oferece uma boa alternativa na confirmação de *Campylobacter* spp.

A identificação das espécies de *Campylobacter* é difícil devido ao crescimento lento e fatidioso desse patógeno (NAYAK, 2005). Em algumas cepas, como *Campylobacter jejuni* e *C. coli*, a diferenciação se baseia apenas no teste da hidrólise do hipurato e, em alguns casos, a identificação definitiva não é possível com os testes laboratoriais utilizados pela metodologia convencional (STERN et al., 2001), fazendo destes organismos candidatos ideais à identificação por PCR (ENGLER, 2000). Apesar disto, a bioquímica convencional é amplamente utilizada em laboratórios de microbiologia para a diferenciação de espécies de *Campylobacter*, pois muitas vezes não dispõem de métodos moleculares.

A bioquímica convencional dos 21 isolados obtidos neste estudo revelou que 19 foram identificados como *C.jejuni* (90,5%) e dois como *C. coli* (9,5%), sendo este último encontrado em apenas uma amostra de abatedouro e em uma amostra de feira-livre. Todos os isolados de supermercados foram identificados como *C. jejuni*

embora um isolado tenha sido inconclusivo no teste da hidrólise do hipurato.

A hidrólise do hipurato que diferencia *C. jejuni* das outras espécies termofílicas é decisiva (TOTTEN et al., 1987). Os isolados que expressaram a enzima hipuricase foram classificados como *C. jejuni*. Apenas um isolado (4,8%) apresentou coloração muito “fraca” e foi considerado resultado “duvidoso” ou não conclusivo resultado também encontrado por Harmon et al. (1997) Baseado em dados da literatura, o gene da hippuricase está presente em todas as cepas de *C. jejuni* apesar de algumas não expressarem a enzima para esta reação. Pequenas alterações na quantidade do inóculo, excessivos subcultivos, deleções no gene *hip* ou até mesmo a presença deste gene, mas ausência de sua transcrição pode interferir na correta identificação da espécie (Linton et al., 1997).

Totten et al. (1987), fizeram a identificação fenotípica e molecular de 98 cepas de *Campylobacter* termofílicos e verificaram que das 46 cepas negativas no teste da hidrólise do hipurato, nove foram confirmadas como *C. jejuni* no teste molecular. Este fato demonstra que a técnica molecular é mais sensível e uma boa opção para a obtenção de resultados mais precisos.

Em relação à susceptibilidade ao ácido nalidíxico e a cefalotina, os resultados encontrados foram diferentes daqueles descritos na literatura para 16 isolados (76,2%). Conforme a tabela 1, *C. jejuni* e *C. coli* são sensíveis ao ácido nalidíxico e resistentes a cefalotina, *C. lari* é resistente aos dois antibióticos e *C. upsaliensis* é sensível aos dois antibióticos. Neste estudo cinco isolados apresentaram sensibilidade aos dois antibióticos (característica de *C. upsaliensis*), no entanto foram positivos no teste da hidrólise do hipurato sendo classificados como *C. jejuni*. Onze amostras apresentaram resistência aos dois antibióticos, no entanto dez foram positivas no teste do hipurato e foram classificadas como *C. jejuni* resistentes ao ácido nalidíxico, uma amostra foi negativa na hidrólise do hipurato, mas positiva no teste da hidrólise do indoxil acetato sendo classificada como *C. coli* resistente ao ácido nalidíxico. Vilardo et al. (2006) identificaram 167 isolados de *Campylobacter* e encontraram seis (3,6%) *C. coli* e dois (1,2%) *C. jejuni* resistentes ao ácido nalidíxico, porém, esses isolados foram confirmados pela PCR e caracterizados como cepas resistentes a este antibiótico.

Embora a susceptibilidade ao ácido nalidíxico e a cefalotina seja considerada característica taxonômica diferencial das espécies termofílicas de *Campylobacter* segundo a ISO 10272-1:2006, os resultados obtidos neste estudo, bem como

aqueles encontrados por Vilaro et al. (2006), onde 4,8% de *C. coli* e *C. jejuni* não foram susceptíveis ao ácido nalidixico, demonstraram a inconsistência desse marcador. A susceptibilidade aos antimicrobianos está associada a muitos fatores relacionados a expressão de genes de resistência; a presença de elementos móveis (por exemplo plasmídios) contendo genes de resistência; além das altas taxas de transferência lateral de genes. Estes e outros fatores fazem com que estes marcadores sejam inconstantes e inapropriados como característica taxonômica. Diante das divergências encontradas em um grande número de isolados (76,2%), pela presença de linhagens atípicas bioquimicamente e ou por fatores de resistências adquiridas, a identificação dos nossos isolados foi complementada pela utilização de metodologia da PCR, como técnica confirmatória na identificação das espécies, conforme sugerido na literatura.

Oyofe et al. (1992) conseguiram amplificar o gene *flaA* de *C. jejuni* e *C. coli* com DNA genômico obtido por lise térmica. Baseado nos resultados de Oyofe et al. (1992), Mohran et al. (1998) avaliaram 45 isolados de uma coleção de *C. jejuni* e *C. coli* no Egito utilizando DNA extraído por fervura e por um método que envolve tratamento com proteinase K e dodecil sulfato de sódio (SDS). Os autores verificaram que no método que empregou SDS todos os DNA foram amplificados pela PCR, já com o método da fervura nove (20%) dos 45 isolados não foram amplificados. Resultados semelhantes foram encontrados por Englen & Kelley (2000) que extraíram o DNA de 38 isolados de *Campylobacter* pelo método de lise térmica e verificaram que o DNA de sete (18,4%) isolados não foi amplificado. Assim como Vilaro et al. (2006) que utilizaram 167 isolados e observaram que 46 (27,5%) não tiveram seu DNA amplificado com extração por fervura. Contrário a esses resultados, Wang et al. (2002) e Nayak et al. (2005) conseguiram identificar 137 e 194 isolados, respectivamente, de *Campylobacter* por PCR com extração do DNA por fervura. Por outro lado, não foi verificado na literatura dados de ausência de amplificação frente a DNA genômico obtido por meio de Kits de extração.

A proposta inicial deste estudo foi realizar a duplex PCR, empregando os genes da oxirredutase e *flaA*, utilizados por Vilaro et al. (2006). Enquanto o gene da oxidoreductase foi rapidamente amplificado nas condições descritas, o gene *flaA* apresentou inúmeras inespecificidade na otimização da PCR. A baixa especificidade em relação aos genes *flaA* e *flaB* foi logo observada por Harmon et al. (1997) que desenharam a duplex PCR utilizada por Vilaro et al. (2006). Harmon et

al. (1997) verificaram a amplificação de *flaA* (460 bp) e ausência do outro fragmento esperado (1,8 kb) para o gene *flaB*, descrito por Oyofó et al. (1992). Esses pesquisadores justificam que o *primer* pg3, provavelmente pode ligar em dois pontos, sendo que o fragmento de 460 pb foi preferencialmente sintetizado por ser menor.

Persson e Olsen (2005) e Potturi-Venkata et al. (2007) em seus experimentos utilizaram os genes *asp* (500 pb), *hipO* (735 pb) e 16S rRNA (854 pb) descritos por Linton (1997), específicos para o reconhecimento das espécies *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni* e o gênero *Campylobacter*, respectivamente. Por outro lado, Denis et al. (1999), selecionaram três genes, sendo 16S rRNA (857 pb) para *Campylobacter* spp.; *mapA* (589 pb) para *Campylobacter jejuni* e *ceuE* (462 pb) para *Campylobacter coli*, descritos por Linton et al. (1997), Stucki et al. (1995) e Gonzalez et al. (1997), respectivamente. Estas pesquisas permitiram a identificação das duas espécies, *C. jejuni* e *C. coli*, em uma única PCR, diminuindo o tempo de resposta.

A duplex PCR estabelecida no presente estudo, utilizando os genes 16S rRNA e oxidoreductase, foi sensível, específica e reprodutível. A análise da PCR “in silico” colaborou para a confirmação da especificidade da duplex em relação a outras espécies de *Campylobacter* (tabela 4). A duplex PCR apresentada certificou a identidade tanto dos isolados cujos perfis bioquímicos não apresentaram dúvidas como daquele isolado cuja hidrólise do hipurato foi inconclusiva. Além disso, a PCR ofereceu a vantagem de identificar os isolados em aproximadamente 4 horas após a obtenção da colônia pura, ao passo que os métodos convencionais levam cerca de sete dias entre o isolamento em alimentos e a confirmação do resultado positivo através da identificação bioquímica (MOORE et al., 2005).

Por ser a hidrólise do hipurato considerada uma prova bioquímica decisiva na diferenciação de *C. jejuni* de outras espécies termofílicas, a presença de inconsistências pode levar a interpretações equivocadas. Harmon et al. (1997) e Vilaro et al. (2006) relataram a presença de isolados inconclusivos pela bioquímica na hidrólise do hipurato e necessitaram da PCR para conclusão da identificação. Esta diferença foi igualmente confirmada através do trabalho elaborado por Nakari, Puhakka e Siitonen (2008), que compararam os resultados obtidos entre o teste de hidrólise do hipurato e a PCR *multiplex*, tendo identificado por este último, 39% das amostras como *Campylobacter jejuni*, enquanto que no teste bioquímico apenas 11% das amostras foram hipurato-positivas.

As espécies termofílicas *C. jejuni* e *C. coli*, são responsáveis por estimadamente 400 milhões de casos de gastroenterite humana, tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento, o que as tornam a causa mais importante de doença bacteriana transmitida por alimentos, superando doenças entéricas causadas por *Salmonella sp.*, *Shigella sp.* e *Escherichia coli*, representando um dos mais importantes enteropatógenos para a saúde pública (ZOETE et al., 2007; MOORE et al., 2005).

Considerando a relevância desse tema, a implementação de métodos seguros e rápidos na detecção desse patógeno alimentar contribui para a aplicação de sistemas de segurança alimentares baseados no controle de qualidade da carne de frango resfriada, devido ao seu grande consumo, o que gera impacto na saúde pública mundial.

Embora a caracterização fenotípica tenha oferecido resultados confiáveis, a certificação pela abordagem molecular apresentou dados ainda mais consistentes, que possibilitou a obtenção dos objetivos propostos no estudo.

## 6. CONCLUSÕES

- Das 30 amostras de carcaças resfriadas de frango analisadas 21 (70%) demonstraram a presença de *Campylobacter* spp.
- Dos 21 isolados dois (9,5%) foram provenientes da etapa do enriquecimento seletivo (Bolton simples) e plaqueamento direto e 19 (90,5%) foram através do plaqueamento direto (mCCDA e Campy Cefex). Portanto a recuperação por plaqueamento direto foi maior e mais rápida do que o enriquecimento seletivo.
- Dos 21 isolados, 19 foram identificados bioquimicamente como *C. jejuni* (90,5%) e dois como *C. coli* (9,5%). Embora eficiente, a identificação bioquímica convencional apresentou alguns resultados inconclusivos, principalmente em relação às cepas atípicas bioquimicamente.
- A duplex PCR desenvolvida para detecção simultânea de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* revelou boa sensibilidade e especificidade. Com base na literatura consultada sua utilização é proposta pela primeira vez e mostrou-se como uma alternativa à bioquímica convencional, uma vez que pode ser concluída no prazo de um dia.
- As duas técnicas de extração de DNA genômico de *Campylobacter* foram eficazes. Entretanto, para a amplificação pela PCR, a qualidade do DNA obtido pelo kit QIAGEN foi superior ao método da lise térmica.
- Em relação ao local da coleta das amostras (abatedouros com ou sem Inspeção, supermercados e feiras livres) não houve diferença estatisticamente significativa nos resultados encontrados ( $p < 0,05$ ).

## REFERÊNCIAS

AÇIK, M. N., ÇETINKAYA, B. Heterogeneity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains from health sheep. **Veterinary Microbiology**. n.115, p. 370-375, 2006.

ADAK, G., LONG, S.M., O'BRIEN, S.J. Trends in indigenous foodborne disease and deaths, England and Wales: 1992 to 2000. **Gut**, v.51, n. 6, p.832-841, 2002.

ALTEKRUSE, S.F., et al. *Campylobacter jejuni* – An Emerging Foodborne Pathogen. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, n. 1, p.28 - 35, 1999.

AMSON, G. V., HARACEMIV, S. M. C., MASSON, M. L. Levantamento de Dados Epidemiológicos relativo à ocorrências/surtos de Doenças Transmitidas por alimentos (DTAs) no Estado do Paraná – Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1139-1145, nov./dez., 2006.

ANDRADE, R. B., et al. Métodos Diagnósticos para os Patógenos Alimentares: *Campylobacter* sp., *Salmonella* sp., e *Listeria monocytogenes*. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 77, n. 4, p. 741-750, out./dez., 2010.

BRASIL. Resolução RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos e seus anexos I e II. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 7-E, p. 45, 10 jan. 2001. Seção 1.

\_\_\_\_\_, Resolução RDC nº 259 de 20 de setembro de 2002 – Aprova o Regulamento Técnico sobre Rotulagem de Alimentos Embalados. **Diário oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 21 set. 2002.

\_\_\_\_\_, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim eletrônico epidemiológico**. Ano 5, n. 6, 2005. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/bol\\_epi\\_6\\_2005\\_corrigeo.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/bol_epi_6_2005_corrigeo.pdf)>. Acesso em: 25 mar. 2011.

BUTZLER, J. P., *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. **Clinical Microbiological Infections**. v. 10, p. 868-876, 2004.

CARVALHO, A.C.F.B.; LIMA, V.H.C.; PEREIRA, G.T. Determinação dos principais pontos de risco de contaminação de frangos por *Campylobacter*, durante o abate industrial. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.16, n. 99, p. 89-93, 2002.

CARVALHO, A. F., et al. Detecção dos genes da toxina citolética distensiva em estirpes de *Campylobacter jejuni* isoladas de carcaças de frangos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**. v. 62, n. 5, p. 1054-1061, 2010.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (USA). **FoodNet**: Foodborne Diseases Active Surveillance Network. Atlanta, 2010a. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/FoodNet/>>. Acesso em: 17 jan. 2011.

\_\_\_\_\_, Centers for Disease Control and Prevention – National Center for Zoonotic, Vector-borne and Enteric diseases. **Campylobacter general information**, 2010b. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/campylobacter/>>. Acesso em: 29 dez. 2010.

CORRY, J. E. L.; et al. Culture media for the isolation of Campylobacters. **International Journal of Food Microbiology** v. 26, p. 43-76, 1995.

CORTEZ, A. L. L., et al. Survey of chicken abattoir for the presence of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.** v. 48, n. 6, p. 307-310, 2006.

CUOMO, A., et al. Detection of thermotolerant Campylobacter in ostriches (*Struthio camelus*) in Italy. **The Veterinary Journal**, n. 174, p. 439–441, 2007.

DEKEYSER, P; GOSSUIN-DETRAIN, M; BUTZLER, JP. et al. Acute enteritis due to related vibrio: first positive stool cultures. **J. Infect. Dis.** n. 125, p. 390-392, 1972.

De WAAL, C.S. Outbreak Alert! Tendências dos surtos de doenças transmitidas por alimentos nos Estados Unidos (1990–2005). **5ª Reunião da Comissão Pan-Americana de inocuidade dos Alimentos (COPAIA 5)**. Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS). Rio de Janeiro, 2008.

DENIS, M. et al. Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, p. 406–410, 1999.

DIAS, T. C., et al. Chicken carcasses as a source of Campylobacter jejuni in Belo Horizonte, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 32, n. 6, p. 414-418, nov./dez., 1990.

DOYLEY, L. P. A. Vibrio Associated with swine dysentery. **American Journal of Veterinary Reserch**, Chicago, v. 5, p. 3-5, 1944.

ENGLIN, M. D & KELLEY, L. C. A rapid DNA isolation procedure for the identification of Campylobacter jejuni by the polymerase chain reaction. **Letters in Applied Microbiology**. v. 31, p. 421-426, 2000.

ENTIS, P et. al. Rapid Methods for Detection, Identification, and Enumeration. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Washington, DC: APHA, 2001. chap 10, p. 89-126.

ESCHERICH, T. Beitrage zur kenntsiss der Darmbakterien. III. Uber das Vorkommen van Vibrionen in Darmcanal und den Stuhlgangen deer Sauglinge. **Munch Med Wochenschr**, Stuttgart, v. 33, p. 833-835, 1886.

EUZÉBY, J.P. **List of prokaryotic names with standing in nomenclature: genus Campylobacter**. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/c/campylobacter.html>>. Acesso em: 27 dez. 2010.

\_\_\_\_\_, J.P.: List of prokaryotic names with standing in nomenclature - genus *Campylobacter*. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/c/campylobacter.html>. Acesso em: 04 out. 2009.

\_\_\_\_\_, J.P.: List of prokaryotic names with standing in nomenclature - genus *Campylobacter*. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/c/campylobacter.html>. Acesso em: 27 dez. 2010.

FENG, P. Development and Impact of Rapid Methods for Detection of Foodborne Pathogens In: DOYLE, M.P.; BEAUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. **Food Microbiology Fundamentals and Frontiers**, Washington, D.C: ASM Press, 2001. chap. 38, p. 775-796.

FERNANDEZ, H. Thermotolerant *Campylobacter* species associated with human diarrhea in Latin America. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 44, p. 39-44, 1992.

\_\_\_\_\_, *Campylobacter* e *Arcobacter* In: TRABULSY, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia – Revista Atualizada**, Rio de Janeiro: Atheneu, 2005., p. 347-352.

FONSECA, B. B., **Transmissão Vertical de *Campylobacter* sp em um Sistema de Produção Avícola**. Minas Gerais: Universidade Federal de Uberlândia, 2006. 65 f. il. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária, Uberlândia. 2006

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424 p.

FRANCO, B.D.G.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2002. 182 p.

FRANCHIN, P. R., AIDOO, K. E., BATISTA, C. R. V. Sources of poultry meat contamination with thermophilic *Campylobacter* before slaughter. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 36, p. 157-162, 2005.

FREITAS, J. A.; NORONHA, G. N. Ocorrência de *Campylobacter* spp. em carne e miúdos de frango expostos ao consumo em Belém, Pará. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**. v. 59, n.3, p. 813-815, 2007.

GANDRAA, E. A., et al., Técnicas Moleculares Aplicadas à Microbiologia de Alimentos. **Acta Sci Technol**. Maringá, v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.

GEORGE, H. A et al.. Improved Media for Growth and Aerotolerance of *Campylobacter fetus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 36-41, 1978.

GERMANO, P. M. L., GERMANO, M. I. S., **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2001. 629 p.

GOMES, F. R., et al. *Campylobacter jejuni* occurrence in chicken fecal samples from small properties in Pelotas, southern of. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 375-378, 2006.

GONZALEZ, I., et al. Specific Identification of the Enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by Using Test Based on the *ceuE* Gene Encoding a Putative Virulence Determinant. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 759-763, 1997.

GORKIEWICZ, G., et al., Species-Specific Identification of *Campylobacters* by Partial 16S Rna Gene Sequencing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 2537–2546, June 2003.

GRANIC, K., et al. Determination of *Campylobacter* spp. In poultry slaughterhouses and poultry meat. **Veterinarski Arhiv**, v. 5, p. 491-497, 2009.

HABIB, I., et al. Baseline Data from a Belgium-Wide Survey of *Campylobacter* Species Contamination in Chicken Meat Preparations and Considerations for a Reliable Monitoring Program. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 5483–5489, Sept. 2008.

HAGENS, S., LOESSNER, M. J., Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 76, p. 513–519, 2007.

HANI, E. K., CHAN, V. L. Expression and Characterization of *Campylobacter jejuni* Benzoylglycine Amidohydrolase (Hippuricase) Gene in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 9, p. 2396–2402, 1995.

HARMON, K. M., RANSOM, G. M., WESLEY, I. V. Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by polymerase chain reaction. **Molecular and Cellular Probes**, n. 11, p. 195-200, 1997.

HARTMAN, P. A. The Evolution of Food Microbiology. In: DOYLE, M.P.; BEAUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. **Food Microbiology Fundamentals and Frontiers**. Washington, D.C: ASM Press, 2001. chap. 1, p. 3-12.

HAVELAAR, A. et al. **CARMA**: a multidisciplinary project to evaluate the cost and benefits of controlling *Campylobacter* in the Netherlands. Interventions against *Campylobacter*. Cambridge, 2005.

HAZELEGER, W. et al. Detection of the coccoid form of *Campylobacter jejuni* in chicken products with the use of the polymerase chain reaction. **International Journal of Food Microbiology**. v. 24, p. 273-281, 1994.

HUMPHREY, T., O'BRIEN, S., MADSEN, M., *Campylobacter* as zoonotic pathogens: A food production perspective. **International Journal of Food Microbiology**, v.117, p. 237-257, 2007.

ISO 10272-1:2006. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Campylobacter* spp. Part 1: Detection method; Part 2: Colony count technique. International Organisation for Standardisation (ISO), ISO Central Secretariat, 1 rue de Varembé, Case Postale 56, CH - 1211, Geneva 20, Switzerland.

JASSON, V. et al. Characterization of *Escherichia coli* from raw poultry in Belgium and impact on the detection of *Campylobacter jejuni* using Bolton broth. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, p. 248–253, 2009.

JOHNSEN, G., KRUSE, H., HOFSHAGEN, M. Genotyping of *Campylobacter jejuni* from Broiler Carcasses and slaughterhouse Environment by Amplified Fragment Length Polymorphism. **Poultry Science**. v. 85, p. 2278–2284, 2006.

JONES, F.S.; ORCUTT, M.; LITTLE, R.B. Vibrios (*Vibrio jejuni* n. sp.) associated with intestinal disorders of cows and calves. **The Journal of Experimental Medicine**. n .53, p. 853-864, 1931.

KASSA, T., et al. The prevalence of thermotolerant *Campylobacter* species in food animals in Jimma Zone, southwest Ethiopia. **Ethiop.J.Health Dev**. v. 3 n. 19, 2005.

KING, E.O. Human infections with vibrio fetus and a closely related vibrio. **J. Infect. Dis.** n.101, p. 119-128, 1957.

KIRK, R.; ROWE, M. T. A PCR assay for the detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in water. **Letters in Applied Microbiology**. n. 19, p. 301-303, 1994.

KONEMAN, E. W. et al. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. 1465 p.

KREUZER, H., MASSEY, A. **Engenharia Genética e Biotecnologia**. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 434 p.

KUANA, S. L. *Campylobacter* na produção e processamento de frangos de corte: prevalência, contagem, fatores de risco e perfil de resistência antimicrobiana. **Acta Scientiae Veterinarie**. v. 33, n. 1, p. 93-94, 2005.

\_\_\_\_\_, 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, abr./jun. 2008a.

\_\_\_\_\_, et al. Pré-enriquecimento e isolamento direto para identificação de *Campylobacter* em swabs cloacais e carcaças de frango. **Acta Scientiae Veterinarie**. v. 36, n. 1, p. 21-24, 2008b.

LEE, M.D.; NEWELL, D.G. *Campylobacter* in poultry: filling an ecological niche. **Avian diseases**. v. 50, p. 1-9, 2006.

LEVY, A. J. A Gastro-enteritis outbreak probably due to a bovine strain of vibrio. **Yale Journal of Biology and Medicine**, New Haven, v. 18, p. 243-258, 1946.

LINTON, D.; OWEN, R. J.; STANLEY, J. Rapid Identification by PCR of the genus *Campylobacter* and of five *Campylobacter* species enteropathogenic for man and animals. **Res. Microbiol. Institut Pasteur Elsevier**, n. 147 p. 707-718, 1996.

\_\_\_\_\_, et al., PCR Detection, Identification to Species Level, and Fingerprint to *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Direct from Diarrheic samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n.10, p. 2568-2572, 1997.

MAIER et. Al., **Avaliação da presença de fungos e bactérias patogênicas nas areias de duas praias de baixo hidrodinamismo e alta ocupação humana no litoral do município do Rio de Janeiro**. PREFEITURA DA CIDADE DO RIO DE JANEIRO Secretaria Municipal de Urbanismo Instituto Municipal de Urbanismo Pereira Passos. Nº 20030701 Julho – 2003.

MARINS, B. R., **Análise do hábito de leitura e entendimento/recepção das informações contidas em rótulos de produtos alimentícios embalados, pela população adulta freqüentadoras de supermercados, no município de Niterói/RJ**. 2004. 130 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2004.

MARSHALL, S. M.; et al. Rapid Identification of *Campylobacter*, *Arcobacter*, and *Helicobacter* Isolates by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the 16S rRNA Gene. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 37, n.12, p. 4158-4160, 1999.

MARTINEZ, I. et al. Detection of *cdtA*, *cdtB*, and *cdtC* genes in *Campylobacter jejuni* by multiplex PCR. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 296, p. 45-48, 2006.

MCFAYDEAN, J.; STOCKMAN. **Report of the Departmental Committee Appointed by the Board of Agriculture and Fisheries to Enquire into Epizootic Abortion**. Appendix to Part II. Abortion in Sheep. London: His Majesty's Stationery office, 1913. p. 1-64.

MEDEIROS, V. M., **Implantação de Metodologia de Pesquisa de *Campylobacter* spp. No Setor de Alimentos do Departamento de Microbiologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS**. 2009. 28 f. Monografia (Especialização em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2009

MILLER, R. S., SPEEGLE, L., OYARZABAL, O. A. Evaluation of Three Commercial Latex Agglutination Tests for Identification of *Campylobacter* spp **Journal of Clinical Microbiology**. Vol. 46, n. 10, p. 3546–3547, Oct. 2008.

\_\_\_\_\_, et al. DNA identification and characterization of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from caecal samples of chickens in Grenada. **Journal of Applied Microbiology**. v. 108, n. 3, p. 1041-1049, 2009.

MISAWA, N., et al., Development of a combined filtration-enrichment culture followed by a one-step duplex PCR technique for the rapid detection of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in human faecal samples. **J. Med. Microbiology**. v. 51, p. 86-89, 2002.

MOHRAN, Z. S. et al. Differentiation of *Campylobacter* Isolates on the Basis of Sensitivity to Boiling in Water as Measured by PCR-Detectable DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 363–365, Jan. 1998.

MOORE J. E., Caldwell PS, Millar BC, Murphy PG. Occurrence of *Campylobacter* spp. In water in Northern Ireland: implications for public health. **The Ulster Medical Journal**. v. 70, n. 2, p. 102-107, 2001.

MOORE, J. E., et al., *Campylobacter*. **Veterinary Research**. v. 36, p.351–382, 2005.

NACHAMKIN, I. *Campylobacter jejuni*. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. **Food Microbiology Fundamentals and Frontiers**. Washington, D.C: ASM Press, 2001. chap. 9, p.179-192.

NAKARI, U. M.; PUHAKKA. A. E.; SIITONEN, A. Correct identification and discrimination between *Campylobacter jejuni* and *C. coli* by a standardized hippurate test and species-specific polymerase chain reaction. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. V. 27, n. 7, p. 513-518, 2008.

NAYAK, R., STEWART, T. M., NAWAZ, M. S. PCR identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* by partial sequencing of virulence genes. **Molecular and Cellular Probes**, v. 19, P. 187–193, 2005.

NISHIMURA, M. et al., PCR-based RFLP analysis and serotyping of *Campylobacter jejuni* isolated from diarrheic patients in China and Japan. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 142, p. 133-138, 1996.

OLIVEIRA, K. A. M., et al. Ocorrência de *Campylobacter* no ambiente de criação de frando de corte. **Ceres**. v. 55, n. 6, p. 556-561, 2008.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. **Declaração Universal dos Direitos Humanos**. 1948. Disponível em: <[http://www.onu-brasil.org.br/documentos\\_direitoshumanos.php](http://www.onu-brasil.org.br/documentos_direitoshumanos.php)>. Acesso em: 30 set. 2009.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE . **Higiene dos Alimentos**: textos Básicos. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Food and Agriculture Organization of the United Nations; Organização Pan-Americana de Saúde. 2006.

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

OYOFO, B. A., et al., Specific Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by Using Polymerase Chain Reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30 n. 10, p.2613-2619, 1992.

PERSSON, S., E OLSEN, k. E. P. Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, p. 1043-1047, 2005.

POTTURI-VENKATA, L. P. et al. Evaluation of Different Plate Media for Direct Cultivation of *Campylobacter* Species from Live Broilers. **Poultry Science**, 86, p. 1304–1311, 2007.

REES, J. H., et al. *Campylobacter jejuni* Infection and Guillain-Barré Syndrome. **New England Journal of Medicine**. n. 333, p. 1374-79, 1995.

RIZAL, A., KUMAR, A., VIDYARTHI, A. S., Prevalence of Pathogenic Genes in *Campylobacter jejuni* Isolated from Poultry and Human. **Internet Journal of Food Safety**, v. 12, p. 29-34, 2010.

RODRÍGUEZ-LÁZARO, D., et al., Trends in analytical methodology I food safety and quality: monitoring microorganisms and genetically modified organism. **Trends Food Sci Technol**, Amsterdam, v. 18, p. 306-319, 2007.

ROZYNEK, E.; DZIERZANOWSKA-FRANGAT, K.; JOZWIAK, P. et al. Prevalence of potential virulence markers in Polish *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates obtained from hospitalized children and from chicken carcasses. **J. M. Microbiol.**, v. 54, p. 615-619, 2005.

SÉBALD, M.; VERON, M. Teneur en baases de l'AND et classification des vibrions. **Annales de l'Institut Pasteur**, Paris, v. 105, p. 897-910, 1963.

SCALLAN, E.; et al. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. **Emerg Infect Dis.**, v.17, n. 11. 2011. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/eid/content/17/17.htm#cit/>>. Acesso em: 18 jan. 2011.

SCARCELLI, E., et al. Molecular subtyping of *Campylobacter jejuni* strains isolated from different animal species in the state of São Paulo, Brasil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v, 36, p. 378-382, 2005.

SIMÕES, A. M. M. **Avaliação da contaminação por *Campylobacter* spp. em peitos de frango embalados em atmosfera pretetora e em superfícies do ambiente fabril.** 2010, 72 f. Dissertação (Mestrado em Segurança Alimentar) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa. 2010

SKIRROW, M. B., *Campylobacter* Enteritis: a “new” disease. **British Medical Journal**, London, v. 2, p. 9-11, 1977.

SKOVGAARD, N. New trends in emerging pathogens. **International Journal of Food Microbiology**. v. 120 n. 3, p. 217-224, 2007.

SMITH, T. Spirilla Associated with disease of the membranes in cattle (infectious abortion). **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 28, p. 701-721, 1918.

STERN, N.J.; LINE, J.E.; CHEN, H-C. *Campylobacter* in: DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, Washington, DC: APHA, 2001. Chapter 31, p. 301-310.

STUCKI et al. Identification of *Campylobacter jejuni* on the basis of a species gene that encodes a membrane protein. **Journal of Clinical Microbiology** 33, 855–859, 1995.

THORNTON et al. Polynucleotide sequence relationships among flagellin genes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **Infect. Immun.** 58:2686-2689. 1990.

TOTTEN, P. A., et al. Prevalence and Characterization of Hippurate-Negative *Campylobacter jejuni* in King County, Washington. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 25, n. 9, p. 1747-1752, 1987.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA. **Norma técnica de produção integrada de frango**, 2009. Disponível em: <[http://www.abef.com.br/uba/uba\\_tecnico.php](http://www.abef.com.br/uba/uba_tecnico.php)>. Acesso em 21 jan 2011.

UBABEF. Associação Brasileira dos Produtores e exportadores de Frango. **Plano Nacional de Prevenção da Influenza Aviária e de Controle e Prevenção da Doença de Newcastle**. 2010. Disponível em: <<http://www.abef.com.br/Legislacoes/IN172006.pdf>>. Acesso em 31 dez 2010.

\_\_\_\_\_, Associação Brasileira dos Produtores e exportadores de Frango. **Estatísticas 2010** Disponível em: <[http://www.abef.com.br/noticias\\_portal/exibenoticia.php?notcodigo=2389](http://www.abef.com.br/noticias_portal/exibenoticia.php?notcodigo=2389)>. Acesso em 19 jan 2011.

VARNAN, A. H.; EVANS, M. G. **Foodborne Pathogens: an illustrated text**. Mosby - Year Book Inc., 1991, 557p.

VILARDO, M. C. B., et al., Application of biochemical and polymerase chain reaction assays for identification of *Campylobacter* isolates from non-human primates. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 10, n. 5, p. 499-501, 2006.

VINZENT R, DUMAS J, PICARD N. Septicémie grave au cours de la grossesse due à un Vibrión. Avortement consécutif. **Bull Acad Nat Med Paris**, v.131, p. 90–92, 1947.

WANG, R. F., SLAVIK, M. F., CAO, W. W., A rapid PCR methodo for detection for low numbers *Campylobacter jejuni*. **Journal of Rapid Methodos and Automation in Microbiology**, v. 1, p. 101-108, 1992.

WANG, G.; et al. Colony Multiplex PCR Assay for Identification and Differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, *C fetus subsp. Fetus*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40, n. 12, p. 4744-4747, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Food safety and foodborne illness**. Genebre: 2002. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/print.html>>. Acesso em: 09 mar. 2010.

WINTERS, D. K., SLAVIK, M. F. Evaluation of a PCR based assay for specific detection of *Campylobacter jejuni* in chicken washes. **Molecular and Cellular Probes**, n. 9, p. 307–10, 1995.

ZOETE, M. R. et al. Vaccination of chickens against *Campylobacter*. **Vaccine**, v. 25, n. 30, p. 5548-5557, Jul. 2007.

ZORMAN, T., MOZINA, S. Classical and Molecular Identification of Thermotolerant *Campylobacter*s from Poultry Meat. **Food Technol. Biotechnol**, v. 40, n. 3, p.177–184, 2002.

## ANEXO 1 – MEIOS DE CULTURA

Todos os meios foram submetidos ao controle de esterilidade, após o preparo e antes da sua utilização.

### a) - Água Peptonada Tamponada (APT)

Peptona	10 g
Cloreto de sódio	5 g
Fosfato de sódio dibásico	3,5 g
Fosfato de potássio monobásico	3,5 g
Água purificada	1000 mL

Suspender e dissolver os componentes em água destilada. Distribuir alíquotas de 225 mL em frascos erlenmeyers com capacidade de 500 mL. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

pH final: 7,2 ± 0,2 a 25°C.

Nota:

O meio pronto deve ser estocado em temperatura de 15 a 30°C.

### b) – Ágar mCCDA

Caldo Nutriente N° 2	25.0 g
Carvão Bacteriológico	4.0 g
Desoxicolato de sódio	3.0 g
Sulfato ferroso	0.25g
Piruvato de sódio	0.25g
Ágar-	12.0g
Água purificada	1000 mL

Dissolver os ingredientes em água purificada. Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos.

pH final 7,4 ± 0,2 a 25°C.

Suplemento contendo agentes seletivos para mCCDA (SR 155 E) – OXOID

Cefoperazone	16 mg
Anfotericina B	5 mg
Água purificada	2mL

Dissolver os agentes seletivos do suplemento na água purificada.

Meio final

Adicionar o conteúdo do suplemento em 500 mL do meio base a 50°C. Homogeneizar vagarosamente e distribuir em placas de Petri.

Nota:

Preparar as placas no dia anterior ao uso e estocar ao abrigo da luz. A seletividade diminui 48 horas após o preparo.

c) – Agar Campy-Cefex

Agar brucella	44.0g
Sulfato ferroso heptahidratado	0.5g
Bissulfato de sódio	0.29
Ácido pirúvico	0.5g
Água purificada	1000mL

Misturar os ingredientes em erlenmeyer e dissolver por aquecimento. Esterilize em autoclave a 121°C por 15 minutos. Esfrie a 50°C e adicione os suplementos.

Suplementos do Agar Campy-Cefex

Cefoperazone	33.0mg
Cycloheximide	200.0mg
Sangue lisado de cavalo	50.0mL

Cefoperazone: Dissolver 1.0g em 10mL de água purificada. Esterilizar por filtração. Estocar em tubos estéreis e estocar a -80°C.

Cycloheximide: Dissolver 2.0g em 10mL de metano 50%. Esterilizar por filtração.

d) – Columbia Base para Agar sangue

Peptona especial	23.0g
Amido	1.0g
Cloreto de sódio	5.0g
Ágar	10.0g
Água purificada	1000mL

Adicione 3,9 g em 100 mL de água destilada. Aqueça em banho-maria até dissolver o meio completamente. Esterilize em autoclave a 121°C por 15 minutos. Esfrie a 50°C e adicione 5 mL de sangue desfibrinado de carneiro, 5 mL da solução FBP e 0,5 mL da solução de antibióticos.

pH final 7,3 ± 0,2 a 25°C.

e) – Caldo Bolton dupla concentração

Peptona de carne	10.0g
Hidrolisado de Lactalbumina	5.0g
Extrato de levedura	5.0g
Cloreto de sódio	5.0g
Ácido alfa – cetoglutárico	1.0g
Piruvato de sódio	0.5g
Metabissulfito de sódio	0.5g
Carbonato de sódio	0.6g
Hemina	0.01g
Água purificada	500mL

Suspender os componentes em água purificada. Autoclavar a 121°C por 15 minutos. Resfriar a 48-50°C e acrescentar 25 mL de sangue lisado de cavalo e um frasco do suplemento seletivo (SR 0183 E). Homogeneizar antes do uso.

pH final: 7,4 ± 0,2 a 25°C.

f) – Suplemento contendo agentes seletivos para Bolton (SR 0183E) – OXOID

Cefoperazone	10.0mg
Vancomicina	10.0mg
Trimethoprin	10.0mg
Cycloheximide	25mg
Água purificada	2,5mL
Etanol	2,5mL

Dissolver os agentes seletivos do suplemento na água purificada e etanol.

Meio final

Adicionar o conteúdo do suplemento em 250 mL do meio base. Homogeneizar vagarosamente.

g) – Meio Brucella semi-sólido

Caseína de digestão pancreática	10.0g
Peptona de carne	10.0g
Dextrose	1.0g
Extrato de levedura	2.0g
Cloreto de sódio	5.0g
Bissulfito de sódio	0.1g
Agar	1,6g
Água purificada	1000mL

Pesar 2,8g de caldo Brucella (Difco), pesar 0,16g de Ágar-ágar e adicionar 100 mL de água purificada. Dissolver por aquecimento em banho-maria. Distribuir em tubos 13x100mm e esterilizar em autoclave a 121°C por 15 min.

Ajustar o pH entre  $7,0 \pm 0,2$  a 25°C.

Obs: Este meio de cultura é utilizado para manutenção de *Campylobacter* em estufa a 35 °C por 15 dias.

## ANEXO 2 – SOLUÇÕES, REAGENTES E PRESERVAÇÃO

### a) - Sangue lisado de cavalo

Este componente é solicitado ao CECAL/FIOCRUZ, após o recebimento, o sangue desfibrinado de cavalo deve ser congelado para a lise das células. Para o congelamento, distribuir porções de até 40 mL em tubos de centrifuga de polipropileno estéril com capacidade de 50 mL. Congelar a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Descongelar e congelar mais uma vez para completar a lise. Estocar os tubos contendo sangue por cerca de 6 meses. Pode ser congelado e recongelado diversas vezes.

### b) - Sangue desfibrinado de carneiro

Este componente é solicitado ao CECAL/FIOCRUZ e sua utilização se dá em até 15 dias após seu recebimento no setor.

### c) - Solução de FBP

Sulfato ferroso	0.5g
Sulfato ferroso	0.5g
Piruvato de sódio	0.5g
Piruvato de sódio	100mL

Esterilização por filtração. Manutenção em frasco âmbar, por 30 dias em geladeira.

### d) – Solução de antibióticos para Agar Columbia

Cefalotina	11mg
Lactato de trimetoprim	50mg
Vancomicina	91mg
Acti-dione (cicloheximide)	20mg
Colistina	22mg
Água destilada estéril	50mL

### e) – Solução de Fucsina Básica a 0,5%

Fucsina Básica	0.5g
Fucsina Básica	20mL
Água purificada q.s.p	100mL

Dissolver a fucsina no álcool. Acrescentar água purificada completando o volume para 100 mL. Se necessário filtrar para remover o excesso de partículas do corante.

f) – Reativo para oxidase (Oxalato de para-amino-dimetilanilina <sup>(N/H)</sup>)

Oxalato de para-amino-dimetilanilina <sup>(N/H)</sup>	0.5g
Água destilada/deionizada	50mL

Agitar até completa dissolução. Distribuir volumes em frascos de cor âmbar ou envoltas em papel alumínio. Identificar e datar. Manter a –20°C.

g) - Liofilização (Freeze-drying)

As culturas foram semeadas em meios de cultivo apropriados e após a incubação o crescimento foi coberto com “Skim Milk” (DIFCO 0001) a 10%, retirado com auxílio de uma alça de “Drigalky” e transferido para ampolas estranguladas, em volumes de 0,3 a 0,5 mL por ampola. Após a distribuição da suspensão em ampolas, estas foram colocadas em um banho de gelo seco e etanol absoluto, para congelamento rápido, onde a temperatura do banho chega a –70°C. Em 30 – 60 segundos de imersão no banho gelado, a suspensão estava congelada e foi transferida para um freezer a –70°C, onde permaneceu por 24-48 horas, antes de ser liofilizada. Este congelamento rápido é importante para evitar a formação de cristais de gelo entre as membranas dos micro-organismos, o que poderia inviabilizar as células, levando a ruptura de estruturas vitais das células.

Após este período as ampolas foram colocadas no liofilizador com o objetivo de retirar toda água da amostra por meio de sublimação à vácuo. O processo acontece por conta da pressão que o vácuo ocasiona no material fazendo com que haja a passagem da água em estado sólido para o estado gasoso. Após 18h, as ampolas foram transferidas para uma “árvore”, que permite a finalização do processo e o fechamento das ampolas com o auxílio de um maçarico de chama dupla. Foram liofilizadas cinco ampolas de cada isolado.

h) - Preparo de Géis e Tampões

Tampão TBE 0,5X

TAMPÃO tbe 10x.....125µl

Água MilliQ esterilizada q.s.p.....2500mL

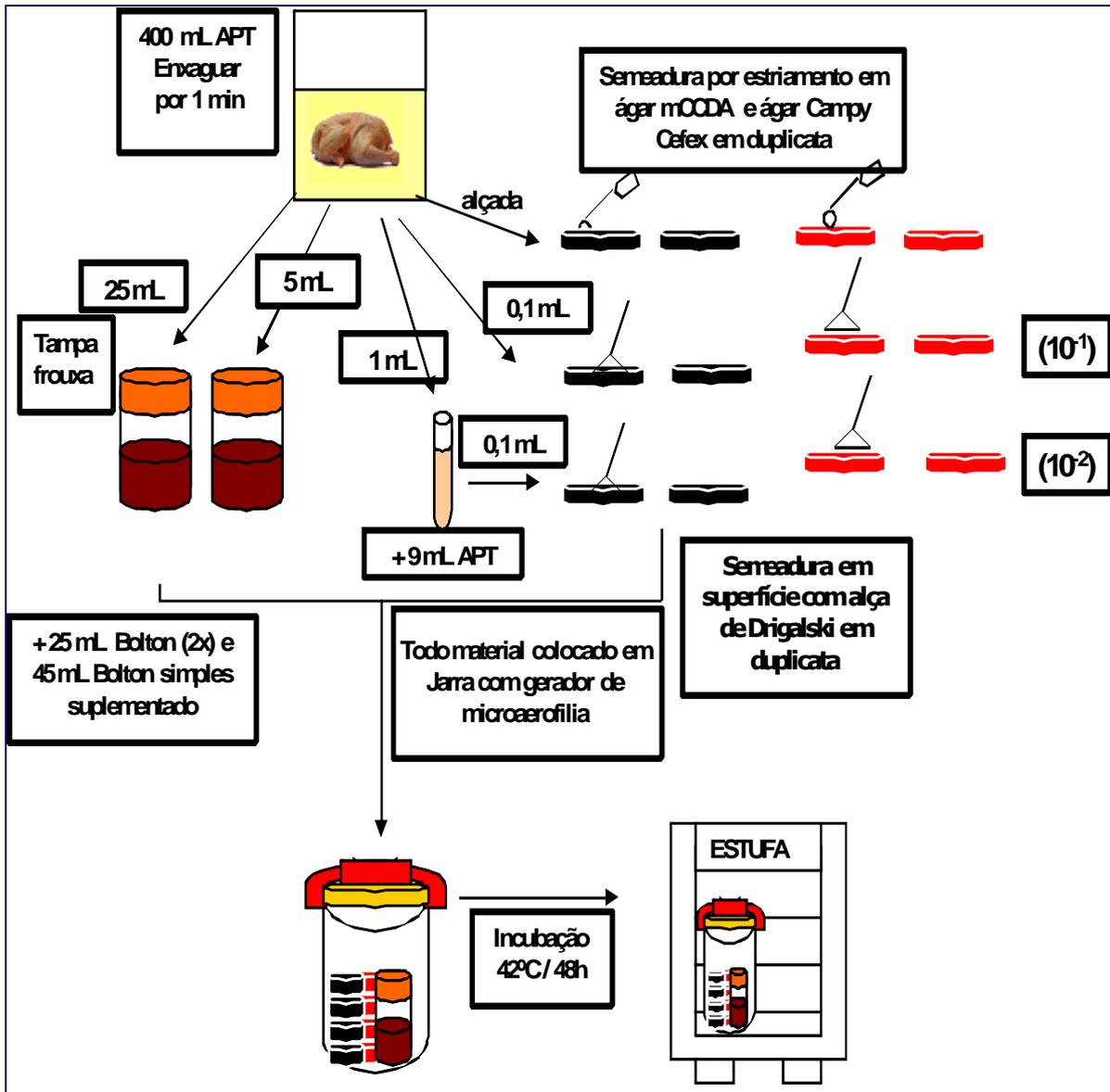
i) Gel de agarose

Agarose (Sigma A-0169).....1,5g

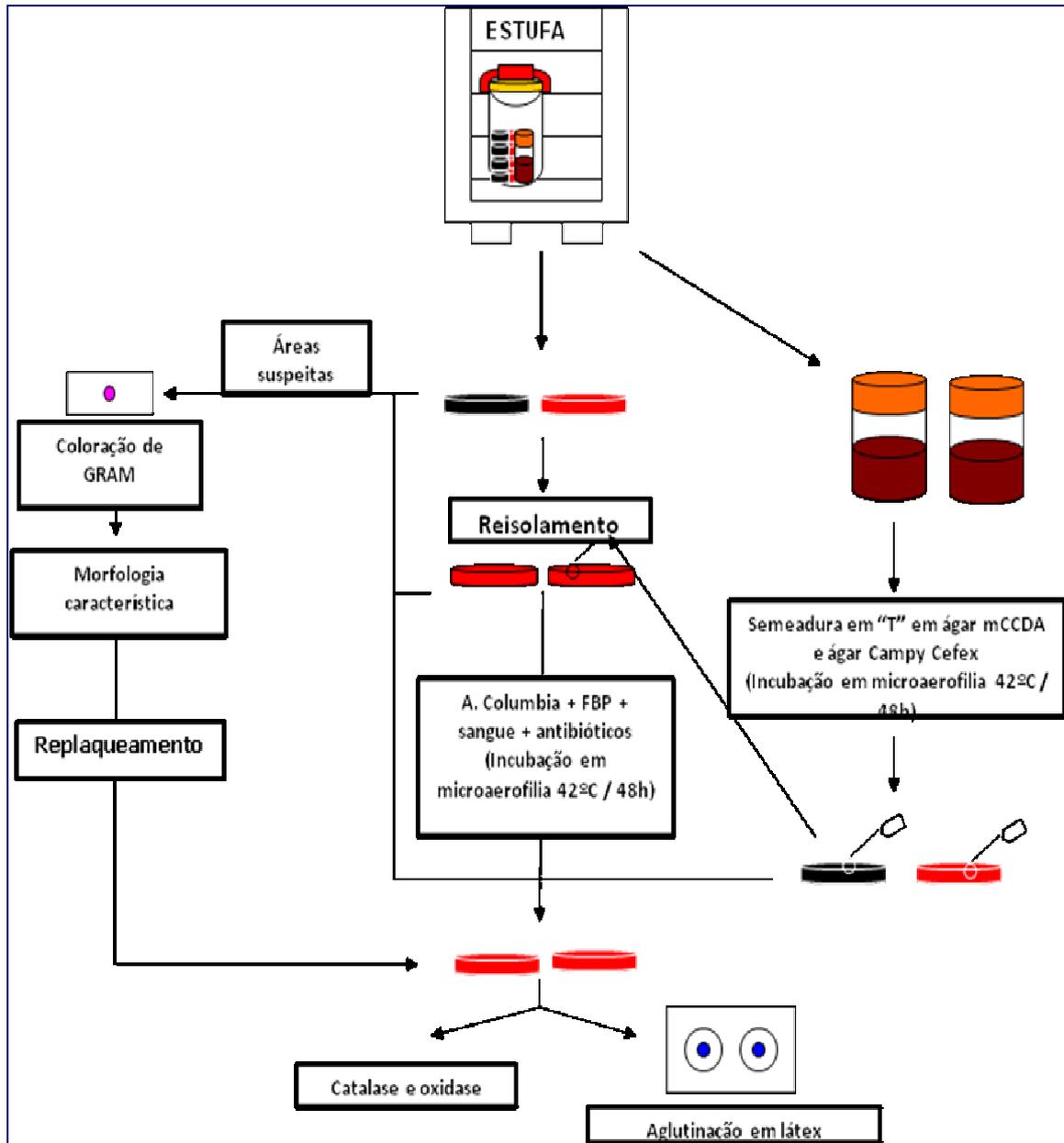
TBE (0,5X).....100mL

Brometo de etídio (10mg/mL).....3,0µl

### ANEXO 3 – ESQUEMA DE ANÁLISE



## Continuação



## ANEXO 4 – ESPÉCIES E SUBESPÉCIES DE *Campylobacter*

- 1-*Campylobacter avium*
- 2-*Campylobacter butzleri*
- 3-*Campylobacter canadensis*
- 4-*Campylobacter cinaedi*
- 5-*Campylobacter coli*
- 6-*Campylobacter concisus*
- 7-*Campylobacter cryaerophilus*
- 8-*Campylobacter cuniculorum*
- 9-*Campylobacter curvus*
- 10-*Campylobacter fennelliae*
- 11-*Campylobacter fetus* (*Campylobacter fetus* subsp. *Fetus*, *Campylobacter fetus* subsp. *Venerealis*)
- 12-*Campylobacter gracilis*
- 13-*Campylobacter helveticus*
- 14-*Campylobacter hominis*
- 15-*Campylobacter hyoilei*
- 16-*Campylobacter hyointestinalis* (*Campylobacter hyointestinalis* subsp. *Hyointestinalis*, *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *Lawsonii*)
- 17-*Campylobacter insulaenigrae*
- 18-*Campylobacter jejuni* (*Campylobacter jejuni* subsp. *Doylei*, *Campylobacter jejuni* subsp. *Jejuni*)
- 19-*Campylobacter lanienae*
- 20-*Campylobacter lari* (*Campylobacter lari* subsp. *Concheus*, *Campylobacter lari* subsp. *Lari*)
- 21-*Campylobacter mucosalis*
- 22-*Campylobacter mustelae*
- 23-*Campylobacter nitrofigilis*
- 24-*Campylobacter peloridis*
- 25-*Campylobacter pylori* (*Campylobacter pylori* subsp. *Mustelae*, *Campylobacter pylori* subsp. *Pylori*)
- 26 -*Campylobacter rectus*
- 27-*Campylobacter showae*
- 28-*Campylobacter sputorum* (*Campylobacter sputorum* subsp. *Bubulus*, *Campylobacter sputorum* subsp. *Mucosalis*, *Campylobacter sputorum* subsp. *Sputorum*)
- 29-*Campylobacter subantarcticus*
- 30-*Campylobacter upsaliensis*
- 31-*Campylobacter ureolyticus*
- 32-*Campylobacter volucris*

Fonte: Adaptado de J. P. Euzéby <http://www.bacterio.cict.fr/c/campylobacter.html>, Acesso em dez 2010.