



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

THALYTA MARINA BENETTI

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE DETECÇÃO,
QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE *Campylobacter*
spp. EM CARÇAÇAS DE FRANGO RESFRIADAS**

Londrina
2014

THALYTA MARINA BENETTI

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE DETECÇÃO,
QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE *Campylobacter*
spp. EM CARÇAÇAS DE FRANGO RESFRIADAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, do Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Tereza Cristina Rocha
Moreira de Oliveira

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

B465a Benetti, Thalyta Marina.
Avaliação de métodos de detecção, quantificação e identificação de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango resfriadas / Thalyta Marina Benetti. – Londrina, 2014.
118 f. : il.

Orientador: Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira.
Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2014.
Inclui bibliografia.

1. Carne de ave – Teses. 2. Reação em cadeia de polimerase – Teses. 3. Infecções por campylobacter – Teses. 4. Campylobacter – Teses. 5. Carne de ave – Bacteriose – Teses. I. Oliveira, Tereza Cristina Rocha Moreira de. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

CDU 664.91

THALYTA MARINA BENETTI

AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE DETECÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE *Campylobacter* spp. EM CARÇAÇAS DE FRANGO RESFRIADAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Orientador. Prof^a Dr^a Tereza Cristina Rocha
Moreira de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a Dr^a Wanda Moscalewski Abrahão
Universidade Federal do Estado do Paraná –
UFPR

Prof^a Dr^a Luciana Bill Mikito Kottwitz
Universidade Estadual do Oeste do Paraná –
UNIOESTE

Prof^a Dr^a Sueli Fumie Yamada Ogatta
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a Dr^a Vanerli Beloti
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 26 de maio de 2014.

Dedico

Aos meus pais Douglas e Rosangela, que sempre me apoiaram e incentivaram em todos esses anos de estudos, por serem sempre um "porto seguro" e pelo exemplo de caráter e humildade.

À minha irmã Stephany, meu laço eterno de amor e cumplicidade.

Ao meu amor Alexssander, por todo o seu carinho, paciência, compreensão e por não medir esforços para me fazer feliz.

AMO VOCÊS!

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus pela capacidade, força e por ter colocado em minha vida pessoas tão especiais, sem as quais certamente não chegaria até aqui!

À profa. Dra. Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira, pela valiosa orientação, por partilhar seu conhecimento e acima de tudo, muito obrigado pela confiança, dedicação, incentivo e carinho durante estes quatro anos.

À minha “mãe do coração”, profa. Dra. Wanda Moscalewski Abrahão, pela orientação na minha carreira acadêmica, demonstração de carinho, paciência, apoio e incentivo nos momentos em que parecia que tudo ia dar errado, e principalmente, por todos os ensinamentos transmitidos ao longo de todos esses anos.

A todos os professores do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UEL, pela dedicação, conhecimentos e experiências transmitidas.

Aos membros participantes da banca pelo tempo empregado na análise, críticas e sugestões na melhoria do trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

À direção do Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN/PR), representadas pela Célia, Elizabeth e Daniel por permitirem o financiamento e realização da parte experimental deste trabalho nas dependências da instituição.

Amigos são irmãos de alma! Agradeço a duas amigas especiais, que, com muito carinho, me ajudaram imensamente nesta caminhada: Isabelle Danguì Ferro e Paula Vergara, meu eterno agradecimento.

À minha amiga Juliane Alves pelo companheirismo e por ter me ajudado em tantos momentos. Obrigado pelo carinho e pela força.

Ao professor Aguinaldo José do Nascimento, pelos conhecimentos em estatística e paciência em me mostrar o melhor caminho.

Aos funcionários do LACEN/PR - Secção de Microbiologia de Alimentos, Secção de Bacteriologia, Secção de Biologia Molecular, Meios de Cultura e reativos e Esterilização, pela calorosa acolhida e pelo apoio fornecido, sem os quais seria impossível a realização deste estudo.

Aos meus amigos e colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, especialmente Daniele Honorato, Erika Kushikawa Saeki, Igor Scanfelli, Marines Corso, Tatiana Colombo Pimentel e Raissa Curti Bonfante pelo carinho e amizade de sempre.

À toda a equipe da Brasil Foods, pela capacitação e incentivo na difícil e árdua tarefa de detectar *Campylobacter*.

Aos meus amados e queridos pais, Rosangela e Douglas, à minha irmã, Stephany, e ao meu noivo, Alexssander, pelo carinho, incentivo e principalmente pela compreensão nos momentos de ausência, a vocês dedico este trabalho, pois lhes devo muito do que sei, e tudo o que sou. Muito obrigada!

E à todos que de alguma forma colaboraram para a realização desta tese e que não foram aqui explicitamente citados, mas a quem expresseo o meu mais profundo agradecimento.

**"A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios.
Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente,
antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos."**

Charles Chaplin

BENETTI, Thalyta Marina. **Avaliação de métodos de detecção, quantificação e identificação de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango resfriadas.** 118 f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

A ocorrência de infecções associadas à *Campylobacter* notificadas tem aumentado em muitos países desenvolvidos nos últimos 20 anos. Embora existam diversas fontes, a campilobacteriose está geralmente associada ao consumo de carne de frango mal processada, e a contaminação cruzada envolvendo este produto. A eficácia dos métodos convencionais de isolamento de *Campylobacter* em alimentos tem sido questionada e as dificuldades encontradas relacionadas à incapacidade dos antibióticos adicionados ao meio de enriquecimento de inibir os micro-organismos contaminantes e a baixa competitividade do *Campylobacter* frente a esses micro-organismos. Os métodos moleculares, como a reação em cadeia polimerase (PCR), têm sido descritos como uma adequada estratégia para a detecção, identificação e quantificação de *Campylobacter* spp. em alimentos. Os objetivos deste estudo foram avaliar diferentes métodos de extração de DNA visando a padronização de ensaio PCR em Tempo Real para detecção e quantificação de *Campylobacter* em carcaças de frango; propor alternativas para melhorar a detecção e a quantificação pela técnica de cultura preconizada pela ISO 10272: 2006, e a avaliar de métodos fenotípicos e genotípicos para a identificação de espécies de *Campylobacter*. A avaliação comparativa entre o método direto (ISO 10272-2) e o de enriquecimento (ISO 10272-1) mostrou a superioridade do método direto, pela maior frequência de isolamento de *Campylobacter* spp. e superior taxa de sensibilidade. O volume da enxaguadura de 10 mL, que atualmente é recomendado pelo protocolo ISO 10272-1 para o enriquecimento, não deve ser utilizado porque volumes de 2,5 e 5,0 mL possibilitaram melhor isolamento de *Campylobacter* spp. A estratégia de utilização de volumes menores que 100 µL de enxaguadura no método direto buscando minimizar a interferência da microbiota contaminante no isolamento e contagem de *Campylobacter* spp., não melhorou o isolamento e a contagem de colônias. Os resultados confirmam que o volume de enxaguadura mais adequado para o método direto é o de 100 µL, como o preconizado na metodologia ISO 10272-2. Os resultados encontrados sugerem o cultivo adicional de 400 µL de enxaguadura porque muitas amostras de carne de frango apresentam contaminação baixa de *Campylobacter*, que só podem ser quantificadas e detectadas se volumes maiores forem utilizados. Os métodos de identificação de espécie avaliados no presente trabalho foram provas fenotípicas convencionais, API Campy® e sistema Diversilab®. As provas fenotípicas convencionais mostraram ser adequadas para a identificação dos isolados hipurato-positivos. Quando os isolados não hidrolisaram o hipurato, não foi possível identificar a espécie, mesmo após sequenciamento. O limite de detecção da PCR em Tempo Real padronizada foi $1,5 \times 10^3$ UFC/g e a faixa linear de amplificação de $1,5 \times 10^3$ a $2,0 \times 10^7$ UFC/g. Dentre os métodos de extração de DNA avaliados, o de Hong *et al.* (2007) e o *kit* Simbios apresentaram resultados mais satisfatórios quando comparado aos métodos de Ronner e Lindmark (2007) e EasyMag®, porque foram os únicos métodos que detectaram *Campylobacter* no limite de detecção da PCR. A

avaliação direta da enxaguadura da carcaça de frango pelo método de PCR em Tempo Real otimizada não foi adequada para quantificação de *Campylobacter* spp. tendo em vista, o alto limite de detecção. Desta forma, o presente trabalho recomenda o enriquecimento da enxaguadura em Caldo Bolton seguido pela PCR em Tempo Real como método mais apropriado para detectar *Campylobacter* spp. em amostras de carne de frango.

Palavras-chave: *Campylobacter*. PCR em tempo real. ISO 10272: 2006. Detecção. Identificação. Quantificação.

BENETTI, Thalyta Marina. **Evaluation of methods for detection, quantification and identification of *Campylobacter* spp. on chicken carcasses cooled.** 118 p. Doctoral thesis (Doctor Degree in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

ABSTRACT

The incidence of reported infections associated with *Campylobacter* has increased in many developed countries the last 20 years. Although there are several sources, the campylobacteriosis is usually associated with the consumption of chicken meat improperly processed, and cross-contamination involving this product. The effectiveness of conventional methods for isolating *Campylobacter* in foods has been questioned and the difficulties related to the inability of antibiotics added to the enrichment medium to inhibit contaminating microorganisms and the low competitiveness of *Campylobacter* against these microorganisms. Molecular methods such as polymerase chain reaction (PCR), have been described as an appropriate strategy for the detection, identification and quantification of *Campylobacter* spp. in foods. The objectives of this study were to evaluate different methods of DNA extraction aiming to standardize real-time PCR assay for detection and quantification of *Campylobacter* on chicken carcasses, propose alternatives to improve the detection and quantification by culture technique recommended by ISO 10272: 2006 and to assess the phenotypic and genotypic methods for identification of *Campylobacter* species. A comparative evaluation of the direct method (ISO 10272-2) and enrichment (ISO 10272-1) showed the superiority of the direct method, the higher frequency of isolation of *Campylobacter* spp. and higher sensitivity rate. The rinse volume of 10 mL, which currently is recommended by ISO 10272-1 protocol for enrichment, should not be used because volumes of 2.5 and 5.0 mL allow better isolation of *Campylobacter* spp. The strategy of using less than 100 μ L of rinse direct method in order to minimize the interference of microbial contaminants in isolation and enumeration of *Campylobacter* spp. volumes, did not improve the isolation and enumeration of colonies. The results confirm that the volume of rinse most suitable for the direct method is to 100 μ L, as recommended in ISO 10272-2 methodology. The results suggest the additional cultivation of 400 μ L rinse because many samples of chicken meat have low contamination of *Campylobacter*, which can only be quantified if larger volumes are used. The methods of identifying species evaluated in this study were conventional biochemical tests, API Campy® and DiversiLab® system. Conventional biochemical tests proved to be suitable for the identification of hippurate-positive isolates. When the isolates hydrolyzed hippurate, we could not identify the species, even after sequencing. The detection limit of the standard real-time PCR was 1.5×10^3 CFU/g linear amplification range of 1.5×10^3 than 2.0×10^7 CFU/g. Among the methods of DNA extraction, the reviews of Hong et al. (2007) and the kit Simbios presented better results when compared methods Ronner and Lindmark (2007) and EasyMag®, because they were the only methods that detected in *Campylobacter* detection limit of PCR. The direct evaluation of the chicken carcass rinse method by real-time PCR was optimized not suitable for quantification of *Campylobacter* spp. in view, the high detection limit. Thus, this study recommends that the enrichment rinse in Bolton broth followed by real-time PCR is the most appropriate method to detect *Campylobacter* spp. in samples of chicken meat.

Keywords: *Campylobacter*. Real-time PCR. ISO 10272: 2006. Detection. Identification. Quantification.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1** – Morfologia de *Campylobacter* spp., esfregaço corado pela coloração de azul de metileno. Forma encurvada e espiral. Aumento de 1000x25
- Figura 2** – Morfologia de *Campylobacter* spp., esfregaço corado com coloração de gram. Forma encurvada e cocóide. Aumento de 1000x.....27

RESUMO EXPANDIDO 2

- Figura 1** – Diversidade genética dos isolados de *Campylobacter* analisada por REP-PCR semi-automatizado (Diversilab® - Biomerieux), com coeficiente de similaridade de 99,34%, obtida pelo programa "web based" Diversilab (Biomerieux)108

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

- Table 1** – Comparative analysis of the direct and enrichment methods for the detection of *Campylobacter* spp. in 80 chicken meat samples as confirmed by real-time PCR.....58
- Table 2** – Comparative analyses of the direct and enrichment methods using different rinse volumes (2.5, 5 and 10 mL) for the detection of *Campylobacter* spp. in 18 chicken meat samples as confirmed by real-time PCR59
- Table 3** – Results of the seven samples that tested positive to *Campylobacter* from 18 samples analyzed using different rinse volumes (2.5, 5 and 10 mL).....59

ARTIGO 2

- Tabela 1** – Contagem (UFC/g) das diluições seriadas de *Campylobacter* pelo método direto, qPCR em Tempo Real após extração do DNA com fenol/clorofórmio e qPCR em Tempo Real após os quatro métodos de extração de DNA74

ARTIGO 3

- Tabela 1** – Identificação das 43 cepas de *Campylobacter*, isoladas de fezes e carcaças de frango, testadas pelo sistema API Campy®, provas fenotípicas convencionais e sistema Diversilab®86
- Tabela 2** – Resultados das amostras que apresentaram discrepância na identificação pelo sistema API Campy®, provas fenotípicas convencionais, sistema Diversilab® e técnica de seqüenciamento88

ARTIGO 4

Tabela 1 – Resultados das contagens de <i>Campylobacter</i> pelo método direto (ISO 10272-2), utilizando 100 e 400 µL da enxaguadura da carcaça de frango	97
--	----

RESUMO EXPANDIDO 1

Tabela 1 – Resultados positivos de <i>Campylobacter</i> identificados pelos métodos de cultura e pela PCR em Tempo Real antes e após o enriquecimento	104
--	-----

RESUMO EXPANDIDO 2

Tabela 1 – Perfil de resistência de isolados de <i>Campylobacter</i> genotipicamente indistinguíveis de fontes alimentares e humanas, coletadas no ano de 2011	109
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
<	Menor
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
°C	Grau Celsius
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CLO	<i>Campylobacter-Like- Organisms</i>
CO ₂	Dióxido de carbônico
CT	<i>Cycle Threshold</i>
CVE	Centro de Vigilância Epidemiológica
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FBP	Sulfato ferroso, piruvato de sódio e metabissulfito de sódio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Foodnet	<i>The foodborne diseases active surveillance network</i>
x g	Força g centrífuga
GBS	<i>Guillain-Barre syndrom</i>
H ₂	Hidrogênio
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
L	Litros
LACEN	Laboratório Central do Estado
M	Molar
Malditof MS	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight – Mass Spectrometry</i>
mCCDA	Ágar carvão cefoperazona desoxicolato modificado
mg	Microgramas
mL	Microlitro
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
min	Minutos
N ₂	Nitrogênio
ng	Nanogramas
O ₂	Oxigênio

pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
PR	Paraná
REP-PCR	PCR de sequências repetitivas
rRNA	RNA ribossômico
s	Segundos
SP	São Paulo
subsp.	Subespécie
TSA	Ágar Trypticase de Soja
TTC	Cloreto de trifenil tetrazolio
UFC	Unidades formadoras de colônias
UFC/g	Unidades formadoras de colônias por grama
UFC/mL	Unidades formadoras de colônias por mililitro
μL	Microlitro
μm	Micrômetro

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	19
OBJETIVO GERAL.....	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
1 Histórico	23
2 Caracterização do gênero <i>Campylobacter</i>	24
3 Campilobacteriose humana	27
4 Epidemiologia	29
5 Infecção nas aves	32
6 Estudos de prevalência em frangos	33
7 Métodos de detecção de <i>Campylobacter</i> spp. em alimentos.....	35
7.1 Identificação das espécies de <i>Campylobacter</i>	37
7.2 Pesquisa de <i>Campylobacter</i> por técnicas moleculares	39
Referências.....	43
ARTIGO 1: EVALUATION OF THE DIRECT AND ENRICHMENT ISO 10272 METHODS FOR THE DETECTION OF <i>Campylobacter</i> spp. IN CHICKEN CARCASSES	53
1 Introduction.....	54
2 Materials and Methods	55
2.1 Sample collection	55
2.2 ISO 10272-2 (Direct Method): Detection and Colony Count of <i>Campylobacter</i> spp. before Selective Enrichment.....	55
2.3 ISO 10272-1 (Enrichment Method): Detection of <i>Campylobacter</i> spp. after Selective Enrichment	56
2.4 ISO 10272-1 (Enrichment Method): Evaluation of different volumes of rinse for detection of <i>Campylobacter</i> spp. after Selective Enrichment.....	56

2.5	Molecular confirmation of <i>Campylobacter</i> spp. by real-time PCR.....	56
2.6	Analyses of the results	57
3	Results.....	57
4	Discussion	60
5	Conclusion	61
	Acknowledgements.....	62
	References	62

ARTIGO 2: AVALIAÇÃO DE QUATRO MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA PARA QUANTIFICAÇÃO DE *Campylobacter* spp. EM CARÇAÇAS DE FRANGO POR PCR EM TEMPO REAL.....

		65
1	Introdução	66
2	Materiais e Métodos	67
2.1	Amostragem.....	67
2.2	Método direto.....	67
2.3	qPCR em Tempo Real	68
2.4	Limite de detecção e Curva de calibração para qPCR em Tempo Real	69
2.5	Métodos de extração de DNA para a detecção e quantificação de <i>Campylobacter</i> spp. utilizando PCR em Tempo Real	70
2.5.1	Metodologia proposta por Ronner e Lindmark (2007).....	70
2.5.2	Metodologia proposta por Hong <i>et al.</i> (2007).....	71
2.5.3	<i>Kit</i> de extração Simbios Biotecnologia	71
2.5.4	Extração automatizada – Nuclisens EasyMag® (BioMérieux – França)	72
2.6	Cálculo da eficiência da PCR	72
2.7	Análise estatística	72
3	Resultados e Discussão	72
3.1	Métodos de extração de DNA para a detecção e quantificação de <i>Campylobacter</i> spp. utilizando PCR em Tempo Real	73
3.2	Amostras naturalmente contaminadas.....	75

3.3	Método qPCR	76
4	Conclusão	77
	Referências	78

ARTIGO 3: IDENTIFICAÇÃO DE CEPAS TERMOFÍLICAS DE <i>Campylobacter</i> spp. POR PROVAS FENOTÍPICAS CONVENCIONAIS, API CAMPY® E SISTEMA REP-PCR SEMI AUTOMATIZADO		81
1	Introdução	82
2	Materiais e Métodos	82
2.1	Cepas	82
2.2	Sistema API e provas fenotípicas convencionais.....	83
2.3	Sistema Diversilab® (REP-PCR).....	84
2.4	Sequenciamento	84
3	Resultados e Discussão	85
	Referências	89

ARTIGO 4: AVALIAÇÃO DE DIFERENTES ALÍQUOTAS DA ENXAGUADURA NO MÉTODO DIRETO ISO 10272-2 PARA A CONTAGEM DE <i>Campylobacter</i> spp. EM CARÇAÇAS DE FRANGO		92
1	Introdução	93
2	Materiais e Métodos	94
2.1	Amostragem.....	94
2.2	Método Direto de Detecção e Contagem de <i>Campylobacter</i> (ISSO 10272-2:2006).....	94
2.3	Confirmação molecular do gênero <i>Campylobacter</i> por PCR em Tempo Real.....	95
2.4	Análise estatística	96
3	Resultados e Discussão	96
	Referências	98

RESUMO EXPANDIDO 1 – DETECÇÃO DE <i>Campylobacter</i> spp. EM CARNE DE FRANGO ANTES E APÓS DO ENRIQUECIMENTO POR PCR EM TEMPO REAL	101
RESUMO EXPANDIDO 2 – GENOTIPAGEM E ANTIBIOGRAMA DE ISOLADOS DE <i>Campylobacter</i> spp. PROCEDENTES DE AMOSTRAS CLÍNICAS E DE ALIMENTOS DO SUL DO BRASIL	105
RESUMO EXPANDIDO 3 – DETECÇÃO DA MICROBIOTA PRESENTE EM CARCAÇAS DE FRANGO E A SUA POSSÍVEL INFLUÊNCIA NA DETECÇÃO DE <i>Campylobacter</i> spp	110
CONCLUSÕES	115
ANEXOS	116
Anexo 1 – Artigo 1 – Fluxograma dos métodos de detecção ISO 10272-2 e ISO 10272-1 (2006).....	116
Anexo 2 – Artigo 2 – Fluxograma dos métodos de quantificação ISO 10272-2 (2006) e qPCR em Tempo Real	117
Anexo 3 – Artigo 4 – Fluxograma do método de quantificação ISO 10272-2 (2006) utilizando diferentes volumes da enxaguadura.....	118

INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se mundialmente na produção e industrialização de alimentos, considerado hoje o terceiro maior produtor mundial de carne de frango e o maior exportador desse produto, sendo o Estado do Paraná o maior produtor brasileiro (31,12%) (UBABEF, 2014).

Em função das exigências cada vez maiores do mercado internacional de carne de frango, o controle da contaminação de carcaças por *Campylobacter jejuni* é uma preocupação mundial (SCARCELLI *et al.*, 2005). A detecção e quantificação de *Campylobacter* em carne de frango e outros alimentos objetiva o monitoramento que deve ocorrer através de estudos de avaliação de risco, incluindo levantamentos epidemiológicos e o estabelecimento de padrões de contagem para a indústria de alimentos.

Nos últimos anos o gênero *Campylobacter* spp. ultrapassou o gênero *Salmonella* nos 17 países europeus onde ocorre o monitoramento, sendo o agente causador de zoonoses mais reportado na União Europeia e a incidência é de cerca de 50 casos para cada 100.000 habitantes. *Campylobacter* também foi o segundo agente causador de surtos de infecção de origem alimentar em 2006 na União Europeia, mesmo que a maioria dos casos relatados de campilobacteriose sejam considerados como casos esporádicos (EFSA, 2009).

Nos Estados Unidos, *Campylobacter* é a causa bacteriana mais comum de doença diarreica. Em 2012, as Doenças Transmitidas por Alimentos da Rede de Vigilância Ativa (FoodNet) estimou que a incidência foi de 14,3 casos por 100.000 habitantes.

Historicamente, *Campylobacter*, foi alvo de muitos programas de atuação e monitoramento nos Estados Unidos. Em 1996, houve a implantação de um amplo sistema de vigilância envolvendo o diagnóstico dos casos de infecção de origem alimentar que resultou em significativa redução (40%) nos casos de campilobacteriose durante 8 anos. Contudo, dados relatados pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) mostram que a incidência de *Campylobacter* voltou a aumentar, sendo 14% maior em 2012 do que no período de 2006 a 2008 e foi o mais alto nível desde 2000 (FOODNET, 2014).

Embora o Brasil seja um grande exportador de carne de frango, existe pouca informação sobre a contaminação deste produto por *Campylobacter*. A legislação brasileira em vigor (BRASIL, 2001) não estabelece padrões para *Campylobacter* em alimentos.

O Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN, Curitiba, PR) dá suporte à Vigilância Sanitária e Epidemiológica de Alimentos na elucidação de surtos de origem alimentar. Como a campilobacteriose raramente ocorre na forma de grandes surtos é necessário o monitoramento da contaminação por *Campylobacter* de alimentos e amostras ambientais. A incidência e a prevalência no Brasil dessa doença de origem alimentar somente serão conhecidas se os laboratórios públicos de diagnóstico tiverem uma rotina de detecção em alimentos implantada. Estudos para analisar melhor a ocorrência desse patógeno devem ser ampliados, principalmente na avicultura além do potencial risco à saúde humana.

Para a detecção de *Campylobacter* em alimentos deve-se levar em consideração que a contaminação é normalmente baixa nos produtos, a necessidade de condições seletivas nos meios de cultura que inibam o crescimento dos micro-organismos contaminantes, e condições adequadas de incubação. Outro desafio é a dificuldade de manutenção desta bactéria devido ao não crescimento em temperaturas abaixo de 30°C e a extrema sensibilidade à concentração de oxigênio do ar (SILVA *et al.*, 2007; GODOI, GANDRA e GANDRA, 2010).

A detecção e enumeração de *Campylobacter* em alimentos por métodos de cultura tradicionais é problemática, devido à dificuldade de isolamento, distinção entre colônias típicas e atípicas, assim como a tendência das colônias a coalescência (FERNANDEZ, 2008).

A detecção e enumeração de *Campylobacter* é frequentemente realizada empregando o método ISO 10272 que utiliza, para a confirmação das espécies termofílicas, a morfologia, agrupamento e motilidade típica, o teste de oxidase positivo, a ausência de crescimento a 25°C em condições microaerófilas e a incapacidade de crescer em condições aeróbicas a 41,5°C. A diferenciação entre as espécies *C. jejuni* subsp. *jejuni*, *C. coli*, *C. lari* e *C. upsaliensis* é opcional e utiliza as seguintes provas: sensibilidade ao ácido nalidíxico, sensibilidade à cefalotina, hidrólise do hipurato e do indoxil acetato. O método ISO 10272 aplica-se aos alimentos destinados ao consumo humano, as rações animais e as amostras do ambiente de fabricação ou manipulação de alimentos (SILVA *et al.*, 2007). A

identificação ao nível de espécie, no entanto, é complexa devido à inatividade do micro-organismo frente aos açúcares e por serem bioquimicamente pouco ativos. (ON, 1996; KUANA *et al.*, 2009).

Métodos moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), vêm ao encontro da solução dos problemas de isolamento e tipificação, por facilitarem a identificação do agente, além da rapidez, especificidade e sensibilidade (STEINHAUSEROVÁ e FOJTÍKOVÁ, 1999). Inúmeros ensaios utilizando PCR em Tempo Real foram desenvolvidos para a caracterização e quantificação de *Campylobacter* a partir de amostras alimentares (RANTSIOU, LAMBERTI e COCOLIN, 2010; BOTTELDOORN *et al.*, 2008; DEBRETSION *et al.*, 2007). Os ensaios necessitam de prévio enriquecimento das amostras porque a presença de substâncias inibidoras, comumente presentes em matrizes alimentares, podem reduzir o limite de detecção ou subestimar a contagem das bactérias presentes, com consequente redução da sensibilidade do ensaio (HE e CHEN, 2010; WOLFFS *et al.*, 2005; RUDI *et al.*, 2005). Essa necessidade de enriquecimento também impossibilita a quantificação. A padronização de métodos de extração e purificação de DNA, são portanto essenciais para eliminar os interferentes da matriz alimentar e assim possibilitar a detecção de *Campylobacter* sem o prévio enriquecimento das amostras.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo principal avaliar diferentes métodos de extração de DNA visando a padronização de ensaio PCR em Tempo Real para detecção e quantificação de *Campylobacter* em carcaças de frango, para o uso na rotina laboratorial. Concomitantemente, foram estudadas alternativas para melhorar a detecção e quantificação da técnica de cultura preconizada pela ISO 10272: 2006, assim como a avaliação de métodos fenotípico e genotípico para a adequada identificação de espécies termofílicas de *Campylobacter* isoladas de amostras clínicas e de alimentos.

OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade dos métodos moleculares e de cultura em detectar, quantificar e identificar *Campylobacter* spp. em carcaças de frango resfriadas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar os métodos ISO 10272-2: 2006 (método direto) e ISO 10272-1: 2006 (método de enriquecimento) para a detecção de *Campylobacter* spp. em carcaças de frangos.
- Avaliar diferentes volumes de enxaguadura de carcaça de frango com a finalidade de minimizar a interferência da microbiota contaminante no isolamento e contagem de *Campylobacter* spp., sem comprometer a sensibilidade do método direto.
- Sugerir modificação do método de enriquecimento para um melhor isolamento de *Campylobacter* spp. em carcaça de frango.
- Identificar bactérias presentes na microbiota contaminante de carcaça de frango que poderiam dificultar a detecção de *Campylobacter*, principalmente após o enriquecimento.
- Avaliar a eficiência da PCR em Tempo Real na detecção de *Campylobacter* spp. na enxaguadura de carcaça de frango antes e após o enriquecimento em caldo Bolton.
- Comparar o desempenho de quatro métodos de extração de DNA para a quantificação de *Campylobacter* spp. a partir da enxaguadura da carcaça de frango por PCR em Tempo Real.
- Avaliar dois métodos fenotípicos (sistema API Campy®, Biomerieux e provas fenotípicas convencionais) e um método genotípico (sistema REP-PCR Diversilab®, Biomerieux) para a identificação de isolados de *Campylobacter* de amostras clínicas e de alimentos.
- Verificar a diversidade genética e suscetibilidade antimicrobiana de diferentes cepas de *Campylobacter* spp. isoladas de alimentos e de material biológico humano.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Histórico

Theodor Escherich, em 1886, identificou uma bactéria espiralada no cólon de crianças que haviam morrido de uma doença denominada por ele de “cólera infantil”. Posteriormente, Escherich observou micro-organismos espiralados em fezes de crianças com diarreia, e, possivelmente, esses sejam os primeiros relatos de isolados de *Campylobacter* (BUTZLER, 2004).

Em 1909, McFadyean e Stockman relataram a presença de micro-organismos na forma de vibrio em fetos abortados de ovelhas. Smith e Taylor propuseram, em 1919, o nome *Vibrio fetus* para micro-organismos isolados de casos clínicos de aborto em bovinos nos EUA (KIST, 1986). Em 1931, Jones *et al.* atribuíram a diarreia de bezerras a infecção por um vibrio, que recebeu o nome de *Vibrio jejuni*. Em 1944, Doyle descreveu micro-organismos similares associados a diarreia de suínos, que receberam o nome de *Vibrio coli* (BUTZLER, 2004).

Em 1947, na França, Vinzent isolou *Vibrio fetus* do sangue de três mulheres grávidas internadas com febre de origem desconhecida. A doença durou cerca de quatro semanas e duas dessas três mulheres abortaram, tendo sido verificado que a placenta apresentava áreas de necrose e inflamação. O primeiro relato de infecção em humanos associado ao consumo de leite cru envolvendo 355 pacientes, ocorreu em Illinois, em 1938. O micro-organismo isolado a partir do sangue dos pacientes foi classificado como *Vibrio jejuni* (BUTZLER, 2004). Elisabeth King, em 1957, descreveu um vibrio semelhante ao agente descrito por Vinzent, mas com características bioquímicas e antigênicas diferentes. Ela se referiu a esses micro-organismos como *related vibrios* (ENGBERG, 2006).

O gênero *Campylobacter* (do grego campylo = curvo e bacter = bacilo) foi inicialmente proposto por Sebald e Verón em 1963, separando-o do gênero *Vibrio*, baseados na relação Guanina/Citosina (G+C) do DNA e verificando que o teor de G+C do gênero *Vibrio* oscilava em torno de 47%, enquanto em *Campylobacter* era de 30 a 40% (KETLEY, 1997). Dez anos depois, Verón e Chatelain publicaram um estudo mais compreensivo sobre a taxonomia desses micro-organismos e consideraram quatro espécies dentro do gênero *Campylobacter*: *C. fetus*, *C. coli*, *C. jejuni* e *C. sputorum* (ENGBERG, 2006).

O isolamento de *Campylobacter* a partir de fezes de pacientes com diarreia só teve sucesso após a publicação de um novo método de cultivo por Butzler *et al.*, em

1973, que possibilitava o isolamento mais eficaz desta bactéria. O trabalho de Skirrow, em 1977, contribuiu para o isolamento de *Campylobacter*, a partir de fezes de pacientes com diarreia. O método utilizava um suplemento seletivo, contendo vancomicina, polimixina B e trimetoprim, que possibilitou aos laboratórios diagnosticar e isolar a bactéria com a inibição da microbiota acompanhante. Anos depois Blaser *et al.* (1980) propôs uma nova mistura de antimicrobianos com maior inibição contendo vancomicina, trimetoprim, polimixina B, anfotericina B e cefalotina.

Na década de 80 micro-organismos similares ao *Campylobacter* foram isolados de diversas fontes e, devido à baixa atividade bioquímica que dificultava a diferenciação entre eles, foi proposto um grupo denominado CLO (*Campylobacter-Like- Organisms*), englobando todas as espécies semelhantes (VANDAMME, 2000).

Atualmente, o gênero *Campylobacter* contém 31 espécies, das quais 19 foram isolados a partir de seres humanos. Há também 10 subespécies, dos quais 9 são de humanos (EUZÉBY, 2014). *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari* são denominadas termofílicas, com temperatura ótima de multiplicação entre 42° e 43°C. Essas espécies são as mais frequentes isoladas de enterites humanas e de animais (WOO *et al.*, 2002; FOSTER *et al.*, 2004; ROSSI *et al.*, 2009).

As enterites por *Campylobacter* são zoonoses de origem alimentar, onde vários estudos têm mostrado a significância dos reservatórios animais na epidemiologia de *Campylobacter jejuni*, e os alimentos de origem animal são considerados a principal fonte de infecção (ALTEKRUSE *et al.*, 1999). A contaminação de carcaças de frangos em abatedouros é considerada o principal fator de risco para infecções humanas (ROZYNEK *et al.*, 2005).

2. Caracterização do gênero *Campylobacter*

Campylobacter faz parte da família *Campylobacteriaceae* e inclui bactérias com tamanhos variando entre 0,5 e 8,0 µm e entre 0,2 e 0,8 µm de comprimento e diâmetro, respectivamente. O gênero é constituído por bactérias gram negativas, geralmente encontradas na forma característica espiralada ou encurvada. Essas bactérias podem ainda apresentar uma citomorfologia particularmente parecida com a letra "S" ou de asas de gaivotas (Figura 1) (VANDAMME *et al.*, 1991).

Os isolados de *Campylobacter* apresentam um único flagelo polar em uma ou em ambas as extremidades. Este flagelo permite o deslocamento da bactéria,

imprimindo movimentos de ziguezague e é cerca de duas ou três vezes maior que a própria célula que o contém (SMIBERT, 1978).

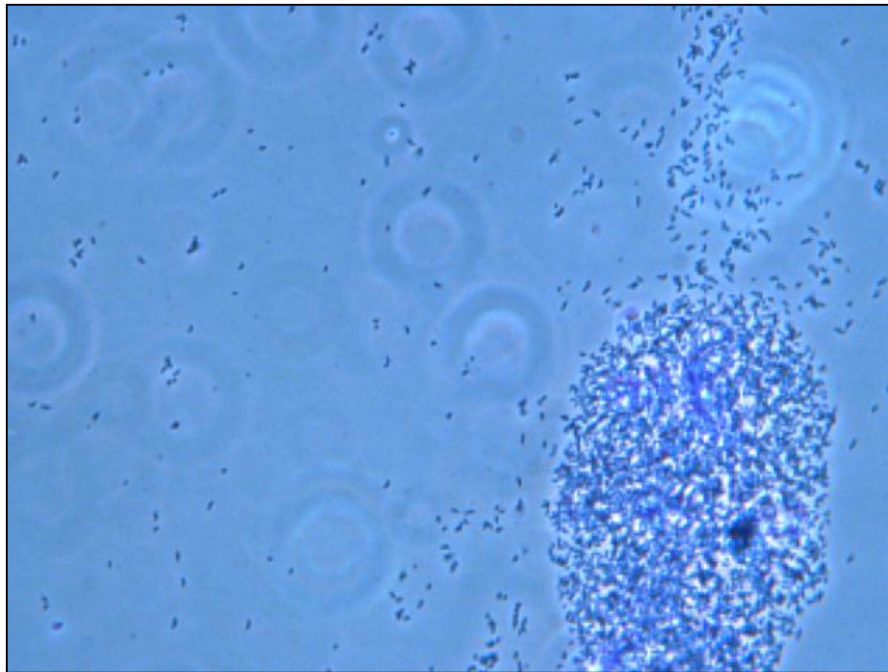


Figura 1 - Morfologia de *Campylobacter* spp., esfregaço corado pela coloração de azul de metileno. Forma encurvada e espiral. Aumento de 1000x.

O isolamento destas bactérias requer meios de cultura específicos (meios seletivos), e condições adequadas de incubação. São microaerófilas, e toleram concentrações de oxigênio entre 5 e 10%, ou entre 3 e 15%. Embora uma concentração de oxigênio relativamente elevada no meio de cultura possa permitir o crescimento de alguns isolados de *Campylobacter* spp., a concentração de 21% é considerada prejudicial para multiplicação (CALIL *et al.*, 2008).

As condições atmosféricas ideais para a incubação destas bactérias podem ser obtidas com a utilização de sistemas geradores de microaerofilia, que proporcionam uma concentração de 5 a 6% de oxigênio e 10% de dióxido de carbono em jarras de anaerobiose (WANG *et al.*, 1982). Em condições de aerobiose menos severas, a adição de fumarato e/ou de formato ao meio de cultura favorece o crescimento de certos isolados deste gênero, assim como a presença de 7% de hidrogênio permite a multiplicação de isolados de *C. jejuni*.

Comparadas as outras bactérias patogênicas transmitidas por alimentos, as condições de crescimento requeridas para a cultura de *Campylobacter* são incomuns, o que implica em limitações quanto às condições dos alimentos em que espécies são capazes de se multiplicar. Por exemplo, a necessidade de

microaerofilia e a faixa de temperatura de desenvolvimento restringem a habilidade das bactérias deste gênero de multiplicarem fora do hospedeiro e conseqüentemente, dificultaria a multiplicação em alimentos durante o processamento e estocagem (PARK, 2002; CALIL *et al.*, 2008).

Todas as espécies de *Campylobacter* são bastante sensíveis a temperaturas fora de sua faixa de crescimento, sendo que o congelamento tem papel fundamental na eliminação desta bactéria. Muitos estudos têm demonstrado que o congelamento por períodos prolongados reduzem a sobrevivência de *Campylobacter* na carne de frango. Stern *et al.* (1985) mostraram que o congelamento de carcaças de frango a -15 °C durante 14 dias e com posterior descongelamento a 5 °C reduz a viabilidade de *C. jejuni* em 70 % a 80 %, contudo estudo realizados por Mazieiro e Oliveira (2010) salientam que mesmos após 28 dias de congelamento a -20 °C é possível a recuperação de células viáveis de *Campylobacter* em uma contagem média de 0,75 Log₁₀ UFC / g .

Nas condições de incubação desfavoráveis, isolados de *Campylobacter* podem apresentar células em forma cocóide (Figura 2). Estas células não têm capacidade de multiplicação e são consideradas não viáveis, pela perda das suas propriedades físico-químicas e fisiológicas. Esta característica pode ocorrer devido a condições adversas, tais como, presença de elevadas concentrações de oxigênio molecular (O₂) ou de derivados tóxicos, tais como, peróxido de hidrogênio, radicais hidróxido e ânions superóxido. Essas substâncias são resultantes das atividades metabólicas das células por mecanismos de auto-oxidação lipídica e oxidação fotoquímica. Essas bactérias não apresentam mecanismos de resistência ou de eliminação dessas substâncias e transformam-se rapidamente nas formas cocóides (MORAN e UPTON, 1987).

As formas cocóides podem ainda ser originadas por envelhecimento das células após um período de incubação mais longo que o recomendado. Este processo de envelhecimento da cultura pode começar após 24 horas a 42°C ou após um período de 48 horas à temperatura de 37°C. Espécies do gênero *Campylobacter* são capazes de se multiplicarem a temperaturas de 35 a 37°C, mas geralmente não crescem a 4°C. *Campylobacter* termofílicos não se multiplicam a temperaturas abaixo de 30°C. Isolados de *C. fetus*, incluídos no grupo dos mesófilos, só crescem a 25°C, mas não a 43°C. Segundo Blaser *et al.*, (1980), *C. jejuni* apresenta maior capacidade de sobrevivência em temperaturas próximas de 4°C.

A transição da morfologia celular vibrióide para uma forma cocóide ocorre na fase estacionária do crescimento e, durante esse processo, não são detectáveis por metodologias convencionais, que corresponde à forma viável, mas não cultivável (VNC). Ou seja, ficam incapazes de se multiplicarem em meios seletivos de isolamento, mas podem ser transmitidas e causar infecção em humanos. 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, embora apresente células desse patógeno não detectadas previamente (FORSYTHE, 2002).

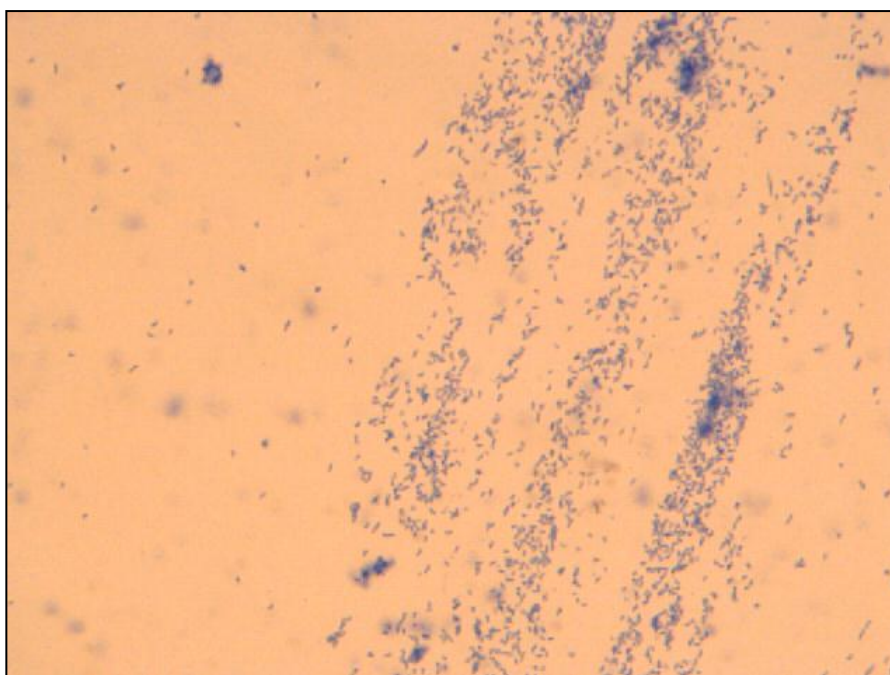


Figura 2 - Morfologia de *Campylobacter* spp., em esfregaço corado com coloração de gram. Forma encurvada e cocóide. Aumento de 1000x.

3. Campilobacteriose humana

As manifestações clínicas da campilobacteriose humana geralmente são gastrintestinais, com duração em torno de sete dias, e melhora espontânea do quadro clínico (COCKER *et al.*, 2002). Os sintomas clássicos da infecção incluem diarreia, frequentemente hemorrágica, dor abdominal, febre, mialgia e, raramente, vômitos (HUMPHREY *et al.* 2007). Em comparação com as infecções causadas por *Salmonella* e *Shigella*, as infecções por *Campylobacter* normalmente são agudas, mas de menor intensidade, com maior tendência a recorrência, se nenhum

tratamento for administrado. As infecções, no entanto, são indistinguíveis clinicamente sem a realização de coprocultura e identificação do agente (MOORE, CORCORAN e DOOLEY, 2005).

O período de incubação em humanos pode variar de um a sete dias, embora seja mais comum entre 24 a 48 horas. As reações inflamatórias precedem às disfunções intestinais que causam diarreia. Em humanos, febre, dor de cabeça, tontura, mialgia e outros sintomas não específicos semelhantes à gripe aparecem entre 12 a 24h antes do início da diarreia e ocorrem em 1/3 dos afetados. A náusea é comum, mas o vômito não é uma manifestação típica. A diarreia é o sintoma mais frequente, porém os sinais clínicos podem variar desde uma colonização intestinal assintomática, ou com poucos movimentos intestinais, até uma profusa e severa disenteria. A presença de sangue nas fezes ocorre em aproximadamente 14% dos afetados (SMITH, 2002).

Dados sugerem que a diarreia causada por *C. jejuni* pode ser decorrente tanto da invasão como da produção de fatores enterotóxicos, mecanismos que poderiam operar simultaneamente ou separadamente (FERNANDEZ, 2008).

A mobilidade, a quimiotaxia e a forma de saca-rolhas das células são fatores importantes na virulência de *Campylobacter*, permitindo que eles atravessem o muco viscoso que cobre a superfície do epitélio do intestino. Mesmo que *Campylobacter* não possua fímbrias, possivelmente possui outras adesinas que lhe permitem aderir às células do epitélio intestinal uma vez que a barreira da mucosa tenha sido atravessada. Na síndrome disentérica, as células do íleo terminal e do cólon são os sítios de infecção mais importantes, sendo sua invasão e posterior necrose as causas de deposições contendo sangue e secreção purulenta (ADAMS e MOSS, 1995; CALIL *et al.*, 2008).

Complicações locais da infecção por *Campylobacter* ocorrem como resultado da disseminação direta do micro-organismo pelo trato gastrointestinal e pode incluir colecistite, pancreatite, peritonite e maciça hemorragia gastrointestinal. As manifestações extraintestinais decorrentes da infecção por *Campylobacter* são relativamente raras, mas frequentemente manifestam graves sequelas da infecção, como a Síndrome de Guillain-Barré, doença que afeta o sistema nervoso periférico, causando desmielinização de neurônios. Outras doenças auto imunes podem ocorrer, tais como, síndrome de Fisher, uma variante da Síndrome de Guillain-Barré; e a Síndrome de Reiter, responsável pela ocorrência de artrite reativa. Tais doenças

aparentemente ocorrem devido a uma semelhança nos antígenos presentes em algumas cepas de *C. jejuni* com proteínas encontradas nos gangliosídeos neuronais de seres humanos (DORREL e WREN, 2007).

A Síndrome de Guillain-Barré é considerada como uma doença auto-imune. O mecanismo imunológico, bem como os antígenos envolvidos ainda são incertos. Entretanto, todo o processo parece se assemelhar a uma resposta imune primária, onde o sistema imunológico passa a reconhecer as células nervosas como impróprias, e como resultado observa-se a desmilenização inflamatória. A Síndrome de Guillain-Barré tem sido associada também a certos vírus, incluindo citomegalovírus e Epstein Barr vírus (ASBURY, 2000; CALIL *et al.*, 2008).

A síndrome de Guillain-Barré é marcada pela perda da bainha de mielina e dos reflexos tendinosos, esta se manifesta sob a forma de inflamação aguda das células nervosas e, às vezes, das raízes nervosas. O processo inflamatório e desmielizante interfere na condução do estímulo nervoso até os músculos e, em parte dos casos, no sentido contrário, isto é, na condução dos estímulos sensoriais até o cérebro (ASBURY, 2000). Em geral, a moléstia evolui rapidamente, atinge o ponto máximo de gravidade por volta da segunda ou terceira semana e regride devagar. Por isso, pode levar meses até o paciente ser considerado completamente curado. Em alguns casos, a doença pode tornar-se crônica (ASBURY, 2000).

Embora existam diversas fontes de *Campylobacter* spp., a campilobacteriose está geralmente associada ao consumo de carne de frango, especialmente se esta não for congelada (NAUTA *et al.*, 2009). Em cerca de 70% dos casos, a infecção tem origem a partir da exposição à carne de frango crua ou mal cozida. Outros fatores de risco relacionados à campilobacteriose humana incluem a ingestão de água não tratada, consumo de leite cru ou não pasteurizado, contato prévio com animais de produção ou de estimação (WINGSTRAND *et al.*, 2006). Os frangos são os principais reservatórios de *C. jejuni*. Perus, patos e outras aves também têm importante papel na manutenção do agente na natureza (SHANE e STERN, 2003). As aves, geralmente, não apresentam manifestações ou lesões clínicas em decorrência da infecção, mostrando alta adaptação ao hospedeiro (MEAD, 2002).

4. Epidemiologia

A ocorrência de infecções associadas à *Campylobacter* notificadas tem aumentado notadamente em muitos países desenvolvidos nos últimos 20 anos. A

falta de notificação é um problema na maioria dos países e as taxas de incidência só correspondem aos casos confirmados em laboratório. Em consequência, a verdadeira taxa de infecção é maior do que o número de casos notificados, estimada entre 7,6 a 100 vezes mais alta (FAO, 2014). Causador de enterite no homem e pertencente ao grupo de *Campylobacter* termófilos, acredita-se que mais de 95 % dos casos de gastroenterites humanas sejam associadas a *C. jejuni* (FOODNET, 2014).

Nos últimos anos o gênero *Campylobacter* spp. ultrapassou o gênero *Salmonella* nos 17 países europeus onde ocorre o monitoramento, sendo o agente causador de zoonoses mais reportado na União Européia, e a taxa de incidência é de cerca de 50 casos para cada 100.000 habitantes. *Campylobacter* também foi o segundo agente causador de surtos de infecção de origem alimentar em 2006 na União Europeia, mesmo que a maioria dos casos relatados de campilobacteriose sejam considerados como casos esporádicos (EFSA, 2009).

Nos Estados Unidos, *Campylobacter* é a causa bacteriana mais comum de doença diarreica. Em 2012, as Doenças Transmitidas por Alimentos da Rede de Vigilância Ativa (FoodNet) estimou que a incidência seja de 14,3 casos por 100.000 habitantes. Historicamente, *Campylobacter*, foi alvo de muitos programas de atuação e monitoramento nos Estados Unidos. Em 1996, houve a implantação de um amplo sistema de vigilância envolvendo o diagnóstico dos casos de infecção de origem alimentar em dez estados. Foi observado uma significativa redução nos casos de campilobacteriose durante 8 anos, representando um decréscimo de 40% nesses casos, porém, estimava-se que ainda era de cerca de 2,5 milhões de casos anuais de campilobacteriose naquele país (FOODNET, 2014).

Dados relatados pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) mostram que a incidência de *Campylobacter* voltou a aumentar, sendo 14% maior em 2012 do que no período de 2006 a 2008 e foi o mais alto nível desde 2000. Contudo, novas estratégias estão sendo estabelecidas para o controle de *Campylobacter* nos Estados Unidos, sendo que a meta para 2020 é redução da incidência para 8,5 casos para cada 100.000 habitantes (FOODNET, 2014).

O primeiro surto de *C. jejuni* nos Estados Unidos foi de origem hídrica pelo consumo de água de abastecimento, ocorrido no ano de 1978, este também foi o maior até hoje relatado. Cerca de três mil indivíduos contraíram a infecção. Os sintomas foram: dores abdominais ou câimbras (88 %), diarreia (83 %), mal estar

(76%), dor de cabeça (54 %) e febre (52 %). Os sintomas desapareceram em um a quatro dias. Nos casos mais graves, fezes com sangue ocorreram, e a diarreia pode assemelhou-se à colite ulcerativa, na qual as dores abdominais, apendicite aguda foram identificadas. Entre 1978 e 1986, 57 surtos de infecções por *Campylobacter* foram relatadas, incluindo 11 surtos de veiculação hídrica, 45 surtos de origem alimentar, e um surto em um grupo de turistas para o qual a fonte não foi identificada (VOGT *et al.*, 1982; ROBERT *et al.*, 1988).

Em Connecticut, Estados Unidos, 1979, durante um acampamento de verão, houve um surto de gastroenterite, no qual identificaram *Campylobacter jejuni* em 16/41 (39%) pessoas. A causa do surto foi o manipulador que, doente, preparou a salada para os campistas com as mãos contaminadas pela bactéria (BLASER *et al.*, 1980). Outro surto relatado nos Estados Unidos, ocorrido em 2001, na região noroeste de Wisconsin, envolveu 75 indivíduos, sendo que todas as pessoas doentes bebiam leite não pasteurizado obtido em uma fazenda local. Os pacientes tinham idades variadas, entre 2 a 63 anos, os sinais e sintomas da doença incluíram diarreia (93 %), câibras abdominais (2 %), febre (76 %), náusea (40 %), e diarreia sanguinolenta (23 %). Nenhum dos pacientes teve a síndrome de Guillain–Barré (HARRINGTON *et al.*, 2002).

Os grandes surtos são incomuns e normalmente não estão associados ao consumo de carne de aves crua, mas sim à ingestão leite não pasteurizado ou da água contaminada. Entretanto, a maioria dos casos de campilobacteriose está associada a manipulação da carne de frango ou ao consumo desta carne crua ou mal cozida (SKIRROW, 1991; CALIL *et al.*, 2008). A carcaça de frango possui grande importância na contaminação cruzada, pois durante seu descongelamento, a água de degelo em contato com alimentos ingeridos *in natura* poderiam explicar a ocorrência de campilobacteriose. A ingestão de apenas 500 micro-organismos, facilmente presentes em uma gota de água de degelo contaminada pode causar enterites em humanos (CARVALHO, FLORIOTO e SCHOCKEN-ITURRINO, 2001).

Em países em desenvolvimento, alta taxa de portadores assintomáticos está, provavelmente, relacionada com a presença de anticorpos séricos produzidos em consequência de repetidas infecções, sendo muito comum em indivíduos que vivem em condições higiênicas insatisfatórias ou, por razões laborais, mantêm estreito contato com animais ou outras fontes de infecção (TRABULSI *et al.*, 2002; FERNANDEZ, 2008; MOURA, 2010).

Estudo realizado por Grados *et al.* (1989) em Lima, no Peru, realizou investigação da causa da diarreia infantil, e identificou que o agente causal foi *Campylobacter* devido a exposição doméstica a frangos vivos. O contato direto com as fezes de frangos infectados por *C. jejuni* no ambiente doméstico foi o principal fator de transmissão dos micro-organismos às crianças susceptíveis.

No Brasil, como em outros países em desenvolvimento, não há programas nacionais de vigilância que investiguem a incidência da campilobacteriose, nem mesmo, a legislação brasileira em vigor (BRASIL, 2001) estabelece padrões para *Campylobacter* em alimentos, o que torna os dados bastante escassos.

No Brasil, alguns autores têm relatado a presença de *Campylobacter* spp. em casos de diarreia aguda ou crônica e até em indivíduos assintomáticos (ESCOBAR, 1993; TOSIN e MACHADO, 1995; PALMA *et al.*, 1997; TRABULSI *et al.*, 2002). Em São Paulo, nos quadros diarreicos, a incidência tem alcançado índice próximo a 26% (SCARCELLI *et al.*, 2005; CALIL *et al.*, 2008).

Tosin e Machado (1995) relataram a presença de portadores de *Campylobacter* spp. em 11/177 (6,2 %) dos manipuladores de alimentos da região Sul do Brasil, principalmente nos indivíduos do sexo masculino.

O Centro de Vigilância Epidemiológica de São Paulo (CVE-SP) registrou em 2001, na cidade de Luís Antônio – SP, um surto que envolveu 11 pessoas. Foram identificados 4 agentes: *Campylobacter* spp., *E. coli* O158, *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., porém a fonte de transmissão não foi relatada (CVE, 2014). Em abril de 2003, o CVE – SP notificou um surto de infecção por *Campylobacter* envolvendo três pessoas que haviam consumido ovos de galinha contaminados, na cidade de Ribeirão Preto, SP. Em agosto do mesmo ano, foi registrado um surto causado por *Campylobacter* em São Paulo de acordo com dados do CVE – SP. Esse surto ocorrido na cidade de Santo André – SP envolveu duas pessoas que haviam ingerido frango (LOPES, 2009).

5. Infecção nas aves

Campylobacter spp. encontram-se distribuídos mundialmente, em especial nas regiões onde a criação comercial de frangos está estabelecida. Frangos e perus normalmente iniciam a eliminação fecal de *C. jejuni* com 2 a 3 semanas de idade. Cerca de 2 a 4 dias após o início da eliminação bacteriana, 90 a 100% do lote torna-se infectado, devido à alta capacidade de transmissão horizontal do agente entre as

aves (SHANE e STERN, 2003). As aves geralmente são portadoras assintomáticas, sem qualquer manifestação capaz de indicar doença. Entretanto, em infecções experimentais, algumas cepas de *C. jejuni*, isolados de casos humanos de campilobacteriose, causaram diarreia e morte em pintinhos (MEAD, 2002).

A disseminação da doença entre o lote, em geral, pode ocorrer por via horizontal, principalmente pela rota fecal-oral, embora existam indícios de transmissão vertical. Cole *et al.* (2004) isolaram *Campylobacter* spp. de 57 entre 59 amostras de sêmen de perus, bem como de diferentes órgãos do trato reprodutivo de galinhas. Da mesma forma, indícios de transmissão vertical foram obtidas por Fonseca *et al.* (2007), ao isolar do mecônio de pintinhos recém-nascidos e da cloaca de matrizes com *Campylobacter* spp. Enquanto Cox *et al.* (2005), isolaram *Campylobacter* spp. em folículos maduros e imaturos.

Evans e Sayers (2000) relataram que a infecção por *Campylobacter* spp. em aves depende da idade da ave e que sua frequência aumenta com a idade. A disseminação no lote é rápida e é maior no final da criação do frango, persistindo a colonização até o abate (GREGORY *et al.*, 1997). Nem todas as cepas de *C. jejuni* são capazes de colonizar o trato gastrointestinal das aves, porém quando a colonização ocorre, os locais principais são o ceco, o cólon e a cloaca das aves, com nível de contaminação de até 10^9 UFC/g de fezes (MEAD, 2002).

A disseminação pode ocorrer durante o abate devido a alta carga de bactérias presentes no trato intestinal, ou pela carga bacteriana presente nas penas e pele das aves, que pode ter ocorrido em função do estresse causado durante o transporte (OLAH *et al.*, 2006). Durante o abate, pode ocorrer contaminação cruzada por *C. jejuni* através dos funcionários, água e equipamentos do frigorífico (MEAD, 2004).

6. Estudos de prevalência em frangos

Os estudos de prevalência de *Campylobacter* termofílicos em amostras de frango resfriado do comércio varejista indicam que a positividade varia de acordo com o país, podendo ser de 8,1% até 100%. (GHAFIR *et al.*, 2007; HUMPHREY *et al.*, 2007; MEDEIROS *et al.*, 2008; MELDRUM *et al.*, 2005; MENA *et al.*, 2008; PEZZOTTI *et al.*, 2003; SALLAM, 2007; SCHERER *et al.*, 2006; TAREMI *et al.*, 2006; VINDIGNI *et al.*, 2007; WONG *et al.*, 2007; MEDEIROS *et al.*, 2012). A

espécie mais isolada neste tipo de produto cárneo é *C. jejuni* (SUZUKI e YAMAMOTO, 2009).

No Brasil, as pesquisas mostram que a frequência de isolamento de *Campylobacter* spp. em frangos varia independentemente do tipo de amostra estudada e do local onde as amostras são coletadas. Em carcaças de frango obtidas de indústria, já foram relatados os seguintes resultados: 63,3% em amostras adquiridas na região sul do Brasil (FRANCHIN, OGLIARI e BATISTA, 2007), 60% nas coletadas no Rio de Janeiro (AQUINO *et al.*, 2002), e 38% e 20% de abatedouros não industrializados e industrializados, respectivamente, em Belo Horizonte, Minas Gerais (DIAS *et al.*, 1990). Quanto às amostras de cortes de frango, verificou-se que a positividade variou de 6,7% nas amostras procedentes da região sudeste do país (REITER *et al.*, 2005) até 62,5% nas amostras coletadas em Niterói, no Rio de Janeiro (AQUINO *et al.*, 2002).

Augusto Filho (2001) detectou o micro-organismo em 25,2% (101/400) das amostras de carcaças de frango em Botucatu, São Paulo e entre os isolados, *C. jejuni* foi o mais frequente. Diferentemente do observado por Sakuma, Franco e Fernandez (1992), que relataram uma ocorrência mais baixa (13,5%), em carcaças, cortes e miúdos de frango da cidade de São Paulo com predominância de *C. coli*.

Franchin Aidoo e Batista (2005) analisaram oito aviários da região Sul do Brasil e observaram que antes do abate os frangos podem apresentar elevada contaminação por *Campylobacter* termofílicos. Esses autores detectaram alta frequência dessas bactérias (75%) na cloaca das aves, sugerindo que a contaminação intestinal é a principal fonte de contaminação. As amostras de penas também foram positivas, indicando que a presença desses micro-organismos em cama de aviário, gaiolas, penas e parapeitos aumentam a probabilidade de contaminação cruzada e o risco da presença de *Campylobacter* no produto final. Um estudo semelhante realizado em seis abatedouros de aves do Estado de São Paulo indicou positividade mais baixa (4,9%). Nesse estudo foram analisadas amostras de fezes, penas e água de escaldamento, e materiais de visceração e de resfriamento e a enxaguadura de carcaças. As amostras de fezes foram as que apresentaram maior taxa de contaminação (22%) (CORTEZ *et al.*, 2006). A água de resfriamento do *chiller* também pode ser uma das principais fontes de contaminação cruzada de *Campylobacter* termofílico em carcaças de frango (FRANCHIN, OGLIARI e BATISTA 2007).

Kuana (2008), ao analisar 22 lotes de frangos de corte com idade entre 3 e 5 semanas, observou que 81,8% das amostras de descarga cecais analisadas estavam contaminadas com *Campylobacter* spp. Ao analisar 96 carcaças no frigorífico, a contaminação observada foi de 99%. Fonseca *et al.* (2007) isolaram *Campylobacter* spp. de 80% de amostras de pool de mecônio e 54,55% das amostras de pool de fezes de matrizes. Por outro lado, Gomes *et al.* (2006) isolaram *C. jejuni* de apenas 5,2% das 404 amostras fecais de frangos provenientes de criações domésticas.

Mais recentemente, Medeiros *et al.* (2012) avaliaram 30 amostras de carcaças de frango resfriadas adquiridas no município do Rio de Janeiro, no período de julho de 2009 a julho de 2010, e identificaram a presença do patógeno em 21 amostras (70%), sendo 6 (28,6%) de abatedouros (3 com Serviço de Inspeção Estadual e 3 sem inspeção), 8 (38,1%) de supermercados e 7 (33,3%) de feiras livres.

No Canadá, Medeiros *et al.* (2008) verificaram que a positividade para *Campylobacter* sp. nas amostras de frango adquiridas em supermercados foi de 19%. Dados americanos revelam que existe variação de 30 a 100 % das aves que carregam este micro-organismo e 20 a 100 % das aves no varejo estão contaminadas (FDA, 2014).

Uma das principais medidas preventivas utilizadas pelos abatedouros é a redução do número de células pelo escaldamento em água, no entanto, reconhece-se que os micro-organismos permanecem viáveis no intestino e recontaminam as carcaças durante a depenagem e evisceração (MADALOZZO *et al.*, 2007).

7. Métodos de detecção de *Campylobacter* spp. em alimentos

Para a detecção de *Campylobacter* em alimentos deve ser levado em consideração o fato de que a população presente nos produtos é normalmente baixa, a necessidade de condições seletivas nos meios de cultura que inibam o crescimento dos micro-organismos contaminantes, além de condições adequadas de incubação. Outro desafio é a dificuldade de manutenção desta bactéria devido ao não crescimento em temperaturas abaixo de 30°C e extrema sensibilidade à concentração de oxigênio do ar (SILVA *et al.*, 2007; GODOI, GANDRA e GANDRA, 2010).

De acordo com as normas da *International Organization for Standardization*, da *Food and Drug Administration* (HUNT *et al.*, 2001) e do *Food Safety and Inspection Service, United States Department of Drug Administration of Agriculture*, os métodos de análises em alimentos estão direcionados para as espécies de *Campylobacter* termotolerantes, com a temperatura ótima de multiplicação de 41,5 ou 42°C. As etapas descritas por essas normas são muito semelhantes, incluindo pré-enriquecimento em Caldo Bolton (cloreto de sódio, metabissulfito de sódio, piruvato de sódio e ácido α -cetoglutárico) ou Caldo de Enriquecimento de Hunt (extrato de levedura suplementado com FBP (sulfato ferroso, piruvato de sódio e metabissulfito de sódio). A fase posterior inclui a inoculação em um ou dois meios seletivos diferenciais e a incubação a temperatura de 41,5 ou 42°C, com posterior seleção das culturas onde estas são caracterizadas de acordo com forma, arranjo e motilidade.

As colônias de *Campylobacter* spp. usualmente são planas, com coloração acinzentada ou translúcida e formato irregular, arredondadas ou convexas. As colônias podem apresentar aspecto seco ou úmido, com brilho d'água ao refletir a luz ambiente. Existe uma tendência das colônias apresentarem crescimento confluyente ao longo da linha de semeadura nos meios solidificados. Reações hemolíticas não são observadas em ágar sangue (KONEMAN, 2008).

Campylobacter spp. são extremamente suscetíveis ao estresse ambiental, sendo sensíveis à exposição ao ar, ressecamento, pH ácido e armazenamento prolongado. O uso de agentes quelantes de oxigênio, uma atmosfera modificada e utilização de antibióticos para suprimir a flora competitiva ampliam as chances de isolamento de *Campylobacter* spp. (SHANE e STERN, 2003).

Tendo em vista a característica fastidiosa da bactéria, a utilização de meios de transporte e de enriquecimento para o cultivo de *Campylobacter*, é necessária quando as amostras não são processadas em um prazo de 24h, ou para amostras que contenham um pequeno número de bactérias viáveis, tais como amostras de água e urina. O meio de transporte utilizado deverá inibir o crescimento de outras bactérias, como *Escherichia coli*, sendo o mais comumente utilizado o de Cary-Blair (GOMES *et. al*, 2006; OIE, 2008).

O cultivo de *Campylobacter* deve ser realizado em condições microaerófilas, sendo indicada a composição gasosa com 5% de O₂, 10% de CO₂ e 85% de N₂. A ISO 10272-1 e 2 (2006) sugere a concentração entre 2 a 5% de O₂, 3 a 10% de CO₂,

menos de 10% de H₂ (opcional) e quantidade de N₂ necessária para completar 100% (SILVA *et al.*, 2007). Bolton *et al.* (1984) observaram que para aumentar a tolerância ao oxigênio os meios devem possuir a suplementação FBP, carvão, heme e sangue. Estas substâncias irão prevenir acúmulo e neutralizar os derivados do oxigênio como o peróxido de hidrogênio produzido durante o crescimento nos meios de cultura e neutralizar os inibidores da trimetropina que são tóxicas para o *Campylobacter* (SILVA *et al.*, 2007).

Os meios devem conter combinações dos antibióticos como a cefoperazona de sódio, trimetoprima, vancomicina, rifampicina, anfotericina B e cicloheximida. Para reduzir a competição com outros tipos de bactérias a vancomicina é utilizada para inibir as bactérias gram positivas, a trimetoprima inibe *Proteus*, a cefoperazona de sódio inibe as bactérias gram-negativas entéricas e algumas gram-positivas, a anfotericina B e a cicloheximida inibe fungos (SILVA *et al.*, 2007).

O método de presença/ausência da ISO 10272-1 utiliza, para a confirmação do gênero *Campylobacter* termotolerante, a morfologia, arranjo, agrupamento e motilidade típicos, o teste de oxidase positivo, o crescimento negativo a 25°C em condições microaerófilas e a incapacidade em crescer em condições aeróbicas a 41,5°C, sendo a diferenciação entre as espécies *C. jejuni* subsp. *jejuni*, *C. coli*, *C. lari* e *C. upsaliensis* opcional (SILVA *et al.*, 2007).

7.1 Identificação das espécies de *Campylobacter*

Os sintomas e o curso da doença causada pelas diferentes espécies de *Campylobacter* são em sua maioria muito parecidos, assim a estes se realiza o mesmo tratamento, e não se justifica a necessidade de caracterização ao nível de espécie do agente patogênico. Contudo, do ponto de vista epidemiológico, a situação é diferenciada, pois os epidemiologistas necessitam traçar a rota de transmissão do *Campylobacter*, sua incidência, assim como comportamento deste no ambiente e em animais. Neste caso, a diferenciação das espécies é indispensável (JACOBS-REITSMA, 2000).

A caracterização das espécies de *Campylobacter* é complexa devido à inatividade do micro-organismo frente aos açúcares e por serem bioquimicamente pouco ativos. As espécies de *Campylobacter* não fermentam nem oxidam açúcares, obtendo energia de aminoácidos e intermediários do ciclo de Krebs com 4 ou 5 carbonos (KONEMAN, 2008; ON, 1996; KUANA *et al.*, 2009).

Testes fenotípicos usados para diferenciar outros grupos de bactéria, como os membros da família *Enterobacteriaceae*, não têm o mesmo potencial discriminatório para *Campylobacter*, dificultando sua identificação na rotina laboratorial (ON, 1996).

A diferenciação entre as espécies do gênero *Campylobacter* recomendada pela norma ISO 10272: 2006, e usualmente utilizada na rotina laboratorial emprega as seguintes provas bioquímicas: catalase, sensibilidade ao ácido nalidíxico, sensibilidade à cefalotina, hidrólise do hipurato e do indoxil acetato. Este método aplica-se a todos os alimentos destinados ao consumo humano, as rações animais e as amostras do ambiente de fabricação ou manipulação de alimentos (SILVA *et al.*, 2007).

Tradicionalmente *C. jejuni* é identificado pelo teste positivo da hidrólise do hipurato, e diante de cepas hipurato negativas verificam-se a resistência ao ácido nalidíxico e cefalotina para diferenciar *C. lari* e *C. upsaliensis*, assim como, a reação ao indoxil acetato para identificar *C. coli*. Neste contexto, a hidrólise do hipurato mostra-se como chave decisória de uma primeira classificação em isolados hipurato positivos e hipurato negativos (NAKARI; PUHAKKA e SIITONEN, 2008).

Os problemas fundamentais na identificação fenotípica do agente decorrem da falta de padronização dos testes utilizados entre os laboratórios, dificultando a comparação dos dados de diversas origens, e a falta de objetividade dos esquemas de identificação disponíveis, onde um único teste seria essencial para caracterizar a espécie, não levando em consideração os mutantes. Exemplo disso é a utilização da hidrólise do hipurato como chave para distinguir *C. jejuni*, apesar da existência de amostras de *C. jejuni* hipurato-negativas, que seriam confundidas como *C. coli* e outras espécies do gênero que não o hidrolisam (KUANA *et al.*, 2009).

Como resultado, o diagnóstico para muitas das cepas avaliadas mostra-se como duvidoso, pois além da possibilidade de presença de cepas *C. jejuni* hipurato-negativas, muitas espécies tem apresentado resistência adquirida aos antibióticos utilizados na avaliação bioquímica (STEINHAUSEROVA *et al.*, 2001).

Métodos alternativos tais como aqueles baseados em PCR como reações espécie-específica, multiplex ou utilizando como alvo regiões repetitivas (REP-PCR). Além disso, o sequenciamento do genoma bacteriano também tem sido proposto como ferramenta para a identificação (HEALY *et al.*, 2005).

No entanto, a maioria dos laboratórios clínicos não usam esses métodos, principalmente em função do custo da análise e manutenção de equipamentos.

Assim, a utilização de um sistema de identificação manual torna-se uma alternativa viável como é o caso do API Campy® (Biomerieux), um sistema miniaturizado composto por 21 provas bioquímicas destinado a identificação de 18 espécies de *Campylobacter*, considerado um teste simples e de rápida execução (MARTINY *et al.*, 2010).

7.2 Pesquisa de *Campylobacter* por técnicas moleculares

Os métodos moleculares, principalmente o método de PCR, têm sido utilizados por superarem muitos dos problemas associados com os métodos tradicionais de cultivo. PCR tem sido amplamente utilizada para identificar espécies microbianas que são difíceis de cultivar, ou não são cultiváveis, e linhagens dentro de espécies que mostram um comportamento fenotipicamente divergente e, portanto, difíceis de serem identificados. A metodologia de PCR tem a maior taxa de detecção entre os métodos de identificação biológica, e sob condições otimizadas mostra também alta especificidade (SIQUEIRA JÚNIOR e ROÇAS, 2003).

Um dos requisitos para a padronização de PCR é a escolha dos pares de iniciadores específicos do patógeno de interesse. A região escolhida deve ser comum à maioria das cepas, codificar de preferência para proteínas com importância na patogenicidade da bactéria e não apresentar homologia com outros micro-organismos (SANTOS *et al.*, 2001).

Entre as várias estratégias de PCR disponíveis, aquelas baseadas no monitoramento da reação de amplificação em tempo real são provavelmente as mais promissoras.

A PCR em tempo real monitora a reação ciclo a ciclo, associando a amplificação do alvo em cada ciclo com a emissão de uma determinada quantidade de fluorescência. A fluorescência é originada durante a hibridação do DNA alvo com sondas ou iniciadores marcados com fluoróforos específicos. A intensidade de sinal emitida é proporcional à quantidade de DNA alvo amplificado e aumenta exponencialmente em cada ciclo de amplificação. Deste modo, é possível monitorar a quantidade de produto gerada em cada ciclo, durante a fase exponencial da reação, onde a quantidade de fragmento gerado é proporcional à quantidade inicial (MARCELINO, 2006).

As vantagens da tecnologia da PCR em Tempo Real incluem velocidade (detecção da presença da sequência alvo do micro-organismo com

aproximadamente 30 a 40 minutos), a possibilidade de monitoramento contínuo do progresso da PCR em cada ciclo, o produto da PCR não precisa ser removido para análise posterior e permite análise qualitativa e quantitativa. Sendo a quantificação baseada no aumento exponencial da quantidade inicial de DNA durante a realização dos ciclos.

Um dos principais obstáculos encontrados atualmente no diagnóstico utilizando DNA é a separação dos micro-organismos vivos e mortos. A fim de explorar o pleno potencial da PCR para diagnóstico microbiológico, há uma grande demanda para os métodos de preparação de amostras relacionadas ao fato dos micro-organismos estarem vivos ou mortos. Um aspecto que ainda não foi amplamente explorado na PCR é a diferença física entre as células vivas e mortas. Atualmente sabe-se que os ácidos nucleicos em células vivas são protegidos, porque as paredes celulares e as membranas estão intactas. Em células mortas, estas barreiras são comprometidas e os ácidos nucleicos são, portanto, expostos aos compostos adicionados à amostra. Contudo, estudos são necessários para que problemas como o apontado anteriormente possam ser solucionados (NOGVA *et al.*, 2000).

Uma característica importante dos métodos baseados em PCR em Tempo Real é a possibilidade de detectar e quantificar patógenos difíceis de serem cultivados por métodos tradicionais de cultura. Além disso, métodos de PCR em Tempo Real podem dispensar o enriquecimento das amostras permitindo rápida detecção e quantificação de patógenos por análise direta de amostras de alimentos (AHMED *et al.*, 2009).

A enumeração direta de *Campylobacter* em carne de frango pode ser muito útil para a determinação da contagem inicial em abatedouros. A rapidez, especificidade, sensibilidade e a possibilidade de quantificação da PCR em Tempo Real tornam essa técnica a mais promissora atualmente conhecida (BOTTELDOORN *et al.*, 2008).

Várias técnicas de PCR para a detecção e simultânea quantificação de *Campylobacter* já foram desenvolvidas. Devido a PCR ser um ensaio sensível, substâncias inibidoras comumente presentes em matrizes alimentares podem levar à redução do limite de detecção do ensaio ou subestimar a contagem das bactérias presentes. Assim sendo, para a detecção e a quantificação de *Campylobacter* empregando o ensaio PCR é necessária a adequada extração e purificação do DNA.

No quadro 01 estão apresentados alguns métodos de extração e purificação de DNA a partir de carne de frango, publicados entre os anos de 2000 a 2010.

Dentre os métodos apresentados no Quadro 01, alguns são capazes de eliminar interferentes da matriz alimentar com o aumento significativo do limite de detecção devido à concentração do DNA. Esses métodos envolvem o enxágue da carcaça e posterior filtração, centrifugação, extração e purificação do DNA (HONG *et al*, 2007; RONNER e LINDMARK, 2007).

Quadro 1 - Métodos de extração e purificação de DNA para a quantificação de *Campylobacter* utilizando PCR em Tempo Real em carne de frango

Ano	País	Procedimentos	Referência
2000	Noruega	Quantificação de <i>C. jejuni</i> em alimentos, utilizando o Dynabeads DNA Direct I (Dynal), sistema este que permite a ligação do DNA da bactéria às esferas magnéticas.	NOGVA <i>et al.</i> , 2000
2003	China	Extração do DNA através do Wizard genomic DNA purification (Promega).	YANG <i>et al.</i> , 2003
2005	Canadá, Dinamarca e Suécia	Método de flotação para a PCR em Tempo Real que permitiu detectar, quantificar e diferenciar células viáveis e células VNC utilizando três sistemas com gradientes de densidades diferentes, todos formulados a partir de RediGrad (Amersham Biosciences).	WOLFFS <i>et al.</i> , 2005.
2006	E.U.A	Extração do DNA sem etapa de enriquecimento utilizando Ultra Diluente Prepman (Applied Biosystem).	DEBRETSION <i>et al.</i> , 2007.
2007	Suécia	Quantificação de <i>Campylobacter</i> com o emprego de DNeasy tissue kit (Qiagen) para a extração do DNA, e etanol para a concentração.	RONNER e LINDMARK, 2007
2007	Coréia	Quantificação de <i>Campylobacter</i> , empregando a resina quelante Chelex-100 (Bio-Rad).	HONG <i>et al.</i> , 2007
2008	Bélgica	Quantificação de <i>Campylobacter</i> , utilizando procedimentos de filtração e a técnica de fervura para a indução da lise celular.	BOTTELDOORN <i>et al.</i> , 2008
2010	Itália	Extração do DNA das amostras alimentares com solução iônica e Master-Pure Complete DNA e RNA Purification Kit (Epicentre).	RANTSIOU <i>et al.</i> , 2010

Referências

ADAMS, M.R.; MOSS, M.O. **Microbiologia de los Alimentos**. Zaragoza: Acribia, p. 205-211, 1995.

AHMED W; SAWANT S; HUYGENS F; GOONETILLEKE A; GARDNER T. Prevalence and occurrence of zoonotic bacterial pathogens in surface waters determined by quantitative PCR. **Water Research**, v. 43, p. 4918-4928, 2009.

ALTEKRUSE, S. F.; STERN, N. J.; FIELDS, P. I.; SWERDLOW, D. L. *Campylobacter jejuni* an emerging foodborne pathogen. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.5, p.28-35, 1999.

AQUINO, M.H.C.; PACHECO, A.P.; FERREIRA, M.C.; TIBANA, A. Frequency of isolation and identification of thermophilic Campylobacters from animals in Brazil. **Veterinary Journal**, v. 164, n.2, p. 159-161, 2002.

ASBURY, A.K. New concepts of Guillain-Barré syndrome. **Journal of Child Neurology**, v. 15, p. 183-191, 2000.

AUGUSTO FILHO, O. **Isolamento de Campylobacter em carcaças resfriadas de frangos, comercializadas no município de Botucatu-SP**. Botucatu, 2001. 62p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

BLASER, M.J., LAFORCE, F.M., WILSON, N.A. AND WANG, W.L. Reservoirs for human campylobacteriosis. **Journal of Infectious Disease**, v. 141, p. 665-669, 1980.

BOLTON, F. J.; COATES, D.; HUTCHINSON, D. N. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 56, n. 1, p. 151-157, 1984.

BOTTELDOORN, N.; VAN COILLIE, E.; PIESSENS, V.; RASSCHAERT, G.; DEBRUYNE, L.; HEYNDRICKX, M.; HERMAN, L.; MESSENS, W. Quantification of *Campylobacter* spp. in chicken carcass rinse by real-time PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v.105, p.1909–1918, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. **Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial da União. Poder Executivo, Seção I, p. 45-53, 2001.

BUTZLER, J.P.; DEKEYSER, P.; DETRAIN, M.; DEHAEN, F. Related vibrios in stool. **Journal of Pediatrics**, v. 82, p. 493-495, 1973.

BUTZLER, J.P. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity, **Clinical Microbiology and Infection**, v.10, n.10, p. 868-876, 2004.

CALIL, R.M.; SCARELLI, E.; MODELLI, K.D.; CALIL, E.M.B. **Campilobacterioses: O agente, a doença e a transmissão por alimentos**. São Paulo: Livraria Varela. 1ª ed., 2008. 129p.

CARVALHO, A.C.F.B.; FLORIOTO, J.F.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P. *Campylobacter* e *Salmonella* nas fezes e em diferentes tipos de cama de frango. **Ars Veterinária**, v. 17, n. 3, p. 201-206, 2001.

COCKER, A.O.; ISOKPEHI, R.D.; THOMAS, B.N.; AMISU, K.O.; OBI, C.L. Human campylobacteriosis in developing countries **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 3, p. 237-242, 2002.

COLE, K. *et al.* Isolation and prevalence of *Campylobacter* in the reproductive tracts and semen of commercial turkeys **Avian Diseases**, Kenneth Square, v. 48, n. 4, p. 625-630, 2004.

CORTEZ, A.L.; CARVALHO, A.C.; SCARCELLI, E.; MIYASHIRO, S.; VIDAL-MARITNS, A.M.; BURGER, K.P. Survey of chicken abattoir for the presence of *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n.6, p. 307-310, 2006.

COX, N. A.; BAILEY, J. S.; RICHARDSON, L. J. Presence of naturally occurring *Campylobacter* and *Salmonella* in the mature and immature ovarian follicles of late life broiler breeder hens. **Avian Diseases**. Kenneth Square, v. 49, n. 3, p. 285-287, 2005.

CVE – Centro de Vigilância Epidemiológica. **Surtos de doenças transmitidas por água e alimentos notificados à Divisão do DDTHA – CVE/SES-SP por semana epidemiológica, DIR e Município – Estado de São Paulo – ano 2001**. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/hm/hidrica/hidri_estat.html. Acesso em: 08 de abril de 2014.

DIAS, T.C.; QUEIROZ, D.M.M.; MENDES, E.N.; PERES, J.N. Chicken carcasses as a source of *Campylobacter jejuni* in Belo Horizonte, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 32, n.6, p.414-418, 1990.

DEBRETSION, A.; HABTEMARIAMB, T.; WILSONC, S.; NGANWAB, D.; YEHUALAESHET, T. Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Campylobacter jejuni* on chicken rinses from poultry processing plant, **Molecular and Cellular Probes**. v.21, p.177–181, 2007.

DORREL, N.; WREN, B. W. The second century of *Campylobacter* research: recent advances, new opportunities and old problems. **Current Opinion in Infectious Diseases**, Philadelphia, v. 20, n.5, p. 514-518, 2007.

EFSA (European Food Safety Authority), 2009. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007. **The EFSA Journal**, p. 223.

ENGBERG, J. Contributions to the epidemiology of *Campylobacter* infections: a review of clinical and microbiological studies. **Danish Medical Bulletin**, v.53, n.4, p.361-389, 2006.

ESCOBAR, A.M.U. **Contribuição ao estudo da doença diarreica aguda em crianças com idade inferior a 5 anos e recuperação fecal de *Campylobacter jejuni***, 1993. 194p. Tese Doutorado – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo, 1993.

EUZÉBY, J.P. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - Genus *Campylobacter*. Disponível em: <http://www.bacterio.net/campylobacter.html>. Acesso em: 05 de março de 2014.

EVANS, S. J.; SAYERS, A. R. A longitudinal study of *Campylobacter* infection of broiler flocks in Great Britain. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 46, n. 3, p. 209-223, 2000.

FAO. Risk assessment of *Campylobacter* spp. in broiler chickens: Interpretative Summary. Microbiological Risk Assessment Series n. 11 FAO/WHO. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/008/y8145e/y8145e00.htm>>. Acesso em 04 de abril de 2014.

FDA – US Food and Drug Administration – **Center for Food Safety and Applied Nutrition**. 2011. Disponível em <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5125a2.htm>> Acesso em 03 de abril de 2014.

FERNANDEZ, H. **Família Campylobacteraceae**. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. Eds. Microbiologia. ed. 5, p. 357-362. São Paulo: Atheneu, 2008.

FONSECA, B. B. *et al.* *Campylobacter* sp em mecônio de pintainhos e em cloaca de reprodutoras de corte. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 23, n. 3, p. 128-132, 2007.

FOODNET. National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases – *Campylobacter*. 2014. Disponível em: <http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/campylobacter/technical.html>. Acesso em: 10 mar. 2014.

FORSYTHE, S.J. Doenças de origem alimentar. In: FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed. 2002. Cap.3, p.65-99.

FOSTER, G.; HOLMES, B.; STEIGERWALT, A. G.; LAWSON, P. A; THORNE, P.; BYRER, D. E.; ROSS, H. M.; XERRY, J.; THOMPSON, P. M.; COLLINS, M. D. *Campylobacter insulaenigrae* sp. nov., isolated from marine mammals. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, GB, v.54, n.6, p.2369-2373, 2004.

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.

FRANCHIN, P.R.; OGLIARI, P.J.; BATISTA, C.R. Frequency of thermophilic *Campylobacter* in broiler chickens during industrial processing in Southern Brazil slaughterhouse. **British Poultry Science**, v. 48, n. 2, p. 127-132, 2007.

GHAFFIR, Y.; CHINA, B.; DIERICK, K.; DE ZUTTER, L.; DAUBE, G. A seven-year survey of *Campylobacter* contamination in meat at different production stages in Belgium. **International Journal of Food Microbiology**, v.116, n.1, p.111-120, 2007.

GODOI HS, GANDRA TK, GANDRA EA. *Campylobacter* spp. em alimentos. Uma revisão. **Arquivo de Ciências Veterinárias e Zootecia**. UNIPAR, Umuarama, v. 13. n. 1, p. 37-41, jan./jun. 2010.

GOMES, F. R.; CURCIO, B.R. ; LADEIRA, S.R.L.; FERNANDEZ, H.; MEIRELES, M.C.A. *Campylobacter jejuni* occurrence in chicken fecal samples from small properties in Pelotas, southern of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n.3, p. 375-378, 2006.

GRADOS, O.; BRAVO, N.; BLACK, R.E.; BUTZLER, J.P. Diarrhea pediátrica por *Campylobacter* debida a la exposicion domestica a pollos vivos em Lima, Peru. **Boletim de la Oficina Sanitária Panamericana**. Washington, v. 106, p. 205-213, 1989.

GREGORY, E.; BARNAHART, H.; DRESEN, D.W.; STERN, N.J.; CORN, J.L. Epidemiological study of *Campylobacter* spp. In broilers: source, time of colonization, and prevalence. **Avian Diseases**, Kenneth Square, v. 41, n. 4, p.890-898,1997.

HARRINGTON, P.; ARCHER, J.; DAVIS J.P.; CROFT, M.D.; VARMA, J.K. Outbreak of *Campylobacter jejuni* infections associated with drinking unpasteurized milk procured through a cow-leasing program – Wisconsin, 2001. **Weekly**, v. 51, p. 548-549, 2002.

HE, Y.; CHEN C. Y. Quantitative analysis of viable, stressed and dead cells of *Campylobacter jejuni* strain 81-176. **Food Microbiology**, v. 27, p. 439-446, 2010.

HEALY, M.; HUONG, J.; BITTNER, T.; LISING, M.; FRYE, S.; RAZA, S.; SCHROCK, R.; MANRY, J.; RENWICK, A.; NIETO, R.; WOODS, C.; VERSALOVIC, J.; LUPSKI, J.R. Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 199–207, 2005.

HONG, J.; JUNG, W.K.; KIM, J.M.; KIM, S.H.; KOO, H.C.; SER, J.; PARK, Y.H. Quantification and Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in raw chicken meats using a real-time PCR method. **Journal of Food Protection**, v.70, n.9, p. 2015-2022, 2007.

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

HUNT, J. M.; ABEYTA, C.; TRANT, T. *Campylobacter* In: **Bacteriological manual online**, 8 ed., Revision A. Washington, DC: Center for Food Safety and Applied

Nutrition, U. S. FDA, 2001. Cap. 7. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm072616.htm>

International Organization for Standardization (ISO). ISO 10272 Microbiology of Food and Animal Feeding Stuff - Horizontal Method for Detection and Enumeration of *Campylobacter* spp. - Part 1: Enrichment Method; Part 2: Enumeration Method. ISO, Geneva, Switzerland; 2006.

JACOBS-REITSMA, W. ***Campylobacter* in the food supply**. In *Campylobacter* ed. Nachamkin, I. and Blaser, M.J. pp. 69±88. Washington: ASM Press, 2000.

KETLEY, J.M. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. **Microbiology**, v. 143, n.1, p 5-21, 1997.

KIST, M. Who discovered *Campylobacter jejuni/coli*? A historical review. **Zentralblatt fuer Bakteriologie, Microbiologie und Hygiene, Abt,1, Originale A: Medizinische Mikrobiologie, Infektionsk**, v. 261, p.177-186, 1986.

KONEMAN, E. W. **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. ed. 6, p. 1154 J.B. Lippincot Company. Philadelphia, 2008.

KUANA,S.L.; SANTOS, L.R.; RODRIGUES, L.B.; BORSOI, A.; MORAES, H.L.; SALLES, C.T.; NASCIMENTO, V.P. Occurrence and characterization of *Campylobacter* in the Brazilian production and processing of broilers. **Avian Diseases**, Kenneth Square, v. 9, n. 2, p. 480-486, 2008.

KUANA, S.L.; SANTOS, L.R.; RODRIGUES, L.B.; NASCIMENTO, V.P. Sistema API Campy para caracterização de amostras de *Campylobacter* isoladas de descarga cecal, fezes, swabs cloacais e carcaças de frangos de corte. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.76, p.273-277, 2009.

LOPES, G.V. ***Campylobacter* spp. no abate e varejo: ocorrência em carcaças de bovinos para exportação e em cortes refrigerados de aves e bovinos**. 2009. 130f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MADALOZZO, F.R.; SANTOS, L.R.S.; RODRIGUES, L.B.; DICKEL, E.L. Controle de *Campylobacter* sp durante o processamento tecnológico de frangos de corte. **Revista Higiene Alimentar**, v.21, n.157, p. 45-51, 2007.

MARCELINO, F. C. Avaliação de resíduos de transgênicos em alimentos no Brasil e desenvolvimento de metodologias de análise, 2006, p. 132 Tese de Doutorado – Viçosa.

MARTINY, D.; DEDISTE, A.; DEBRUYNE, L.; VLAES, L; HADDOU, N.B.; VANDAMME, P.; VANDENBERG, O. Accuracy of the API Campy system, the Vitek 2 Neisseria–Haemophilus card and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for the identification of *Campylobacter* and related organisms. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, p. 1001–1006, 2010.

MAZIERO, M. T.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Effect of refrigeration and frozen storage on the *Campylobacter jejuni* recovery from naturally contaminated broiler carcasses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 501 – 505, 2010.

MEAD, G. C. Factors affecting intestinal colonisation of poultry by *Campylobacter* and role of microflora in control . **World's Poultry Science Journal**, Ithaca, v. 58, n. 2, p.169-178, 2002.

MEAD, G. C. Microbiological quality of poultry meat: a review **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v. 6, n. 3, p. 135-142, 2004.

MEDEIROS, D.T.; SATTAR, S.A.; FARBER, J.M.; CARRILLO, C.D. Occurrence of *Campylobacter* spp. in raw and ready-to-eat foods and in a Canadian food service operation. **Journal of Food Protection**, v.71, n.10 p.2087-2093, 2008.

MEDEIROS, V.M.; BRICIO, S.M.L.; FILGUEIRAS, A.L.L.; CLEMENTINO, B.M. Use of Bolton for selective enrichment and comparative analysis of its performance with direct plating methodology for isolating *Campylobacter* spp. from chilled chicken carcasses. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.71, p. 456-461, 2012.

MELDRUM, R.J.; GRIFFITHS, J.K.; SMITH, R.M.; EVANS, M.R. The seasonality of human *Campylobacter* infection and *Campylobacter* isolates from fresh, retail chicken in Wales. **Epidemiology and Infection**, v. 133, n.1, p. 49-52, 2005.

MENA, C.; RODRIGUES, D.; SILVA, J.; GIBBS, P., TEIXEIRA, P. Occurrence, identification, and characterization of *Campylobacter* species isolated from portuguese poultry samples collected from retail establishments. **Poultry Science**, v. 87, n.1, p. 187-190, 2008.

MORAN, A. P. AND UPTON, M. E. Factors affecting production of coccoid forms by *Campylobacter jejuni* on solid media during incubation. **Journal of Applied Bacteriology**, v.62, p. 527-537, 1987.

MOORE, J. E.; CORCORAN, D.; DOOLEY, J. S. G. *Campylobacter*. **Veterinary Research**, v. 36, p. 351-382, 2005.

MOURA, H.M. **Isolamento e análise de resistência a antimicrobianos de cepas de *Campylobacter jejuni* em amostras de carnes de aves resfriadas comercializadas no Distrito Federal**. Dissertação (Mestrado). 2010. 63p. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília. 2010.

NAKARI, U.M.; PUHAKKA, A.; 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 and Infectious Diseases**, v. 27, p. 513–518, 2008.

NAUTA, M.; VAN DER WAL, F.J.; PUTIRULAN, F.F.; POST, J.; VAN DE KASSTEELE, J.; BOLDER, N.M A comparison of the risks assessments on

Campylobacter in broiler meat. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 129, p. 107-123, 2009.

NOGVA, H.K.; BERGH, A.; HOLCK, A.; RUDI, K. Application of the 5'-nuclease PCR assay in evaluation and development of Methods for Quantitative Detection of *Campylobacter jejuni*. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 4029-4036, Set. 2000.

OIE, *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. In: OIE, **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. ed. 6, p.1185-1191 2008.

OLAH, P. A. ; DOETKOTTB, C.; FAKHRA, M. K.; LOGUEA, C. M. Prevalence of the *Campylobacter* multi-drug efflux pump (CmeABC) in *Campylobacter* spp. isolated from freshly processed turkeys. **Food Microbiology**, v. 23, n. 5, p 453-460, 2006.

ON, S. L. W. Identification methods for campylobacters, helicobacters and related organisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v.9, p.405-422, 1996.

PALMA, D.; OLIVA, C.A.; TADDEI, J.A.; FAGUNDES-NETO, U. Acute diarrhea: stoolwater loss in hospitalized infantis and its correlation with etiologic agent and lactose contend in the diet. **Arquivo de Gastroenterologia**, v. 34, p.186-195, 1997.

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

PEZZOTTI, G. SERAFIN, A.; LUZZI, I.; MIONI, R.; MILAN, M.; PERIN, R. Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in animals and meat in northeastern Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, n. 3, p. 281-287, 2003.

RANTSIOU, K.; LAMBERTI, C.; COCOLIN, L. Survey of *Campylobacter jejuni* in retail chicken meat products by application of a quantitative PCR protocol, International. **Journal of Food Microbiology**, 2010.

REITER, M.G.; BUENO, C.M.; LOPEZ, C.; JORDANO, R. Occurrence of *Campylobacter* and *Listeria monocytogenes* in a poultry processing plant. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 9, p. 1903-1906, 2005.

ROBERT, V.; TAUXE, M.D.; NANCY HARGRETT-BEAN, M.P.H.; CHARLOTTE, M.; PATTON, M.S. *Campylobacter* isolates in the United States, 1982-1986. **Surveillance Summaries**, v. 37, p. 1-13, 1988.

ROSSI. M.; DEBRUYNE, L.; ZANONI, R.G.; MANFREDA, G.; REVEZ, J.; VANDAMME, P. *Campylobacter avium* sp. nov., a hippurate-positive species isolated from poultry. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. V. 59, p. 2364-2369, 2009.

ROONER, A.C.; LINDMARK, H. Quantitative detection of *Campylobacter jejuni* on fresh chicken carcasses by Real-Time PCR, **Journal of Food Protection**, v.70, n. 6, p. 1373-1378, 2007.

ROZYNEK, E.; DZIERZANOWSKA-FRANGAT, K.; JOZWIAK, P.; POPOWSKI, J.; KORSAK, D.; DZIERZANOWSKA, D. Prevalence of potential virulence markers in Polish *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates obtained from hospitalized children and from chicken carcasses. **Journal of Medical Microbiology**, London, v.54, p.615-619, 2005.

RUDI K.; MOEN, B.; DROMTORP, S. M.; HOLCK, A. L. Use of Ethidium Monoazide and PCR in Combination for Quantification of Viable and Dead Cells in Complex Samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 2, p. 1018-1024, 2005.

SAKUMA, H.; FRANCO, B.D.G.M.; FERNANDEZ, H. Occurrence of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in retail raw chicken meat and giblets in São Paulo, Brazil. **Revista de Microbiologia**, v.23, p.13-16, 1992.

SALLAM, K.I. Prevalence of *Campylobacter* in chicken and chicken by-products retailed I Sapporo area, Hokkaido, Japan. **Food Control**, v, 18, n. 9, p. 1113-1120, 2007.

SANTOS, L.R.; NASCIMENTO, V.P. ; OLIVEIRA S.D. ; FLORES, M.L. ; PONTES, A.P. ; PILOTTO, F. ; NEVES, N. ; SALLE, C.T.P. ; LOPES R.F.F. Identificação de *Salmonella* através da reação em cadeia pela polimerase (PCR). **Arquivos da Faculdade de Veterinária.**, v. 29, p. 87-92, 2001.

SCARCELLI, E.; PIATTI, R.M.; HARAKAVA, R.; MIYASHIRO, S.; CAMPOS FERNANDES, F. M; CAMPOS, F. R.; FRANCISCO, W.; GENOVEZ, M. E.; RICHTZENHAIN, L. J. Molecular subtyping of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* strains isolated from different animal species in the state of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.36, n.4, p.378-382, 2005.

SCHERER, K.; BARTELT, E.; SOMMERFELD, C.; HILDEBRANT, G. Quantification of *Campylobacter* on surface and in the muscle of chicken legs at retail. **Journal of Food Production**, v.79, n.4, p. 757-761, 2006.

SHANE, S. M.; STERN, N. J. *Campylobacter* Infection. In.:SAIF, Y. M. **Diseases of poultry**. 11th .ed. Ames: Iowa State Press. Cap.17, p.615-625, 2003.

STERN, N. J.; ROTHENBERG, P. J.; STONE J.M. Enumeration and reduction of *Campylobacter jejuni* in poultry and red meats. **Journal of Food Protection**, v. 48, p. 606- 610, 1985.

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

SKIRROW, M. B. Epidemiology of *Campylobacter enteritidis*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 12, p. 9-16, 1991.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. *Campylobacter*, Cap. 15. In: **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**, 3ª ed., Varela, 2007.

SIQUEIRA JÚNIOR, J.F.; RÔÇAS, I.N. A 16S rDNA-based nested PCR protocol to detect *Campylobacter gracilis* in oral infections, **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v.17, n.2. São Paulo, 2003.

SMIBERT, R. M. The genus *Campylobacter*. **Annual Review of Microbiology**, v. 32, p. 673-709, 1978.

SMITH, J. L. *Campylobacter jejuni* infection during pregnancy: long-term consequences of associated bacteremia Guillain-Barré syndrome, and reactive arthritis. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 65, n. 4, p. 696-708, 2002.

STEINHAUSEROVA, I.; FOJTIKOVA, K. Serotyping and identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains of human and animal origin using PCR method. **Acta Veterinary BRNO**, Kobenhavn, v.68, p.149-154, 1999.

STEINHAUSEROVA, I.; CESCOVA, J.; FOJTIKOVA, K.; OBROVSKA, I. Identification of thermophilic *Campylobacter* spp. by phenotypic and molecular methods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p.470–475, 2001.

SUZUKI, H.; YAMAMOTO, S. *Campylobacter* contamination in retail poultry meats and by-products in the world: a literature survey. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 71, n.3, p. 255-261, 2009.

TAREMI, M.; DALLAL, M.S.; GACHKAR, L.; MOEZARDALAN, S.; ZOLFAGHARIAN, K.; ZALI, M.R. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolated from retail raw chicken and beef meat, Tahrán, Iran. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, n. 3, p. 401-403, 2006.

TOSIN, I.; MACHADO, R.A. Occurrence of *Campylobacter* spp among food handlers in hospital kitchens in urban areas of the southern region of Brazil. **Revista da Saúde Pública**, São Paulo, v.29, p.472-477, 1995.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTEZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**, 3ª Ed., Atheneu, p.29-31, 2002.

VANDAMME, P.; DE LEY, J. Proposal for a new family, *Campylobacteriaceae*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 41, p. 451-455, 1991.

VANDAMME, P. Taxonomic of the family *Campylobacteriaceae*. In: NACHAMKIN, I.; BASER, M.J., eds. p. 3-27. **Campylobacter**. Washington: ASM Press, 2000.

VINDIGNI, S.M.; SRIJAN, A.; WONGSTITWILAIROONG, B.; MARCUS, R.; MEEK, J.; RILEY, P.L.; MASON, C. Prevalence of foodborne microorganisms in retail foods in Thailand. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.4, n.2, p. 208-215, 2007.

VOGT, R.L.; SOURS, H.E.; BARRETT, T.; FELDMAN, R.A.; DICKINSON, R.J.; WITHERELL, L. *Campylobacter enteritis* associated with contaminated water. **Annals of Internal Medicine**, v. 96, p.292-296, 1982.

UBABEF, União Brasileira de Avicultura. **Relatório Anual – 2014**. Produção e Exportação Brasileira de Carne de Frango em 2013. 16p. Disponível em: <http://www.ubabef.com.br/files/publicacoes/8ca705e70f0cb110ae3aed67d29c8842.pdf>. Acesso em: 26 mar. 2014.

WANG, W.L., LUECHTEFELD, N.W., BLASER, M.J. AND RELLER, L.B. Comparison of Campy Pak II with standard 5 % oxygen and candle jar growth of *Campylobacter jejuni* from human faeces. **Journal of Clinical Microbiology**, v.16, p. 291-294, 1982.

WINGSTRAND, A. *et al.* Fresh chicken as a main risk factor for *Campylobacteriosis*, Denmark. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 12, n 2, p. 280-284, 2006.

WOLFFS, P.; NORLING, B.; HOORFAR, J.; GRIFFITHS, M.; RADSTRO, P. Quantification of *Campylobacter* spp. in Chicken Rinse Samples by Using Flotation prior to Real-Time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 10, p. 5759–5764, 2005.

WONG, T.L; HOLLIS, L.; CORNELIUS, A.; NICOL, C.; COOK, R.; HUDSON, J.A. Prevalence, numbers, and subtypes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in uncooked retail meat samples. *Journal of Food Protection*, v.70, n.3, p.566-573, 2007.

WOO, P. C.; LEUNG, K. W.; TSOI, H. W.; WONG, S. S.; TENG, J. L.; YUEN, K. Y. Thermotolerant *Campylobacter fetus* bacteraemia identified by 16S ribosomal RNA gene sequencing: an emerging pathogen in immunocompromised patients. **Journal of Medical Microbiology**, London, v.51, p.740-746, 2002.

YANG, C.; JIANG, Y.;HUANG K.; ZHU, C.; YIN, Y. Application of real-time PCR for quantitative detection of *Campylobacter jejuni* in poultry, milk and environmental water, **FEMS Immunology and Medical Microbiology** v. 38, p. 265-271, 2003.

ARTIGO 1

EVALUATION OF THE DIRECT AND ENRICHMENT ISO 10272 METHODS FOR THE DETECTION OF *Campylobacter* spp. IN CHICKEN CARCASSES

ABSTRACT: In 2006, the International Organization for Standardization (ISO) published two standard protocols for the detection and enumeration of *Campylobacter* spp. in foods: the ISO 10272-2 (direct method) and the ISO 10272-1 (enrichment method). The aim of this study was to compare the efficiency of these two methods in the detection of *Campylobacter* spp. and propose a modification in the enrichment method. Compared to the enrichment method, the direct method had a higher number of positive results for *Campylobacter* spp. and, consequently, a higher sensitivity percentage. The isolation of *Campylobacter* spp. was more difficult when 10 mL of rinse was used in the enrichment method, which is currently recommended by the ISO protocol. Therefore, different rinse volumes were tested (2.5 and 5 mL). The most efficient recovery of *Campylobacter* spp. occurred when 2.5 mL of rinse were used in the enrichment method, most likely due to a lower number of microbial contaminants than that present in the 5 or 10 mL rinses. The proposed modification of the enrichment method will contribute to the food analysis by improving the detection of *Campylobacter* spp. in chicken carcass.

Keywords: *Campylobacter* spp., detection, ISO 10272, refrigerated chicken carcass

1. Introduction

Campylobacter spp. is a common cause of bacterial food-borne illness that has been associated with autoimmune diseases including Guillain-Barre syndrome (GBS), Miller Fisher syndrome, arthritis and Reiter's syndrome (OLIVEIRA; BARBUT and GRIFFITHS, 2005; Snelling *et al.*, 2005). Poultry and poultry products are considered the main vehicle of transmission to humans (JACOBS-REITSMA *et al.*, 2008; CASARIL 2010).

The control of *Campylobacter jejuni* contamination in poultry carcasses has been increased as a demand of international trade (SCARCELLI *et al.*, 2005; HUMPHREY; O'BRIEN and MADSEN, 2007). Brazil is the largest exporter and Parana state the largest producer of poultry meat in the country (IBGE 2013). The prevalence of *Campylobacter* contamination in poultry carcasses in Brazil ranges from 38 to 93.3% (DIAS *et al.*, 1990; AQUINO *et al.*, 2002; FRANCHIN, OGLIARI and BATISTA, 2007; MAZIERO and OLIVEIRA, 2010).

False-negative results have been obtained during the detection of *Campylobacter* spp. in poultry meat due to their nutritional and environmental requirements and to their difficulty in outcompeting bacteria present in the product (EDSON; EMPSON and MASSEY, 2009). Therefore, the use of adequate enrichment broths, selective media and conditions that allow the consistent growth of *Campylobacter* spp. are important for their isolation from poultry meat (HABIB; UYTENDAELE and ZUTTER, 2011).

In 2006, the International Organization for Standardization (ISO) published the ISO 10272 protocols for the detection and enumeration of *Campylobacter* spp. in foods destined for human and animal consumption. Part 1 of the protocol (ISO 10272-1) describes the detection of *Campylobacter* spp. after selective enrichment of poultry carcass rinse (enrichment method) and Part 2 (ISO 10272-2) describes the detection and colony count of *Campylobacter* spp. before selective enrichment (direct method).

The aim of this study was to compare the ISO 10272-2 (direct method) and ISO 10272-1 (enrichment method) protocols for the detection of *Campylobacter* spp. in poultry carcasses. Modification of the enrichment method was suggested for a better isolation of *Campylobacter* spp. in chicken carcass.

2. Materials and Methods

2.1 Sample collection

A total of 80 samples of refrigerated whole broiler carcass from 12 brands were analyzed, 5 to 8 samples per brand. The samples were collected in their original packaging from different retailers of Curitiba, Paraná, and sent to the laboratory under refrigeration. After the removal of the packing and the giblets, the samples were placed in sterile plastic bags and weighed. One mL of buffered peptone water (0.1%) was added per gram of sample, and the surface of the carcass was hand massaged for approximately two minutes. Aliquots of rinse were used for the detection of *Campylobacter* spp. before (direct method) and after (enrichment method) selective enrichment (ANNEX 1).

2.2 ISO 10272-2 (Direct Method): Detection and Colony Count of *Campylobacter* spp. before Selective Enrichment

Aliquots of rinse (0.1 mL), prepared as previously described, were streaked in duplicate on mCCDA plates (CM 739) (Oxoid Inc., Ogdensburg, N.Y., U.S.A.), which were supplemented with cefoperazone (16 mg/ L) and amphotericin B (5 mg/ L) (SR 155E) (Oxoid Inc., Ogdensburg, N.Y., U.S.A.), and on modified Bolton agar (MBA) plates. The plates were incubated at 41.5 ± 0.5 °C for 48 h in microaerobic conditions generated by the injection of a mixture of gases (5% O₂, 10% CO₂ and 85% N₂) (Air Liquide, São Paulo, Brazil) into special jars. The MBA plates and the microaerobic system were prepared as described by Franchin, Aidoo and Batista (2005).

In each plate, five characteristic colonies were observed under the microscope and evaluated in accordance to their characteristic morphology. The colonies with the characteristic morphology were sub-cultured on Trypticase Soy Agar (TSA) plates, which were supplemented with 5% defibrinated sheep blood (Newprov, Curitiba, Paraná, Brazil), and incubated at 36 ± 1 °C for 24 and 48 h in microaerophilic conditions. Subsequently, oxidase and catalase tests were carried out; if these tests were positive, a biochemical identification test was carried out using the API Campy® system (Biomérieux S.A., Lyon, France). The molecular confirmation of *Campylobacter* genus were done by real-time PCR. The quantification was

performed using the equation $Q = n \times 2.5$, where n corresponded to the total number of colonies that were biochemically identified. The results were expressed as CFU/g.

2.3 ISO 10272-1 (Enrichment Method): Detection of *Campylobacter* spp. after Selective Enrichment

In 80 whole broiler carcass samples, aliquots of 10 mL of rinse were transferred to 90 mL of Bolton broth, which was supplemented with cefoperazone (10 mg/ L), vancomycin (10 mg/ L), trimethoprim (10 mg/ L) and amphotericin B (5 mg/ L) (SR 208E) (Oxoid Inc., Ogdensburg, N.Y., U.S.A.). The enrichment broths were incubated at 37 °C for 4 h followed by an additional incubation at 41.5 ± 0.5 °C for 48 h in microaerobic conditions. The enrichment broths were plated onto mCCDA agar and MBA agar plates that were incubated at 41.5 ± 0.5 °C for 48 h in microaerobic conditions. The biochemical identification of *Campylobacter* spp. colonies was performed as described in the ISO 10272-2 protocol (2006).

2.4 ISO 10272-1 (Enrichment Method): Evaluation of different volumes of rinse for detection of *Campylobacter* spp. after Selective Enrichment

In 18 whole broiler carcass samples, the detection of *Campylobacter* spp. by the enrichment method was carried out using different volumes of rinse (2.5, 5.0 and 10.0 mL) added to 90 mL of Bolton broth, as previously described. The selective enrichment, the biochemical identification and the molecular confirmation of *Campylobacter* were performed as described in section 2.3 and 2.5.

2.5 Molecular identification of *Campylobacter* spp. by real-time PCR

The molecular identification was confirmed by using TaqMan® real-time PCR. Bacterial DNA extraction was performed using the NewGene Prep and NewGene Preamp from Simbios Technology (Canoas, Rio Grande do Sul, Brazil). The PCR mixture consisted of a final volume of approximately 30 µL: 28 µL of TaqMan Master Mix Kit (Simbios Technology), 0.32 µL of Taq polymerase (Simbios Technology) and 2 µL of DNA.

The PCR reactions were carried out in a Thermocycler 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.) with the following conditions: an initial denaturation step at 95 °C for 3 min, followed by 40 cycles at 95 °C for 15 s, 65 °C for 30 s and 60 °C for 1 min.

Purified DNA from *Campylobacter jejuni* ATCC 33291 was used as a positive control. Ultrapure water and buffered Master Mix Kit with Taq polymerase were used as negative controls.

2.6 Analyses of the results

The prevalence of *Campylobacter* spp. in the chicken meat samples was expressed as percentage. The sensitivity and specificity of the two methods were calculated according to the model described by Hanrahan and Madupu (1994). The sensitivity and specificity percentages were calculated considering as samples positive for *Campylobacter* those in which the result for the culture was confirmed by real-time PCR. Analyses of accuracy and correlation were carried out using an Excel spreadsheet (Microsoft), according to models described by Jekel, Elmore and Katz (1999).

3. Results

The prevalence of *Campylobacter* spp. was 41.2% (n= 33). *C. jejuni*, *C. lari*, *C. upsaliensis* and *C. coli* were identified in 33.7% (n= 27), 3.75% (n= 3), 2.5% (n= 2), and 1.2% (n= 1), respectively, of the samples.

In the 80 chicken carcass samples analyzed, the comparative results of the direct method (ISO 10272-2: 2006) and the enrichment method (ISO 10272-1: 2006) as confirmed by real-time PCR, are shown in Table 1. Twenty samples were positive only by the direct method, five were positive only by the enrichment method and eight samples were positive by both methods. The sensitivity of the direct and enrichment methods was 84.8% and 39.4%, respectively. The specificity was 100% for both methods.

The overall correlation between the direct and enrichment methods was 64.5%. Therefore, there was little agreement in the results between the ISO 10272-1 and ISO 10272-2 methods.

TABLE 1 - Comparative analysis of the direct and enrichment methods for the detection of *Campylobacter* spp. in 80 chicken meat samples as confirmed by real-time PCR.

	Number of positive samples obtained exclusively by one method	Number of positive samples obtained by both methods	Sensitivity (%) ¹	Specificity (%) ²
Direct Method	20		84.8	100
Enrichment Method	5	8	39.4	100

¹ Sensitivity = (true positive results / true positive results+ false negative results) x 100

² Specificity = (true negative results / true negative results + false positive results) x 100

The results obtained from the 18 chicken meat samples, in which the enrichment was carried out with different rinse volumes, are shown in Table 2. The prevalence of the 18 samples was 38.9% (n=7). Six (33.3%) samples tested positive by the direct method. The number of positive samples with rinse volumes of 2.5, 5, 10 mL were five (27.8%), four (22.2%) and one (5.5%), respectively. Two samples were positive only by the direct method and one sample was positive by the enrichment method with 2.5 mL of rinse. The sensitivity of the direct method was 85.7%, and that of the enrichment method with rinse volumes of 2.5, 5 and 10 mL was 71.4%, 57.1% and 14.3%, respectively. The specificities of the direct method and the enrichment method with different rinse volumes were 100%.

The results of the seven samples that tested positive to *Campylobacter* from 18 samples analyzed with different volumes of rinse (2.5, 5 and 10 mL) are showed in Table 3. *Campylobacter* was isolated in the direct method in six from seven positive samples. The better recovery of *Campylobacter* after enrichment was observed with 2.5 mL of rinse. The correlation percentage between the direct method and the enrichment method with 2.5 mL of rinse was 83.3%. In sample 13 (brand E), *Campylobacter* spp. was isolated only after enrichment, possibly due to the small number of viable cells present in the sample. In the brand D samples, *Campylobacter* spp. was not isolated after enrichment regardless of the rinse volume used, possibly due to the high microbial contamination in the chicken carcass samples.

Table 2 - Comparative analyses of the direct and enrichment methods using different rinse volumes (2.5, 5 and 10 mL) for the detection of *Campylobacter* spp. in 18 chicken meat samples as confirmed by real-time PCR

	Direct Method	Enrichment Method		
		Rinse volumes		
		2.5 mL	5 mL	10 mL
Number of positive samples	6 (33.3%)	5 (27.8%)	4 (22.2%)	1 (5.5%)
Number of positive samples obtained exclusively by one method	2	1	0	0
Sensitivity (%) ¹	85.7	71.4	57.1	14.3
Specificity (%) ²	100	100	100	100
Prevalence (%) ³		38.9 (n=7)		

¹ Sensitivity = (true positive results / true positive results+ false negative results) x 100

² Specificity = (true negative results / true negative results + false positive results) x 100

³ Prevalence = (true positive samples x 100) / total number of samples

Table 3 - Results of the seven samples that tested positive to *Campylobacter* from 18 samples analyzed using different rinse volumes (2.5, 5 and 10 mL).

Samples	Brands	Direct Method	Enrichment Method		
			Rinse volumes		
			2.5 mL	5 mL	10 mL
7	C	+	+	-	-
9	C	+	+	+	-
10	D	+	-	-	-
12	D	+	-	-	-
13	E	-	+	+	-
14	E	+	+	+	+
15	E	+	+	+	-

4. Discussion

Compared to the enrichment method, the direct method had a higher number of positive results for *Campylobacter* spp. and a higher sensitivity percentage. Similar results were obtained by Kiess, Parker and McDaniel (2010) who obtained a higher isolation of *Campylobacter* spp. in broiler chicken litter using the direct method. On the other hand, Kuana *et al.* (2008) found no statistically significant difference ($p > 0.05$) between the direct and enrichment methods in cloacae swabs and poultry carcasses.

The results obtained in the present study with the direct method suggest that refrigeration does not affect the recovery of *Campylobacter* spp. Maziero and Oliveira (2010) found no significant difference in the prevalence of *C. jejuni* in chicken meat whether fresh, chilled or frozen, indicating that this bacterium is able to survive low temperature storage conditions.

Although the direct method was more efficient than the enrichment method, colony counting was difficult to perform on the mCCDA and MBA plates. Hunt, Abeyta and Trant (2001) reported that selective media with high water content, such as those used for the isolation of *Campylobacter* spp., can result in colonies that tend to coalesce, making it very difficult to count. Problems with colony counting by the direct method were also observed by Habib *et al.* (2008), after the incubation of 0.3 and 0.4 mL of chicken meat rinse, and the difficulty in counting *Campylobacter* spp. colonies was related to the sample contamination with aerobic mesophilic bacteria (10^5 CFU/g) and *Escherichia coli* (10^3 CFU/g). In the same study, the difficulty in colony counting was observed even when 0.1 mL of chicken meat rinse was used.

Despite the efficiency of the direct method, the exclusive use of this method might compromise the accuracy of the results. The enrichment method detected five samples that were contaminated with *Campylobacter* spp. However, the direct method did not detect the presence of *Campylobacter* spp. in these samples, possibly because contamination was low and it required enrichment (Table 3). However, two samples were detected by the direct method and were not detected by the enrichment method at any volume rinse.

Several authors have obtained a higher detection of *Campylobacter* spp. by the enrichment method and concluded that the number of *Campylobacter* spp. colonies in certain samples was not sufficient for the detection by the direct method and that the enrichment of the samples contributed to an increase in the percentage

of isolation GHARST; HANSON and KATARIOU, 2006; NAUTA *et al.*, 2009; HABIB *et al.*, 2011.

Jacobs-Reitsma *et al.* (2007a), who reviewed the ISO 10272 protocol, found that the enrichment method was unsuitable for the isolation of *Campylobacter* spp. from refrigerated chicken meat, and suggested that a culture medium other than mCCDA should be used. In the present study, *Campylobacter* was not isolated after enrichment in two samples positive in the direct method regardless of the rinse volume used. This have happened possibly due to the inefficacy of antibiotics present in the enrichment broth (JACOBS-REITSMA *et al.*, 2007b) and the inability of *Campylobacter* spp. to outcompete the present microbial contamination (LEE and NEWELL, 2006).

Kiess *et al.* (2010) found no increase in the percentage of *Campylobacter* spp. after enrichment in *Campylobacter Enrichment Broth* (CEB) and suggested that a better recovery could have been obtained if the Preston broth, previously used by Bolton and Robertson (1982), had been used. However, an even better recovery could have been obtained by modifying the proportion between rinse and enrichment broth, e.g. 1:10 that have been already used by Kuana *et al.*, (2008) and Nauta *et al.*, (2009) instead of 1:4, used by Kiess *et al.* (2010).

The highest number of positive samples with the enrichment method using 2.5 mL of rinse obtained in the present study suggests that the rinse volume described in the ISO 10272-2 protocol should be modified. In spite of the similar number of positive samples obtained with the direct and the enrichment method using the 2.5 mL rinse, the use of only one method is not recommended because the correlation percentage of 83.3% is not ideal.

It is recognized that only a limited number of samples (18 samples) were analyzed in this study to test different volumes of rinse for the selective enrichment. The results, however, showed that the volume of 10 mL rinse used in ISO 10272-1 (method enrichment) could difficult the detection of *Campylobacter* spp. and that the use of a smaller volumes of rinse (2.5 mL) could provide better recovery of *Campylobacter* after selective enrichment.

5. Conclusion

The direct method (ISO 10272-2) was more efficient than the enrichment method (ISO 10272-1) for the detection of *Campylobacter* spp. The use of the 10 mL

rinse in the enrichment method, as proposed in the ISO 10272-1 protocol, was less efficient in the recovery of *Campylobacter* spp. than the use of the 2.5 mL rinse. The use of a smaller volume of rinse may be a better option due to inefficiency of antibiotics to inhibit microbial contaminants and to the low competitiveness of *Campylobacter* spp., especially when present in low counts. The correlation percentage of 83.3% between the direct method and the enrichment method with 2.5 mL of rinse indicated that the exclusive use of the direct method might compromise the accuracy of the results.

Acknowledgements

This study was carried out in part at Federal University of Paraná, and it was funded by the Central Laboratory of Parana State, Catholic University of Parana and Londrina State University. We are grateful to the Brazil Foods S.A., Videira Unit, Santa Catarina for the expert technical assistance in real-time PCR, and to Simbios Technology for providing reagents for real-time PCR.

References

- AQUINO, M.H.C.; PACHECO, A.P.; FERREIRA, M.C.; TIBANA, A. Frequency of isolation and identification of thermophilic *Campylobacter* from animals in Brazil. **The Veterinary Journal**; v. 164, p.159-161, 2002.
- BOLTON, F.J.; ROBERTSON, B. A selective medium for isolating *Campylobacter jejuni/ coli*. **Journal of Clinical Pathology**, v.35, p. 462-467, 1982.
- CASARIL, K.B.P.B. Standardization of traditional PCR and Real Time for the detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in foods [Doctoral Thesis] Department of Food Science and Technology, Center for Agricultural Sciences, State University of Londrina, Londrina - PR/ Brazil; 2010.
- DIAS, T.C.; QUEIROZ, D.M.M.; MENDES, E.N.; PERES, J.N. Chicken carcasses as a source of *Campylobacter jejuni* in Belo Horizonte, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 32, p.414-418, 1990.
- EDSON, D.C.; EMPSON, S.; MASSEY, L.D. Pathogen detection in food microbiology laboratories: an analysis of qualitative proficiency test data, 1999 and 2007. **Journal of Food Safety**, v. 29, p. 521-530, 2009.
- FRANCHIN, P.R.; AIDOO, K.E.; BATISTA, C.R.V. Sources of poultry meat contamination with thermophilic *Campylobacter* before slaughter. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 36, v.157- 162, 2005.

FRANCHIN, P.R.; OGLIARI, P.J.; BATISTA, C.R. Frequency of thermophilic *Campylobacter* in broiler chickens during industrial processing in Southern Brazil slaughterhouse. **British Poultry Science**, v. 48, p.127-132, 2007.

GHARST, G.; HANSON, D.; KATHARIOU, S. Effect of direct culture versus selective enrichment on the isolation of thermophilic *Campylobacter* from feces of mature cattle at harvest. **Journal of Food Protection**, v. 69, p. 1024-1027, 2006.

HABIB, I.; SAMPERS, I.; UYTTENDAELE, M.; BERKVEN, D.; ZUTTER, L.D. Performance characteristics and estimation of measurement uncertainty of three plating procedures for *Campylobacter* enumeration in chicken meat. **Food Microbiology**, v. 25, p.65-74, 2008.

HABIB, I.; UYTTENDAELE, M.; ZUTTER, L.D. Evaluation of ISO 10272:2006 standard versus alternative enrichment and plating combinations for enumeration and detection of *Campylobacter* in chicken meat. **Food Microbiology**, v. 28 p. 1117-1123, 2011.

HANRAHAN, E.J.; MADUPU, D.G. **Appleton and Lange's review of epidemiology and biostatistics for the USMLE**. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall, 1994.

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

HUNT, J.M.; ABEYTA, C.; TRANT, T. *Campylobacter* In: Bacteriological manual online. 8.ed. Washington, Center for Food Safety and Applied Nutrition, FDA; 2001.

IBGE - Brazilian Institute of Geography and Statistics. 2013. Estatística da produção pecuária [Internet]. Available from: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201302_publ_completa.pdf. Accessed may 2014.

International Organization for Standardization (ISO). ISO 10272 Microbiology of Food and Animal Feeding Stuff - Horizontal Method for Detection and Enumeration of *Campylobacter* spp. - Part 1: Enrichment Method; Part 2: Enumeration Method. ISO, Geneva, Switzerland; 2006.

JACOBS-REITSMA, W.F.; OVERBEEK, W.V.; DIJK, S.O.V.; AARTS, H.J. Implementation of ISO 10272:2006 for detection and enumeration of *Campylobacter* in foods. **Zoonoses Public Health**, v. 54 (Suppl. 1), p. 49, 2007a.

JACOBS-REITSMA, W.F.; LYHS, U.; WAGENAAR, J. *Campylobacter*. In: Nachamkin; C.M.M. Szymanski, M.J. Blaser, *Campylobacter* in the food supply (3rd ed.), Washington DC: ASM Press, p. 627-644, 2007b.

JEKEL, J.F.; ELMORE, J.G.; KATZ, D.L. Epidemiology and Biostatistics and Preventive Medicine. Artmed, Porto Alegre – RS/ Brazil, 1999.

KIESS, A.S.; PARKER, H.M.; MCDANIEL, C.D. Evaluation of different selective media and culture techniques for the quantification of *Campylobacter* spp. from broiler litter. **Poultry Science**, v. 89, p.1755-1762, 2010.

KUANA, S.L.; SANTOS, L.R.; RODRIGUES, L.B.; BORSOI, A.; MORAES, H.L.; SALLE, C.T.; NASCIMENTO, V.P. Occurrence and characterization of *Campylobacter* in the Brazilian production and processing of broilers. **Avian Disease**, v. 9, p. 480-486, 2008.

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

MAZIERO, M.T.; OLIVEIRA, T.C.R.M. Effect of refrigeration and frozen storage on the *Campylobacter jejuni* recovery from naturally contaminated broilerskins. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 501-505, 2010.

NAUTA, M.J.; VAN DER WAL, F.J.; PUTIRULAN, F.F.; POST, J.; VAN DE KASSTEELE, J.; BOLDER, N.M. Evaluation of the "testing and scheduling" strategy for control of *Campylobacter* in broiler meat in the Netherlands. **International Journal of Food Microbiology**, v. 134, p. 216-222, 2009.

OLIVEIRA, T.C.R.M.; BARBUT, S.; GRIFFITHS, M.W. A robotic DNA purification protocol and real-time PCR for the detection of *Campylobacter jejuni* in foods. **Journal Food Protection**, v. 68, p. 2131-2135, 2005.

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

SNELLING, W.J.; MATSUDAC, M.; MOOREC, J.E.; DOOLEY, J.S.G. Under the microscope: *Campylobacter jejuni*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 41, p. 297-302, 2005.

ARTIGO 2

AVALIAÇÃO DE QUATRO MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA PARA QUANTIFICAÇÃO DE *Campylobacter* spp. EM CARÇAÇAS DE FRANGO POR PCR EM TEMPO REAL

RESUMO: A campilobacteriose está geralmente associada ao consumo de carne de frango. As avaliações de risco requerem dados quantitativos e *Campylobacter* spp. são frequentemente enumerados por contagem do número de unidades formadoras de colônias, que permite a identificação de bactérias viáveis e cultiváveis, e necessita de ao menos 5 dias para um resultado positivo. Métodos baseados na detecção e quantificação de DNA como a reação em cadeia polimerase (PCR) podem ser mais rápidos, sensível e mais específico. O objetivo do presente estudo foi comparar o desempenho de quatro métodos de extração de DNA para a quantificação de *Campylobacter* spp. a partir da enxaguadura da carcaça de frango por PCR em Tempo Real. A curva de calibração da PCR em Tempo Real otimizada determinou um coeficiente de correlação de 0,9905, com limite de detecção de $1,5 \times 10^3$ UFC/g e a faixa linear de amplificação de $1,5 \times 10^3$ a $2,0 \times 10^7$ UFC/g. Os métodos Hong *et al.* (2007) e *kit* Simbios apresentaram resultados mais satisfatórios quando comparados com os métodos de Ronner e Lindmark (2007) e EasyMag® para a quantificação de *Campylobacter* spp. em carcaça de frango. Na avaliação direta da enxaguadura da carcaça de frango o método de PCR em Tempo Real otimizada não foi adequado para quantificação de *Campylobacter* spp. tendo em vista, o limite de detecção de $1,5 \times 10^3$ UFC/g. O presente trabalho indica a necessidade do enriquecimento prévio das amostras a PCR em Tempo Real, para assegurar que a concentração de *Campylobacter* sempre alcance o limite de detecção do ensaio.

Palavras-chave: *Campylobacter*, Quantificação, Carcaça de frango, PCR em Tempo Real, Métodos de extração de DNA.

1. Introdução

O gênero *Campylobacter*, particularmente as espécies termofílicas, têm sido reconhecido mundialmente como um dos principais patógenos de origem alimentar (DORREL e WREN, 2007). A detecção de *Campylobacter* spp. pelos métodos de cultura é demorada e laboriosa. *Campylobacter* spp. possuem exigências nutricionais e ambientais, e necessitam de condições e procedimentos especiais para a sua detecção e quantificação em amostras alimentares (SOLOMON e HOOVER, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2005). Os métodos adotados para detectar *Campylobacter* spp. em alimentos utilizam uma etapa de enriquecimento para aumentar o número de células, no entanto, a quantificação deste patógeno é realizada diretamente na enxaguadura de frango (NOGVA *et al.*, 2000; YANG *et al.*, 2003; JOSEFSEN *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2005; DEBRETSON *et al.*, 2007).

Os métodos moleculares para detecção e quantificação de *Campylobacter* spp. em alimentos parecem ser uma alternativa válida para substituir os tradicionais métodos microbiológicos, porque apresentam a vantagem de detecção e quantificação de células bacterianas viáveis mas não cultiváveis. Uma das técnicas mais promissoras é a reação em cadeia da polimerase (PCR), e o desafio é realizar a PCR sem enriquecimento ou cultura anterior para quantificar *Campylobacter* diretamente nos alimentos (ON e JORDAN, 2003; FITZGERALD *et al.*, 2008).

Alternativas para melhorar a sensibilidade da PCR em Tempo Real envolvem alterações na etapa de extração e purificação do DNA (SPANIOLAS *et al.*, 2008). Vários métodos para a recuperação do DNA de *Campylobacter* foram avaliados, envolvendo o uso de detergentes, enzimas proteolíticas, lisozima, ruptura mecânica, mudanças de temperatura, isoladamente ou em várias combinações, além do uso de *kits* disponíveis comercialmente, concentração do DNA e o emprego de etapas de filtração da enxaguadura (YANG *et al.*, 2003; HONG *et al.*, 2007; RONNER e LINDMARK, 2007; BOTTELDORN *et al.*, 2008).

O presente estudo teve por objetivo comparar o desempenho de quatro métodos de extração de DNA para a quantificação de *Campylobacter* spp. a partir da enxaguadura da carcaça de frango por PCR em Tempo Real.

2. Materiais e Métodos

2.1 Amostragem

Um total de 75 amostras de carcaças de frango resfriadas produzidas no Estado do Paraná foram coletadas na sua embalagem original em diferentes estabelecimentos comerciais da cidade de Curitiba, Paraná. As amostras foram representativas de 10 marcas diferentes, sendo que em 5 marcas foram coletadas 10 amostras, e nas 5 marcas restantes foram coletadas 5 unidades amostrais cada. Amostras de algumas marcas foram coletadas mais de uma vez. Após a coleta, as amostras foram encaminhadas sob refrigeração ao laboratório e analisadas ao seu recebimento.

Após a retirada asséptica da embalagem original, dos miúdos, dos pés e da cabeça, as carcaças foram pesadas e colocadas em sacos plásticos esterelizados. O enxágue das carcaças foi realizado com adição de água peptonada tamponada a 0,1% (Oxoid, Inglaterra) na proporção de 1 mL para cada grama de peso da carcaça com fricção de toda a superfície do frango, por aproximadamente dois minutos. Alíquotas da enxaguadura foram utilizadas para detecção e enumeração de *Campylobacter* spp. por cultura, e por PCR em Tempo Real (ANEXO 2).

2.2 Método direto

O método direto, também denominado método de contagem direta, seguiu a metodologia ISO 10272-2: 2006. Alíquotas de 0,4 e 0,1mL da enxaguadura foram inoculadas em duplicata em placas de Ágar mCCDA (Ágar carvão cefoperazona desoxicolato modificado) (CM 739) (Oxoid, Inglaterra), suplementado com cefoperazone (16.0mg/ L) e anfotericina B (5.0mg/ / L) (SR 155E) (Oxoid, Inglaterra) e Ágar Bolton modificado preparado conforme o descrito por Franchin, Aidoo e Batista (2005). As placas foram incubadas a 37°C durante 4 horas e posterior incubação a 41,5 ± 0,5°C por 48 horas, em microaerofilia, obtida em jarras por injeção de uma mistura gasosa, contendo 5% O₂, 10% CO₂ e 85% N₂ (Air liquide, Brasil) durante 20 segundos.

As células foram avaliadas por preparações a fresco, coradas com solução de azul de metileno 1% (Laborclin, Brasil) e por coloração de gram (Laborclin, Brasil). As colônias com morfologia característica de *Campylobacter* foram reisoladas em Ágar Trypticase de Soja (TSA) suplementado com 5% de sangue de carneiro

desfibrinado (Newprov, Brasil), incubado a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 e 48 horas sob microaerofilia.

A identificação das colônias com morfologia característica foi realizada por provas bioquímicas: catalase, oxidase, hidrólise hipurato, indoxil acetato, e avaliação da sensibilidade ao ácido nalidíxico e à cefalotina (Oxoid, Inglaterra). Em adição as provas bioquímicas convencionais foi realizada a identificação pelo sistema API Campy® (Biomerieux, França) de acordo com as instruções do fabricante.

A contagem de colônias foi realizada considerando o volume da enxaguadura empregado, de acordo com as seguintes equações: $Q = n \times 2,5$, quando utilizado a alíquota de 0,4mL e $Q = n \times 10$, quando empregado a alíquota de 0,1mL. O n correspondeu ao número total de colônias características presentes na placa com confirmação bioquímica. O resultado foi expresso em UFC/g.

2.3 qPCR em Tempo Real

As quantificações de *Campylobacter* nas carcaças de frango por PCR (qPCR) em Tempo Real foram realizadas utilizando o método TaqMan, para detecção específica e quantificação de espécies de *Campylobacter* termotolerantes de origem alimentar, baseada na amplificação de uma sequência de 287pb do gene 16S rRNA, como descrito previamente por Josefsen *et al.* (2004) e Josefsen *et al.* (2010).

A reação consistiu em um volume final de 25 μL , contendo 12,5 μL de Taqman Universal PCR Master Mix® (Applied Biosystems, EUA), 0,44 μM do *primer forward* 5' CTG CTT AAC ACA AGT TGA GTA GG 3', 0,48 μM do *primer reverse* 5' TTC CTT AGG TAC CGT CAG AA 3' (Ludwig, Brasil), 100nM da sonda Taqman para *Campylobacter* 5'[6FAM] CA[+T] CC[+T] CCA CGC GGC G[+T]T GC [BHQ1] 3' (Biosearch Technologies, EUA), controle de amplificação interno - Taqman Exogenous Internal Positive Control Reagents® (Applied Biosystems, EUA) (utilizado de acordo com recomendações do fabricante) e 5 μL de DNA. As condições de reação foram: aquecimento a 50 $^\circ\text{C}$ por 2 minutos, e 95 $^\circ\text{C}$ durante 3 minutos, 40 repetições de 95 $^\circ\text{C}$ por 15 segundos, 50 $^\circ\text{C}$ por 30 segundos e 60 $^\circ\text{C}$ por 1 minuto.

Em todas as reações de PCR, três concentrações diferentes de DNA de *Campylobacter* extraído e purificado conforme item 2.4 foram utilizadas como controle positivo, e como controle negativo água ultrapura.

As leituras da fluorescência foram realizadas pelo equipamento 7300 Real-Time PCR (Applied Biosystems) a cada ciclo de amplificação e, posteriormente, analisados pelo Sequence Detection Software (SDS) v1.3 (Applied Biosystems).

A divisão por 10 das contagens (UFC/g) obtidas pelo software do equipamento de PCR em Tempo Real foi necessária, porque a enxaguadura das carcaças de frango passaram por etapa inicial de concentração, como descrito no item 2.5.

2.4 Limite de detecção e Curva de calibração para qPCR em Tempo Real

A curva de calibração foi preparada com *Campylobacter jejuni* ATCC 33291 cultivado em caldo de Bolton (Oxoid, Inglaterra) suplementado com cefoperazone (10.0mg/L), vancomicina (10.0mg/L), trimetoprim (10.0mg/L), anfotericina B (5.0mg/L) (SR 208E) (Oxoid, Inglaterra), incubado a 37°C durante 4 horas e por mais 48 horas a $41,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ em microaerofilia. A partir dessa suspensão, foram realizadas nove diluições seriadas utilizando enxaguadura de uma das amostras de carcaça de frango não contaminada com *Campylobacter*, preparada conforme item 2.1 e analisada conforme itens 2.2 e 2.3.

Alíquotas de 1 mL de cada uma das diluições foram centrifugadas a 16.000 x g por 10 min. Os sedimentos foram adicionados de 1 mL de água peptonada tamponada (Acumedia, Lansing, Michigan, EUA) esterelizada, centrifugados por 10 min a 16000 x g, os sobrenadantes descartados e os sedimentos ressuspensos em 300 µL de solução de Triton X-100 1% (Nuclear). Para a extração do DNA, as misturas foram fervidas a 100 °C por 10 min, resfriadas em banho de gelo por 5 min e centrifugadas por 5 min a 16.000 x g. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos para a purificação do DNA.

Alíquotas de 300 µL de solução fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (25:24:1) foram adicionados aos sobrenadantes e as misturas agitadas por inversão e centrifugadas 13.000 x g por 10 min. A fase aquosa foi transferida para novo tubo, no qual foram adicionados 30 µL de acetato de sódio (3M) e 270 µL de etanol absoluto. Os tubos foram mantidos por 2 horas a -20°C, e centrifugados a 13.000 x g por 10 min. Os precipitados foram lavados com etanol 70%, e centrifugados novamente como descrito anteriormente. Os precipitados foram secos a 37°C e ressuspensos em 50 µL de água ultrapura (Mili-Q®) para uso na PCR em Tempo Real.

A curva de calibração foi construída plotando o *cycle threshold* (C_T) contra \log_{10} UFC/g. A eficiência de amplificação foi analisada através da fórmula: $EA = [10^{(-1/\text{inclinação})}] - 1$.

A curva de calibração foi construída com concentrações da bactéria alvo de 10^0 a 10^7 UFC/g, em duplicata. A comprovação da contagem de *Campylobacter* foi realizada com a cultura das diferentes diluições seriadas preparadas com enxaguadura da carcaça de frango, conforme item 2.4, em placas de Ágar mCCDA e Ágar Bolton modificado. A quantificação de *Campylobacter* de cada um dos pontos da diluição seriada seguiu o método direto utilizando os volumes de 400, 100, 50, 10, 5 e 1 μL de enxaguadura em placas de Ágar mCCDA e Ágar Bolton modificado, nas condições descritas acima. A identificação da densidade bacteriana inicial foi realizada pelo método de contagem em gotas (Silva *et al.*, 2010).

2.5 Métodos de extração de DNA para a detecção e quantificação de *Campylobacter* spp. utilizando PCR em Tempo Real

Quarenta mililitros das enxaguaduras das carcaças de frango, preparadas conforme item 2.1, foram filtradas em papel celulose com poro de $7,5\mu\text{M}$ (Nalgon, Brasil) utilizando suporte de filtração Sterifil® (Millipore, EUA) e bomba a vácuo. O filtrado foi fracionado em quatro tubos contendo 10mL cada. Os tubos foram centrifugados a $5.000 \times g$ por 5 minutos, os sobrenadantes descartados e os sedimentos utilizados para a extração do DNA, de acordo com um dos quatro métodos de extração avaliados.

Todos os métodos de extração de DNA avaliados foram realizados após preparo da enxaguadura e remoção de resíduos maiores de carne e de gordura por filtração para posterior centrifugação.

2.5.1 Metodologia proposta por Ronner e Lindmark (2007)

Os sedimentos, preparados conforme item 2.5, foram submetidos à extração e purificação do DNA utilizando o *kit* comercial DNeasy tissue *kit* (Qiagen, UK), seguindo o protocolo para lise de DNA de células bacterianas gram negativas. Alíquotas de $190\mu\text{L}$ de DNA purificado foram adicionadas de $400\mu\text{L}$ de etanol 95% e $8\mu\text{L}$ de NaCl 5M. A mistura foi homogeneizada em vortex e centrifugada a $19.000 \times g$ por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, o sedimento ressuspendido em $19\mu\text{L}$ de água ultrapura (Mili-Q®) (Millipore, EUA) e utilizado na PCR em Tempo Real.

2.5.2 Metodologia proposta por Hong *et al.* (2007)

Os sedimentos, preparados conforme item 2.5, foram ressuspensos em 1 mL de água ultrapura (Mili-Q®) (Millipore, EUA), centrifugados a 3.000 x g por 30 segundos a 4°C, e os sedimentos descartados. Os sobrenadantes foram novamente centrifugados a 13.000 x g por 5 minutos a 4°C, e os sobrenadantes descartados. Os sedimentos foram lavados duas vezes com solução Tris-EDTA (Fluka – Sigma Aldrich, EUA) e ressuspensos em 0,1mL de uma suspensão de resina Chelex-100 a 6% (Bio-Rad). As misturas foram homogeneizadas em vortex, incubadas em termobloco (Dry Bath Heat and Cool Control, Loccus Biotecnologia, Brasil) a 95°C durante 10 minutos, novamente homogeneizadas em vortex, resfriada em bloco térmico (Sistema IsoTherm, Eppendorf, EUA) por 5 minutos. As misturas foram centrifugadas a 13.000 x g por 5 minutos a 4°C, e os sobrenadantes utilizados para a quantificação de *Campylobacter* por PCR em Tempo Real.

2.5.3 Kit de extração Simbios Biotecnologia

Os sedimentos, preparados conforme item 2.5, foram ressuspensos em 500 µL de NewGene Prep (Simbios Biotecnologia, Canoas, Brasil), homogeneizados em vortex e incubados em termobloco (Dry Bath Heat and Cool Control, Loccus Biotecnologia, Brasil) a 60°C durante 10 minutos. As misturas foram centrifugadas a 10.000 x g por 1 minuto. Em novos tubos, 20 µL de sílica (NewGene Preamp, Simbios Biotecnologia) foram adicionadas a 500 µL do sobrenadante. As misturas foram mantidas a temperatura ambiente por 10 minutos, com inversão manual a cada 2 minutos, e posteriormente centrifugadas a 10.000 x g por 1 minuto. Os sedimentos foram lavados duas vezes com a solução de lavagem A, duas vezes com a solução de lavagem B, e uma vez com a solução de lavagem C (NewGene Preamp, Simbios Biotecnologia). Os tubos foram em seguida incubados em termobloco (Dry Bath Heat and Cool Control, Loccus Biotecnologia, Brasil) a 60°C durante 10 minutos. Às sílicas secas foram adicionados 50 µL da solução de eluição (NewGene Preamp, Simbios Biotecnologia), as misturas homogeneizadas em vortex e incubadas em termobloco (Dry Bath Heat and Cool Control, Loccus Biotecnologia, Brasil) a 60°C por mais 5 minutos. As misturas foram centrifugadas a 10.000 x g por 3 minutos, e os sobrenadantes utilizados para a quantificação de *Campylobacter* por PCR em Tempo Real.

2.5.4 Extração automatizada – Nuclisens EasyMag® (BioMérieux – França)

Os sedimentos, preparados conforme item 2.5, foram ressuspensos em 100 µL de água ultrapura, e adicionados a 2 mL de tampão de lise, sendo a mistura incubada durante 24 horas à temperatura ambiente. A extração automática do DNA foi realizada no sistema Nuclisens EasyMag® (BioMérieux) seguindo o protocolo B, específico do fabricante, com volume final de eluição de 60 µL.

2.6 Cálculo da eficiência da PCR

A determinação da eficiência da PCR em Tempo Real foi realizada utilizando as diluições da suspensão de *Campylobacter*, conforme item 2.4. A curva de calibração, a equação linear e o coeficiente de regressão linear (R^2) foram automaticamente gerados pelo programa *Sequence Detection Software* (SDS) v 1.3 (Applied Biosystems). O valor da inclinação da equação linear foi usado para determinar a eficiência de amplificação.

2.7 Análise estatística

A análise estatística das contagens (UFC/g) obtidas nos diferentes métodos de extração foi realizada em base logarítma pela análise de variância modelo inteiramente casualizado e teste de Tukey para classificação das médias, com a utilização do pacote estatístico Statistica 10.0 (StatSoft). O nível de significância considerado foi $p < 0,05$.

A prevalência de *Campylobacter* spp. nas carcaças de frango foi expressa em porcentagem. As correlações das quantificações de *Campylobacter* foram apresentadas através de gráfico de dispersão, coeficiente de correlação e a linha de regressão. Os cálculos estatísticos foram efetuados utilizando-se a planilha eletrônica Excel (Microsoft®), com programação apropriada.

3. Resultados e Discussão

A eficiência do ensaio de PCR em Tempo Real otimizado foi determinada pela curva de calibração. Os valores de C_T foram correlacionados com as contagens (UFC/g) obtidas pelo método convencional de cultura. A eficiência da amplificação da PCR foi de 62%, com o coeficiente de correlação de 0,9905 e inclinação da reta de $-4,649$. O limite de detecção da reação otimizada foi de $1,5 \times 10^3$ UFC/g e a faixa linear de amplificação da reação foi de $1,5 \times 10^3$ a $2,0 \times 10^7$ UFC/g (Tabela 1). O controle interno foi amplificado em todas as amostras, nos valores de C_T de 30 a 32,

exceto quando as contagens de *Campylobacter* ultrapassaram os valores de 10^6 UFC/g.

O valor para o limite de detecção obtido neste trabalho foi superior ao obtido por outros autores; como os apresentados pelos estudos de Ronner e Lindmark (2007) e Hong *et al.* (2007) que afirmam que as metodologias padronizadas por estes para quantificação de *Campylobacter* em carcaça de frango é capaz de detectar 25 UFC/ mL e 10 UFC/ mL de amostras respectivamente. No entanto, na discussão dos dados, Ronner e Lindmark (2007) contradizem os resultados identificados, pois afirmam que as amostras utilizadas para a curva padrão continha mais cópias do que calculado, levando a uma subestimação das cópias de *Campylobacter*. Em ambos os estudos, os autores identificaram contagens superiores de *Campylobacter* pela qPCR quando comparado ao método direto e atribuem esta discordância de resultados a alta concentração de células mortas ou viáveis mas não cultiváveis (VNC).

3.1 Métodos de extração de DNA para a detecção e quantificação de *Campylobacter* spp. utilizando PCR em Tempo Real

Foram utilizados quatro métodos de extração de DNA. Dois deles foram empregados pelo *kit* manual da Simbios e o método semi automatizado EasyMag®, estão disponíveis comercialmente. Estes dois métodos foram selecionados por serem utilizados na rotina de laboratórios brasileiros de diagnóstico para a detecção de patógenos em amostras clínicas e de alimentos. Os outros dois métodos utilizados, o de Ronner e Lindmark e o de Hong *et al.*, foram publicados como sendo adequados para a quantificação de *Campylobacter* spp. em carne de frango.

Os resultados obtidos após o processamento das enxaguaduras com diferentes contagens de *Campylobacter* pelos quatro diferentes métodos avaliados estão apresentados na Tabela 1. Pode-se observar que, com a gradual redução da densidade celular, o resultado quantitativo obtido com os diferentes métodos se aproxima da contagem de *Campylobacter* pelo método direto, principalmente quando avaliado o resultado do método Hong *et al.* nas menores densidades.

TABELA 1 Contagem (UFC/g) das diluições seriadas de *Campylobacter* pelo método direto, qPCR em Tempo Real após extração do DNA com fenol/clorofórmio e qPCR em Tempo Real após os quatro métodos de extração de DNA.

Contagem de colônias (UFC/g)	qPCR em Tempo Real (UFC/g)			
	Ronner e Lindmark	Hong <i>et al.</i>	Kit Simbios	EasyMag®
$2,0 \times 10^7$ b	$5,5 \times 10^6$ a	$1,2 \times 10^7$ c	$4,0 \times 10^6$ a	$3,7 \times 10^6$ a
$2,0 \times 10^6$ c	$1,6 \times 10^5$ a	$1,1 \times 10^6$ b	$9,0 \times 10^5$ b	$1,3 \times 10^5$ a
$2,0 \times 10^5$ c	$1,9 \times 10^4$ a	$9,1 \times 10^4$ b	$8,9 \times 10^4$ b	$1,6 \times 10^4$ a
$3,0 \times 10^4$ b	$1,4 \times 10^3$ a	$2,8 \times 10^4$ b	$2,5 \times 10^4$ c	$1,2 \times 10^3$ a
$1,5 \times 10^3$ a	NA	$1,0 \times 10^3$ a	$1,0 \times 10^3$ a	NA
$2,3 \times 10^2$	NA	NA	NA	NA
$2,5 \times 10^1$	NA	NA	NA	NA

Os resultados são apresentados como a média dos resultados da duplicata

NA Não obtidos valores de C_T

Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes (teste Tukey $p=0,00$)

A quantificação de *Campylobacter* quando a contagem era de 10^3 UFC/g somente foi possível pela metodologia proposta por Hong *et al.* e o kit Simbios, com contagens por ambos os métodos de $1,0 \times 10^3$ UFC/g. Não houveram diferenças estatisticamente significantes destas em relação às contagens de colônias obtidas pelo método direto.

Os resultados obtidos pela PCR em Tempo Real foram estatisticamente iguais entre os métodos de extração de Ronner e Lindmark e do EasyMag® para as contagens de colônias de $3,0 \times 10^4$ a $2,0 \times 10^7$ UFC/g.

O método Hong *et al.* e o kit Simbios apresentaram resultados mais satisfatórios quando comparado as demais metodologias. Apesar das contagens demonstrarem diferenças estatísticas destas em relação às contagens de colônias entre $3,0 \times 10^4$ e $2,0 \times 10^7$ UFC/g, estes métodos de extração foram os que mais se aproximaram do valor real, assim como foram os únicos métodos que detectaram *Campylobacter* no limite de detecção da PCR, ou seja, mostraram os mesmos resultados com ou sem concentração da enxaguadura.

Método Hong *et al.* utiliza reduzidas etapas de lavagens, e emprega para a extração do DNA a resina Chelex® 100, uma resina quelante composta por estireno-divinilbenzeno, reconhecida pela remoção de substâncias inibidoras como íons metálicos polivalentes que possuem efeito lesivo na extração de DNA, quando submetidos a altas temperaturas (LAMBALLERIE *et al.*, 1992; GIRAFFA, ROSSETTI e NEVIANI, 2000; MARTÍN-PLATERO *et al.*, 2010).

Diferentes matrizes alimentares, incluindo a carne de frango, possuem os glóbulos vermelhos como potenciais inibidores da PCR, desta maneira a utilização da resina Chelex® 100 tem minimizado tal adversidade, por promover a eliminação de íons metálicos polivalentes, como o ferro, visto que a resina possui alta capacidade de troca iônica (MYGIND *et al.*, 2002; HEDMAN e RADSTROM, 2013).

O *kit* Simbios composto pelos sistemas reagentes NewGene Prep e NewGene Preamp (Simbios Biotecnologia) é baseado no método descrito por Boom *et al.* (1990). Este, como qualquer procedimento básico de extração de DNA envolve a lise celular, com liberação de todo o conteúdo intracelular, e a purificação do DNA. Para a lise celular utilizou-se o reagente NewGene Prep, composto por Tiocianato de Guanidina (5M), Tris HCl (0,1M), EDTA (0,5M) e Triton X-100. A purificação foi realizada pelo NewGene Preamp, composto pelos insumos necessários a etapa de lavagem (solução de lavagem A (Tiocianato de Guanidina (5M) e TrisHCl (0,1M)); solução de lavagem B (Etanol 75%); solução de lavagem C (Etanol absoluto)) juntamente com a sílica e solução de eluição (Tris 10nM e EDTA 1mM).

As sucessivas etapas de lavagem necessárias à purificação do DNA mostraram-se como o diferencial na qualidade final do DNA dos isolados de *Campylobacter* spp. extraídos e purificados com o *kit* Simbios, no presente estudo. A purificação foi realizada devido a adesão do DNA às partículas da sílica, esta facilitada pela ação do Tiocianato de Guanidina, e em etapa final houve a recuperação do DNA através da solução de eluição (BOOM *et al.*, 1990).

3.2 Amostras naturalmente contaminadas

Vinte quatro amostras (32%) de carcaças de frango naturalmente contaminadas com *Campylobacter* de um total de 75 amostras analisadas foram testadas com os quatro diferentes métodos de extração do DNA. A contagem de colônias pelo método direto convencional de 17 amostras variou de 3,0 a 4,7 x 10² UFC/g. Em 7 amostras a contagem não foi possível de ser realizada porque as

colônias estavam confluentes nos dois volumes da enxaguadura utilizados e a contagem foi considerada como superior a $2,5 \times 10^3$ UFC/g.

A quantificação de *Campylobacter* spp. por PCR em Tempo Real foi possível em apenas duas das 24 amostras de carcaças de frango positivas pelo método direto após concentração e extração do DNA pelos métodos Simbios e EasyMag®.

Comparando-se a capacidade de detecção dos métodos avaliados, método direto com a qPCR em Tempo Real considerando os diferentes métodos de extração, em relação às amostras naturalmente contaminadas, todos apresentaram 100% de probabilidade de identificação dos negativos. Os diferentes métodos da qPCR em Tempo Real não foram capazes de identificar os positivos, em comparação com o método direto. Assim sendo, apenas os métodos Simbios e EasyMag® apresentaram a probabilidade de 4,2% de identificação dos positivos comparados com o método direto (uma amostra cada), sendo considerados de capacidade irrelevante na detecção dos verdadeiros positivos.

As amostras naturalmente contaminadas apresentavam contaminação inferior ao limite de detecção da PCR em Tempo Real otimizada, e desta forma foi possível na maioria das amostras somente a detecção e quantificação pelo método direto. Mesmo nas contagens superiores a $2,5 \times 10^3$ UFC/g pelo método direto não foi possível a quantificação pela qPCR, sugerindo que o material extraído apresentava reduzida concentração de DNA da bactéria alvo e a presença de inibidores da PCR.

3.3 Método qPCR

A quantificação de *Campylobacter* utilizando PCR em Tempo Real seria uma técnica vantajosa pelo reduzido tempo necessário à análise, além da sensibilidade e especificidade do método, podendo facilmente substituir os tradicionais métodos de contagem por cultura, que revelam colônias com bordas pouco definidas acarretando dificuldade na visualização e distinção entre colônias típicas e atípicas, assim como a tendência das colônias a coalescência.

A intensão de concentrar a enxaguadura das amostras de carcaças de frango analisadas para aumentar a sensibilidade de qPCR não foi adequada, pois a concentração de células de *Campylobacter* levou à possível concentração concomitante de substâncias inibidoras da matriz alimentar, como sugerido por Filion (2012). Como resultado, a amplificação da reação de qPCR foi comprometida, o que

pode explicar a percentagem de 91,7% de resultados falso-negativos entre os verdadeiros positivos encontrados no presente trabalho.

Os resultados identificados pelo presente estudo corroboram com informações relatadas por Hedman e Radstrom (2013), onde os mesmos afirmam que apesar da alta sensibilidade da metodologia de PCR em Tempo Real, a quantificação direta de patógenos alimentares por esta técnica, pode ser difícil quando existe um baixo número de bactérias presentes nas amostras. Logo, o presente estudo destaca que apesar da importância da quantificação de *Campylobacter* do ponto de vista epidemiológico, a quantificação da bactéria por PCR em Tempo Real ainda não é adequada, e que a alternativa mais apropriada seria a detecção, empregando etapa de enriquecimento prévio a PCR em Tempo Real a fim de aumentar a concentração bacteriana para sua posterior detecção com a necessária confiabilidade à rotina laboratorial.

Conclusão semelhante foi obtida por Rochonczy *et al.* (2013), estes definiram que o enriquecimento em Caldo Bolton seguido pela PCR em Tempo Real demonstrou ser o método mais adequado para detectar *C. jejuni* em amostras de carne de frango, e que a quantificação de *C. jejuni* em alimentos por PCR em Tempo Real não produz resultados confiáveis. O enriquecimento impossibilita a realização de contagem sendo possível realizar somente a detecção.

O objetivo de estabelecer um método de extração para a quantificação de *Campylobacter* em enxaguadura de carcaça de frango por PCR em Tempo Real, sem prévia etapa de enriquecimento, não foi alcançado. O alto limite de detecção de $1,5 \times 10^3$ UFC/g não possibilitou a detecção de *Campylobacter* em contagens inferiores, mesmo após concentração das amostras e uso de diferentes métodos de extração, e também indica que a quantificação de *Campylobacter* em amostras naturalmente contaminadas pode ser difícil.

4. Conclusão

Os presentes resultados comprovam que o método Hong *et al.* e o *kit* Simbios apresentaram resultados mais satisfatórios quando comparado as demais metodologias para a quantificação de *Campylobacter* spp. a partir do enxaguadura da carcaça de frango.

A avaliação direta da enxaguadura da carcaça de frango pelo método de PCR em Tempo Real otimizada não foi adequada para quantificação de *Campylobacter*

spp. tendo em vista, o alto limite de detecção ($1,5 \times 10^3$ UFC/g). Desta forma, o presente trabalho recomenda a adição de uma etapa de enriquecimento prévio a PCR em Tempo Real a fim de aumentar a densidade bacteriana para sua posterior detecção com a necessária confiabilidade à rotina laboratorial.

Referências

BOOM, R.; SOL, C.J.A.; SALIMANS, M.M.M.; JANSEN, C.L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P.M.E.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 495-503, 1990.

BOTTELDOORN, N.; VAN COILLIE, E.; PIESSENS, V.; RASSCHAERT, G.; DEBRUYNE, L.; HEYNDRICKX, M.; HERMAN, L.; MESSENS, W. Quantification of *Campylobacter* spp. in chicken carcass rinse by real-time PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v.105, p.1909–1918, 2008.

DEBRETSON, A.; HABTEMARIAMB, T.; WILSONC, S.; NGANWAB, D.; YEHUALAESHET, T. Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Campylobacter jejuni* on chicken rinses from poultry processing plant, **Molecular and Cellular Probes**. v.21,p.177–181, 2007.

DORREL, N.; WREN, B.W. The second century of *Campylobacter* research: recent advances, new opportunities and old problems. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 20, n.5, p. 514-518, 2007.

FILION, M. Quantitative Real-time PCR in Applied Microbiology. **Caister Academic Press**. British Library, Norfolk, UK, p. 149-160, 2012.

FITZGERALD, C.; WHICHARD, J.; NACHAMKIN, I. Diagnosis and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* species, p. 227–243. In I. Nachamkin, C. M. Szymanski, and M. J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 3rd ed. ASM Press, Washington, DC, 2008.

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.

GIRAFFA, G.; ROSSETTI, L.; NEVIANI, E. An evaluation of chelex-based DNA purification protocols for the typing of lactic acid bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 42, p.175–184, 2000.

HEDMAN, J.; RADSTROM, P. Overcoming inhibition in real-time diagnostic PCR. **Methods in molecular biology**, v. 943, p. 17–48, 2013.

HONG, J.; JUNG, W.K.; KIM, J.M.; KIM, S.H.; KOO, H.C.; SER, J.; PARK, Y.H. Quantification and Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in raw chicken meats using a real-time PCR method. **Journal of Food Protection**, v.70, n.9, p. 2015-2022, 2007.

JOSEFSEN, M.H.; JACOBSEN, N.R.; HOORFAR, J. Enrichment followed by quantitative PCR both for rapid detection and as a tool for quantitative risk assessment of food-borne thermotolerant *Campylobacter*s. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n. 6, p. 3588-3592, 2004.

JOSEFSEN, M.H.; LOFSTROM, C.; HANSEN, T.B.; CHRISTENSEN, J.E.; OLSEN, J.E.; HOORFAR, J. Rapid Quantification of Viable *Campylobacter* Bacteria on Chicken Carcasses, Using Real-Time PCR and Propidium Monoazide Treatment, as a Tool for Quantitative Risk Assessment. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, n. 15, p. 5097-5104, 2010.

LAMBALLERIE, X.; ZANDOTTI, C.; VIGNOLI, C.; BOLLETT, C.; MICCO, P. A one-step microbial DNA extraction method using "Chelex 100" suitable for gene amplification. **Research in Microbiology**, v.143 785–790, 1992.

MARTÍN-PLATERO, A.M.; PERALTA-SÁNCHEZ, J.M.; SOLER, J.J.; MARTÍNEZ-BUENO, M. Chelex-based DNA isolation procedure for the identification of microbial communities of eggshell surfaces. **Analytical Biochemistry**, v.397, p.253–255, 2010.

MYGIND, T.; BIRKELUND, S.; BIRKEBAEK, N.H.; OSTERGAARD, L.; JENSEN, J.S.; CHRISTIANSEN, G. Determination of PCR efficiency in chelex-100 purified clinical samples and comparison of real-time quantitative PCR and conventional PCR for detection of *Chlamydia pneumoniae*. **BMC Microbiology**, v.2, p. 12-18, 2002.

NOGVA, H.K.; BERGH, A.; HOLCK, A.; RUDI, K. Application of the 5'-Nuclease PCR Assay in Evaluation and Development of Methods for Quantitative Detection of *Campylobacter jejuni*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 4029-4036, 2000.

OLIVEIRA, T.C.R.M.; BARBUT, S.; GRIFFITHS, M.W. A robotic DNA purification protocol and real-time PCR for the detection of *Campylobacter jejuni* in foods. **Journal of Food Protection**, v.68, p.2131-2135, 2005.

ON, S.L.; JORDAN, P.J. Evaluation of 11 PCR assays for species-level identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p.330–336, 2003.

ROHONCZY, K.; RANTSIOU, K.; COCOLIN, L. Modified enrichment strategies coupled with molecular and conventional methods to detect and quantify *Campylobacter jejuni* in chicken meat from the market. **Journal of Food Safety**, v.33, p. 497-502, 2013.

ROONER, A.C.; LINDMARK, H. Quantitative detection of *Campylobacter jejuni* on fresh chicken carcasses by Real-Time PCR, **Journal of Food Protection**, v.70, n. 6, p. 1373-1378, 2007.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. Editora Varela. 623p., 2010.

SOLOMON, E.B.; HOOVER, D.G. *Campylobacter jejuni*: a bacterial paradox. **Journal of Food Safety**, v. 19, 121 -136, 1999.

SPANIOLAS, S.; TSACHAKI, M.; BENNETT, M.J.; TUCKER, G.A. Evaluation of DNA extraction methods from green and roasted coffee beans. **Food Control** v. 3, p. 257-262, 2008.

YANG, C.; JIANG, Y.; HUANG, K.; ZHU, C.; YIN, Y. Application of real-time PCR for quantitative detection of *Campylobacter jejuni* in poultry, milk and environmental water, **FEMS Immunology and Medical Microbiology** v. 38, p. 265-271, 2003.

ARTIGO 3

IDENTIFICAÇÃO DE CEPAS TERMOFÍLICAS DE *Campylobacter* spp. POR PROVAS FENOTÍPICAS CONVENCIONAIS, API CAMPY® E SISTEMA REP-PCR SEMI AUTOMATIZADO

RESUMO: A diferenciação entre as espécies de *Campylobacter* spp. é necessária para vigilância epidemiológica e na avaliação de risco, porque *C. jejuni* é a espécie mais associada à campilobacteriose humana. Problemas na identificação das espécies de *Campylobacter* estão relacionados à incapacidade desse gênero de metabolizar carboidratos, de serem bioquimicamente pouco ativos e da falta de padronização dos testes utilizados nos laboratórios, o que dificulta a comparação de dados. Neste trabalho foram avaliados dois métodos fenotípicos (sistema API Campy® (Biomérieux) e provas fenotípicas convencionais) e um método genotípico (sistema REP-PCR Diversilab®, Biomérieux) para a identificação de isolados de *Campylobacter* spp. de amostras clínicas e de alimentos. Neste estudo, apesar de todas as dificuldades já relatadas quando do uso das provas fenotípicas tradicionais, estas mostraram o melhor desempenho dentre as técnicas avaliadas. A maioria dos isolados foi (93,0%) adequadamente identificada (40/43). Não foi possível a identificação das espécies hipurato negativas, mesmo após a realização do sequenciamento. Os resultados do presente trabalho sugerem que o uso das provas fenotípicas convencionais para a identificação das espécies de *Campylobacter* é adequado para as espécies hipurato positivas.

Palavras-chave: *Campylobacter* spp., identificação, Diversilab, sistema API Campy®, provas fenotípicas.

1. Introdução

O gênero *Campylobacter* compreende 31 espécies e 10 subespécies (EUZÉBY, 2014). As cepas termofílicas de *Campylobacter*, *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* e *C. upsaliensis*, são responsáveis pela elevada percentagem dos cerca de 76 milhões de incidentes anuais de doenças de origem alimentar nos Estados Unidos (MARINOU *et al.*, 2012). *C. jejuni* é considerado o agente causador de zoonoses mais reportado na União Europeia (EFSA, 2009).

A identificação de espécies de *Campylobacter* era baseada, anteriormente, na prova de hidrólise do hipurato, que quando positiva identificava a espécie *C. jejuni*. Atualmente, sabe-se que alguns isolados de *C. jejuni* podem não hidrolisar o hipurato e que isolados de *C. curvus* e *C. avium* podem ser hipurato positivos (ROSSI *et al.*, 2009). Problemas na identificação das espécies de *Campylobacter* estão relacionados à incapacidade desse gênero de metabolizar carboidratos, de serem bioquimicamente pouco ativos e da falta de padronização dos testes utilizados nos laboratórios, o que dificulta a comparação de dados (ON, 1996; KUANA *et al.*, 2009).

O sistema miniaturizado API Campy® (Biomerieux), composto por 21 provas fenotípicas, tem sido empregado na rotina laboratorial para a identificação de 18 espécies de *Campylobacter*, por ser simples e de rápida execução (KUANA *et al.*, 2009). Técnicas moleculares são aplicadas para a identificação e diferenciação de espécies de *Campylobacter*, tais como, PCR convencional, PCR de sequências repetitivas de DNA (REP-PCR) e o sequenciamento do genoma bacteriano (HEALY *et al.*, 2005).

Neste trabalho foram avaliados dois métodos fenotípicos (sistema API Campy®, Biomerieux e provas fenotípicas convencionais) e um método genotípico (sistema REP-PCR Diversilab®, Biomerieux) para a identificação de isolados de *Campylobacter* spp. de amostras clínicas e de alimentos.

2. Materiais e Métodos

2.1 Cepas

Um total de 43 isolados de *Campylobacter* spp. foi estudado neste trabalho, sendo 21 isolados provenientes de carcaças de frango resfriadas e 22 de amostras

de fezes humanas. Os isolados de fezes foram provenientes de amostras de pacientes de diferentes municípios do Estado do Paraná, Brasil, com infecção gastrointestinal, e identificadas no período de 2006 a 2012. As cepas bacterianas utilizados neste ensaio pertencem a coleção de culturas do Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN-PR). O meio de cultura utilizado para o isolamento de *Campylobacter* de fezes humanas foi o Ágar tripticase soja (TSA) *Campy*, preparado com Ágar tripticase de soja desidratado (Himedia Laboratórios, Índia), adicionado de extrato de levedura (Becton Dikson, EUA) (0,5g/L), sulfato ferroso (Vetec, Brasil) (0,25g/L), metabissulfito de sódio (Vetec, Brasil) (0,25g/L), piruvato de sódio (Vetec, Brasil) (0,25g/L), sangue de carneiro desfibrinado (Newprov, Brasil) (100mL/L) e suplemento contendo vancomicina (5.0mg/L), polimixina B (1.25mg/L), cefalotina (7.5mg/L), trimetropim (2.5mg/L) e anfotericina B (1.0mg/L) (SR 098E) (Oxoid, Inglaterra).

As cepas de *Campylobacter* spp. de carcaças de frango resfriadas foram isoladas de amostras adquiridas no comércio da cidade de Curitiba, Paraná e produzidas nos Estados da região Sul do Brasil, no ano de 2011. O isolamento foi realizado pelo método direto e pelo método de enriquecimento seguindo a metodologia ISO 10272: 2006. Os meios seletivos empregados foram Ágar carvão cefoperazona desoxicolato modificado (mCCDA) (CM 739) (Oxoid, Inglaterra), suplementado com cefoperazone (16.0mg) e anfotericina B (5.0mg) (SR 155E) (Oxoid, Inglaterra) e Ágar Bolton modificado, preparado conforme descrito por Franchin *et al.* (2005). A condição de microaerofilia foi obtida por injeção em jarras de uma mistura gasosa contendo 5% de O₂, 10%, CO₂ e 85% de N₂ (Air liquide, Brasil) durante 20 segundos.

Os isolados foram mantidos à temperatura de -80°C em pérolas para a estocagem de bactérias (Cryo bank, Laborclin, Brasil).

2.2 Sistema API e provas fenotípicas convencionais

As cepas mantidas a -80°C, conforme item 2.1 foram cultivadas utilizando Ágar Trypticase de Soja (TSA) suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado (Newprov, Brasil), incubado a 36 ± 1°C durante 24 e 48 horas sob microaerofilia. Colônias isoladas foram identificadas utilizando provas fenotípicas convencionais, API Campy® e sistema Diversilab®.

As provas fenotípicas convencionais utilizadas foram catalase, oxidase, hidrólise de hipurato, hidrólise do indoxil acetato, e avaliação da sensibilidade ao ácido nalidíxico e à cefalotina (Oxoid, Inglaterra). A identificação empregando o sistema API Campy® (Biomerieux, França) foi realizada de acordo com as instruções do fabricante.

2.3 Sistema Diversilab® (REP-PCR)

O sistema Diversilab® foi realizado após a extração e purificação do DNA pelo sistema MoBio Ultra-Clean™ Microbial DNA (MoBio Laboratories), seguindo as recomendações do fabricante. As amplificações foram efetuadas no termocilador Veriti® (Life Technologies) utilizando o Diversilab® *Campylobacter* kit. Os perfis de bandas obtidos através do analisador Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) foram analisados utilizando programa "web based" Diversilab (Biomerieux).

A base de dados utilizada para avaliação das amostras apresenta dez diferentes perfis de bandas de cepas de *C. jejuni*, dois de *C. fetus*, e um de *C. coli*, totalizando treze padrões a serem confrontados ou que foram comparados com os perfis de bandas obtidos com as cepas estudadas. As percentagens de similaridade foram calculadas pelo coeficiente de *Pearson Correlation*.

2.4 Sequenciamento

O DNA foi extraído utilizando tampão PrepMan Ultra (Applied Biosystems) e a concentração de DNA ajustada para 25ng/mL. Para a amplificação parcial da região do gene 16S rRNA, foram utilizados os primers universais, conforme recomendações do fabricante (Microseq® 16s rDNA PCR kit, Applied Biosystems/ Life Tech, California, US) e o termociclador Veriti (Applied Biosystems). A reação de sequenciamento foi realizada utilizando o kit Microseq® 16s rDNA Sequencing kit, Applied Biosystems/ Life Tech, California, US) e o termociclador Veriti® (Life Technologies). O sequenciamento foi realizado no 3130 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). As sequências geradas (477-500 pb) foram comparadas com as dos bancos de dados Le BIBI (DEVULDER *et al.*, 2003) e Sepsitest BLAST (SepsitTest BLAST, 2013).

3. Resultados e Discussão

A identificação das 43 cepas de *Campylobacter* avaliadas neste estudo pelo sistema API Campy®, provas fenotípicas convencionais e sistema Diversilab® está apresentada na Tabela 1. O uso apenas das provas fenotípicas convencionais para a identificação de espécies de *Campylobacter* pode resultar em erros de identificação de isolados atípicos ou mutantes e foi questionado quanto ao seu potencial discriminatório (STEINHAUSEROVA *et al.*, 2001). Embora alguns autores tenham enfatizado esse problema (ON *et al.*, 1996; STEINHAUSEROVA *et al.*, 2001), neste estudo a maioria dos isolados (93,0%) pôde ser adequadamente identificada (40/43) pelas provas fenotípicas convencionais.

A percentagem de concordância entre os três métodos avaliados foi de 83,7%. Discrepância na identificação foi observada em sete isolados (11, 14, 22, 23, 24, 34 e 38). Os resultados obtidos com esses sete isolados estão apresentados na Tabela 2. Quatro desses isolados (11, 14, 23 e 24) foram hipurato positivo no API Campy® e na prova convencional em tubo e foram identificados como *C. jejuni*. O sistema Diversilab® identificou esses quatro isolados como sendo *C. coli*, no entanto, o sequenciamento confirmou a identificação de *C. jejuni*. O isolado 38 foi identificado como *C. jejuni* pelo API Campy® e como *C. coli* pela prova fenotípica convencional, porque houve divergência na prova do hipurato. O sistema Diversilab® identificou esse isolado como sendo *C. jejuni*. Os isolados 22 e 34 não hidrolisaram o hipurato e foram identificados como sendo *C. lari* pelo API Campy®, *C. coli* pela prova fenotípica convencional e *C. jejuni* pelo sistema Diversilab®. Nesses três casos o sequenciamento também não possibilitou a identificação da espécie. A impossibilidade do sequenciamento de identificar alguns isolados de *C. jejuni* e *C. coli* já havia sido relatada por Gorkiewicz *et al.* (2003), devido à presença de seqüências idênticas ou muito semelhantes no gene 16S rRNA de isolados dessas duas espécies.

Quando o isolado hidrolisa o hipurato, no caso de cepas hipurato positivas, as espécies que tradicionalmente o hidrolisam poderiam ser distinguidas de *C. jejuni*. *C. curvus*, que pode também hidrolisar o hipurato pode ser diferenciado de *C. jejuni* pela prova da catalase (ROSSI *et al.*, 2009). A outra espécie hipurato positiva é *C. avium*, que não tem capacidade de crescer no Ágar mCCDA e não reduz o TTC (cloreto de trifênil tetrazolio) presente no Ágar Bolton, não sendo, portanto, isolada pela metodologia utilizada no presente estudo.

Tabela 1 - Identificação das 43 cepas de *Campylobacter*, isoladas de fezes e carcaças de frango, testadas pelo sistema API Campy®, provas fenotípicas convencionais e sistema Diversilab®.

N° do isolado	Amostra	API Campy®	Provas fenotípicas	Sistema Diversilab® (% de similaridade)
1	Fezes	<i>C. jejuni</i> ssp <i>doylei</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> (92,4%)
2	Fezes	<i>C. jejuni</i> ssp <i>jejuni</i> 1	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> (67,0%)
3	Fezes	<i>C. jejuni</i> ssp <i>jejuni</i> 1	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> (65,9%)
4	Fezes	<i>C. jejuni</i> ssp <i>jejuni</i> 1	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> (94,9%)
5	Fezes	<i>C. jejuni</i> ssp <i>jejuni</i> 1	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> (95,0%)
6	Fezes	<i>C. jejuni</i> ssp <i>jejuni</i> 1	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> (94,6%)
7	Fezes	<i>C. jejuni</i> ssp <i>jejuni</i> 1	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> (95,2%)
8	Fezes	<i>C. jejuni</i> ssp <i>jejuni</i> 1	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> (70,3%)
9	Fezes	<i>C. jejuni</i> ssp <i>doylei</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> (94,8%)
10	Fezes	<i>C. jejuni</i> ssp <i>jejuni</i> 1	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> (93,6%)
11	Fezes	<i>C. jejuni</i> ssp <i>jejuni</i> 1	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i> (81,2%)
12	Fezes	<i>C. jejuni</i> ssp <i>jejuni</i> 1	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> (91,8%)
13	Fezes	<i>C. jejuni</i> ssp <i>jejuni</i> 1	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> (65,1%)
14	Fezes	<i>C. jejuni</i> ssp <i>jejuni</i> 1	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i> (75,8%)
15	Fezes	<i>C. jejuni</i> ssp <i>jejuni</i> 1	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> (74,3%)
16	Fezes	<i>C. jejuni</i> ssp <i>jejuni</i> 1	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> (74,7%)
17	Fezes	<i>C. jejuni</i> ssp <i>jejuni</i> 1	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> (74,4%)
18	Fezes	<i>C. jejuni</i> ssp <i>doylei</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> (76,8%)
19	Fezes	<i>C. jejuni</i> ssp <i>doylei</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> (98,1%)
20	Carcaça de frango	<i>C. jejuni</i> ssp <i>doylei</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> (69,0%)
21	Carcaça de frango	<i>C. jejuni</i> ssp <i>jejuni</i> 1	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> (98,2%)
22	Carcaça de frango	<i>C. lari</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. jejuni</i> (55,3%)
23	Carcaça de frango	<i>C. jejuni</i> ssp <i>jejuni</i> 1	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i> (75,5%)
24	Carcaça de frango	<i>C. jejuni</i> ssp <i>jejuni</i> 1	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i> (73,8%)
25	Carcaça de frango	<i>C. jejuni</i> ssp <i>jejuni</i> 1	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> (92,0%)
26	Carcaça de frango	<i>C. jejuni</i> ssp <i>jejuni</i> 1	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> (69,8%)
27	Carcaça de frango	<i>C. jejuni</i> ssp <i>jejuni</i> 1	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> (95,2%)
28	Carcaça de frango	<i>C. jejuni</i> ssp <i>jejuni</i> 1	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> (95,1%)
29	Carcaça de frango	<i>C. jejuni</i> ssp <i>doylei</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> (95,8%)
30	Carcaça de frango	<i>C. jejuni</i> ssp <i>jejuni</i> 1	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> (73,9%)
31	Carcaça de frango	<i>C. jejuni</i> ssp <i>jejuni</i> 1	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> (94,9%)
32	Carcaça de frango	<i>C. jejuni</i> ssp <i>jejuni</i> 1	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> (95,0%)
33	Carcaça de frango	<i>C. jejuni</i> ssp <i>jejuni</i> 1	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> (95,2%)
34	Carcaça de frango	<i>C. lari</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. jejuni</i> (88,9%)
35	Carcaça de frango	<i>C. jejuni</i> ssp <i>doylei</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> (90,2%)
36	Carcaça de frango	<i>C. jejuni</i> ssp <i>doylei</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> (92,2%)
37	Carcaça de frango	<i>C. jejuni</i> ssp <i>doylei</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> (69,9%)
38	Carcaça de frango	<i>C. jejuni</i> ssp <i>doylei</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. jejuni</i> (69,8%)
39	Carcaça de frango	<i>C. jejuni</i> ssp <i>jejuni</i> 1	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> (95,2%)
40	Carcaça de frango	<i>C. jejuni</i> ssp <i>jejuni</i> 1	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> (95,1%)
41	Fezes	<i>C. jejuni</i> ssp <i>jejuni</i> 1	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> (93,6%)
42	Fezes	<i>C. jejuni</i> ssp <i>jejuni</i> 1	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> (94,3%)
43	Fezes	<i>C. jejuni</i> ssp <i>jejuni</i> 1	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> (95,8%)

A diferenciação entre *C. jejuni* e *C. coli* é necessária para vigilância epidemiológica e na avaliação de risco porque *C. jejuni* é a espécie mais associada à campilobacteriose humana (VANDAMME, 2000; STEINHAUSEROVA *et al.*, 2001; SAMUELSON *et al.*, 2013). Nos Estados Unidos, *C. jejuni* é responsável por 99,9%

dos casos de campilobacteriose (BESSEDE *et al.*, 2014). Em Luxemburgo, o número de casos de infecção por *C. coli* é maior que a dos Estados Unidos, chegando a uma percentagem de isolamento de 91,9%, sendo que a prevalência de *C. coli* nos casos de campilobacteriose na Europa têm se mantido, nos últimos anos, próximo a 31,9% (EFSA, 2010). Neste estudo 93% dos isolados foram identificados seguramente como *C. jejuni*, indicando que possivelmente essa seja também a espécie mais associada à campilobacteriose no Estado do Paraná e na região Sul do Brasil.

Uma alternativa para a identificação dessas espécies são os métodos moleculares de detecção, que utilizam genes espécie-específicos. Alguns ensaios de PCR já foram padronizados para a diferenciação de *C. jejuni* e *C. coli*, que são as espécies mais frequentes isoladas de infecção humana (STEINHAUSEROVA *et al.*, 2001; ON e JORDAN, 2003). Nakari e colaboradores (2008) realizaram estudo comparativo entre o teste da hidrólise do hipurato e dois ensaios de PCR-multiplex para a diferenciação de isolados de *Campylobacter*, e concluíram que os métodos moleculares deveriam ser usados somente para a identificação de isolados hipurato negativos. No entanto, no presente estudo, a divergência na identificação dos isolados testados ocorreu somente com os isolados hipurato negativos.

A introdução de sistemas de identificação comerciais, como o API Campy®, permitiu que provas fenotípicas fossem realizadas em ensaios miniaturizados padronizados, que possibilitam melhorar a precisão e a reprodutibilidade das técnicas de identificação de *Campylobacter* (KUANA *et al.*, 2009). Nenhuma cepa avaliada pelo sistema API Campy® apresentou perfil inaceitável, sendo que o perfil de identificação obtido para as amostras isoladas resultou na probabilidade de 73,4% a 98,9%.

O sistema API Campy® identificou dois isolados como sendo *C. lari* (22 e 34), porém o sequenciamento não confirmou esta identificação. Nas provas fenotípicas convencionais, a diferenciação dessas espécies é realizada pelo teste adicional da hidrólise do indoxil acetato, que permitiu a identificação dos isolados 22 e 34 como sendo *C. coli*. O uso da resistência ao ácido nalidíxico no sistema API Campy® para a identificação de *C. lari* já foi questionado devido ao isolamento de outras espécies de *Campylobacter* resistentes às quinolonas (HUYSMANS *et al.*, 1995).

Tabela 2 - Identificação das amostras que apresentaram discrepância pelo sistema API Campy®, provas fenotípicas convencionais, sistema Diversilab® e pela técnica de sequenciamento.

N° da amostra	Amostra	API Campy®	Provas fenotípicas	Sistema Diversilab®	Sequenciamento
11	Fezes	<i>C. jejuni</i> spp <i>jejuni</i> 1	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i> ATCC 49941 (81,2%)	<i>C. jejuni</i> (100%)
14	Fezes	<i>C. jejuni</i> spp <i>jejuni</i> 1	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i> ATCC 49941 (75,8%)	<i>C. jejuni</i> (100%)
22	Carcaça de frango	<i>C. lari</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. jejuni</i> ATCC 29428 (55,3%)	<i>C. jejuni/ C. coli</i> (97,1%)
23	Carcaça de frango	<i>C. jejuni</i> spp <i>jejuni</i> 1	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i> ATCC 49941 (75,5%)	<i>C. jejuni</i> (100%)
24	Carcaça de frango	<i>C. jejuni</i> spp <i>jejuni</i> 1	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i> ATCC 49941 (73,8%)	<i>C. jejuni</i> (100%)
34	Carcaça de frango	<i>C. lari</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. jejuni</i> ATCC 29428 (88,9%)	<i>C. jejuni/ C. coli</i> (100%)
38	Carcaça de frango	<i>C. jejuni</i> spp <i>doylei</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. jejuni</i> ATCC 29428 (69,8%)	<i>C. jejuni/ C. coli</i> (100%)

Problemas na identificação de *C. lari* pelo sistema API Campy® também foi relatada anteriormente em estudo realizado por Martiny *et al.* (2010) porque segundo esses autores 40% das cepas destas espécies não puderam ser identificadas adequadamente, além disso, os autores relatam que 22,7% das cepas de *C. coli* foram identificadas erroneamente.

A técnica com menor desempenho na identificação de *Campylobacter* foi o sistema Diversilab®, comprovando que a amplificação das sequências repetitivas do genoma das cepas de *Campylobacter* analisadas não foi adequada para a caracterização dos isolados em estudo pelo reduzido número de perfis de bandas presentes na base de dados.

O sistema Diversilab® utiliza da presença de sequências repetitivas não codificadoras conservadas e dispostas aleatoriamente no genoma na hibridização dos iniciadores. Como resultado, vários produtos de amplificação de DNA de diferentes tamanhos e de diferentes quantidades são gerados durante a PCR. Os fragmentos formados são separados por tamanho e carga através do Agilent 2100

Bioanalyser utilizando um chip microfluído, que realiza a detecção com base na intensidade de fluorescência e tempo de migração. Posteriormente, o software analisa os resultados através da criação de uma matriz de proximidade usando a correlação de *Pearson* para calcular semelhanças entre as amostras testadas com os padrões presentes na base de dados (SHUTT *et al.*, 2005; WILSON *et al.*, 2009; BEHRINGER *et al.*, 2011).

A base de dados utilizada pelo sistema Diversilab® determina que a identificação da espécie de *Campylobacter* é segura quando a percentagem de similaridade com um dos perfis é superior a 95%. Somente 27,9% das amostras analisadas (12/ 43) apresentaram similaridade igual ou superior a 95% a um dos perfis de bandas do banco de dados do sistema Diversilab® e poderiam ser seguramente identificadas (Tabela 1).

Dentre os métodos de identificação avaliados, a prova fenotípica convencional mostrou ser a técnica mais adequada para a identificação da maioria dos isolados (40/43). Os resultados do presente trabalho sugerem que o uso das provas fenotípicas convencionais para a identificação das espécies de *Campylobacter* é adequado para isolados hipurato positivos. Quando os isolados não hidrolisaram o hipurato, não foi possível identificar a espécie, mesmo após o sequenciamento.

Referências

BESSEDE, E.; LEHOURS, P.; LABADI, L.; BAKIRI, S.; MEGRAUD, F. Comparison of characteristics of patients infected by *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter fetus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, p. 328-330, 2014.

BEHRINGER, M.; MILLER, W.G.; OYARZABAL, O.A. Typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from live broilers and retail broiler meat by flaA-RFLP, MLST, PFGE and REP-PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v. 84, p. 194-201, 2011.

DEVULDER, G.; PERRIÈRE, G.; BATY, F.; FLANDROIS, J.P. BIBI, a bioinformatics bacterial identification tool. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, p. 1785 – 1787, 2003.

EFSA (European Food Safety Authority). The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007. **The EFSA Journal**, p. 223, 2009.

EFSA (European Food Safety Authority). Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and

Salmonella on broiler carcasses in the EU, 2008. **The EFSA Journal**, v. 8: 1503, 1-100, 2010.

EUZÉBY, J.P. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - Genus *Campylobacter*. Disponível em: <http://www.bacterio.net/campylobacter.html>. Acesso em: 05 de março de 2014.

GORKIEWICZ, G.; FEIERL, G.; SCHOBER, C.; DIEBER, F., KOFER, J.; ZECHNER, R.; ZECHNER, EL. Species-Specific Identification of *Campylobacters* by Partial 16S rRNAGene Sequencing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 2537–2546, 2003.

HEALY, M.; HUONG, J.; BITTNER, T.; LISING, M.; FRYE, S.; RAZA, S.; SCHROCK, R.; MANRY, J.; RENWICK, A.; NIETO, R.; WOODS, C.; VERSALOVIC, J.; LUPSKI, J.R. Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 199–207, 2005.

HUYSMANS, M.B.; TURNIDGE, J.D.; WILLIAMS, J.H. Evaluation of API Campy in comparison with conventional methods for identification of thermophilic *Campylobacters*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p. 3345–3346, 1995.

International Organization for Standardization (ISO). ISO 10272 Microbiology of Food and Animal Feeding Stuff - Horizontal Method for Detection and Enumeration of *Campylobacter* spp. - Part 1: Enrichment Method; Part 2: Enumeration Method. ISO, Geneva, Switzerland; 2006.

KUANA, S.L., SANTOS, L.R., RODRIGUES, L.B.; NASCIMENTO, V.P. Sistema API Campy para caracterização de amostras de *Campylobacter* isoladas de descarga cecal, fezes, *swabs* cloacais e carcaças de frangos de corte. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.76, p.273-277, 2009.

MARINO, I.; BERSIMIS, S.; IOANNIDIS, A.; NICOLAOU, C.; MITROUSSIA-ZIOUVA, A.; LEGAKIS, J.L.; CHATZIPANAGIOTOU. S. Identification and antimicrobial resistance of *Campylobacter* species isolated from animal sources. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1-6, 2012.

MARTINY, D.; DEDISTE, A.; DEBRUYNE, L.; VLAES, L.; HADDOU, N.B.; VANDAMME, P.; VANDENBERG, O. Accuracy of the API Campy system, the Vitek 2 *Neisseria*–*Haemophilus* card and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for the identification of *Campylobacter* and related organisms. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, p. 1001–1006, 2010.

NAKARI, U.M.; PUHAKKA, A.; 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 and Infectious Diseases**, v. 27, p. 513–518, 2008.

ON, S.L.W. Identification methods for campylobacters, helicobacters and related organisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v.9, p.405-422, 1996.

ON, S.L.W, JORDAN, P.J. Evaluation of 11 PCR assays for specieslevel identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 330–336, 2003.

ROSSI, M.; DEBRUYNE, L.; ZANONI, R.G.; MANFREDA, G.; REVEZ, J.; VANDAMME, P. *Campylobacter avium* sp. nov., a hippurate-positive species isolated from poultry. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 2364- 2369, 2009.

SAMUELSON, D.R.; EUCKER, T.P.; BELL, J.A.; DYBAS, L.; MANSFIELD, L.S.; KONKEL, M.E. The *Campylobacter jejuni* CiaD effector protein activates MAP kinase signaling pathways and is required for the development of disease. **Cell Communication and Signaling**, v. 11, p. 2-15, 2013.

SepsiTest BLAST—identification by 16S/18S rDNA sequence analysis. Disponível em: <http://www.sepsitest-blast.de/en/index.html>. Acesso em: 29 de janeiro de 2013.

SHUTT, C.K.; POUNDER, J.I.; PAGE, S.R.; SCHAECHER, B.J.; WOODS, G.L. Clinical evaluation of the Diversilab microbial typing system using repetitive-sequence-based PCR for characterization of *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 1187-1192, 2005.

STEINHAUSEROVA, I.; CESKOVA, J.; FOJTIKOVA, K.; OBROVSKA, I. Identification of thermophilic *Campylobacter* spp. by phenotypic and molecular methods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p.470–475, 2001.

WILSON, M.K.; LANE, A.B.; LAW, B.F.; MILLER, W.G.; JOENS, L.A.; KONKEL, M.E.; WHITE, B.A. Analysis of the pan genome of *Campylobacter jejuni* isolates recovered from poultry by pulsed-field gel electrophoresis, multilocus sequence typing (MLST), and repetitive sequence polymerase chain reaction (rep-PCR) reveals different discriminatory capabilities. **Microbial Ecology**, v. 58, p. 843-844, 2009.

VANDAMME, P. Taxonomy of the family *Campylobacteraceae*. In *Campylobacter* ed. Nachamkin, I. and Blaser, M.J. pp. 3-27, 2000.

ARTIGO 4

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES ALÍQUOTAS DA ENXAGUADURA NO MÉTODO DIRETO ISO 10272-2 PARA A CONTAGEM DE *Campylobacter* spp. EM CARÇAÇAS DE FRANGO

RESUMO: O objetivo do presente estudo foi avaliar diferentes volumes de enxaguadura de carne de frango com a finalidade de minimizar a interferência da microbiota contaminante no isolamento e contagem de *Campylobacter* spp., sem comprometer a sensibilidade do método direto ISO 10272-2. A estratégia de utilização de volumes menores que 100 µL de enxaguadura, no entanto, não melhorou o isolamento e a contagem de colônias de *Campylobacter*. Esses resultados, portanto, confirmam que o volume de enxaguadura mais adequado para o método direto é o de 100 µL, como o preconizado na metodologia ISO 10272-2. Assim, uma provável solução para minimizar a interferência da microbiota contaminante seria desenvolver novos meios seletivos ou incorporar aos já existentes outros antimicrobianos.

Palavras-chave: *Campylobacter* spp., quantificação, ISO 10272-2, carcaça de frango refrigerada.

1. Introdução

A alta prevalência de *Campylobacter* spp. em frangos de corte levou à necessidade de implementação de estratégias para impedir a contaminação da carne de frango por esse patógeno, em todos os níveis da cadeia de produção. A detecção e enumeração de *Campylobacter* spp. em carne de frango são essenciais para reduzir os riscos de contaminação (AHMED; LEÓN-VELARDE; ODUMERU, 2012).

Um aumento no isolamento de *Campylobacter* spp. em frango tem sido observado na Europa nos últimos anos. As percentagens de isolamento, no entanto, são muito diferentes entre os países, provavelmente, devido ao tipo de inspeção realizada pelos sistemas de saúde ou pelos órgãos de vigilância dos países que compõe a Comunidade Européia. Essas diferenças nas percentagens de isolamento poderiam estar também relacionadas com as metodologias de isolamento utilizadas (EFSA, 2012).

Campylobacter spp. são micro-organismos fastidiosos que requerem temperatura de crescimento e meios de cultivo seletivos específicos, além de atmosfera de incubação em microaerofilia. A quantificação de *Campylobacter* spp. em carne de frango é necessária nas avaliações de risco que exige métodos quantitativos confiáveis. A quantificação deve ser realizada antes do enriquecimento (método direto) com a sementeira da enxaguadura da carne de frango em meios seletivos específicos. O volume da enxaguadura utilizado poderá levar a prejuízos na quantificação desse patógeno (HUTCHISON *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2012).

Muitos estudos associaram as dificuldades na contagem de *Campylobacter* em carne de frango à sua baixa competitividade frente à microbiota contaminante e à incapacidade dos agentes antimicrobianos adicionados aos meios seletivos de eliminar esta contaminação (HUNT *et al.*, 2001; HABIB *et al.*, 2008; JASSON *et al.*, 2009). Além da interferência da microbiota contaminante da carne de frango, é comum verificar colônias de *Campylobacter* sobrepostas umas às outras, assim como, espalhadas sobre o Ágar mCCDA o que torna difícil a contagem de colônias (STERN; LINE e CHEN, 2001).

Algumas discussões nos últimos 10 anos têm sido realizadas sobre a melhor metodologia para detecção de *Campylobacter* a partir de carne de frango, incluindo opiniões controversas sobre o método direto ISO 10272-2, que é recomendado para

o isolamento e contagem de *Campylobacter* spp. em alimentos (OLIVEIRA, BARBUT e GRIFFITHS, 2005; ISO, 2006; RICHARDSON *et al.*, 2009). Embora vários métodos tenham sido desenvolvidos nos últimos 30 anos, não existe um consenso sobre qual metodologia seria a mais adequada para garantir a sensibilidade e a reprodutibilidade dos resultados (OYARZABAL e HUSSAIN, 2010).

O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes volumes de enxaguadura de carne de frango com a finalidade de minimizar a interferência da microbiota contaminante no isolamento e contagem de *Campylobacter* spp., sem comprometer a sensibilidade do método direto ISO 10272-2.

2. Materiais e Métodos

2.1 Amostragem

Quarenta amostras de carcaças de frango resfriadas produzidas no Estado do Paraná foram coletadas na sua embalagem original em diferentes estabelecimentos comerciais da cidade de Curitiba, Paraná. As amostras foram representativas de 8 marcas diferentes, com 5 unidades amostrais cada. Após a coleta as amostras foram encaminhadas sob refrigeração ao laboratório e analisadas ao seu recebimento.

Após a retirada asséptica da embalagem original, dos miúdos, dos pés e da cabeça, as carcaças foram pesadas e colocadas em sacos estéreis. O enxágue das carcaças foi realizado com adição de água peptonada tamponada a 0,1% (Oxoid, Inglaterra) na proporção de 1 mL para cada grama de peso da carcaça, com fricção de toda a superfície do frango por aproximadamente dois minutos. Alíquotas da enxaguadura foram utilizadas para os testes de detecção e de enumeração de *Campylobacter* spp. (ANEXO 3)

2.2 Método Direto de Detecção e Contagem de *Campylobacter* (ISO 10272-2:2006)

Alíquotas de 400, 100, 50, 10 e 5µL da enxaguadura foram semeadas em duplicata para placas de Ágar carvão cefoperazona desoxicolato modificado (mCCDA) (CM 739) (Oxoid, Inglaterra), suplementado com cefoperazone (16.0mg/L) e anfotericina B (5.0mg/L) (SR 155E) (Oxoid, Inglaterra) e para placas de Ágar Bolton modificado, preparado conforme descrito por Franchin, Aidoo e Batista (2005). As placas foram incubadas a 37°C durante 4 horas com posterior incubação a 41,5 ± 0,5°C por 48 horas em microaerofilia por injeção de atmosfera modificada (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂) (Air liquide, Brasil) durante 20 segundos.

A confirmação da morfologia típica de *Campylobacter* foi realizada ao microscópio em preparações à fresco das colônias típicas coradas com solução de azul de metileno 1% (Laborclin, Brasil) e coloração de gram (Laborclin, Brasil). As colônias que apresentaram morfologia característica foram reisoladas em Ágar Tripticase de Soja (TSA) suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado (Newprov, Brasil), incubado a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 e 48 horas sob microaerofilia. As provas de catalase e oxidase foram realizadas a partir de colônias isoladas.

A identificação fenotípica foi realizada com as provas de catalase, oxidase, hidrólise hipurato, indoxil acetato, e avaliação da sensibilidade ao ácido nalidíxico e cefalotina (Oxoid, Inglaterra). Paralelamente, foi realizada a identificação empregando o sistema API Campy® (Biomérieux, França) de acordo com as instruções do fabricante, e confirmadas em nível de gênero por PCR (reação de cadeia polimerase) em Tempo Real.

A quantificação foi realizada considerando o volume da enxaguadura empregado, de acordo com as seguintes equações: $Q = n \times 2,5$, quando utilizado a alíquota de 400 μL , $Q = n \times 10$, $Q = n \times 20$, $Q = n \times 100$, $Q = n \times 200$, para as alíquotas respectivas de 100, 50, 10 e 5 μL , onde n corresponde ao número total de colônias características presentes na placa com confirmação fenotípica. O resultado foi expresso em UFC/g.

2.3 Identificação molecular do gênero *Campylobacter* por PCR em Tempo Real

A identificação molecular do gênero *Campylobacter* nos isolados identificados bioquimicamente foi realizada por PCR em Tempo Real, utilizando o método TaqMan. A extração do DNA foi realizada utilizando o sistema reagente NewGene Prep e NewGene Preamp, disponibilizado pela Simbios Tecnologia (Canoas, Brasil). As amplificações por PCR em Tempo Real foram realizadas em um volume final de aproximadamente 30 μL contendo 28 μL de TaqMan Kit Master Mix *Campylobacter* (Simbios Tecnologia, Brasil) este composto por tampão, dNTP's, água ultrapura, *primers* e sonda, 0,32 μL de Taq polimerase e 2 μL de DNA. As condições de reação foram: aquecimento a 95 $^\circ\text{C}$ durante 3 minutos, 40 repetições de 95 $^\circ\text{C}$ por 15 segundos e 60 $^\circ\text{C}$ por 1 minuto. Em todas as reações de PCR foram utilizados DNA de *C. jejuni* ATCC 33291, como controle positivo, e água ultrapura e tampão do Kit Master Mix com a enzima Taq polimerase, como controles negativos. As leituras da fluorescência foram realizadas pelo equipamento 7300 Real-Time PCR (Applied

Biosystems, EUA) a cada ciclo de amplificação e, posteriormente, analisadas pelo Sequence Detection Software (SDS) v 1.3 (Applied Biosystems, EUA).

2.4 Análise estatística

A análise estatística das contagens de colônias de *Campylobacter* em função dos volumes de enxaguadura foi realizada pela análise de variância modelo inteiramente casualizado e teste de Tukey para classificação das médias, com a utilização do pacote estatístico Statistica 10.0 (StatSoft). O nível de significância considerado foi $p < 0,05$.

3. Resultados e Discussão

No presente trabalho, 12 (30,0%) das 40 amostras de carne de frango analisadas estavam foram positivas para *Campylobacter* spp. pelo método direto, quando volumes de 400 e 100 μL de enxaguadura foram utilizados. Todas as colônias com morfologia típica de *Campylobacter* foram identificadas como pertencentes ao gênero *Campylobacter* pelas provas fenotípicas e pela PCR em Tempo Real.

Embora tenha sido possível a detecção de *Campylobacter* em 12 amostras, apenas em seis (50%) e em duas amostras (16,7%) foi possível realizar a contagem de colônias quando volumes de 100 μL e de 400 μL de enxaguadura foram utilizados, respectivamente. Nos demais volumes, 50, 10 e 5 μL , somente foi possível a detecção e quantificação em 4 (33,3%), 3 (25,0%) e 1 (8,3%) das 12 amostras positivas, respectivamente. Essas contagens mostraram diferenças estatisticamente distintas das contagens com volumes de 100 μL e de 400 μL da enxaguadura.

A diminuição do volume de enxaguadura facilitou a contagem, porque houve menor interferência da microbiota contaminante no desenvolvimento de *Campylobacter*, porém a diminuição do volume também diminuiu consideravelmente a sensibilidade do método direto em todas as amostras.

As contagens de colônias de *Campylobacter* obtidas nas doze amostras de carne de frango positivas analisadas, utilizando os volumes de enxaguadura de 100 e 400 μL , estão apresentadas na tabela 1. Em várias placas as colônias estavam confluentes, o que impossibilitou a contagem.

Tabela 1 - Resultados das contagens de *Campylobacter* pelo método direto (ISO 10272-2), utilizando 100 e 400 µL da enxaguadura da carcaça de frango.

Amostras positivas	Método Direto (UFC/g)	
	400µL	100µL
01	$> 6,5 \times 10^2$	$> 2,5 \times 10^3$
03	$> 6,5 \times 10^2$	$1,4 \times 10^2$
12	$> 6,5 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$
15	$> 6,5 \times 10^2$	$8,0 \times 10^2$
18	$> 6,5 \times 10^2$	$> 2,5 \times 10^3$
20	$> 6,5 \times 10^2$	$> 2,5 \times 10^3$
23	$> 6,5 \times 10^2$	$1,1 \times 10^3$
27	$2,5 \times 10^1$	$6,0 \times 10^1$
29	$2,3 \times 10^2$	$1,3 \times 10^2$
30	$> 6,5 \times 10^2$	$> 2,5 \times 10^3$
31	$> 6,5 \times 10^2$	$> 2,5 \times 10^3$
34	$> 6,5 \times 10^2$	$> 2,5 \times 10^3$

A dificuldade na contagem de *Campylobacter* spp. em carne de frango tem sido relacionada à sua baixa competitividade frente a microbiota contaminante e à incapacidade dos agentes antimicrobianos utilizados nos meios seletivos de inibir essa microbiota. A estratégia de utilização de volumes menores que 100 µL de enxaguadura, no entanto, não melhorou o isolamento e a contagem de colônias de *Campylobacter*. Esses resultados, portanto, confirmam que o volume de enxaguadura mais adequado para o método direto é o de 100 µL, como o preconizado na metodologia ISO 10272-2. Franchin, Ogliari e Batista (2007), no entanto, propuseram também o cultivo de 400 µL de enxaguadura porque, segundo a experiência desses autores, muitas amostras de carne de frango apresentam contaminação baixa de *Campylobacter*, que só podem ser quantificadas se volumes maiores forem utilizados.

O método direto ISO 10272-2 preconiza o uso do Ágar mCCDA e em um segundo meio de cultura a escolha do analista. No presente trabalho, foi escolhido como segundo meio de cultura o Ágar Bolton modificado. A cor escura do mCCDA, a coloração acinzentada das colônias de *Campylobacter* e as bordas das colônias

pouco definidas nesse meio dificultam a visualização e a distinção entre colônias típicas e atípicas. Esse fato exigiu a necessidade de realizar a avaliação das características morfológicas das colônias de todas as placas. Essa dificuldade já havia sido previamente descrita por Habib, Uyttendaele e De Zutter (2011) e Franchin, Aidoo e Batista (2005). O uso de Ágar Bolton modificado foi preconizado por Franchin, Aidoo e Batista (2005), pois a triagem das colônias de *Campylobacter* termofílicas nesse meio é facilitada, uma vez que, as colônias típicas apresentam bordas bem definidas de coloração marrom sob um fundo claro devido a capacidade de *Campylobacter* reduzir o corante 2,3,5 – trifeniltetrazólio, presente no meio de cultura. No presente trabalho, embora colônias típicas de *Campylobacter* tenham sido melhor observadas no meio de Ágar Bolton, foi necessária também a confirmação morfológica das colônias de todas as placas.

O Ágar Bolton não mostrou frequência maior de isolamento, apesar de permitir uma melhor visualização das colônias de *Campylobacter*. Sete das doze amostras positivas foram identificadas exclusivamente pelo Ágar mCCDA e três pelo Ágar Bolton, sendo que duas amostras foram positivas para ambos os meios. Assim sendo, a necessidade de se utilizar no mínimo dois diferentes meios seletivos para o isolamento de *Campylobacter* foi confirmada no presente trabalho porque o isolamento em algumas amostras foi possível em apenas um dos meios de cultura.

O método direto de detecção e contagem de *Campylobacter* em carne de frango é de fácil execução, considerada uma ferramenta útil no controle de *Campylobacter*, que pode ser utilizada nas indústrias e nos laboratórios oficiais que dão suporte aos órgãos de vigilância sanitária. Esse método, no entanto, precisa de adequações. Neste trabalho ficou provado que a diminuição do volume de enxaguadura não pode ser utilizada porque diminui consideravelmente a sensibilidade do método. Uma provável solução para minimizar a interferência da microbiota contaminante seria desenvolver novos meios seletivos ou incorporar aos já existentes outros antimicrobianos de forma a solucionar ou minimizar esse problema.

Referências

AHMED, R.; LEÓN-VELARDE, C.G.; ODUMERU, J.A. Evaluation of novel agars for the enumeration of *Campylobacter* spp. in poultry retail samples. **Journal of Microbiological Methods**, v. 88, p. 304-310, 2012.

EFSA. European Food Safety Authority. Scientific report of EFSA and ECDC. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. **The EFSA Journal**, v.10, p. 1-442, 2012.

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.

FRANCHIN, P.R.; OGLIARI, P.J.; BATISTA, C.R.V. Frequency of thermophilic *Campylobacter* in broiler chickens during industrial processing in a Southern Brazil slaughterhouse. **British Poultry Science**, v.48, p. 127-132, 2007.

HABIB, I.; SAMPERS, I.; UYTENDAELE, M.; BERKVEN, D.; ZUTTER, L.D. Performance characteristics and estimation of measurement uncertainty of three plating procedures for *Campylobacter* enumeration in chicken meat. **Food Microbiology**, v. 25, p. 65-74, 2008.

HABIB, I.; UYTENDAELE, M.; DE ZUTTER, L. Evaluation of ISO 10272:2006 standard versus alternative enrichment and plating combinations for enumeration and detection of *Campylobacter* in chicken meat. **Food Microbiology**, v. 28, p. 1117-1123, 2011.

HUNT, J.M.; ABEYTA, C.; TRANT, T. *Campylobacter* In: Bacteriological manual online. 8.ed. Revision A. Washington, DC: **Center for Food Safety and Applied Nutrition**, FDA. Cap.7, 2001.

HUTCHISON, M.L.; WALTERS, L.D.; ALLEN, V.M.; MEAD, G.C.; HOWELL, M. Measurement of *Campylobacter* numbers on carcasses in British poultry slaughterhouses. **Journal of Food Protection**, v. 69, p. 421–424, 2006.

ISO. International Organization for Standardization - ISO 10272 Microbiology of Food and Animal Feeding Stuff - Horizontal Method for Detection and Enumeration of *Campylobacter* spp. - Part 2: Enumeration Method. ISO, Geneva, Switzerland, 2006.

JASSON, V.; SAMPERS, I.; BOTTELDOORN, N.; LÓPEZ-GÁLVEZ, F.; BAERT, L.; DENAYER, S.; RAJKOVIC, A.; HABIB, I.; DE ZUTTER, L.; DEBEVERE, J.; UYTENDAELE, M. 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.

OLIVEIRA, T.C.R.M.; BARBUT, S.; GRIFFITHS, M.W. A robotic DNA purification protocol and real-time PCR for the detection of *Campylobacter jejuni* in foods. **Journal of Food Protection**, v.68, p.2131-2135, 2005.

OYARZABAL, O.A.; HUSSAIN, S.K. Chapter 36 – Microbial Analytical Methodology for Processed Poultry Products. In: *Handbook of Poultry Science and Technology, Volume 2: Secondary Processing*, Edited by Isabel Guerrero-Legarreta and Y.H. Hui. pp. 527-544, 2010.

RICHARDSON, L.J.; COX, N.A.; BAILEY, J.S.; BERRANG, M.E.; COX, J.M.; BUHR, R.J.; FEDORKA-CRAY, P.J.; HARRISON, M.A. Evaluation of TECRA broth, Bolton broth, and Direct Plating for recovery of *Campylobacter* spp. from Broiler Carcass Rinsates from Commercial Processing Plants. **Journal of Food Protection**, v. 72, p. 972-977, 2009.

SANTOS, M.R.M.; SÁEZ, A.C.; MARTEACHE, A.H.; LÓPEZ, A.M. Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) on the control strategies to reduce the burden of *Campylobacter* spp. in fresh poultry meat (broiler). **Revista del Comité Científico de la AESAN**, v. 16, p. 21-55, 2012.

STERN, N.J.; LINE, J.E.; CHEN, H.C. *Campylobacter*. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. eds **Compendium of methods for the microbiology examination of foods**. 4 ed. Washington: American Public Health Association, p. 301-310, 2001.

RESUMO EXPANDIDO 1

DETECÇÃO DE *Campylobacter* spp. EM CARNE DE FRANGO, ANTES E APÓS DO ENRIQUECIMENTO, POR PCR EM TEMPO REAL

A PCR em Tempo Real tem sido considerada um método promissor para a detecção e a quantificação de micro-organismos patogênicos em alimentos (MALORNY *et al.*, 2008). A PCR em Tempo Real oferece algumas vantagens em relação aos métodos convencionais, tais como, rapidez e capacidade de detecção de pequenas quantidades do DNA alvo. A quantificação de *Campylobacter* em carne de frango por PCR em Tempo Real é realizada no enxágue, antes do enriquecimento da amostra, no entanto, os resultados não são confiáveis quando pequenas quantidades de bactérias estão presentes nas amostras (MEDEIROS *et al.*, 2012). A PCR em Tempo Real é extremamente sensível quando o DNA alvo é extraído de culturas puras, contudo a presença de inibidores da PCR que podem estar presentes nas matrizes alimentares diminuem a sensibilidade por aumentar o limite de detecção e prejudicar a eficiência da amplificação (GARCIA *et al.*, 2013; HEDMAN e RADSTROM, 2013).

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência da PCR em Tempo Real na detecção de *Campylobacter* spp. na enxaguadura de carne de frango antes e após o enriquecimento em caldo Bolton. Os resultados da PCR em Tempo Real foram comparados com os resultados obtidos com a metodologia convencional (ISO 10272: 2006).

Sessenta amostras de carcaças de frango resfriadas foram analisadas pelo método de enriquecimento e de cultura direto, descritos, respectivamente, pela ISO 10272-1 e ISO 10272-2. Paralelamente, 1 mL da enxaguadura e 1 mL do caldo Bolton foram analisados pela PCR em Tempo Real. A metodologia de extração e amplificação do DNA foi realizada como descrito por Biasi *et al.* (2011).

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 1. Das 60 amostras analisadas, 34 (58,4%) foram positivas para *Campylobacter* pela PCR em Tempo Real após o enriquecimento, 11 (18,4%) amostras foram positivas pelo método tradicional de cultura antes do enriquecimento. Pelo método tradicional de cultura uma (1,7%) amostra foi positiva pelo método direto, e três (5,0%) pelo método de enriquecimento.

A concordância dos resultados obtidos pela PCR em Tempo Real na detecção de *Campylobacter* antes e após o enriquecimento foi de 60%. Em nenhuma amostra, *Campylobacter* foi detectado somente na enxaguadura sem enriquecimento.

Todas as amostras positivas para a PCR antes do enriquecimento apresentaram valores de CT (*Cycle Threshold*) acima de 30, porém resultados negativos no método direto de cultura. Os valores de CT dessas amostras foram semelhantes ou superiores aos obtidos após o enriquecimento, indicando, que provavelmente as células de *Campylobacter* estavam na forma viável não cultivável (VCN) ou mortas.

Não foi isolado *Campylobacter* pelo método direto de cultura na maioria das amostras positivas para a PCR após o enriquecimento, indicando que, provavelmente, a contaminação era baixa e houve a necessidade da multiplicação celular para alcançar o limite de detecção da PCR de $1,5 \times 10^3$ UFC/g, as células, neste caso, possivelmente estavam viáveis e se multiplicaram no meio.

Os dados apresentados mostram que após o enriquecimento das amostras a PCR em Tempo Real é uma técnica confiável para a detecção de *Campylobacter* spp. em carne de frango.

Referências

BIASI, R.S.; MACEDO, R.E.F.; MALAQUIAS, M.A.S.; FRANCHIN, P.R. Prevalence, strain identification and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. isolated from slaughtered pig carcasses in Brazil. **Food Control**, v. 22, p. 702 – 707, 2011.

GARCIA, A.B.; KAMARA, J.N.; VIGRE, H.; HOORFAR, J.; JOSEFSEN, M.H. Direct Quantification of *Campylobacter jejuni* in Chicken Fecal Samples Using Real-Time PCR: Evaluation of Six Rapid DNA Extraction Methods. **Food Analytical Methods**, v. 6, p. 1728–1738, 2013.

HEDMAN, J.; RADSTROM, P. Overcoming inhibition in real-time diagnostic PCR. **Methods in molecular biology**, v. 943, p. 17–48, 2013.

ISO. International Organization for Standardization. ISO 10272 Microbiology of Food and Animal Feeding Stuff - Horizontal Method for Detection and Enumeration of *Campylobacter* spp. - Part 1: Enrichment Method; Part 2: Enumeration Method. ISO, Geneva, Switzerland, 2006.

MALORNY, B.; LOFSTROM, C.; WAGNER, M.; KRAMER, N.; HOORFAR, J. Enumeration of *Salmonella* bacteria in food and feed samples by real-time PCR for

quantitative microbial risk assessment. **Applied Environmental Microbiology**, v. 74, p. 1299–1304, 2008.

MEDEIROS, V.M.; BRICIO, S.M.L.; FILGUEIRAS, A.L.L.; CLEIMENTINO, B.M. Use of Bolton for selective enrichment and comparative analysis of its performance with direct plating methodology for isolating *Campylobacter* spp. from chilled chicken carcasses. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.71, p. 456-461, 2012.

Tabela 1 - Resultados positivos de *Campylobacter* spp. identificados pelos métodos de cultura e pela PCR em Tempo Real antes e após o enriquecimento.

Amostras Positivas	Método de cultura		PCR em Tempo Real	
	ISO 10272-2 (2006)	ISO 10272-1 (2006)	Antes do Enriquecimento	Após o enriquecimento
01	-	-	+ (CT: 31,60)	+ (CT: 28,36)
02	-	-	+ (CT: 34,22)	+ (CT: 29,79)
45	-	-	+ (CT: 33,59)	+ (CT: 35,00)
49	-	-	+ (CT: 34,25)	+ (CT: 32,24)
53	-	-	+ (CT: 32,77)	+ (CT: 30,04)
11	-	-	+ (CT: 33,00)	+ (CT: 25,90)
51	-	-	+ (CT: 32,21)	+ (CT: 34,55)
34	-	-	-	+ (CT: 16,83)
06	-	-	-	+ (CT: 21,29)
08	-	-	-	+ (CT: 22,88)
09	-	-	-	+ (CT: 19,00)
10	-	-	-	+ (CT: 15,76)
14	-	-	-	+ (CT: 23,24)
17	-	-	-	+ (CT: 20,99)
23	-	-	-	+ (CT: 25,11)
38	-	-	-	+ (CT: 20,04)
39	-	-	-	+ (CT: 19,46)
48	-	+	-	+ (CT: 17,26)
50	-	+	-	+ (CT: 14,47)
52	-	-	+ (CT: 31,65)	+ (CT: 29,43)
18	+	-	-	+ (CT: 27,27)
22	-	-	-	+ (CT: 29,42)
35	-	-	+ (CT: 30,09)	+ (CT: 29,31)
40	-	-	+ (CT: 32,68)	+ (CT: 30,04)
47	-	-	+ (CT: 34,88)	+ (CT: 32,09)
03	-	-	-	+ (CT: 33,99)
13	-	-	-	+ (CT: 25,07)
16	-	-	-	+ (CT: 25,86)
26	-	-	-	+ (CT: 33,08)
30	-	-	-	+ (CT: 25,69)
31	-	-	-	+ (CT: 30,18)
36	-	-	-	+ (CT: 33,40)
44	-	-	-	+ (CT: 31,69)
60	-	+	-	+ (CT: 26,53)

CT: *Cycle Threshold* (Valor quantitativo correspondente ao ciclo de amplificação)

+: Amostra positiva para *Campylobacter* spp.

-: Amostra negativa para *Campylobacter* spp.

RESUMO EXPANDIDO 2

GENOTIPAGEM E ANTIBIOGRAMA DE ISOLADOS DE *Campylobacter* spp. PROCEDENTES DE AMOSTRAS CLÍNICAS E DE ALIMENTOS DO SUL DO BRASIL

O objetivo do presente estudo foi verificar a diversidade genética e sensibilidade aos antimicrobianos de diferentes cepas de *Campylobacter* spp. isoladas de alimentos e de material biológico humano, com a finalidade de estabelecer a ligação entre os genótipos e a origem dos isolados no mesmo período de tempo. Para a genotipagem utilizou-se a técnica semi-automatizada Diversilab® (Biomerieux) que se baseia na técnica de sequências repetitivas de DNA (REP-PCR). O perfil de sensibilidade a antimicrobianos foi realizado pela técnica de disco difusão de Kirby-Bauer (BAUER *et al.*, 1966).

Um total de 43 cepas de *Campylobacter* foram avaliadas, sendo 21 isoladas de carcaças de frango, produzidas nos estados da região Sul do Brasil, e 22 de fezes humanas, procedentes de diferentes municípios do Estado do Paraná. As cepas de fezes foram coletadas entre os anos de 2006 a 2011, sendo as cepas de carcaças de frango isoladas em 2011.

Doze antibióticos foram testados, de acordo com recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2011): AMC (amoxicilina + ác. clavulânico, 10 µg), AMP (ampicilina, 10 µg), KF (cefalotina, 30 µg), CTX (cefotaxima, 30 µg), CIP (ciprofloxacina, 5 µg), C (cloranfenicol, 30 µg), CN (gentamicina, 10 µg), NA (ácido nalidíxico, 30 µg), TE (tetraciclina, 30 µg), TOB (tobramicina, 10 µg), E (eritromicina, 5 µg), MEM (meropenem, 10 µg) (Becton Dikson, Sparks, USA). A interpretação dos resultados obtidos seguiu os padrões interpretativos descritos pela norma M100 S21 para *Enterobacteriaceae* (CLSI, 2011).

Vinte e três genótipos distribuídos em 14 grupos foram obtidos na análise de 43 isolados de *Campylobacter* estudados (Figura 1). No grupo 8 foi encontrado o genótipo mais frequente. Nove cepas apresentavam padrão 17 e foram incluídas no grupo 8. Essas cepas foram genotipicamente indiscrimináveis e apresentavam similaridade superior a 95%. Nesse grupo 8 foram identificadas cepas isoladas de fezes humanas e de carcaças de frango, coletadas entre os anos de 2008 a 2011.

Cepas genotipicamente indistinguíveis também foram identificadas entre as cepas isoladas de alimentos e de fezes humanas do grupo 3, coletadas no ano de 2011. A semelhança genotípica dos dois isolados de carcaças de frango (35 e 36) e

dos isolados de fezes humanas (16, 17 e 18), sugere uma provável correlação epidemiológica (Tabela 1). Para avaliar a similaridade entre os isolados realizou-se a análise do perfil de resistência e sensibilidade a antimicrobianos, e em três isolados (17, 18 e 35) identificou-se sensibilidade aos 12 antimicrobianos testados. Esses isolados foram coletados em julho de 2011, na região do norte do Estado Paraná. Considerando que informações adicionais seriam necessárias, não pode ser afirmado que os isolados analisados estão envolvidos em um evento de surto, contudo, os dados apresentados dão suporte para futura investigação epidemiológica.

Na avaliação do perfil de resistência antimicrobiana 32 dos 43 isolados de *Campylobacter* (74,4%) eram resistentes a pelo menos um antimicrobiano. Um total de 6,9% (n=3) foi resistente a 2 antibióticos, e 16,3% (n=7) resistente a 5 antibióticos. As maiores frequências de resistência foram verificadas para cefalotina, ciprofloxacina, tetraciclina e ácido nalidíxico. Dos isolados de carcaças de frango, somente 9,5% (n=2) apresentaram sensibilidade a todos os antibióticos testados.

Dos isolados de fezes humanas, 45,5% (n=10) apresentaram sensibilidade a todos os antibióticos testados, 40,9% (n=9) apresentaram resistência a ciprofloxacina e 13,6% (n=3) a tetraciclina.

O presente trabalho mostra a ocorrência de cepas resistentes, estas podem causar falha no tratamento clínico, limitando as opções terapêuticas tanto na medicina veterinária como humana, quando há necessidade de tratamento (PEZZOTTI *et al.*, 2003).

Os resultados do presente estudo identificaram correlação entre a similaridade genética e o perfil de sensibilidade a antimicrobianos de alguns isolados analisados, dados estes que poderão facilitar o desenvolvimento de estratégias de intervenção para o controle e prevenção da campilobacteriose.

Referências

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) **Performance Standards for Antimicrobial Testing**, 21^o Informational Supplement, M100 S21, 31, 2011.

PEZZOTTI, G.; SERAFIN, A.; LUZZI, I.; MIONI, R.; MILAN, M.; PERIN, R. Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in animals ad meat in northeastern Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, p. 281-287, 2003.

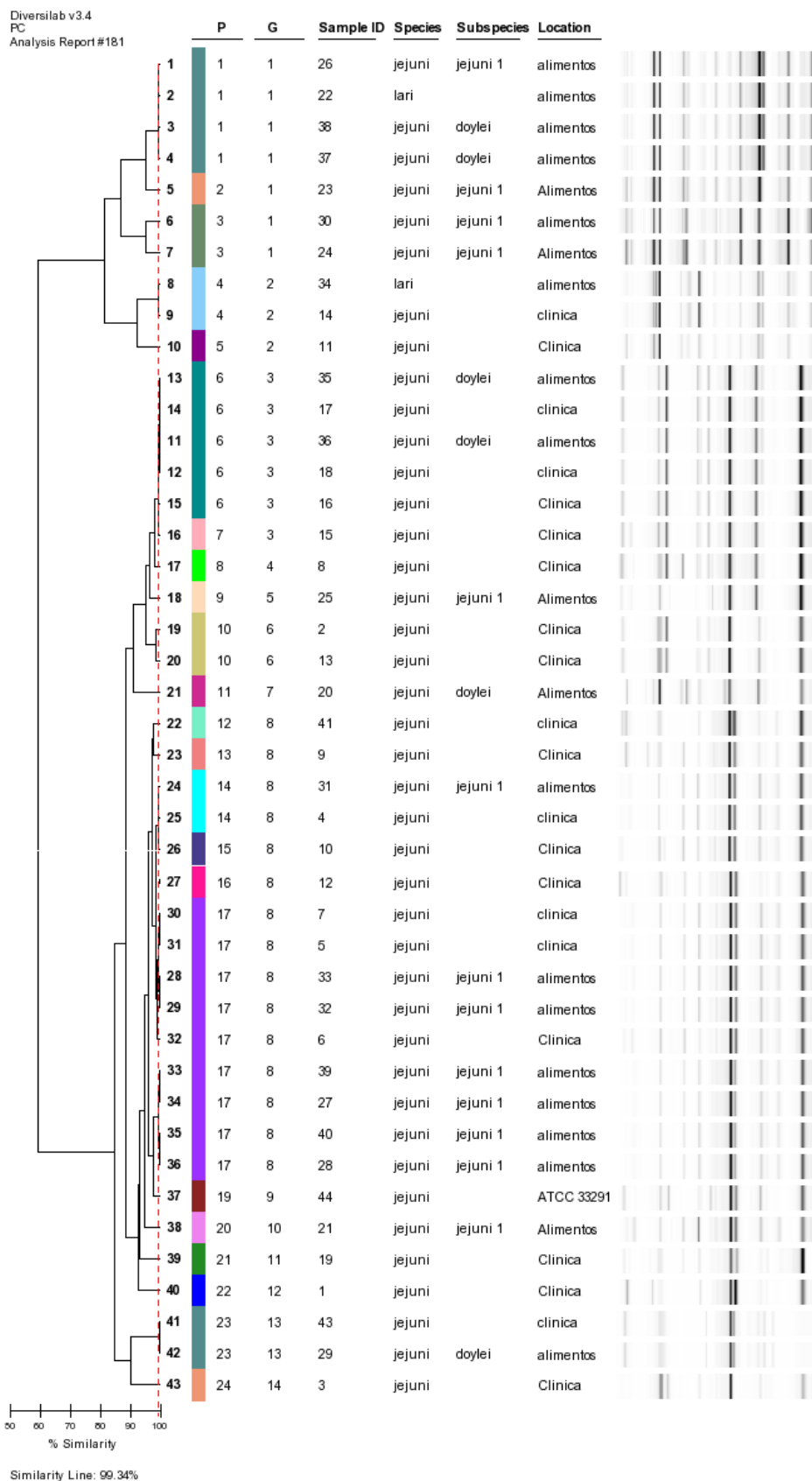


Figura 1 – Diversidade genética dos isolados de *Campylobacter* analisada por REP-PCR semi-automatizado (Diversilab® - Biomerieux), com coeficiente de similaridade de 99,34%, obtida pelo programa "web based" Diversilab (Biomerieux).

Tabela 1 - Perfil de resistência de isolados de *Campylobacter* genotipicamente indistinguíveis de fontes alimentares e humanas, coletadas no ano de 2011.

Amostra	Procedência	NA	AMC	AMP	KF	CTX	CIP	C	CN	E	TE	TOB	MEM
16	Fezes	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
17	Fezes	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
18	Fezes	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
35	Frango	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
36	Frango	R	S	R	R	S	R	S	S	S	R	S	S

NA ácido nalidíxico, AMC amoxicilina/ácido clavulânico, AMP ampicilina, KF cefalotina, CTX cefotaxima, CIP ciprofloxacina, C cloranfenicol, CN gentamicina, E eritromicina, TE tetraciclina, TOB tobramicina, MEM meropenem.

RESUMO EXPANDIDO 3

MICROBIOTA PRESENTE EM CARÇAÇAS DE FRANGO E A SUA POSSÍVEL INFLUÊNCIA NA DETECÇÃO DE *Campylobacter* spp.

A eficácia do enriquecimento na detecção de *Campylobacter* em alimentos, especialmente em carne de frango tem sido questionada por muitos autores (JACOBS-REITSMA *et al.*, 2007; HABIB *et al.*, 2008; MEDEIROS, 2009; KIESS; PARKER e MCDANIEL, 2010; MEDEIROS *et al.*, 2012). A dificuldade de isolamento pode ser explicada pela incapacidade dos antibióticos adicionados ao meio de enriquecimento de inibir os micro-organismos contaminantes e a baixa competitividade do *Campylobacter* frente a esses micro-organismos, especialmente se este estiver presente em baixo número (LEE e NEWELL, 2006). O presente trabalho realizou a identificação de bactérias presentes na carcaça de frango que poderiam dificultar a detecção de *Campylobacter*, principalmente após o enriquecimento.

Quarenta amostras de carcaças de frango resfriadas produzidas no Estado do Paraná foram coletadas na sua embalagem original em diferentes estabelecimentos comerciais da cidade de Curitiba, Paraná. As amostras foram representativas de 8 marcas diferentes, com 5 unidades amostrais cada. Alíquotas da enxaguadura, preparadas com a adição de água peptonada na proporção de 1 mL para cada grama da carcaça, foram utilizadas para detecção e enumeração de *Campylobacter* spp. por cultura e PCR em Tempo Real, assim como, para a contagem de aeróbios mesófilos, psicrófilas e a identificação das bactérias gram negativas.

A pesquisa de *Campylobacter* pelo método direto e pelo método de enriquecimento seguiu a metodologia ISO 10272: 2006. Os meios seletivos empregados foram Ágar carvão cefoperazona desoxicolato modificado (mCCDA), suplementado com cefoperazone (16.0mg/L) e anfotericina B (5.0mg/L) e Ágar Bolton modificado preparado conforme descrito por Franchin, Aidoo e Batista (2005). A condição de microaerofilia foi realizada por injeção de atmosfera modificada (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂) (Air liquide, Brasil) durante 20 segundos. A identificação foi realizada pelas provas fenotípicas convencionais catalase, oxidase, hidrólise hipurato, indoxil acetato, e avaliação da sensibilidade ao ácido nalidíxico e a cefalotina, e pelo sistema API Campy®, e confirmadas em nível de gênero por PCR em Tempo Real, como descrito por Biasi *et al.* (2011).

A contagem de aeróbios mesófilos e psicrófilos seguiu o preconizado por Silva *et al.* (2010). Alíquotas de 25 mL da enxaguadura da carcaça de frango foram adicionadas a 225 mL de água peptonada tamponada, e preparadas diluições decimais seriadas. De cada diluição, alíquotas de 1 mL foram inoculadas por técnica de plaqueamento em profundidade em meio Ágar Padrão para Contagem, com incubação a 35°C por 48 horas e 7°C por 10 dias para determinação de aeróbios mesófilos e psicrófilos, respectivamente.

A contagem de bactérias gram negativas foi realizada após incubação de 0,1 mL de cada diluição de enxaguadura de carne de frango em Ágar MacConkey com incubação a 35°C por 24 horas. A identificação fenotípica das colônias lactose positiva foi realizada pelo sistema API 20E® (Biomerieux), e das colônias lactose negativa pelo sistema API 20NE® (Biomerieux).

A prevalência de *Campylobacter* spp. nas 40 amostras de carcaças de frango analisadas foi de 35,0% (n=14). *C. jejuni* foi isolado em 30,0% das amostras (n=12) e *C. coli* em 5,0% (n=2).

A contagem de bactérias aeróbias mesófilas foi homogênea em cada marca avaliada. Três marcas apresentaram contagens de aeróbios mesófilos com valores médios respectivos de $5,7 \times 10^7$, $1,0 \times 10^7$ e $4,3 \times 10^7$ UFC/g. Contagens inferiores a $3,5 \times 10^4$ UFC/g foram identificadas nas demais marcas analisadas.

Das 40 amostras avaliadas, 7 (17,5%) apresentaram contaminação por bactérias psicrófilas, com contagens superiores a $2,5 \times 10^4$ UFC/g. Carcaças de frango armazenadas à temperaturas entre 0 e 7°C apresentam frequentemente microbiota psicrófilas originários em grande parte da pele dos animais abatidos (LAHELLEC *et al.*, 1975; ERCOLINI *et al.*, 2009). No presente trabalho a predominância foi de bactérias aeróbias mesófilas devido, provavelmente, ao reduzido tempo de armazenamento das carcaças sob refrigeração. Resultados divergentes foram observados por Ercolini *et al.* (2009), que obtiveram contagens de bactérias psicrotróficas em média de 1 log maior que as contagens de aeróbios mesófilos.

As espécies de enterobactérias mais frequentemente isoladas no presente estudo foram *Klebsiella ozaenae*, *Escherichia coli* e *Klebsiella rhino* com frequência respectiva em 12, 5 e 2 amostras. *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter agglomerans*, *Serratia rubidaea*, *Klebsiella pneumoniae* e *Serratia liquefaciens* foram isoladas em apenas uma amostra cada. Em 17 amostras não foram isoladas cepas

lactose positivas. As espécies predominantes no grupo das gram negativas não fermentadoras da glicose foram de *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas putida* com frequência respectiva em 15 e 9 amostras. *Photobacterium damsela* e *Pseudomonas alcaligenes* foram isoladas em duas amostras cada. Em 12 amostras não foram isoladas cepas lactose negativas. As espécies de *Pseudomonas* estão particularmente envolvidas na deterioração da carne armazenada sob refrigeração.

Isolados de *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas alcaligenes* e *Pseudomonas fluorescens* foram verificados na presença e na ausência de *Campylobacter*, não estabelecendo uma correlação entre a presença de *Pseudomonas* e a dificuldade em isolar *Campylobacter*.

Hilbert e colaboradores (2010) comprovaram a relação estabelecida entre *Campylobacter* e *Pseudomonas*, os autores verificaram que quando ambas as bactérias foram inoculadas, *Campylobacter* apresentou sobrevivência prolongada a condições aeróbica, a estirpe que frequentemente tolera até 18 horas a presença de oxigênio, na presença da bactéria acompanhante suportou 48 horas a esta condição.

Os vários estudos realizados em diferentes países, avaliando a contaminação de carne de frango, mostraram a diversidade microbiana, essa justificada pela condição de armazenamento, que afeta o tipo de micro-organismo encontrado na superfície da carcaça de frango, ou mesmo, condições inerentes ao ambiente de criação das aves (HINTON JR *et al.*, 2004; ERCOLINI *et al.*, 2009; LIANG *et al.*, 2012).

A supressão de *Campylobacter* por outras bactérias em caldo de enriquecimento Bolton tem sido descrita por vários autores, e evidenciada pela incapacidade dos antibióticos adicionados ao meio de enriquecimento de inibir os micro-organismos contaminantes (HABIB *et al.*, 2008; JASSON *et al.*, 2009; MEDEIROS *et al.*, 2012).

Jasson *et al.* (2009) relataram o crescimento excessivo de *Escherichia coli* e outras enterobactérias, após enriquecimento em Caldo Bolton, o que dificultou a visualização das colônias de *Campylobacter* nas placas de Ágar mCCDA. Esse problema foi atribuído à resistência adquirida da *E. coli* à concentração de cefoperazona utilizada no Caldo Bolton e no Ágar mCCDA. A resistência das bactérias gram negativas à cefalosporinas pode contribuir para o crescimento dos

micro-organismos contaminantes, tanto no caldo de enriquecimento, como nos ágaros seletivos.

Os dados deste estudo dão suporte para a realização de adequações às metodologias de detecção de *Campylobacter*. Novos estudos devem ser realizados para avaliar novas combinações de antibióticos a serem introduzidos nos meios seletivos. A identificação da microbiota contaminante realizada no presente estudo contribuirá para obtenção de condições de crescimento restritivas à essa microbiota competidora, favorecendo a detecção de *Campylobacter*.

REFERÊNCIAS

BIASI, R.S.; MACEDO, R.E.F.; MALAQUIAS, M.A.S.; FRANCHIN, P.R. Prevalence, strain identification and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. isolated from slaughtered pig carcasses in Brazil. **Food Control**, v. 22, p. 702 – 707, 2011.

ERCOLINI, D.; RUSSO, F.; NASI, A.; FERRANTI, P.; VILLANI, F. Mesophilic and psychotropic bacteria from meat and their spoilage potencial in vitro and in beef. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 1990-2001, 2009.

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.

HABIB, I.; SAMPERS, I.; UYTENDAELE, M.; BERKVEN, D.; ZUTTER, L.D. Performance characteristics and estimation of measurement uncertainty of three plating procedures for *Campylobacter* enumeration in chicken meat. **Food Microbiology**, v. 25, p. 65-74, 2008.

HILBERT, F.; SCHEWITZEL, M.; PAULSEN, P.; SZOSTAK, M.P. Survival of *Campylobacter* under conditions of atmospheric oxygen tension with support of *Pseudomonas* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 5911-5917, 2010.

HINTON JR, A.; INGRAM, C.J.A.; KIMBERLY, D. Tracking spoilage bacteria in commercial poultry processing and refrigerated storage of poultry carcasses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, p. 155-165, 2004.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). ISO 10272 Microbiology of Food and Animal Feeding Stuff - Horizontal Method for Detection and Enumeration of *Campylobacter* spp. - Part 1: Enrichment Method; Part 2: Enumeration Method. ISO, Geneva, Switzerland; 2006.

JACOBS-REITSMA, W.F.; OVERBEEK, W.V.; DIJK, S.O.V.; AARTS, H.J. Implementation of ISO 10272:2006 for detection and enumeration of *Campylobacter* in foods. **Zoonoses Public Health**, v. 54, n. 49, 2007.

JASSON, V.; SAMPERS, I.; BOTTELDOORN, N.; LÓPEZ-GÁLVEZ, F.; BAERT, L.; DENAYER, S.; RAJKOVIC, A.; HABIB, I.; DE ZUTTER, L.; DEBEVERE, J.; UYTENDAELE, M. 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.

KIESS, A.S.; PARKER, H.M.; MCDANIEL, C.D. Evaluation of different selective media and culture techniques for the quantification of *Campylobacter* spp. from broiler litter. **Poultry Science**, v. 89, p. 1755-1762, 2010.

LAHELLEC C, MEURIER C, BENNEJEAN G, CATSARAS M. A study of 5920 strains of psychotrophic bacteria isolated from chickens. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 38, p. 89-97, 1975.

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

LIANG, R.; YU, X.; WANG, R.; LUO, X.; MAO, Y.; ZHU, L.; ZHANG, Y. Bacterial Diversity and Spoilage-Related Microbiota Associated with Freshly Prepared Chicken Products under Aerobic Conditions at 4°C. **Journal of Food Protection**, v. 75, p. 1057-1062, 2012.

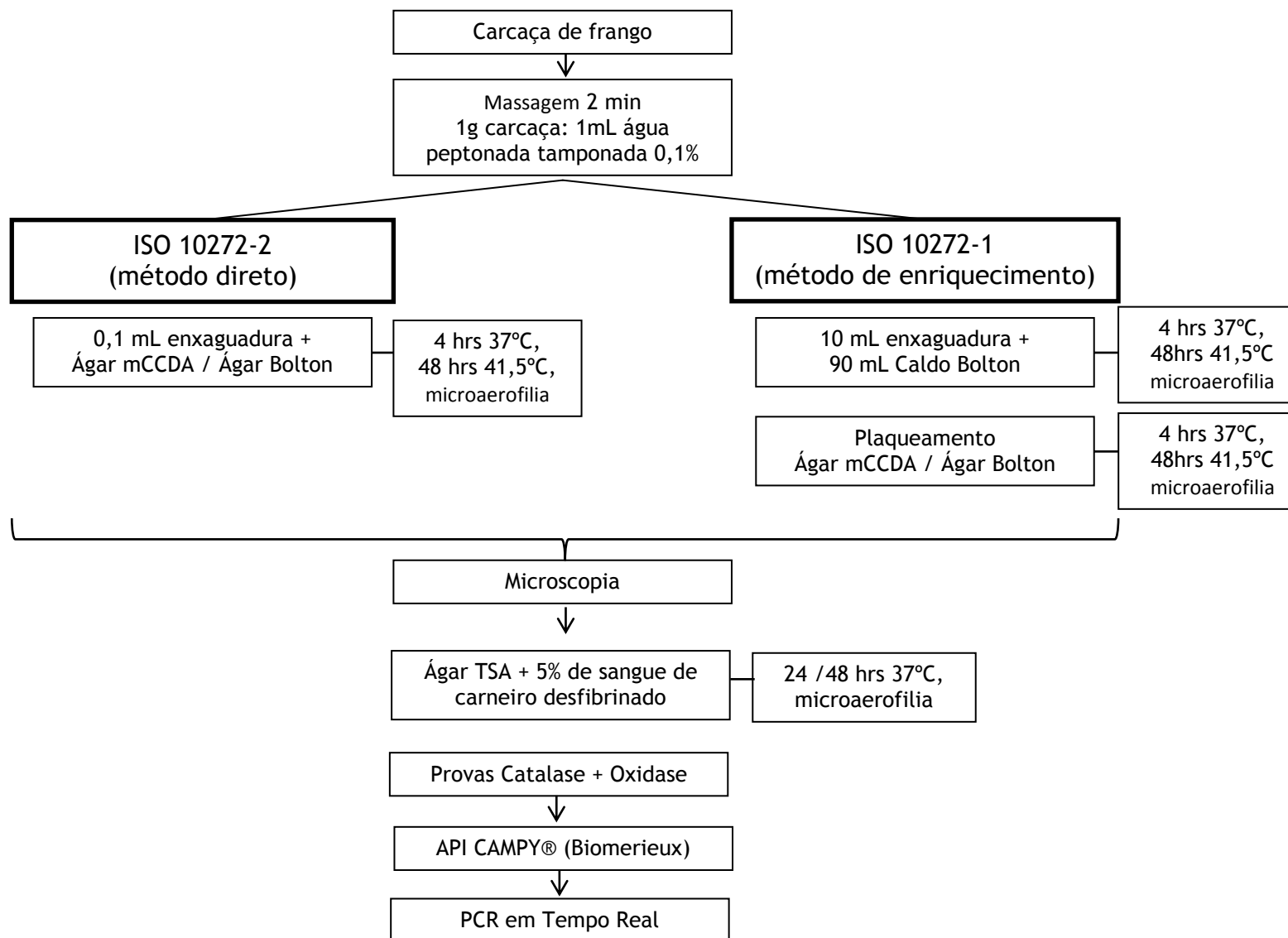
MEDEIROS, V.M. (2009). Implantação de metodologia de pesquisa de *Campylobacter* spp. no Setor de Alimentos do Departamento de Microbiologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro. [monografia especialização]. Rio de Janeiro (RJ): Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/Fundação Oswaldo Cruz.

MEDEIROS, V.M.; BRICIO, S.M.L.; FILGUEIRAS, A.L.L.; CLEIMENTINO, B.M. Use of Bolton for selective enrichment and comparative analysis of its performance with direct plating methodology for isolating *Campylobacter* spp. from chilled chicken carcasses. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.71, p. 456-461, 2012.

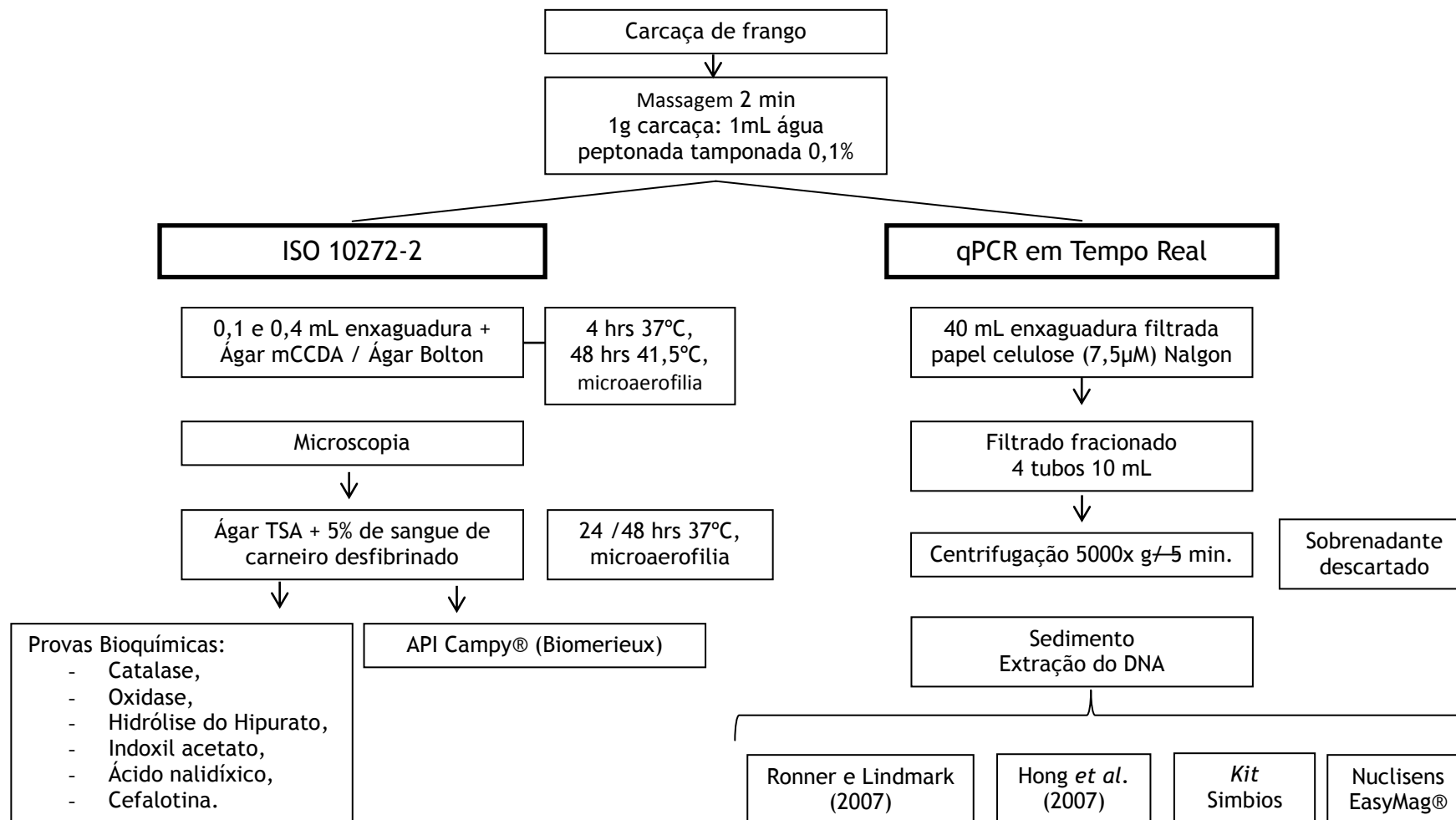
SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. Editora Varela. 623p., 2010.

CONCLUSÕES

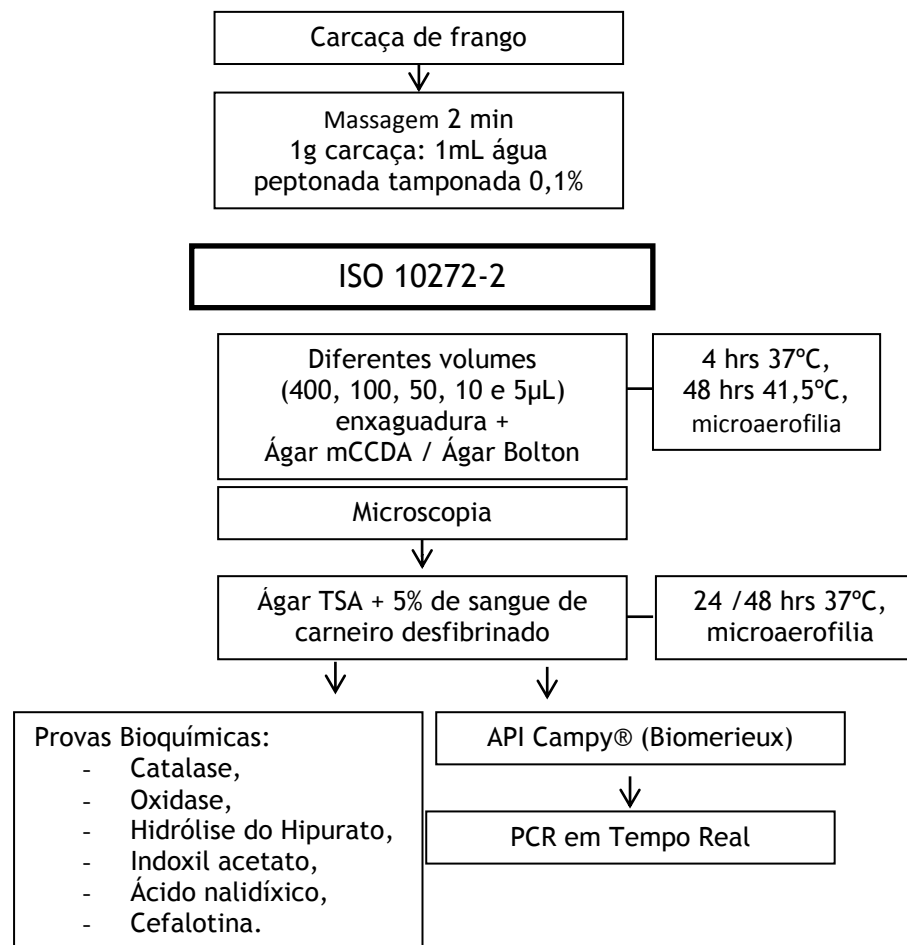
- O método direto (ISO 10272-1) mostrou-se superior ao método de enriquecimento (ISO 10272-2), pela maior frequência de isolamento de *Campylobacter* spp. e superior taxa de sensibilidade.
- Resultados sugerem que o volume da enxaguadura de 10 mL, que atualmente é recomendado pelo método de enriquecimento (ISO 10272-1), deva ser modificado para um melhor isolamento de *Campylobacter* spp.
- O volume de enxaguadura mais adequado para o método direto é o de 100 µL, como o preconizado na metodologia ISO 10272-2.
- As provas fenotípicas convencionais mostraram ser adequadas para a identificação dos isolados hipurato positivos. Quando os isolados não hidrolisaram o hipurato, não foi possível identificar a espécie, mesmo após sequenciamento.
- Os métodos Hong *et al.* (2007) e *kit* Simbios apresentaram resultados mais satisfatórios quando comparado aos métodos de Ronner e Lindmark (2007) e EasyMag®.
- A curva de calibração da PCR em Tempo Real otimizada determinou um limite de detecção de $1,5 \times 10^3$ UFC/g e a faixa linear de amplificação de $1,5 \times 10^3$ a $2,0 \times 10^7$ UFC/g. A avaliação direta da enxaguadura da carcaça de frango pelo método de PCR em Tempo Real otimizada não foi adequada para quantificação de *Campylobacter* spp. considerando o alto limite de detecção.
- O enriquecimento da enxaguadura em Caldo Bolton seguido pela PCR em Tempo Real mostrou ser o método mais apropriado para detectar *Campylobacter* spp. em amostras de carne de frango.



ANEXO 1 – Artigo 1 – Fluxograma dos métodos de detecção ISO 10272-2 e ISO 10272-1 (2006)



ANEXO 2 – Artigo 2 – Fluxograma dos métodos de quantificação ISO 10272-2 (2006) e qPCR em Tempo Real



ANEXO 3 – Artigo 4 – Fluxograma do método de quantificação ISO 10272-2 (2006) utilizando diferentes volumes da enxaguadura.