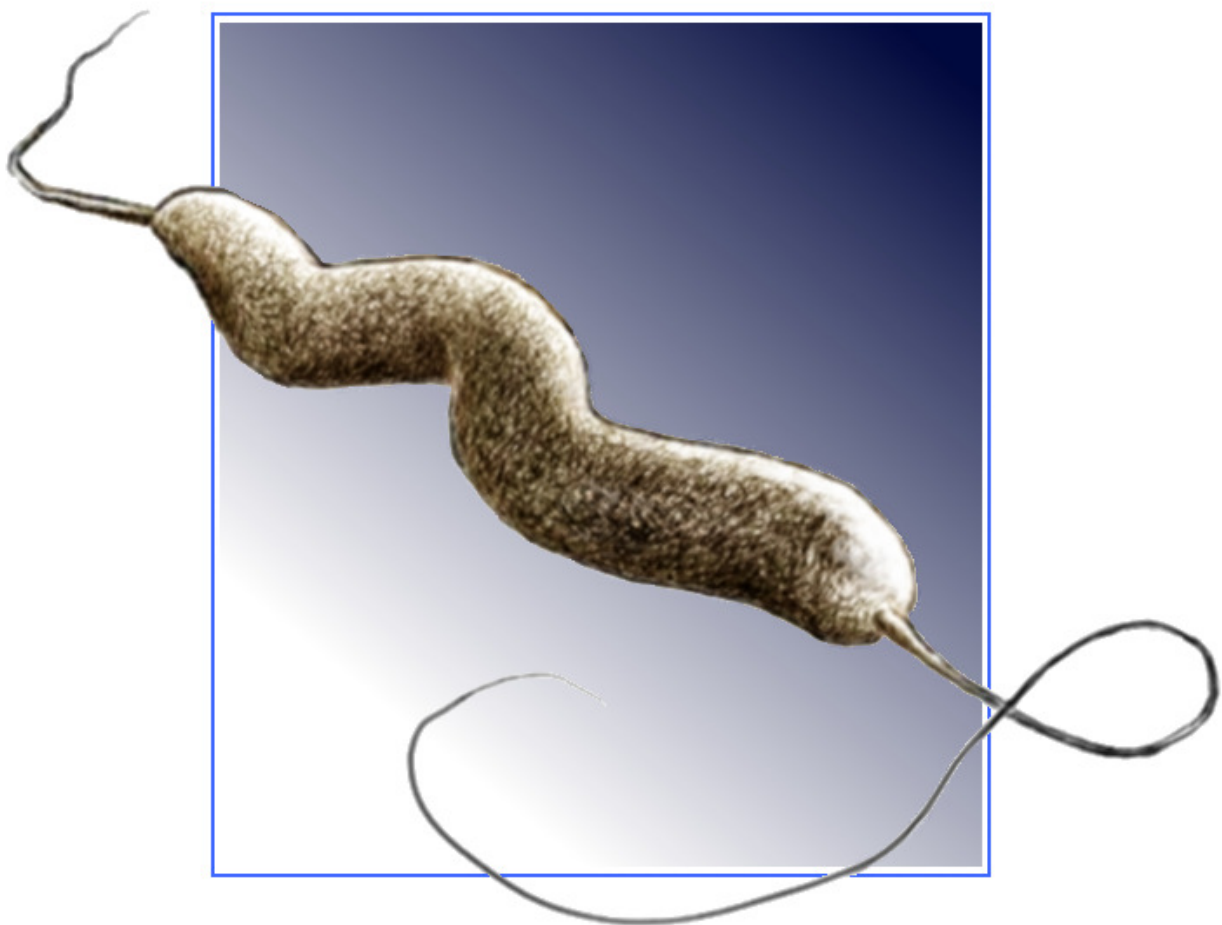


Anais do Workshop de Diagnóstico Microbiológico de *Campylobacter* Aplicado à Avicultura



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Suínos e Aves
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 155

**Anais do Workshop de Diagnóstico Microbiológico
de *Campylobacter* Aplicado à Avicultura**

Clarissa Silveira Luiz Vaz
Editora

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Suínos e Aves

Rodovia BR 153 - Km 110

89.700-000, Concórdia-SC

Caixa Postal 21

Fone: (49) 3441 0400

Fax: (49) 3441 0497

<http://www.cnpsa.embrapa.br>

sac@cnpsa.embrapa.br

Comitê de Publicações da Embrapa Suínos e Aves

Presidente: Luizinho Caron

Secretária: Tânia M.B. Celant

Membros: Gerson N. Scheuermann

Jean C.P.V.B. Souza

Helenice Mazzuco

Nelson Morés

Rejane Schaefer

Suplentes: Mônica C. Ledur

Rodrigo S. Nicoloso

Comissão organizadora

Beatris Kramer

Clarissa S.L. Vaz

Daiane V. Rech

Jean C.V.B. Porto

Luizinho Caron

Marisa N. Cadorin

Raquel Rebelatto

Tania M.B. Celant

Coordenação editorial: Tânia M.B. Celant

Revisão técnica: Cátia S. Klein e Luizinho Caron

Normalização bibliográfica: Claudia A. Arrieche

Editoração eletrônica: Vivian Fracasso

Ilustrações: Alexandre Matthiensen

1ª edição

Versão eletrônica (2012)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Suínos e Aves

Workshop de Diagnóstico Microbiológico de *Campylobacter* Aplicado à Avicultura
(1.: 2012: Concórdia, SC)

Anais / I Workshop de Diagnóstico Microbiológico de *Campylobacter* Aplicado
à Avicultura; Clarissa Silveira Luiz Vaz

Editora - Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2012.

42 p.: il.; 29 cm. - (Documentos/Embrapa Suínos e Aves, ISSN 0101-6245;
155).

1. Avicultura. 2. Microbiologia. 3. Bactéria. I. Vaz, Clarissa Silveira Luiz. II. Título.

CDD 636.50063

© Embrapa 2012

Editora

Clarissa Silveira Luiz Vaz

Médica Veterinária, D.Sc. em Ciências Veterinárias, pesquisadora da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC, clarissa.vaz@embrapa.br

Apresentação

Desde o seu reconhecimento como agente de zoonose, *Campylobacter* vem figurando entre as principais causas bacterianas de doença transmitida por alimentos em diversos países, que relacionam a maioria dos casos ao consumo ou manuseio de carne de frango contaminada. Em contra partida, há poucas informações oficiais sobre a ocorrência de campilobacteriose de origem alimentar ou dados de prevalência de *Campylobacter* em frangos de corte no Brasil.

Embora não seja uma bactéria específica de frangos, o papel de *Campylobacter* como eventual contaminante da carne de aves o torna relevante para a avicultura de corte. Por esse motivo, diversas pesquisas sobre *Campylobacter* na avicultura já foram e estão sendo desenvolvidas no Brasil e em outros países, entretanto, muitos aspectos epidemiológicos da bactéria na cadeia avícola ainda permanecem desconhecidos. Do ponto de vista de saúde pública, ainda não está claro o real envolvimento da carne de frango *in natura*, eventualmente contaminada, com a ocorrência de campilobacteriose de origem alimentar no país. Em relação a frangos de corte, não se conhecem intervenções efetivas, cuja aplicação seja viável para reduzir quantitativamente a colonização pela bactéria na idade pré-abate. Não obstante, pesquisas científicas ou monitorias voluntárias de *Campylobacter* em frangos de corte necessitam de suporte laboratorial para a detecção microbiológica da bactéria, cujas características peculiares envolvem condições diferenciadas e para as quais há pouca oferta de treinamento técnico no país.

Nesse cenário, a Embrapa Suínos e Aves promove o *Workshop de diagnóstico microbiológico de Campylobacter* com o objetivo de reunir profissionais ligados a diferentes segmentos da cadeia avícola para compartilhar experiências por meio de debate técnico e capacitação básica para a detecção microbiológica da bactéria, buscando desenvolver visão estratégica sobre as implicações de *Campylobacter* para a avicultura do Brasil. Desejamos boas-vindas aos participantes e esperamos que esse evento seja uma oportunidade de integração e aprimoramento técnico, que venha a contribuir com a rotina profissional de cada um em benefício da avicultura.

Clarissa Silveira Luiz Vaz
Editora

Programação

06 DE NOVEMBRO DE 2012

Local: Sala de cursos da Embrapa Suínos e Aves

08h15 - Recepção dos participantes

08h30 - Abertura do evento

Chefia Geral da Embrapa Suínos e Aves

08h45 - Apresentação dos participantes e definição das Turmas 1 e 2

09h - Palestra: **Aspectos gerais de *Campylobacter* na segurança dos alimentos**

Ana Luzia Lauria-Filgueiras, pesquisadora, Setor de Campylobacter, FIOCRUZ

09h40 - Palestra: ***Campylobacter* na avicultura - resultados de pesquisas**

Clarissa Silveira Luiz Vaz, pesquisadora, Embrapa Suínos e Aves

10h20 - Debate

10h30 - Intervalo

10h50 - Palestra: **Técnicas laboratoriais para detecção de *Campylobacter* em material avícola**

Daiane Voss-Rech, analista, Embrapa Suínos e Aves

11h30 - Debate/Instruções para acesso ao laboratório

12h30 - 13:30 Almoço

Local: Laboratório de Sanidade Animal da Embrapa Suínos e Aves

13h45 - Detecção qualitativa e quantitativa de *Campylobacter* (Turma 1)

Características morfológicas, testes de confirmação, manutenção de culturas (Turma 2)

14h45 - Detecção qualitativa e quantitativa de *Campylobacter* (Turma 2)

Características morfológicas, testes de confirmação, manutenção de culturas (Turma 1)

Instrutores: *Clarissa Vaz, Daiane Rech, Raquel Rebelatto e Beatris Kramer (Embrapa Suínos e Aves)*

15h45 - Antibiograma (Turmas 1 e 2)

Instrutores: *Clarissa Vaz, Daiane Rech, Raquel Rebelatto e Beatris Kramer (Embrapa Suínos e Aves)*

Local: Sala de reuniões do Laboratório de Sanidade Animal

16h45 - Intervalo

17h15 - Palestra: **Negociações em fóruns internacionais relacionadas a *Campylobacter* em carne de aves**

Alexandre Pontes, Fiscal Federal Agropecuário

18h - Debate

07 DE NOVEMBRO DE 2012

Local: Laboratório de Sanidade Animal da Embrapa Suínos e Aves

08h15 - Teste cego: Identificação de culturas (Turmas 1 e 2)

Instrutores: *Clarissa Vaz, Daiane Rech, Raquel Rebelatto e Beatris Kramer (Embrapa Suínos e Aves)*

09h30 - Aula prática: Interpretação dos resultados dos testes qualitativos, quantitativos e antibiograma (Turmas 1 e 2)

Instrutores: *Clarissa Vaz, Daiane Rech, Raquel Rebelatto e Beatris Kramer (Embrapa Suínos e Aves)*

Local: Sala de reuniões do Laboratório de Sanidade Animal

10h30 - Intervalo

11h - Debate final

11h30 - Encerramento e entrega dos certificados

Sumário

Aspectos gerais de <i>Campylobacter</i> na segurança dos alimentos.....	11
<i>Ana Luzia Lauria-Filgueiras</i>	
<i>Campylobacter</i> na avicultura: resultados de pesquisas.....	16
<i>Clarissa Silveira Luiz Vaz; Daiane Voss-Rech</i>	
Técnicas laboratoriais para detecção de <i>Campylobacter</i> em material avícola.....	21
<i>Daiane Voss-Rech; Clarissa Silveira Luiz Vaz</i>	
Anexo 1 - Procedimentos para identificação morfológica e bioquímica de <i>Campylobacter</i> termófilos.....	29
Anexo 2 - Teste de difusão em ágar para determinação da sensibilidade a antimicrobianos em <i>Campylobacter</i>	35
Anexo 3 - Composição e preparo de meios de cultivo e reagentes.....	36

Anais do Workshop de Diagnóstico Microbiológico de *Campylobacter* Aplicado à Avicultura

Clarissa Silveira Luiz Vaz

ASPECTOS GERAIS DE *Campylobacter* NA SEGURANÇA DOS ALIMENTOS

Ana Luzia Lauria-Filgueiras

Pesquisadora do Setor de Campylobacter do Laboratório de Zoonoses Bacterianas (LABZOO)

Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ/ RJ)

anal@ioc.fiocruz.br

O gênero *Campylobacter* compreende, atualmente, 24 espécies de bactérias Gram negativas que colonizam o trato gastrointestinal de uma variedade de hospedeiros, podendo também ter localização extra-intestinal. Algumas espécies são comensais enquanto outras têm particular importância como patógenos. Na área veterinária destacam-se como agentes etiológicos de doenças reprodutivas, que podem ocasionar o aborto e a infertilidade, principalmente em bovinos, ovinos e suínos, gerando grandes perdas econômicas ao setor pecuário. Por outro lado, no homem, os casos de aborto são excepcionais, ao passo que as enterites por *Campylobacter* representam um grande problema de Saúde Pública. Gengivites e doenças periodontais são infecções que também podem ser causadas por algumas espécies de *Campylobacter* que colonizam a cavidade oral. Outras espécies termofílicas deste gênero têm se mostrado como enteropatógenos de grande importância para a Saúde Pública, principalmente nos países desenvolvidos.

Campylobacter jejuni é a espécie enteropatogênica que recebe maior atenção, por ser a principal espécie (90% dos casos) causadora de enterites por campilobacteriose. Em vários países industrializados, a infecção por *C. jejuni* é considerada a maior causa de doença diarreica no homem, o que leva a um intenso monitoramento por parte das entidades de vigilância epidemiológica. Nestes países, a campilobacteriose já prevalece sobre os casos de gastroenterites causadas por *Salmonella* sp., *Shigella* sp. e *Escherichia coli* O157. Em contrapartida, poucos trabalhos investigam a sua incidência em países no processo de industrialização, onde se estima haver uma incidência maior de infecções assintomáticas, provavelmente devido à aquisição de imunidade.

No Brasil não pode ser observada a situação epidemiológica descrita acima, pois são poucos os laboratórios que desenvolvem estudos sobre essa bactéria. Por conseguinte, poucos são os relatos descritos na literatura nacional e/ou internacional com dados sobre isolamentos ou caracterizações de cepas brasileiras.

A campilobacteriose se propaga na maioria das vezes pela via fecal-oral, através do contato direto com fezes de animais infectados (incluindo de seres humanos), ingestão de alimentos de origem animal contaminados e, ainda, pela veiculação hídrica, principalmente com água não tratada, contaminada com fezes humanas e/ou de outros animais. Portanto, o homem e os demais animais homeotérmicos são considerados as fontes de infecção (doente, portador e reservatório), o que lhes atribui um caráter ubíquo e enquadra a campilobacteriose como uma zoonose bastante comum.

Características do micro-organismo

O gênero *Campylobacter* é composto por espécies de bactérias Gram negativas com morfologia típica de bastonetes curvos, espiralados ou em forma de “S”, que possuem 0,2-0,9 µm de largura por 0,5-5 µm de comprimento. Em culturas mais antigas ou sob condições adversas, suas células podem adquirir formas esféricas ou cocóides, o que representaria um estágio degenerativo do seu ciclo de vida, contudo, sem perder seu poder infectante.

São extremamente móveis por flagelo desbainhado, monotríquio ou anfitriúio, o que lhes confere uma motilidade característica em torno do próprio eixo (movimento em saca-rolha).

As espécies deste gênero não produzem endósporos, são quimiorganotróficos, produzem a enzima oxidase (exceto *C. gracilis*), são urease negativas (exceção de algumas cepas de *Campylobacter lari*) e não utilizam a via oxidativa e fermentativa de carboidratos (oxidam aminoácidos e ácidos tricarbóxicos).

A maioria é microaerófila, necessitando 3-15 % de O₂ e 3-5% de CO₂ e metabolismo do tipo respiratório. Outras necessitam de ambiente anaerobiótico para um crescimento ótimo ou ainda hidrogênio para crescerem sob condições de microaerofilia.

O gênero *Campylobacter*, em função de ser catalase positivo ou negativo, pode ser dividido em dois grandes grupos. Dentre as espécies produtoras de catalase encontram-se cepas que crescem bem entre 25-37°C, mas não a 43°C, e ainda aquelas (conhecidas como termofílicas ou termotolerantes) que não apresentam crescimento a 25°C, crescem a 37°C, porém, preferencialmente a 43°C.

Genética

O genoma do *Campylobacter* possui 1.600-1.700 kb (cerca de 35% do tamanho do genoma da *E. coli*), com exceção de *C. upsaliensis* que parece possuir 2 Mb. É rico em Adenina:Timina, com uma porcentagem de Citosina:Guanina 29-47%, o que pode explicar seu comportamento fastidioso no cultivo e sua incapacidade de fermentar carboidratos.

Uma grande contribuição para o conhecimento sobre a genética deste gênero bacteriano provém dos estudos com a espécie *C. jejuni*. O seu genoma (NCTC11168) foi completamente sequenciado. Possui um cromossoma circular contendo 1.641.481 pb (30,6% G + C) com predição de codificar 1.654 proteínas e 54 espécies de RNA. O genoma não é usual e não possui sequências de inserção ou sequências associadas a fagos e muito poucas sequências repetidas. Um dos mais importantes achados foi a presença de sequências hipervariáveis em genes que codificam a biossíntese ou modificações de estruturas de superfície celular, ou associados a genes de funções ainda não conhecidas. A aparente alta taxa de variação destes homopolímeros podem ser importantes para a sobrevivência estratégica do *C. jejuni*.

Epidemiologia

A diversidade ecológica de *Campylobacter* é bastante expressiva. Animais homeotérmicos, tanto domésticos como silvestres (cães, gatos, primatas, roedores, bovinos, ovinos e, em especial as aves), permitem a colonização intestinal de espécies termofílicas deste micro-organismo, desenvolvendo ou não a doença, o que raramente ocorre em animais de sangue frio. *Campylobacter jejuni* também apresenta localização extra-intestinal, como nas ovelhas, ocasionando abortos.

Na maioria das aves, estes micro-organismos podem ser detectados em quantidades superiores a dez milhões por grama de fezes, razão pela qual são incriminados, em diferentes episódios, como fonte de infecção, direta ou indireta, adquirindo importância na sua disseminação ambiental.

Contudo, não há evidências de transmissão vertical nas aves e, por conta disto, muitas investigações vem sendo realizadas para identificar as principais fontes de transmissão, principalmente, em criadouros de frangos.

Deve-se destacar, entretanto, que a maior preocupação está no potencial destes animais em transmitir a bactéria ao homem através dos alimentos de origem animal. O consumo de frangos e derivados de aves representa a maior causa de gastroenterite em todo o mundo, estimando-se sua implicação em 50- 70% das infecções esporádicas humanas.

Por outro lado, os micro-organismos envolvidos em infecções alimentares (*Salmonella* sp., *E. coli* O157:H7, *Campylobacter* sp, *Yersinia enterocolitica* e *Listeria monocytogenes*) podem alternar sua veiculação ao homem, dependendo dos diferentes alimentos.

No caso de frangos, como houve aumento no consumo em todo o mundo e, portanto, um maior manuseio das carcaças e miúdos, foram publicadas, em maio de 2010, medidas profiláticas rigorosas para as etapas de abate, processamento e comercialização, incluindo a importação e a exportação – o “Compliance Guideline for Controlling *Salmonella* and *Campylobacter* in Poultry” (3ª edição) – pelo “Food Safety and Inspection Service” (FSIS), do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, com base nos critérios do “National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Food” (NACMCF). Este fato demonstra a importância sanitária atribuída a *Campylobacter* sp. dentre os enteropatógenos de origem alimentar.

Surtos de enterites por *Campylobacter* spp. são também frequentemente associados ao consumo de leite não pasteurizado e águas não tratadas ou contaminadas por fezes humanas ou animais. A água representa um poderoso veículo de transmissão de espécies de *Campylobacter* e a sua presença em corpos d’ água pode ser usada, até mesmo, como um sinal de contaminação fecal recente, visto ser a sua sobrevivência menor que àquela apresentada pelos indicadores bacterianos usuais.

No Brasil, são poucos os estudos epidemiológicos realizados em relação ao *Campylobacter*. Isto decorre em grande parte pela escassez de laboratórios que pesquisam esses micro-organismos, registrando-se, assim, poucos dados sobre isolamentos e caracterização de cepas brasileiras. Esta grande falta de dados, especialmente relacionados a isolados clínicos, torna-se uma situação muito preocupante ao se considerar as possíveis complicações pós-infecciosas ligadas à campilobacteriose, que trazem grandes prejuízos sócio-econômicos, como o desenvolvimento da Síndrome de Guillain Barré (GBS).

Acredita-se que a taxa de isolamento em nosso país possa ser maior do que àquela detectada, portanto há necessidade de uma investigação bem conduzida, estudando-se: a incidência, a distribuição geográfica e as vias de transmissão da campilobacteriose em todo o território nacional. Esta etapa é um fator imprescindível para o conhecimento real da epidemiologia dos casos brasileiros, possibilitando ainda a comparação de dados de cepas autóctones com aqueles oriundos de cepas de países desenvolvidos e, principalmente, contribuindo para o planejamento de medidas de controle em Saúde Pública.

***Campylobacter* nos alimentos de origem avícola**

As células de *Campylobacter* por serem microaerófilas respondem ao estresse oxidativo, temperatura baixa ou falta de nutrientes, mudando a sua morfologia para formas cocóides, entrando num estado viável, mas não cultivável, sendo incapazes de crescer em meios seletivos de isolamento, mas podendo ser transmitidas e causar infecção em humanos. Esta característica representa um perigo potencial à saúde pública, sendo de grande importância em microbiologia de alimentos, uma vez que o alimento após ser analisado, pode ser classificado como próprio para o consumo, apesar de apresentar células de *Campylobacter* que não foram previamente detectadas.

Na detecção de *Campylobacter* em alimentos, geralmente é encontrado um baixo número de células, principalmente se este alimento for congelado. Por outro lado, como a sua dose infectante é muito baixa, sendo necessárias apenas 500 células para que ocorra uma infecção, a carne de frango congelada pode ser veículo de transmissão da campilobacteriose (quantitativo de células deste micro-organismo no trato digestivo das aves muito alto = 10^7 células por grama de fezes).

Desta forma, torna-se indispensável o acompanhamento de todo o processo da produção do frango, a fim de se obter um produto final com qualidade.

Práticas inadequadas de manipulação e higiene dos alimentos, como: a utilização de matérias-primas contaminadas ou de má procedência, falta de higiene do local onde é preparado o alimento, falta de higiene do manipulador de alimento e a sua condição de saúde, equipamentos e utensílios mal conservados, presença de vetores, a temperatura e o tempo que o alimento fica em exposição contribuem para o surgimento de infecções ou intoxicações alimentares.

Campylobacter spp. é capaz de sobreviver por mais de uma hora nas bancadas e em panos de cozinha, sendo capaz de contaminar outros alimentos que entrem em contato com estas superfícies.

Um fator comum que exemplifica os fatos acima é a contaminação cruzada. A água de degelo do descongelamento do frango em contato com alimentos prontos, o uso da mesma faca doméstica de corte do frango para a preparação da salada *in natura*, a falta da higienização correta das mãos do manipulador que processa a carne fresca de aves e toca em outros alimentos e superfícies e a não especificação de uma única tábua de corte para alimentos de origem animal poderiam explicar a origem dos pequenos surtos.

Assim, considerando o alto consumo da carne de frango, por ser um alimento proteico de alto valor biológico e baixo custo, o problema assume uma importância expressiva quando produtos contaminados são destinados a milhares de pessoas, diariamente.

Literatura recomendada

AZEREDO, L. I.; LUCHESE, R. H.; LAURIA-FILGUEIRAS, A. L. *Campylobacter* spp in fresh meat poultry: chilling step assessment. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 69, n. 4, p. 518-524, 2010.

CARUSO, L. I. A.; Souza, M. C. L.; LAURIA-FILGUEIRAS, A. L.; DUQUE, S. S.; ESTEVES, W. T. C.; THOMÉ, J. D. S. Searching to combine technologies for safer food attainment. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 2, p. 380-387, 2011.

FREITAS, J. A.; NORONHA, G. N. Ocorrência de *Campylobacter* spp. em carne e miúdos de frango expostos ao consumo em Belém, Pará. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 3, p. 813-815, 2007.

GOMES, J. P. M. Gênero *Campylobacter* spp. **Microbiologia Clínica Veterinária VET 3225**. UFRGS, 2012.

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

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. Dissertação (Mestrado em Bromatologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, SP.

MEDEIROS, V. M. **Isolamento e identificação fenotípica e molecular das espécies termofílicas de *Campylobacter* a partir de frango resfriado.** 2011. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

MOURA, H. M. **Isolamento e análise de resistência a antimicrobianos de cepas de *Campylobacter jejuni* em amostras de carne de aves resfriadas comercializadas no Distrito Federal.** 2010 Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) - Universidade de Brasília, Brasília, DF.

NAUTA, M.; HILL, A.; ROSENQUIST, H.; BRYNESTAD, S.; FETSCH, A.; VAN DERLOGT, P.; FAZIL, A.; CHRISTENSEN, B.; KATSMA, E.; BORCK, B; HAVELAAR, A. Comparison of risk assessments on *Campylobacter* in broiler meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, p. 107-123, 2009.

PARKHILL, J.; WREN, B. W.; MUNGALL, K.; KETLEY, J.; CHURCHER, C.; BASHAM, B. The complete genome sequence of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences associated with surface structures. **Nature**, v. 403, p. 665-669, 2000.

LUBER, P. Cross-contamination versus undercooking of poultry meat or eggs — which risks need to be managed first? **International Journal of Food Microbiology**, v. 134, p. 21–28, 2009.

ROSSI, M.; DEBRUYNE, L.; ZANONI, R. G.; MANFREDI, 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.

SKIRROW, M. B. Diseases due to *Campylobacter*, *Helicobacter* and related bacteria. **Journal of Comparative Pathology**, v. 111, p. 113-149, 1994.

***Campylobacter* NA AVICULTURA: RESULTADOS DE PESQUISAS**

Clarissa Silveira Luiz Vaz* e Daiane Voss-Rech

Embrapa Suínos e Aves

*clarissa.vaz@embrapa.br

Introdução

Campylobacter coloniza o intestino de frangos de corte sem causar sinais clínicos nem perdas produtivas. Entretanto, a bactéria é de interesse para a avicultura sob o aspecto da segurança dos alimentos, já que é um eventual contaminante da carne de aves no abate. A redução da colonização intestinal de frangos de corte em idade pré-abate reflete na diminuição do risco de contaminação da carne durante o abate e processamento. Por isso, estudos básicos para entender a epidemiologia de *Campylobacter* e identificar intervenções práticas nas granjas que reduzam quantitativamente a bactéria no intestino dos frangos estão sendo desenvolvidos em diversos países. Entretanto, muitas das medidas propostas não são aplicáveis na prática no Brasil, em grande parte devido às diferenças regionais da produção de frangos entre países. As medidas de biossegurança utilizadas nas granjas de frangos de corte e que são comprovadamente efetivas na prevenção de diversos vírus e bactérias atualmente não impedem a colonização das aves por *Campylobacter*. Além disso, a diversidade de sorotipos de *Campylobacter* dificulta a identificação de antígenos imunogênicos com potencial para uso no desenvolvimento de uma vacina comercial capaz de estimular resposta imunológica protetora frente às diferentes cepas circulantes no campo. Tudo isso reforça o interesse em pesquisas voltadas à avicultura de corte no Brasil, incluindo os aspectos epidemiológicos básicos, muitos dos quais ainda pouco conhecidos. Esse texto apresenta alguns resultados de estudos conduzidos por diferentes grupos de pesquisa quanto aos tópicos mais frequentemente questionados a respeito de *Campylobacter* na avicultura.

***Campylobacter* em frangos de corte**

Campylobacter não é uma bactéria específica de aves. Contudo as condições do ambiente intestinal favorecem sua multiplicação, principalmente no ceco, onde $7,0 \log_{10}$ UFC/g foi a concentração média identificada na descarga cecal coletada de frangos em idade pré-abate no Sul do Brasil (KUANA, et al., 2008). A prevalência de *Campylobacter* em frangos de corte sofre flutuações ao longo do ano em países com estações climáticas bem definidas. Assim, o aumento da prevalência durante o verão parece ter relação com o maior número de vetores, como moscas (WAGENAAR, 2012). Ainda não está claro se isso também ocorre na avicultura no Brasil, entretanto a detecção de *Campylobacter* em frangos de corte comerciais continua frequente. Entre 2010 e 2011 a Embrapa Suínos e Aves amostrou lotes de frangos de corte com idades a partir de três semanas em quatro agroindústrias do Brasil. *Campylobacter* (C.) foi isolado de todos os lotes, sendo identificados *C. jejuni* e *C. coli*, dos quais o primeiro foi mais frequente (Tabela 1). De fato, *C. jejuni* tem sido a espécie predominante em frangos de corte no Brasil (FRANCHIN, et al., 2005; KUANA, et al., 2008) assim como em outros países, reforçando a importância de seu gerenciamento na avicultura, já que é a espécie mais envolvida nos casos de campilobacteriose de origem alimentar em humanos (WAGENAAR, 2012).

A transmissão de *Campylobacter* a frangos de corte ainda precisa ser mais compreendida, já que a transmissão vertical não está completamente comprovada. Pintos oriundos de incubatórios comerciais permanecem livres da bactéria até a segunda semana de vida nos aviários, sugerindo envolvimento de imunidade materna (WAGENAAR, 2012). A partir da terceira semana, torna-se possível isolar *Campylobacter* de algumas aves do lote, que aparentemente amplificam a bactéria no intestino e disseminam a contaminação rapidamente dentro do lote, de modo que aos 42 dias de vida quase a totalidade dos frangos estará colonizada pela bactéria (Tabela 2). Partindo da detecção de *Campylobacter* em suabes de cloaca coletados semanalmente durante um estudo longitudinal em lotes subsequentes alojados no mesmo aviário, foi estimado que 95% dos frangos de corte dos lotes amostrados estariam positivos até os 34,8 dias de idade (Tabela 3) (WAGENAAR, 2012).

Tabela 1. Isolamento de *Campylobacter* em lotes de frangos de corte na região Sul do Brasil

Lote	Idade (dias)	Espécies identificadas
1	49	<i>C. jejuni</i>
2	32	<i>C. jejuni</i>
3	32	<i>C. jejuni</i>
4	31	<i>C. jejuni</i>
5	31	<i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>
6	32	<i>C. jejuni</i>
7	32	<i>C. jejuni</i>
8	41	<i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>
9	35	<i>C. jejuni</i>
10	39	<i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>
11	39	<i>C. jejuni</i>
12	35	<i>C. jejuni</i>
13	42	<i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>
14	30	<i>C. jejuni</i>
15	32	<i>C. jejuni</i>
16	32	<i>C. jejuni</i>
17	42	<i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>
18	32	<i>C. jejuni</i>
19	32	<i>C. jejuni</i>
20	26	<i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>
21	33	<i>C. jejuni</i>
22	27	<i>C. jejuni</i>
23	33	<i>C. jejuni</i>
24	34	<i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>
25	34	<i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>
26	34	<i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>
27	34	<i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>
28	42	<i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>
29	42	<i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>
30	42	<i>C. jejuni</i>

A presença de *Campylobacter* já foi detectada em cloaca, penas e cama de aviário de lotes de frangos no pré-abate, sendo estas elencadas como possíveis fontes de contaminação no abate (FRANCHIN, et al., 2005). Por sua vez, a contaminação residual por *Campylobacter* na cama reutilizada poderia ser potencial fonte de contaminação para o lote subsequente. De fato, *Campylobacter* pode ser detectado tanto nos frangos quanto na cama aos 42 dias de alojamento. Entretanto, essa contaminação foi eliminada ou reduzida a um nível não detectado após o vazio das instalações e o tratamento da cama, respaldando o benefício de ambas as práticas para a redução entre lotes da contaminação do aviário por *Campylobacter* (VAZ, et al., 2012a).

Tabela 2. Detecção da colonização intestinal de frangos de corte em lotes subsequentes num aviário

Idade (dias)	Lote		
	1	2	3
7	Negativo	Negativo	Negativo
14	Negativo	Negativo	Negativo
21	Negativo	Positivo	Negativo
28	Positivo	Positivo	Positivo
35	Positivo	Positivo	Positivo
42	Positivo	Positivo	Positivo

Tabela 3. Estimativa da idade dos frangos de corte para atingir 50% e 95% de suabes positivos em função do lote, respectivamente.

Lote	Idade (dias)	
	50%	95%
1 e 3	28,4	34,8
2	17,9	24,3

Por outro lado, os cascudinhos (*Alphitobius diaperinus*), frequentemente identificados em aviários de frangos de corte, podem ser contaminados por *Campylobacter*, porém seu papel como disseminadores da bactéria nas granjas ainda é incerto. Resultados preliminares indicam que é possível detectar a bactéria em cascudinhos coletados do ambiente avícola após o estabelecimento da colonização dos frangos (VAZ, et al., 2010b). Contudo a presença de cascudinhos positivos para *Campylobacter*, como fator isolado, não parece suficiente para disseminar a contaminação no aviário (VAZ, et al., 2012a). Aparentemente, o estabelecimento da colonização das aves é importante para amplificar a bactéria no intestino e dispersá-la no aviário por meio da rota fecal-oral.

A dispersão de linhagens de *Campylobacter* nas granjas ao longo do tempo pode auxiliar o entendimento da manutenção de *Campylobacter* no ambiente avícola, uma informação valiosa na identificação dos pontos relacionados à entrada da bactéria nos lotes. Ainda que a variabilidade das cepas de *Campylobacter* possa ser atribuída à troca de material genético entre cepas (WAGENAAR, 2012), foi possível observar a permanência ou manutenção de determinadas linhagens em lotes alojados na mesma granja no Brasil (Figura 1). Não obstante, essas linhagens foram típicas de cada agroindústria amostrada, o que poderia sugerir fatores individuais na circulação dessas cepas (VAZ, et al., 2012a).

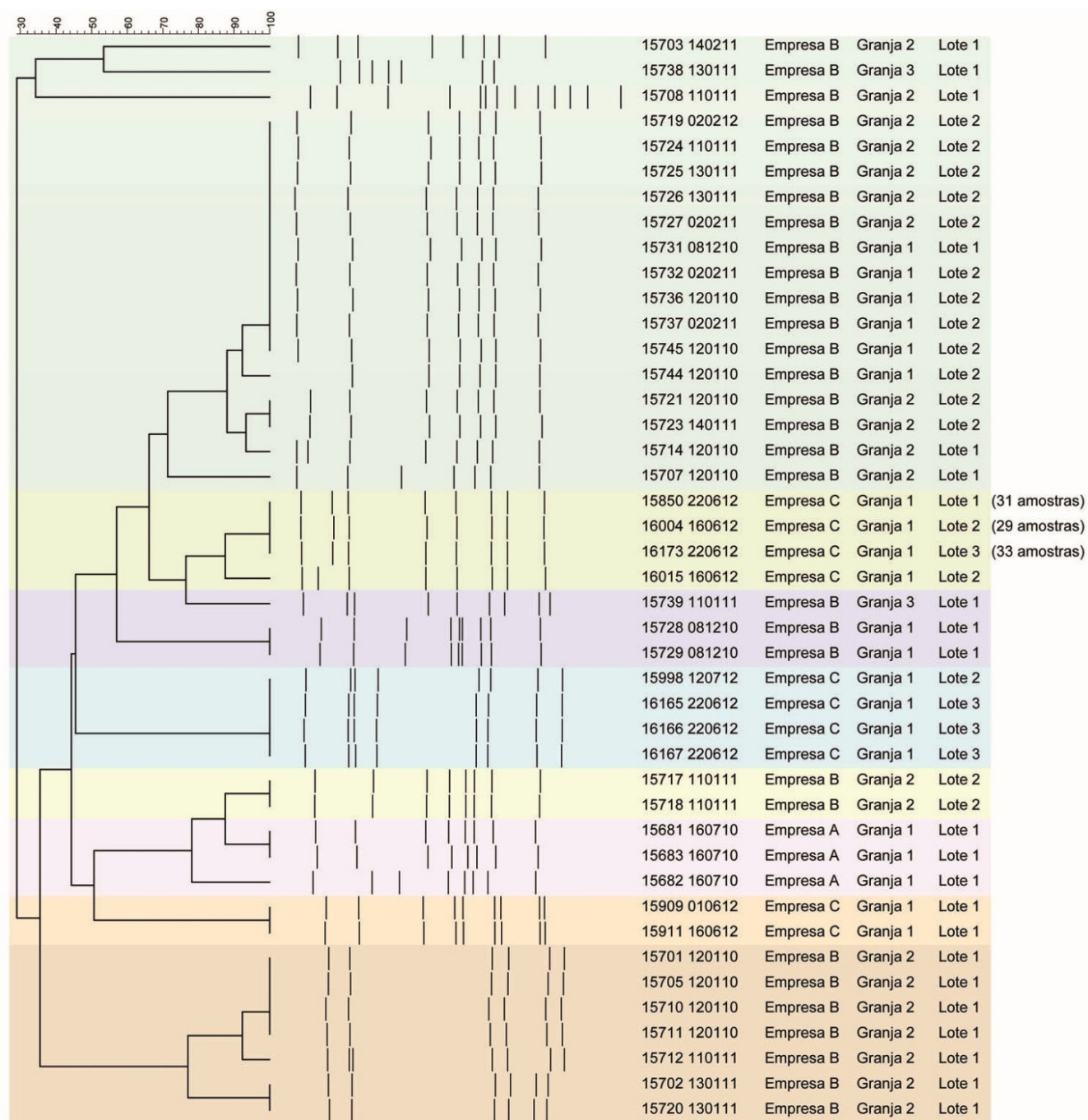
***Campylobacter* no abate de frangos de corte**

Durante a elaboração das diretrizes do *Codex Alimentarius* para controle de *Salmonella* e *Campylobacter* em carne de aves, um comitê técnico formado por membros da *Food and Agriculture Organization* (FAO) e *World Health Organization* (WHO) teceu considerações científicas sobre o assunto. Em relação a *Campylobacter*, o grupo considerou que, por ser encontrado predominantemente no intestino, sua presença no abate está mais relacionada à contaminação fecal. Por isso, as principais etapas elegíveis para aplicar estratégias de redução da contaminação no abate seriam a escaldagem, depenamento, evisceração, lavagem das carcaças e resfriamento. Entre as intervenções adicionais citadas como eficazes na redução de *Campylobacter* estão o uso de *chiller* de ar e o congelamento das carcaças (FAO/WHO, 2009).

No Brasil, *Campylobacter* já foi detectado em carcaças após o resfriamento (ALVES, et al. 2012; FRANCHIN, et al., 2007; KUANA, et al., 2008; REITER, et al.; 2005) e em outras etapas do abate de frangos. Entretanto, pelo efeito positivo do congelamento na redução de *Campylobacter* (BOYSEN; ROSENQUIST, 2009), pode ser esperada uma redução da contaminação do produto comercializado congelado. De fato, o nível de *Campylobacter* detectado em carne de frango embalada e resfriada foi semelhante ao detectado no produto após a etapa de resfriamento no abate, enquanto o congelamento da carne reduziu significativamente essa contaminação residual (ROSENQUIST, et al., 2006). O efeito do congelamento sobre a redução da contaminação de carcaças por *Campylobacter* também foi demonstrado em planta de abate e processamento da carne de frango no Brasil (FRANCHIN, et al., 2007).

Considerações finais

Campylobacter é bem adaptado ao intestino dos frangos e está mundialmente distribuído na avicultura de corte. Há diversas intervenções propostas em outros países para sua redução em frangos de corte ou durante o abate e processamento da carne, contudo não são totalmente efetivas ou não são aplicáveis universalmente. Por isso, exigências quanto à produção de carne de aves livre de *Campylobacter* não parecem uma perspectiva próxima ou real.



Isolados analisados por *Pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE). A similaridade das cepas foi calculada pelo Coeficiente de Dice e o dendrograma gerado a partir da análise de cluster por *Unweighted pair group method with arithmetic averages* (UPGMA). Coluna 1: identificação da cepa; Coluna 2: agroindústria amostrada; Coluna 3: granja amostrada na empresa; Coluna 4: lote amostrado em cada granja.

Figura 1. Relação entre cepas de *Campylobacter* isoladas de frangos de corte conforme a agroindústria de origem (A, B e C), granja e lotes amostrados.

Referências bibliográficas

- ALVES, L.; VOSS-RECH, D.; SILVA, V. S.; POZZA, J. S.; GASPARETTO, A.; VAZ, C. S. L. Study of thermophilic *Campylobacter* contamination of a broiler batch at slaughter. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 40, n. 3, p. 1-8. 2012.
- BOYSEN, L.; ROSENQUIST, H. Reduction of thermotolerant *Campylobacter* species on broiler carcasses following physical decontamination at slaughter. **Journal of Food Protection**, v. 72, p. 497-502. 2009.
- FAO/WHO. 2009. **Salmonella and Campylobacter in chicken meat**: meeting report. Rome. 2009. 56 p. (Microbiological Risk Assessment Series, 19.)
- 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, n. 2, p. 127-132. 2007.
- KUANA, S. L.; SANTOS L. R.; RODRIGUES L. B.; BORSOI, A.; MORAES, H. L. S.; SALLE, C. T. P.; NASCIMENTO, V. P. Occurrence and characterization of *Campylobacter* in the Brazilian production and processing of broilers. **Avian Diseases**, v. 52, p. 680-684. 2008.
- REITER, M. G. R.; BUENO, C. M. M.; LÓPEZ 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.
- ROSENQUIST, H.; SOMMER, H. M.; NIELSEN, N. L.; CHRISTENSEN, B. B. The effect of slaughter operations on the contamination of chicken carcasses with thermotolerant *Campylobacter*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 226-232. 2006.
- VAZ, C. S. L.; VOSS-RECH, D.; POZZA, J. S.; COLDEBELLA, A.; SILVA, V. S. *Campylobacter* como contaminante da cama de aviário. **Avicultura Industrial**, ed. 1216, n. 10, p. 12-17. 2012a.
- VAZ, C. S. L.; VOSS-RECH, D.; POZZA, J. S.; SANTOS, F. B. O.; COLDEBELLA, A.; SILVA, V. S. Dynamics of thermophilic *Campylobacter* colonization in broiler flocks reared on reused litter. **World's Poultry Science Journal**, v. 68, n. 1. 2012b.
- WAGENAAR, J. *Campylobacter*: a friend of poultry but an enemy of public health. **World's Poultry Science Journal**, v. 68, n. 1, p. 1-8. 2012.

TÉCNICAS LABORATORIAIS PARA ISOLAMENTO DE *Campylobacter* EM MATERIAL AVÍCOLA

Daiane Voss-Rech* e Clarissa Silveira Luiz Vaz

Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC

**daiane.rech@embrapa.br*

O gênero *Campylobacter* tem sido reconhecido mundialmente como agente de enterocolite humana transmitida por alimentos. Sua importância como doença transmitida por alimentos é crescente e simultaneamente crescem os esforços laboratoriais para detecção do patógeno. Diversos métodos de coleta e isolamento vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de obter melhores resultados na detecção bacteriológica de *Campylobacter*. Inúmeras variações dos métodos microbiológicos convencionais (ADVISORY COMMITTEE ON THE MICROBIOLOGICAL SAFETY OF FOOD, 2010; INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2006; USDA/FSIS, 1998), técnicas de cultura seletiva como passagem por membrana filtrante e centrifugação (BOLTON, et al., 1988; STEELE; MCDERMOTT, 1984) ou associação destas (MÉGRAUD, 1987; SPEEGLE, et al., 2009) vêm sendo utilizadas para o isolamento de *Campylobacter*. Apesar das inúmeras possibilidades metodológicas, a divergência entre os resultados e a inexistência de um método de referência para amostras de origem aviária dificultam a definição do método de isolamento a ser utilizado no laboratório. Como suporte à linha de pesquisa com *Campylobacter*, na Embrapa Suínos e Aves, foi necessário desenvolver estudos para selecionar um protocolo para o isolamento de *Campylobacter* a partir de amostras de origem aviária. A seguir descreveremos os resultados desta experiência.

Coleta e transporte das amostras

As condições de coleta e transporte de amostras destinadas à análise microbiológica de *Campylobacter* devem considerar algumas características deste gênero. São bactérias que requerem baixa tensão de oxigênio para multiplicação. São sensíveis a concentrações superiores a 2% de NaCl a 30-35°C ou 1% a 4°C. O pH ótimo está entre 6,5 e 7,5 e são sensíveis à desidratação (HOLT, 1994). Sobrevivem melhor em baixas temperaturas, porém são sensíveis ao congelamento (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2006; HUNT; ABEYTA, 1995).

Sendo assim, as amostras coletadas devem ser transportadas sob refrigeração e processadas rapidamente. Amostras íntegras, como cecos ou carcaças de frango podem ser embaladas e transportadas em sacos plásticos. Amostras naturalmente mais expostas às condições ambientais, como suabes de cloaca e de arrasto, devem ser transportadas em meio de conservação. Ágar Cary-Blair e Caldo Peptonado Tamponado 1% (CPT) são boas soluções como meio de transporte sólido e líquido, respectivamente, pois são de fácil acesso aos laboratórios e apresentam capacidade tamponante, que favorece a manutenção das amostras até o processamento.

Um estudo sobre a colonização de frangos de corte por *Campylobacter* demonstrou que a detecção da bactéria ocorreu a partir da terceira semana, sendo possível estimar o percentual de suabes de cloaca positivos, aumentando gradativamente a partir da detecção dos primeiros positivos e atingindo quase 100% do lote no pré-abate (VAZ, et al. 2012a) (Figura 1), sendo este o período mais indicado para a coleta das amostras.

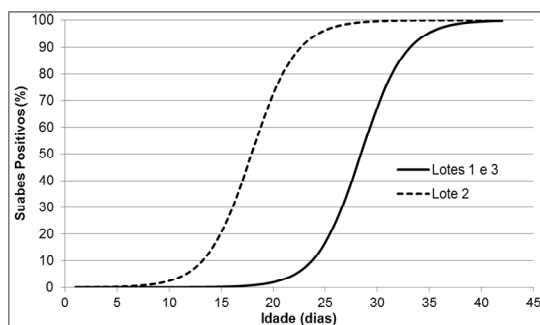


Figura 1. Percentual de suabes de cloaca positivos para *Campylobacter* em três lotes de frangos conforme modelo logístico ajustado.

Isolamento laboratorial

Aspectos gerais

O isolamento de *Campylobacter* demanda que o laboratório disponha de algumas condições mínimas, como geradores de microaerofilia ou mistura gasosa adequada (N_2 :85%, O_2 :5% e CO_2 :10%) (Figura 2), meios de cultura e antimicrobianos específicos, amostras controle e treinamento laboratorial.

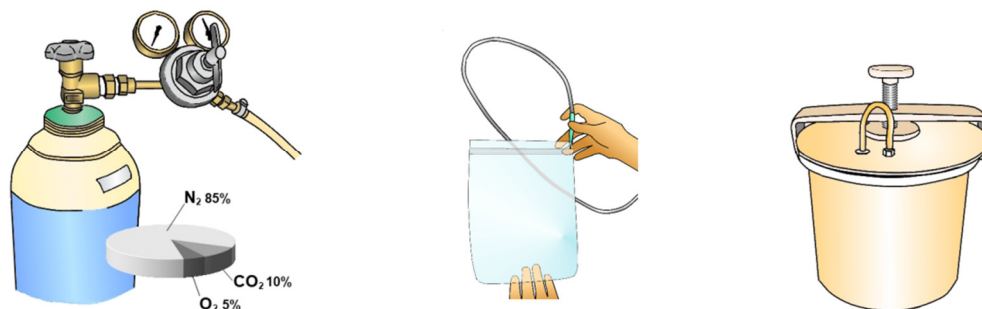


Ilustração: Alexandre Matthiensen/Embrapa

Figura 2. Equipamentos e acessórios utilizados na Embrapa Suínos e Aves para geração e manutenção de condições microaerófilas no cultivo de *Campylobacter*

Existem três principais fatores que dificultam o isolamento de *Campylobacter*:

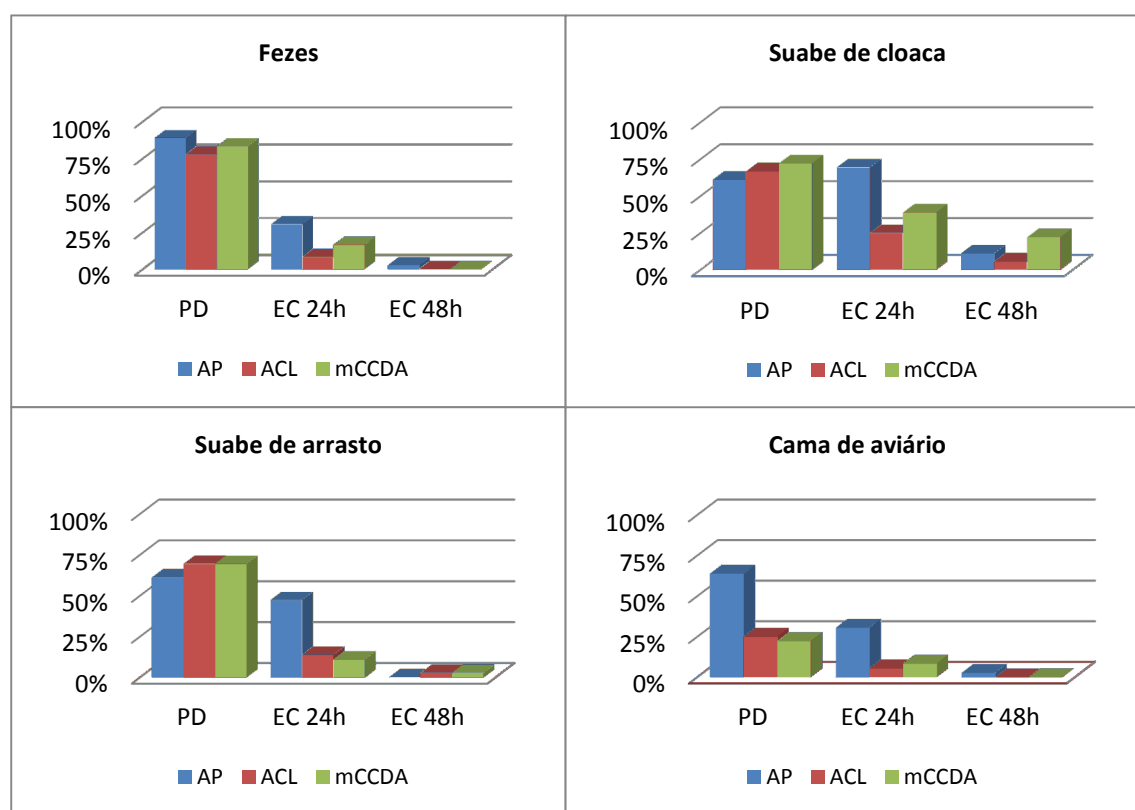
1. Amostras muito contaminadas com flora competitiva;
2. Amostras com baixo número de micro-organismos;
3. Células injuriadas pelas condições de armazenamento e processamento (congelamento, dessecação, aquecimento, acidificação e exposição ao oxigênio) (ADVISORY COMMITTEE ON THE MICROBIOLOGICAL SAFETY OF FOOD, 2010; THEOPHILO; JAKABI, 2008).

O uso de antimicrobianos e antifúngicos nos meios de cultura é indispensável para reduzir a flora contaminante, dentre os quais podemos citar: trimetoprim, vancomicina, anfotericina B, cefalotina, polimixina B, cefoperazona, rifampicina e outras. Suplementos redutores de oxigênio como sulfato ferroso, metabissulfito e piruvato de sódio, hemina, sangue e carvão bacteriológico também são componentes de alguns meios de cultura (HUNT; ABEYTA, 1995).

Nossa experiência

Material de campo

Um trabalho foi desenvolvido para avaliar a eficiência de diferentes meios seletivos e estratégias de isolamento para detecção de *Campylobacter* termófilos em material avícola, rotineiramente usado em pesquisas ou monitorias microbiológicas de aves (cama de aviário, fezes, suabes de cloaca e de arrasto). O estudo demonstrou que amostras de fezes, suabe de cloaca e suabe de arrasto coletados de lotes de frangos a partir de quatro semanas de idade apresentaram maior frequência de isolamento da bactéria (Figura 3) (VAZ, et al., 2012b) e seriam os mais adequados para monitoria de *Campylobacter* em frangos de corte.



ACL: Agar Campy-Line; mCCDA: Agar Carvão Cefoperazona Deoxycolato modificado

Figura 3. Detecção de *Campylobacter* termófilos em amostras de origem aviária conforme diferentes estratégias e meios seletivos para isolamento bacteriológico

O mesmo trabalho demonstrou que para as amostras de cama de aviário o plaqueamento direto (PD) em Ágar Preston foi o mais efetivo para detecção de *Campylobacter* ($p < 0,05$). Para as demais amostras não houve diferença estatística entre os três meios seletivos analisados no PD. Para as amostras de suabes de cloaca e de arrasto não houve diferença estatística entre o plaqueamento direto ou o enriquecimento em Caldo Bolton (EC) por 24h em Ágar Preston. Em relação à cama e fezes, o PD foi mais eficiente no isolamento de *Campylobacter* se comparado ao EC 24h, independente do meio seletivo utilizado.

Por outro lado, o EC por 48h não favoreceu o isolamento de *Campylobacter* em cama de aviário, fezes, suabes de arrasto e de cloaca em relação ao PD e ao EC por 24h (Figura 3) (VAZ, et al., 2012b). Esse resultado sugere que o tempo de incubação no enriquecimento em caldo é um fator importante: a partir de 24h a flora competitiva aumenta reduzindo os índices de isolamento de *Campylobacter*, que ficam ainda menores após 48h (ADVISORY COMMITTEE ON THE MICROBIOLOGICAL SAFETY OF FOOD, 2010; VAZ, et al., 2012b).

O plaqueamento direto facilita o isolamento de *Campylobacter* por inibir a proliferação exacerbada de contaminantes naturalmente presentes na amostra, entretanto, é descrito como não suficientemente sensível para a detecção em amostras com baixa concentração do micro-organismo. O enriquecimento seletivo favorece o isolamento de *Campylobacter* nestas amostras (THEOPHILO; JAKABI, 2008). Assim, a combinação do PD e do EC por 24h pode ser avaliada para aumentar a probabilidade de isolamento.

Baseado nesses resultados e considerando o ganho em termos de custo e tempo de execução do ensaio, o plaqueamento direto em dois meios seletivos com diferentes composições de suplementos seletivos (ex. AP e mCCDA) pode ser recomendado como primeira opção para detecção de *Campylobacter* em cama de aviário, fezes, suabes de arrasto e de cloaca; podendo ser associado ao EC 24h para análise de suabes de cloaca e de arrasto. O protocolo utilizado na Embrapa Suínos e Aves para isolamento de *Campylobacter* em amostras aviárias segue o fluxograma descrito na Figura 4.

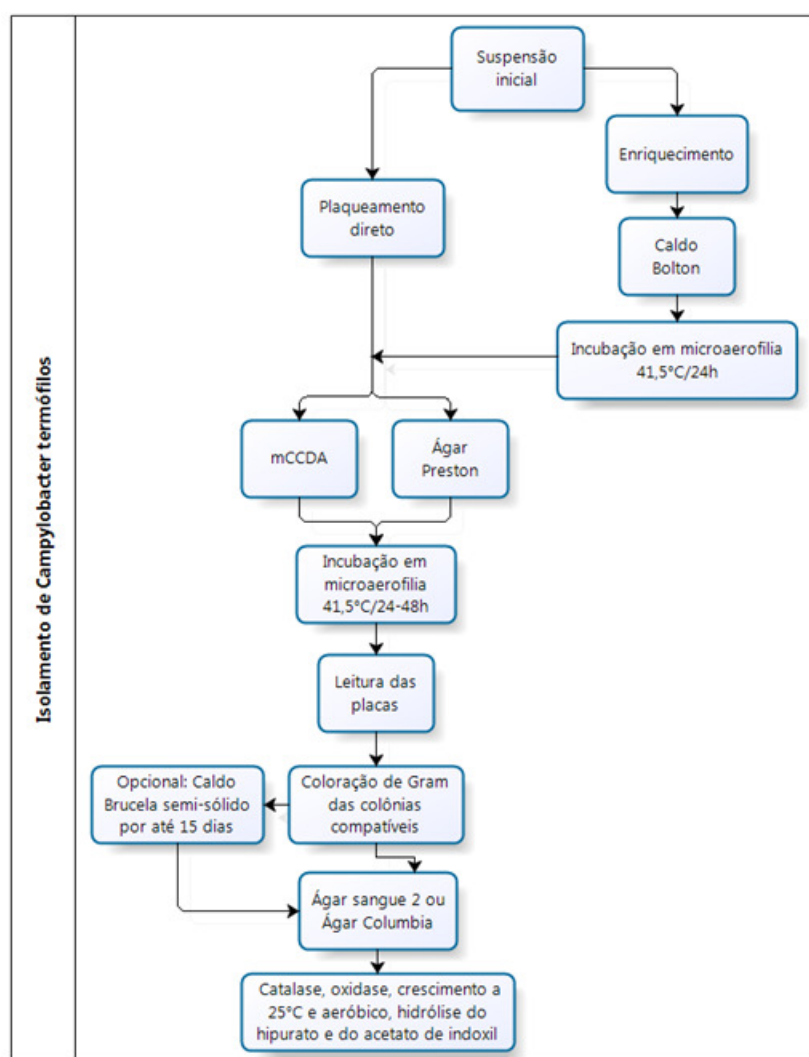


Figura 4. Fluxograma do isolamento de *Campylobacter* termófilos de amostras de origem aviária utilizado pela Embrapa Suínos e Aves

Carcaças e cortes de frango

Em relação a alimentos, existem métodos validados para análise qualitativa de *Campylobacter*, dos quais o mais conhecido é o padronizado pela *International Organization for Standardization* (ISO) (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2006). Porém, alguns autores relatam resultados variáveis com esse protocolo (GRITTI, et al., 2011; MORAN, et al., 2009). O fluxograma deste método está apresentado na Figura 5. Nesse tipo de material é preconizada a pré-incubação em caldo seletivo por 4h a 37°C em microaerofilia (BOLTON, 2000; HUMPHREY, 1989; INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2006;), evitando meios com rifampicina e polimixina, para recuperação das células lesadas que podem tornar-se sensíveis à temperatura de 42°C e a esses antibióticos (ADVISORY COMMITTEE ON THE MICROBIOLOGICAL SAFETY OF FOOD, 2010). O tempo de 4h deve ser limitante para evitar o crescimento exacerbado de contaminantes (ADVISORY COMMITTEE ON THE MICROBIOLOGICAL SAFETY OF FOOD, 2010; GOOSENS; BUTZLER, 1992; THEOPHILO; JAKABI, 2008).

O preparo da suspensão inicial é realizado pela rinsagem do produto inteiro ou amostragem a partir de 5-10g de fragmentos da pele do pescoço, os quais são homogeneizados em um diluente, como Caldo Peptonado Tamponado, a partir do qual uma parte é retirada e adicionada a nove volumes de Caldo Bolton. A recomendação para os cortes de frangos é utilizar fragmentos da superfície adicionados de nove volumes de Caldo Peptonado Tamponado (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2003).

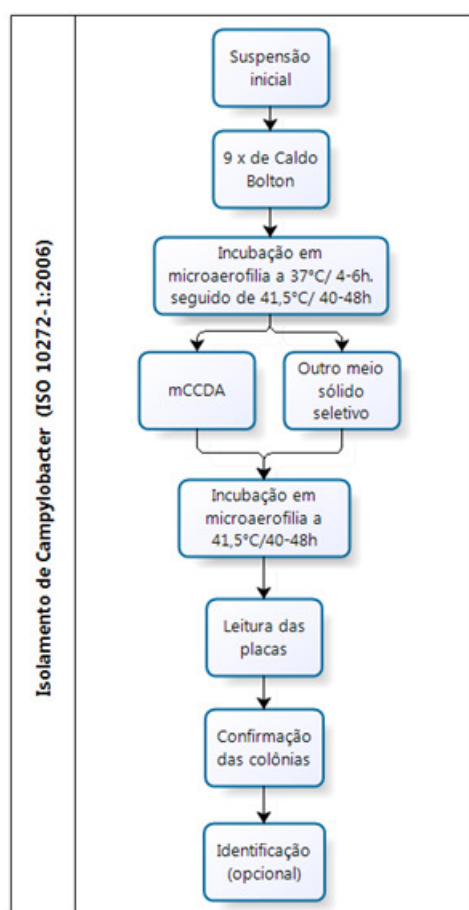


Figura 5. Fluxograma do isolamento de *Campylobacter* termófilos de amostras de alimentos e ração animal, conforme ISO 10272-1:2006. Adaptado de Humphrey et al. (2007).

Identificação das colônias

Colônias de *Campylobacter* não são hemolíticas, podem ser: lisas, convexas, brilhantes e com bordas perfeitas; ou ainda planas, translúcidas e lustrosas, com bordas irregulares e espalhadas. Geralmente são incolores, com tonalidades creme ou acinzentada, e diâmetro de 1-2 mm, podendo ainda ser puntiformes com 4-5 mm.

As células são móveis, Gram negativas, delgadas, curvas ou em forma de “S” ou de asa de gaivota, geralmente formando pequenas cadeias em *zig-zag*. Por esta morfologia particular o exame microscópico é um grande aliado no diagnóstico presuntivo de *Campylobacter*. Células velhas ou injuriadas podem apresentar-se cocóides e de multiplicação mais lenta.

Confirmação das colônias

Campylobacter não metaboliza açúcares, portanto a maioria das provas bioquímicas rotineiramente disponíveis nos laboratórios não são aplicáveis. Colônias com morfologia características devem ser semeadas em ágar sangue nº2 (AS) ou ágar Colúmbia (AC) com ou sem adição de sangue para confirmação pelas provas de catalase, oxidase e motilidade. A morfologia celular associada às provas confirmatórias costuma ser suficiente para diferenciar *Campylobacter* da maioria das espécies contaminantes, sendo recomendável associar os testes de crescimento microaeróbico a 25°C e aeróbico a 41,5°C para diferenciação de bactérias do gênero *Arcobacter*, filogeneticamente relacionado à *Campylobacter*.

Para diferenciar as espécies de *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari* são realizadas as provas de hidrólise do hipurato e acetato de indoxil. O teste de sensibilidade a cefalotina e ácido nalidíxico é descrito como prova diferencial das espécies de *Campylobacter* (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2006), sendo a resistência a cefalotina uma característica do gênero e ao ácido nalidíxico variável conforme a espécie. Na prática, observamos alta frequência de isolados de campo resistentes ao ácido nalidíxico, independente de espécie, o que recomenda cautela no uso e na interpretação desse teste como diferencial.

Outro teste que pode ser útil para a confirmação de colônias é a prova de aglutinação em látex, comercializada em *kit*. *Kits* comerciais para identificação também estão disponíveis (APY CAMPY-Biomeuriex), assim como *kits* de detecção por imunoensaio enzimático (CAMPY - Meridian Bioscience; ProSpecT - Remel e ImmunoCard - Meridian Bioscience), além de outros. Nestes casos, entretanto, o custo por amostra pode ser um fator limitante ao uso em menor escala.

Manutenção e estoque dos isolados

Campylobacter não tolera a exposição ao oxigênio atmosférico, portanto uma alternativa prática para manter os isolados viáveis em curto prazo, durante a rotina laboratorial, é o Caldo Brucella semi-sólido (CBSS) (HUNT; ABEYTA, 1995). As colônias semeadas em CBSS multiplicam-se lentamente abaixo da superfície do meio, permanecendo viáveis a 37°C por até 15 dias. O meio de congelamento, composto por caldo nutriente, extrato de levedura, soro fetal bovino e FBP (sulfato ferroso, piruvato de sódio e metabisulfito de sódio) é uma alternativa para estocar as amostras em longo prazo à -70°C (HUNT; ABEYTA, 1995).

Conclusão

O estabelecimento da rotina laboratorial para isolamento de *Campylobacter* demanda tempo e perseverança e os resultados obtidos podem variar significativamente de acordo com o método utilizado. Contudo, o diagnóstico laboratorial de *Campylobacter* pode ser feito com segurança quando técnicas e métodos laboratoriais são avaliados e utilizados adequadamente.

Referências bibliográficas

- ADVISORY COMMITTEE ON THE MICROBIOLOGICAL SAFETY OF FOOD. **The isolation of *Campylobacter* spp. from food and environmental samples**. Surveillance Working Group. Discussion Paper ACM/994. 2010.
- BOLTON, F. J. Methods for isolation of *campylobacters* from humans, animals, food and water. In: The increasing incidence of human campylobacteriosis Report and Proceedings of a WHO Consultation of Experts. **Copenhagen Denmark**, p. 87-93. 2000.
- BOLTON, F. J.; HUTCHINSON, D. N.; PARKER, G. Reassessment of selective agars and filtration techniques for isolation of *Campylobacter* species from faeces. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 7, p. 155–160. 1988.
- GOOSENS, H.; BUTZLER, J. P. Isolation and identification of *Campylobacter* spp. In: NACHAMKIN, I., BLASER, M.J., TOMPKINS, L.S. (Ed.). ***Campylobacter jejuni*: current status and future trends**. Washington, DC: ASM, 1992. p. 93–109.
- GRITTI, D.; VAZ, C.S.L.; VOSS-RECH, D.; ALVES, L.; BORTOLINI, F. Thermophilic *Campylobacter* survey in chilled and frozen poultry meat at retail in Concórdia, Santa Catarina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 3, p.1-5. 2011.
- HOLT, J. G. (Ed.) **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9th. ed. Maryland: Williams e Wilkins, 1994. 787 p.
- HUMPHREY, T. J. An appraisal of the efficacy of pre-enrichment for the isolation of *Campylobacter jejuni* from water and food. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, p. 119–126, 1989.
- HUMPHREY, T. J.; O'BRIEN, S.; MADSEN, M. *Campylobacters* as zoonotic pathogens: a food production perspective. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, n. 3, p. 237-257, 2007.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Microbiology of food and animal feeding stuffs** – Horizontal method for detection and enumeration of thermotolerant *Campylobacter* spp. – Part 1: detection method. (ISO 10272-1:2006 [E]). Geneva: ISO, 2006. 16 p.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Microbiology of food and animal feeding stuffs** – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. (ISO 6887-2) Geneva: ISO, 2003.
- MÉGRAUD, F. Isolation of *Campylobacter* spp. from pigeon feces by a combined enrichment-filtration technique. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 1394–1395. 1987.
- MORAN L.; KELLY C.; MADDEN R. H. Factors affecting the recovery of *Campylobacter* spp. from retail packs of raw, fresh chicken using ISO 10272-1:2006. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, p. 628-632, 2009.
- SPEEGLE, L.; MILLER, M. E.; BACKERT, S.; OYARZABAL, O. A. Use of cellulose filters to isolate *Campylobacter* spp. from naturally contaminated retail broiler meat. **Journal of Food Protection**, v. 72, p. 2592–2596, 2009.
- STEELE, T. W.; MCDERMOTT, S. N. The use of membrane filters applied directly to the surface of agar plates for the isolation of *Campylobacter jejuni* from feces. **Pathology**, v. 16, p. 263–265. 1984.

THEOPHILO, G. N. D; JAKABI, M. **Manual técnico**. WHO Global Salm-Surv Nível III. Capacitação Integrada. *Campylobacter spp.* Diagnóstico laboratorial: métodos clássicos e moleculares. 2008.

USDA/FSIS. **Isolation, identification, and enumeration of *Campylobacter jejuni/coli* from meat and poultry products**. Microbiology Laboratory Guidebook, chapter 6. 1998.

HUNT, J. M.; ABEYTA, C. *Campylobacter*. In: BACTERIOLOGICAL analytical manual. 8. ed. Maryland: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1995.

VAZ, C. S. L.; VOSS-RECH, D.; POZZA, J. S.; SANTOS, F. B. O.; COLDEBELLA, A.; SILVA, V. S. Dynamics of thermophilic *Campylobacter* colonization in broiler flocks reared on reused litter. **World's Poultry Science Journal**, v. 68, n. 1, 2012.

VAZ, C.S.L.; VOSS-RECH, D.; POZZA, J. S.; SANTOS, F. B. O.; COLDEBELLA, A.; SILVA, V. S. Frequency of thermophilic *Campylobacter* in commercial broiler farms in southern Brazil using different culturing techniques and selective media. **World's Poultry Science Journal**, v. 68, v. 1, p. 268-270. 2012.

ANEXO 1 - PROCEDIMENTOS PARA IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE *Campylobacter* TERMÓFILOS

Análise morfológica das colônias

As colônias de *Campylobacter* são pequenas, não hemolíticas e apresentam-se com aspecto liso (Figura 1a) ou irregular e espalhado (Figura 1b); de coloração brilhante ou lustrosa e em tons de cinza ou creme.



Figura 1. Colônias de *Campylobacter* em (a) Ágar seletivo (mCCDA) e (b) não seletivo (Ágar Sangue nº2)

Coloração de Gram

A partir de diferentes colônias isoladas na placa de ágar seletivo, preparar esfregaços individuais em uma gota de solução salina 0,85%. Após a fixação, prosseguir com a coloração conforme descrito:

1. Cristal violeta (60 segundos)
2. Lugol (60 segundos)
3. Etanol (10 segundos)
4. Fuccina fenicada (120 segundos)

Campylobacter apresenta-se ao microscópio óptico como pequenas células Gram negativas, com tamanho entre 0,2 a 0,9 μm de largura e 0,2 a 5 μm de comprimento, de formato curvo ou em espiral (Figura 2). Células procedentes de colônias velhas podem apresentar aspecto cocóide. Colônias de aspecto compatível devem ser semeadas em ágar não seletivo (Ágar sangue nº2 ou Ágar Colúmbia com sangue) e incubadas em microaerofilia a 41,5°C por 24 a 48 h para confirmação.

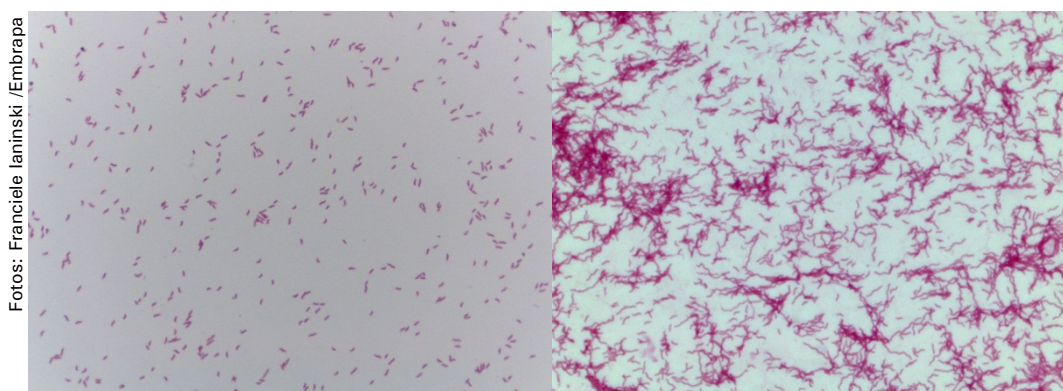


Figura 2. Morfologia de *Campylobacter* ao microscópio óptico (aumento de 1000X)

Análise da motilidade

A partir do ágar não seletivo, selecionar uma colônia e homogeneizar em uma gota de solução salina 0,85% na superfície de uma lâmina de microscopia. Opcionalmente, o homogeneizado pode ser acrescido de uma gota da solução de cristal violeta, usada na coloração de Gram. Cobrir com lamínula e examinar em microscópio óptico ou de contraste de fase. *Campylobacter* apresenta movimentos em espiral ou em formato de “saca-rolhas” devido à presença de flagelos polares.

Prova da catalase

A partir de ágar não seletivo sem adição de sangue (Ágar Colúmbia), retirar uma colônia e depositar sobre uma gota de H₂O₂ a 3%. Observar a formação de bolhas decorrentes da liberação de O₂ pela clivagem do peróxido de hidrogênio na presença da catalase (Figura 3). Controle positivo: *Pseudomonas aeruginosa*. Controle negativo: *Enterococcus faecalis*.



Figura 3. Teste de catalase positivo (esquerda) e negativo (direita)

Prova da oxidase

Usando um palito, suabe de algodão ou alça de vidro estéreis, transferir uma colônia isolada em ágar não seletivo à fita reativa de oxidase. Observar a alteração para cor púrpura (reação positiva), de acordo com as instruções do fabricante (Figura 4). Controle positivo: *Pseudomonas aeruginosa*. Controle negativo: *Staphylococcus aureus*.

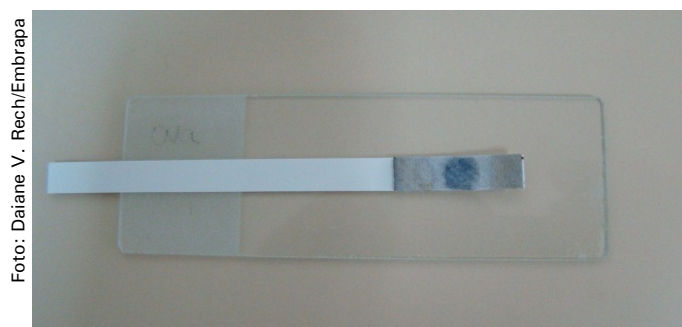


Figura 4. Reação positiva (centro) e negativa (extremidades) ao teste da oxidase

Análise do crescimento microaeróbico a 25°C

Identificar colônias morfológicamente compatíveis com *Campylobacter* no meio não seletivo e semear, individualmente, em ágar não seletivo (Ágar sangue nº 2 ou Ágar Colúmbia com sangue). Incubar as placas a 25°C em microaerofilia por 44 ± 4h. Controle positivo: *Arcobacter skirrowii*. Controle negativo: *Campylobacter jejuni* subsp. *doylei*.

Análise do crescimento aeróbico a 41,5°C

Identificar colônias morfológicamente compatíveis com *Campylobacter* no meio não seletivo e semear, individualmente, em ágar não seletivo (Ágar sangue n° 2 ou Ágar Colúmbia com sangue). Incubar as placas a 41,5°C em aerobiose por 44 ± 4 h. Controle positivo: *Arcobacter butzleri*. Controle negativo: *Campylobacter jejuni* subsp. *doylei*.

Teste da hidrólise do hipurato de sódio

A partir do ágar não seletivo, transferir uma alçada da cultura para um tubo contendo 0,4 mL de solução de hipurato de sódio 1% e incubar em bloco térmico ou banho de água a 37°C por 2 h. Adicionar 0,2 mL de solução de ninhidrina 3,5% lentamente, pela parede do tubo, formando uma sobre camada. Incubar a 37°C por 10 minutos e observar a alteração de coloração. Reações positivas apresentam-se em azul escuro, enquanto que reações negativas permanecem sem alteração da cor (Figura 5). Controle positivo: *Campylobacter jejuni*. Controle negativo: *Campylobacter coli*.

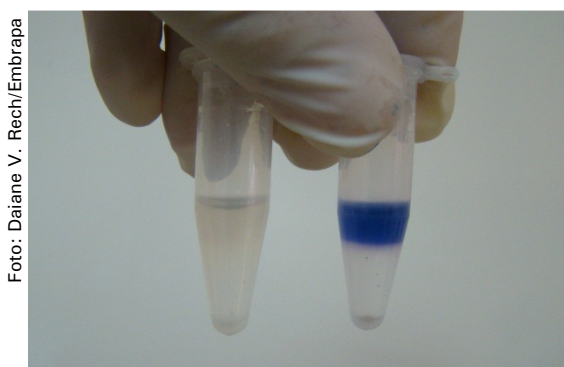


Figura 5. Reação negativa (esquerda) e positiva (direita) ao teste da hidrólise do hipurato de sódio

Teste da hidrólise do acetato de indoxil

A partir de ágar não seletivo, transferir uma alçada da cultura para a superfície de um disco de papel impregnado com acetato de indoxil e cobrir com uma gota de água destilada estéril. Aguardar entre 5 e 10 minutos e verificar alteração para cor azul escuro (Figura 6). Controle positivo: *Campylobacter jejuni*. Controle negativo: *Campylobacter lari*.



Figura 6. Reação negativa (esquerda) e positiva (direita) ao teste de hidrólise do acetato de indoxil

Teste de sensibilidade ao ácido nalidíxico e cefalotina

A partir da cultura em ágar não seletivo, preparar uma suspensão em Caldo *Brucella* de acordo com o tubo 0,5 da escala de McFarland, e diluir essa suspensão 1:10 em Caldo *Brucella*. Distribuir sobre a superfície de uma placa contendo Ágar Mueller-Hinton com 5% de sangue ovino desfibrinado. Distribuir um disco de cefalotina e um disco de ácido nalidíxico sobre a superfície. Incubar as placas a 37°C em microaerofilia por 22hs ± 2hs. A presença de halo de inibição de qualquer diâmetro indica sensibilidade, e a ausência indica resistência (Tabela 1).

Tabela 1. Espécies de *Campylobacter* termófilos de acordo com o perfil de sensibilidade*

	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>
Cefalotina	R	R	R	S
Ácido nalidíxico *	S	S	S ou R	S

R = resistente

S = sensível

*Considerar a aplicabilidade do ensaio frente à ocorrência de cepas de *C. jejuni* e *C. coli* resistentes ao ácido nalidíxico.

Características bioquímicas de *Campylobacter*

A Tabela 2 apresenta as principais características bioquímicas usadas para diferenciação de espécies de *Campylobacter* e bactérias relacionadas.

Tabela 2. Características bioquímicas diferenciais de *Campylobacter*

Espécie	Crescimento microaeróbico a 25°C	Crescimento aeróbico a 41,5°C	Catalase	Oxidase	Hidrólise do hipurato de sódio	Hidrólise do acetato de indoxil	Redução de nitrato
<i>C. jejuni jejuni</i>	-	-	+	+	+	+	+
<i>C. jejuni doylei</i>	-	-	+	+	+	+	-
<i>C. coli</i>	-	-	+	+	-	+	+
<i>C. lari</i>	-	-	+	+	-	-	+
<i>C. upsaliensis</i>	-	D	-	+	-	+	w
<i>C. fetus fetus</i>	-	w	+	+	-	-	w
<i>C. fetus venerealis</i>	-	-	+	+	-	-	w
<i>A. butzleri</i>	+	+	+	+	-	+	w
<i>A. skirrowii</i>	+	+	+	+	-	+	w

W = fracamente positivo

D = algumas cepas são +, outras

Adaptado de Corry et al. (1995), Snelling et al. (2006) e Lastovica e Allos (2008).

Referências bibliográficas

CORRY, J. E. L.; POST, D. E.; COLIN, P.; LAISNEY, M. J. Culture media for the isolation of *campylobacters*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 26, p. 43-76, 1995.

LASTOVICA, A. J.; ALLOS, B. M. Clinical significance of *Campylobacter* and related species other than *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. In: NACHAMKIM, I.; SZYMANSKI, C. M.; BLASER, M. J. **Campylobacter**. 3. ed. Washington, DC: ASM Press, 2008. p. 123-149.

SNELLING, W. J.; MATSUDA, M.; MOORE, J. E.; DOOLEY, J. S. G. Under the microscope: *Arcobacter*. **Letters in Applied Microbiology**. v. 42, p. 7-14, 2006.

Literatura recomendada

HUNT, J. M.; ABEYTA, C. *Campylobacter*. In: BACTERIOLOGICAL analytical manual. 8. ed. Maryland: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1995.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Microbiology of food and animal feeding stuffs** – Horizontal method for detection and enumeration of thermotolerant *Campylobacter* spp. – Part 1: detection method. (ISO 10272-1:2006 [E]). Geneva: ISO, 2006. 16 p.

ANEXO 2: TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR PARA DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS EM *Campylobacter*

Princípio

De acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, documento M45-A2), a sensibilidade a antimicrobianos em *Campylobacter* é determinada pelo teste da concentração inibitória mínima por meio de microdiluição em caldo ou pelo método de difusão em ágar. Ambos os ensaios apresentam características peculiares devido à natureza fastidiosa da bactéria. As informações a seguir referem-se ao teste de difusão em ágar, conforme recomendações do CLSI (M45-A2), e são direcionadas a laboratórios de microbiologia clínica para o teste de suscetibilidade a antimicrobianos em bactérias fastidiosas, dentre as quais *Campylobacter*, que requerem suplementação de componentes no meio e atmosfera diferenciada.

Condições do ensaio

O inóculo parte de uma suspensão das colônias cultivadas em meio não seletivo por 24 h, conforme o tubo 0,5 da escala de McFarland. Essa suspensão é distribuída em Ágar Mueller-Hinton com 5% de sangue ovino sobre o qual os discos com antimicrobianos são depositados. As placas são incubadas em atmosfera de microaerofilia (10% CO₂, 5% O₂ e 85% N₂) sob temperatura de 36°C a 37°C por 48 h; ou 42°C por 24 h. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Tabela 1) é usado no controle de qualidade do teste de difusão em ágar, sendo distribuído em Ágar Mueller-Hinton sem adição de sangue e incubado sob temperatura de 35°C a 37°C por 16 a 18 h em aerobiose. O grupo primário de antimicrobianos a testar em laboratórios clínicos são macrolídeos e quinolonas, especialmente eritromicina e ciprofloxacina (Tabela 2).

Tabela 1. Padrões para o controle de qualidade no teste de difusão em ágar.

Antimicrobiano	Concentração no disco	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
Eritromicina	15 µg	22-30
Ciprofloxacina	5 µg	22-30

Tabela 2. Critério de interpretação do teste de difusão em ágar para *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*.

Antimicrobiano	Concentração no disco	Critério conforme o diâmetro do halo de inibição (mm)		
		Sensível	Intermediário	Resistente
Eritromicina	15 µg	-	-	6
Ciprofloxacina	5 µg	-	-	6

Literatura recomendada

METHODS for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. 2. ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010. Approved guideline M45-A2

ANEXO 3 - COMPOSIÇÃO E PREPARO DE MEIOS DE CULTIVO E REAGENTES**Água peptonada 1%**

Peptona.....	10 g
Cloreto de sódio (NaCl).....	5 g
Fosfato de sódio dibásico (Na ₂ HPO ₄).....	3,5 g
Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄).....	1,5 g
Água destilada.....	1000 mL
pH.....	7,2 ± 0.2

Dissolver o KH₂PO₄ em água morna antes adicionar ao meio ou aquecer toda a solução até dissolver completamente. Autoclavar a 121 °C por 15 min.

Literatura recomendada

BACTERIOLOGICAL analytical manual. 8. ed. Maryland: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1995.

Ágar Cary-Blair

Tioglicolato de sódio.....	1,5 g
Fosfato de sódio dibásico (Na ₂ HPO ₄).....	1,1 g
Cloreto de sódio (NaCl)	5 g
Ágar bacteriológico.....	5 g
Cloreto de cálcio (CaCl ₂ , solução 1%).....	9 mL
Água destilada (q.s.p)	1000 mL
pH.....	8,4

Dissolver os reagentes por agitação com aquecimento. Aguardar resfriar a 50 °C e adicionar a solução de CaCl₂ 1%. Distribuir alíquotas de 7 mL em tubos de 9 mL com tampa rosca e esterilizar em calor úmido (autoclave entreaberta) por 15 minutos. Após resfriar, fechar as tampas e estocar a 4 °C.

Literatura recomendada

BACTERIOLOGICAL analytical manual. 8. ed. Maryland: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1995.

Ágar CCD modificado (mCCDA)

Extrato de carne.....	10 g
Digestão enzimática de tecidos animais.....	10 g
Cloreto de sódio (NaCl)	5 g
Carvão bacteriológico.....	4 g
Caseína hidrolisada.....	3 g
Deoxicolato de sódio.....	1 g
Sulfato ferroso.....	0,25 g
Piruvato de sódio.....	0,25 g
Ágar bacteriológico.....	até 18 g

Água destilada (q.s.p.)	1000 mL
pH.....	7,4 ± 0.2
Suplemento seletivo	
Cefoperazona.....	0,032 g
Anfotericina B.....	0,01 g

Autoclavar a 121°C por 15 min. Aguardar resfriar até 50°C e adicionar assepticamente o suplemento seletivo previamente dissolvido em água e esterilizado por filtração. Distribuir em placas e aguardar solidificar. Armazenar a 4°C protegido da luz por até sete dias.

Literatura recomendada

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Microbiology of food and animal feeding stuffs** – Horizontal method for detection and enumeration of thermotolerant *Campylobacter* spp. – Part 1: detection method. (ISO 10272-1:2006 [E]). Geneva: ISO, 2006. 16 p.

Ágar Colúmbia Base

Digestão pancreática de caseína.....	10.0 g
Digestão enzimática de carne.....	5.0 g
Extrato de levedura.....	5.0 g
Digestão pancreática de coração.....	3.0 g
Amido.....	1.0 g
Cloreto de sódio.....	5.0 g
Ágar bacteriológico.....	13.5 g

Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos. Aguardar resfriar a 50°C, distribuir em placas e aguardar a solidificação. Armazenar a 4°C.

Literatura recomendada

MANUAL of clinical culture media. 2nd ed. Sparks: BD Diagnostics, 2009.

Ágar Colúmbia com sangue

Digestão enzimática de tecidos animais.....	23 g
Amido.....	1 g
Cloreto de sódio (NaCl).....	5 g
Ágar bacteriológico.....	até 18g
Água destilada (q.s.p.).....	1000 mL
Sangue ovino desfibrinado.....	50 mL
pH.....	7,3 ± 0,2

Autoclavar a 121°C por 15 minutos. Aguardar resfriar a 50°C e adicionar o sangue ovino desfibrinado. Distribuir em placas e armazenar a 4°C.

Literatura recomendada

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Microbiology of food and animal feeding stuffs** – Horizontal method for detection and enumeration of thermotolerant *Campylobacter* spp. – Part 1: detection method. (ISO 10272-1:2006 [E]). Geneva: ISO, 2006. 16 p.

Ágar Mueller-Hinton com sangue

Digestão enzimática de tecidos animais.....	6 g
Digestão enzimática de caseína.....	17,5 g
Amido.....	1,5 g
Ágar bacteriológico.....	até 18 g
Água destilada (q.s.p.).....	1000 mL
Sangue ovino desfibrinado.....	50 mL
pH.....	7,3 ± 0.2

Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos. Aguardar resfriar a 50°C e, em condições assépticas, adicionar o sangue ovino desfibrinado. Homogeneizar, distribuir em placas e aguardar solidificar. Armazenar a 4°C.

Literatura recomendada

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Microbiology of food and animal feeding stuffs** – Horizontal method for detection and enumeration of thermotolerant *Campylobacter* spp. – Part 1: detection method. (ISO 10272-1:2006 [E]). Geneva: ISO, 2006. 16 p.

Ágar Preston

Caldo nutriente nº2 (Oxoid).....	25 g
Ágar bacteriológico.....	14 g
Sangue equino lisado.....	50 mL
Água destilada (q.s.p.)	1000 mL

Suplemento seletivo

Polimixina B.....	5.000 IU
Rifampicina.....	10 mg
Trimetoprim.....	10 mg
Anfotericina B.....	100 mg

Solução de FBP

Sulfato ferroso.....	0,25 g
Metabissulfito de sódio.....	0,25 g
Piruvato de sódio.....	0,25 g
Água destilada (q.s.p.).....	4 ml

Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos. Aguardar resfriar a 50°C e, em condições assépticas, adicionar 50 mL de sangue equino lisado, a solução de FBP (esterilizada por filtração) e o suplemento seletivo. Homogeneizar, distribuir em placas e aguardar solidificar. Armazenar a 2-8°C protegido da luz por até sete dias.

Literatura recomendada

BOLTON, F. J.; ROBERTSON, L. J. A selective medium for isolating *Campylobacter jejuni/coli*. **Clinical Pathology**, v. 35, n. 4, p. 462-467. 1982.

BOLTON, F. J.; COATES, D.; HUTCHINSON, D. N. The ability of *campylobacter* media supplements to neutralize photochemically induced toxicity and hydrogen peroxide. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 56, p. 151-157. 1984.

Ágar sangue nº2

Proteose peptona.....	15 g
Digestão enzimática de fígado.....	2,5 g
Extrato de levedura.....	5 g
Cloreto de sódio.....	5 g
Ágar bacteriológico.....	12 g
Água destilada (q.s.p.).....	950 mL
Sangue ovino desfibrinado.....	50 mL
pH.....	7,4 ± 0.2

Autoclavar a 121°C por 15 minutos. Aguardar resfriar a 50°C e em condições assépticas, adicionar 50 mL de sangue ovino desfibrinado. Armazenar a 2-8°C por até sete dias.

Literatura recomendada

BACTERIOLOGICAL analytical manual. 8. ed. Maryland: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1995.

Caldo Bolton

Extrato enzimático de tecidos animais.....	10 g
Lactoalbumina hidrolisada.....	5 g
Extrato de levedura.....	5 g
Cloreto de sódio.....	5 g
Piruvato de sódio.....	0,5 g
Metabissulfito de sódio.....	0,5 g
Carbonato de sódio.....	0,6 g
Ácido α-cetoglutarico.....	1,0 g
Hemina (diluída em NaOH 0,1%).....	0,01 g
Água destilada (q.s.p.)	1000 mL
Sangue equino lisado.....	50 mL
pH.....	7,4 ± 0.2

Suplemento seletivo

Cefoperazona.....	0,02 g
Vancomicina.....	0,02 g
Lactato de trimetoprim.....	0,02 g
Anfotericina B.....	0,01 g

Autoclavar por 121 °C por 15 minutos. Deixar resfriar até 50 °C e adicionar assepticamente o sangue equino lisado e o suplemento seletivo. Armazenar protegido da luz, a 2-8 °C, por até sete dias.

Literatura recomendada

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Microbiology of food and animal feeding stuffs** – Horizontal method for detection and enumeration of thermotolerant *Campylobacter* spp. – Part 1: detection method. (ISO 10272-1:2006 [E]). Geneva: ISO, 2006. 16 p.

Caldo Brucella semi-sólido

Digestão enzimática de caseína.....	10 g
Digestão enzimática de tecidos animais.....	10 g
Glicose.....	1 g
Extrato de levedura.....	2 g
Cloreto de sódio.....	5 g
Bissulfito de sódio.....	0,1 g
Ágar bacteriológico.....	1,8 g
Água destilada (q.s.p.).....	1000 mL
Vermelho neutro 0,2%.....	10 mL
pH.....	7,1 – 7,2

Dissolver os reagentes desidratados na água por agitação com aquecimento. Resfriar e ajustar o pH. Adicionar o vermelho neutro e distribuir 3-4 mL em tubos com tampa de rosca. Autoclavar a 121 °C por 15 minutos.

Vermelho neutro 0,2%

Vermelho neutro.....	0,2 g
Etanol.....	10 mL
Água destilada.....	90 mL

Dissolver o corante no etanol e adicionar a água destilada.

Literatura recomendada

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Microbiology of food and animal feeding stuffs** – Horizontal method for detection and enumeration of thermotolerant *Campylobacter* spp. – Part 1: detection method. (ISO 10272-1:2006 [E]). Geneva: ISO, 2006. 16 p.

BACTERIOLOGICAL analytical manual. 8. ed. Maryland: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1995.

Discos com acetato de indoxil 10%

Acetato de indoxil.....	0,1 g
Acetona.....	1 mL
Discos de papel branco de 6 mm	

Dissolver e armazenar a solução em frasco escuro a 4°C. Numa placa de Petry, distribuir 25 µL da solução em cada disco de papel. Deixar secar em temperatura ambiente. Armazenar os discos protegidos da umidade e em frasco escuro a 4°C. Nessas condições, o período de validade é de 12 meses.

Literatura recomendada

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Microbiology of food and animal feeding stuffs** – Horizontal method for detection and enumeration of thermotolerant *Campylobacter* spp. – Part 1: detection method. (ISO 10272-1:2006 [E]). Geneva: ISO, 2006. 16 p.

Meio de congelamento de culturas de *Campylobacter*

Caldo Nutriente 2 com extrato de levedura.....	119,4 mL
FBP esterilizado por filtração.....	0,6 mL
Soro fetal bovino estéril.....	15 mL
Glicerol estéril.....	15 mL

Preparar o Caldo Nutriente nº 2 com 0,6% de extrato de levedura, autoclavar a 121°C por 15 minutos e aguardar resfriar em temperatura ambiente. Adicionar assepticamente os demais componentes ao caldo homogeneizar e distribuir alíquotas de 1 mL em microtubos estéreis.

Literatura recomendada

HUNT, J. M.; ABEYTA, C. *Campylobacter*. In: BACTERIOLOGICAL analytical manual. 8. ed. Maryland: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1995.

Solução de hipurato de sódio 1%

Hipurato de sódio.....	10 g
PBS (q.s.p.)	1000 mL

Homogeneizar e esterilizar por filtração. Assepticamente, preparar alíquotas individuais de 0,4 mL e armazenar a - 20°C.

Literatura recomendada

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Microbiology of food and animal feeding stuffs** – Horizontal method for detection and enumeration of thermotolerant *Campylobacter* spp. – Part 1: detection method. (ISO 10272-1:2006 [E]). Geneva: ISO, 2006. 16 p.

Solução de ninhidrina 3,5%

Ninhidrina.....	1,75 g
Acetona.....	25 mL
Butanol.....	25 mL

Homogeneizar a ninhidrina na solução de acetona e butanol até dissolver completamente (30-60 minutos). Armazenar em frasco escuro a 4°C por até sete dias.

Literatura recomendada

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Microbiology of food and animal feeding stuffs** – Horizontal method for detection and enumeration of thermotolerant *Campylobacter* spp. – Part 1: detection method. (ISO 10272-1:2006 [E]). Geneva: ISO, 2006. 16 p.



Suínos e Aves

Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

G O V E R N O F E D E R A L
BRASIL
PAÍS RICO É PAÍS SEM POBREZA