

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Tese

**Detecção de *Campylobacter jejuni* em produtos de frango utilizando técnicas
convencionais e separação imunomagnética**

Talita Schneid Tejada

Pelotas, 2016

Talita Schneid Tejada

Detecção de *Campylobacter jejuni* em produtos de frango utilizando técnicas convencionais e separação imunomagnética

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Dias Timm

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia dos Santos da Conceição

Pelotas, 2016

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

T253d Tejada, Talita Schneid

Detecção de *Campylobacter jejuni* em produtos de frango utilizando técnicas convencionais e separação imunomagnética / Talita Schneid Tejada ; Cláudio Dias Timm, orientador ; Rita de Cássia dos Santos da Conceição, coorientadora. — Pelotas, 2016.

46 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2016.

1. Campilobacteriose. 2. Saúde pública. 3. Avicultura. 4. Alimento seguro. 5. Gastroenterite bacteriana. I. Timm, Cláudio Dias, orient. II. Conceição, Rita de Cássia dos Santos da, coorient. III. Título.

CDD : 636.5

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Talita Schneid Tejada

Detecção de *Campylobacter jejuni* em produtos de frango utilizando técnicas convencionais e separação imunomagnética

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 21/11/2016

Banca examinadora:

Prof. Dr. Cláudio Dias Timm (Orientador)
Doutor em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas

Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia dos Santos da Conceição (Coorientadora)
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof^a. Dr^a. Natacha Deboni Cereser
Doutora em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista

Dr^a. Priscila Alves Dias
Doutora em Ciência pela Universidade Federal de Pelotas

Dedico este trabalho aos meus filhos de quatro patas.

Agradecimentos

Muito obrigada aos integrantes do LIPOA pelo coleguismo, em especial meu orientador e amigo, Prof. Dr. Cláudio Dias Timm, pelos ensinamentos e paciência durante esses 12 anos de orientação e amizade.

À minha família, pelo apoio e incentivo. Minha mãe pela paciência, carinho e companheirismo em toda minha trajetória acadêmica, sempre presente em todas minhas defesas; meu pai que mesmo longe fisicamente sempre esteve ao meu lado, me apoiando e incentivando quando pensei em desistir. Meus irmãos, os melhores irmãos do mundo sem dúvida, muito obrigada!

Ao Rafael, meu companheiro para todas as horas, inclusive madrugadas no campus enquanto corria os géis de PCR e incubava amostras.

À equipe de trabalho do Pet Show e todos os clientes que entenderam a minha ausência quando muitas vezes necessitavam da minha presença.

E por fim, aos meus filhotes e meus pacientes, os quais me mantiveram firmes no meu foco quando muitas vezes pensei em desistir.

“A vida é uma tormenta jovem amigo. Você se aquece ao sol em um momento e é jogado às rochas noutro. O que faz de você um homem é a sua reação quando vem a tormenta.”
Alexandre Dumas em “O Conde de Monte Cristo”

Resumo

TEJADA, Talita Schneid. **Detecção de *Campylobacter jejuni* em produtos de frango utilizando separação imunomagnética**. 2016. 46f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

Campylobacter é um importante microrganismo patogênico, envolvido em grande número de casos de doença transmitida por alimento. Diversas metodologias têm sendo desenvolvidas a fim de melhorar sua detecção e isolamento. Inicialmente foram realizadas análises comparativas com diferentes metodologias convencionais utilizadas usualmente para detecção de *C. jejuni* a fim de avaliar qual a mais eficaz. Foram utilizadas amostras de carne de frango contaminadas experimentalmente com uma população de *C. jejuni* conhecida e foi observado se as técnicas testadas eram capazes de detectar a presença deste microrganismo. Posteriormente desenvolveu-se uma nova técnica de diagnóstico utilizando separação imunomagnética, a qual foi testada frente a amostras contaminadas artificial e naturalmente. Micropartículas magnéticas foram ligadas a anticorpos policlonais anti-*C. jejuni*, as quais foram utilizadas após a etapa de enriquecimento para ligarem-se às células de *C. jejuni* e, com uso de separador magnético, concentrá-las para posterior semeadura em ágar. Foi possível observar que, quando foram utilizados meios de pré-enriquecimento, houve melhora na detecção nos meios sólidos. A separação imunomagnética apresentou maior sensibilidade no isolamento de *C. jejuni* de amostras de carne de frango do que o método convencional. A técnica de separação imunomagnética pode ser usada para isolamento de *C. jejuni* de produtos de frango, oferecendo a vantagem de detectar o microrganismo em amostras a partir das quais o isolamento não é obtido com o uso do método convencional.

Palavras-chave: campilobacteriose; saúde pública; avicultura; alimento seguro; gastroenterite bacteriana.

Abstract

TEJADA, Talita Schneid. **Detection of *Campylobacter jejuni* in chicken products using immunomagnetic separation**. 2016. 46f. Thesis (Doctor degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

Campylobacter is an important pathogenic microorganism, involved in a large number of foodborne disease cases. Several methodologies have been developed in order to improve their detection and isolation. This is a dissertation about the study of detection of *C. jejuni* in chicken products using immunomagnetic separation. In the beginning comparative analysis were carried out with different conventional methodologies often used for *C. jejuni* detection in order to assess which one was more effective. Contaminated chicken meat samples were experimentally used with a known *C. jejuni* population and it was observed if the techniques tested were capable of detecting the presence of this microorganism. Afterwards, it was developed a new diagnosis technique using immunomagnetic separation, which was tested if face to artificial and naturally contaminated samples. Magnetic microparticles were connected to anti-*C. jejuni* polyclonal antibodies, which were used after the stage of enrichment to connect to the cells of *C. jejuni* and, with the use of magnetic separator, concentrate them for later plating in agar. It was possible to observe that, when pre-enriched means were used, there was improvement in the detection of solid means. The immunomagnetic separation has presented bigger sensibility in the isolation of *C. jejuni* of samples of chicken food than the conventional method. The technique of immunomagnetic separation can be used for isolation of *C. jejuni* of chicken products, offering the advantages of detecting the microorganism in samples from which the isolation is not obtained with the use of conventional method.

Keywords: campylobacteriosis; public health; aviculture; safe food; bacterial gastroenteritis.

Lista de Figuras

Figura 1	Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação por multiplex-PCR de isolados de amostras de produtos de frango naturalmente contaminados com <i>Campylobacter</i>	36
----------	--	----

Lista de Tabelas

Tabela 1	Presença de <i>C. jejuni</i> em 25 g de carne moída de frango experimentalmente contaminada com diferentes concentrações bacterianas analisadas imediatamente após a contaminação (Hora 0) e após 24 h de refrigeração (Hora 24)	23
----------	--	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ADA	<i>Ampicillin Dextrin Agar</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion Both</i>
BP	<i>Baird-Parker Agar</i>
C.	<i>Campylobacter</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CA	<i>Cetrimide Agar</i>
DO	Densidade Ótica
Dr	Doutor
et al.	<i>et alii</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
G	Grama
H	Horas
IMS	<i>Immunomagnetic separation</i>
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
MC	<i>MacConkey Agar</i>
Min	Minutos
µm	Micrometro
µL	Microlitro
mCCDA	<i>Modified Charcoal-Cefoperazone-Deoxycholate Agar</i>
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
MMP	<i>Micro-magnetic Particle</i>
Nm	<i>Nanômetro</i>
AO	<i>Oxford Agar</i>
PA	<i>Palcam Agar</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>

PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
Prof	Professor
PWB	<i>Pyridine Wash Buffer</i>
SGB	Síndrome de Guillain-Barré
UFC	Unidade Formadora de Colônia
XLD	<i>Xylose Lysine Deoxycholate Agar</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

Lista de Símbolos

®	Registro de marca
°C	Grau Celsius
%	Porcentagem

Sumário

1 Introdução.....	14
2 Artigos.....	18
2.1 Artigo 1.....	18
2.2 Artigo 2.....	28
3 Considerações Finais.....	40
Referências.....	41

1 Introdução

Bactérias do gênero *Campylobacter* estão entre as principais causadoras de doença transmitida por alimentos, podendo estar presentes em diferentes alimentos, produtos lácteos não pasteurizados, água contaminada e produtos avícolas (CDC, 2014). A campilobacteriose geralmente ocorre em casos isolados, sendo menos comuns os surtos. A maioria dos casos está associada ao consumo de carne de aves crua ou mal cozida ou à contaminação cruzada de outros alimentos por contato com utensílios previamente utilizado em produtos avícolas, como facas e tábuas de corte (ZBRUN et al., 2015). A prevalência de *Campylobacter* spp. em produtos cárneos de frango é bastante variável. Em trabalho realizado na Itália, Stella et al. (2017) isolaram o microrganismo de 34,1% de 472 amostras de carne de frango. Já, em estudo realizado no sul da Coreia, 58,8% de um total de 80 amostras estavam contaminadas por *Campylobacter* spp. (WEI et al., 2016). No entanto, no Brasil a prevalência relatada é mais baixa. Silva et al. (2016) isolaram *Campylobacter* spp. em apenas 17% de 200 amostras de carne de frango analisadas.

A manifestação mais comum da campilobacteriose é a forma de gastroenterite clássica, sendo observada diarreia, febre, dores abdominais, cefaleia, náuseas e lombalgia (NACHAMKIN, 2007). O curso da doença dura cerca de uma semana, sendo na maioria das vezes autolimitante e de recuperação espontânea (GONÇALVES et al., 2012). No entanto, em casos de infecções graves, de longa duração ou em pacientes imunocomprometidos, a terapia medicamentosa e muitas vezes cuidados hospitalares tornam-se necessários (BOLTON, 2015). *Campylobacter* termotolerantes, particularmente *C. jejuni* e, em menor grau, *C. coli*, são a principal causa de infecções gastrointestinais nos países industrializados (DONISSON & ROSS, 2014). A dose infectante de *C. jejuni* varia de 500 a 10 mil células, dependendo da cepa e da susceptibilidade do hospedeiro (HUNT et al., 2001).

Além da infecção entérica, *C. jejuni* pode causar a Síndrome de Guillain-Barré - SGB, uma neuropatia autoimune aguda que envolve o sistema nervoso periférico, a qual se caracteriza por paralisia flácida devido à inflamação desmielinizante que acomete os músculos esqueléticos, podendo comprometer os músculos respiratórios

e levar o paciente a óbito (BOLAN et al., 2007). Apesar de ser uma doença de etiologia múltipla, observou-se que 40% dos casos de SGB apresentam antecedentes de afecção por *Campylobacter* (GOTTARDI, 2006). A estimativa é de que, a cada mil infecções, uma evolua a SGB, tornando maior a importância do microrganismo em questão (CDC, 2014). Outras complicações mais raras da campilobacteriose são a Síndrome de Miller-Fisher (SALLOWAY et al., 1996), que compromete as musculaturas oculares diminuindo os reflexos, e a Síndrome de Reiter (FITZGERALD et al., 2007), também conhecida como artrite reativa, resposta autoimune que provoca inflamação em diferentes articulações em resposta à infecção por *C. jejuni*.

A real incidência da campilobacteriose é pouco conhecida, devido à dificuldade de diagnóstico e identificação (WHO, 2011). Isso se deve principalmente à variada microbiota competidora da amostra, ao baixo número de células bacterianas, presença de células viáveis não cultiváveis, às difíceis condições de isolamento e aos métodos convencionais que muitas vezes não são eficientes, podendo levar a resultados errôneos.

Bactérias do gênero *Campylobacter* são Gram negativas, com tamanho variando entre 0,2 a 0,9 µm de largura e 0,5 a 5 µm de comprimento. Apresentam-se morfologicamente na forma de bastonetes curvos, em forma de “S” ou “asa de gaivota”. São móveis por meio de flagelo em uma ou ambas as extremidades com movimento característico em “serrote” ou “saca-rolha”, que pode ser observado claramente em microscópio de contraste de fase ou de campo escuro. Produzem toxinas, não formam esporos e não são hemolíticas. Multiplica-se em ambiente de atmosfera microaerofílica e capnofílica ideal de 85% de nitrogênio, 10% de gás carbônico e 5% de oxigênio, sendo o crescimento inibido quando a concentração de oxigênio é menor que 3% e maior que 15% (NACHAMKIN, 2007). Multiplica-se em temperatura entre 25-47°C e são inativados acima de 55°C, no entanto, espécies termófilas (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* e *C. upsiliensis*) têm temperatura ótima de crescimento de 41,5°C (SILVA et al., 2011). Apresentam metabolismo do tipo respiratório, obtendo energia através de aminoácidos e produtos intermediários do Ciclo de Krebs e não utilizam carboidratos como fonte de carbono (SILVA et al., 2011). Além disso, são altamente sensíveis ao sal, necessitam pH entre 4,9-9,0 para sobrevivência, sendo o pH ótimo 6,5-7,5, sendo facilmente inativadas em pH abaixo de 4,9 e acima de 9,0 e atividade de água abaixo de 0,987 (LAWLEY, 2013). Em

condições adversas, como alterações bruscas de pH, temperatura ou falta de nutrientes, *Campylobacter* gera formas cocóides viáveis, mas não cultiváveis (ROLLINS & COLWELL, 1986; HE & CHEN, 2010). Essas formas não são cultiváveis em meios de cultura tradicionais, porém são infectivas se ingeridas (MOORHEAD & DYKES, 2002; MORENO et al., 2001).

Quanto à detecção e isolamento de *Campylobacter* em amostras clínicas e de alimentos, diferentes autores (CHON et al., 2014; GHARST et al., 2013; RODGERS et al., 2012) discutem sobre a eficiência dos métodos, principalmente sobre a utilização ou não de meios de pré-enriquecimento. Os métodos convencionais clássicos (BRASIL, 2011), além de trabalhosos, exigem vários dias de análise e, muitas vezes, a presença de microbiota competitiva inibe o crescimento do *Campylobacter*, podendo levar a resultados errôneos.

Em 1984, Bolton et al. (1984) já relatavam que o uso de pré-enriquecimento no protocolo laboratorial aumentava a recuperação de *Campylobacter*, favorecendo a recuperação de células bacterianas injuriadas. Isso se deve, provavelmente, ao fato desses meios serem ricos em nutrientes como peptonas que são a principal fonte nutritiva *in vitro* para bactérias deste gênero. No entanto, outros autores (MEDEIROS et al., 2012; RODGERS et al., 2012) relatam ser dispensável o uso do pré-enriquecimento pois os meios de isolamento direto são eficazes. O maior problema no isolamento direto é o grau de contaminação das amostras, o qual geralmente sobrepõe-se ao número de *Campylobacter* impedindo que este seja detectado e isolado. A utilização de suplementos (sangue, carvão ativado e antioxidante) previne o acúmulo e neutralizam os derivados do oxigênio produzido durante o crescimento nos meios de cultura, como peróxido de hidrogênio, além de neutralizarem os inibidores da trimetopina que são tóxicos para o *Campylobacter* (SILVA et al., 2007). Já, a adição de antimicrobianos reduz a competição com outros microrganismos, principalmente bactérias entéricas Gram-negativas e algumas Gram-positivas.

Diversos métodos têm sido desenvolvidos a fim de abreviar o tempo de detecção e aumentar a especificidade, como métodos moleculares (ALVES et al., 2016; MATT et al., 2016) e imunoensaios (BOJANIĆ et al., 2016; YU et al., 2001). A separação imunomagnética (IMS) é uma técnica imunológica de separação e concentração de microrganismos em cultivo líquido, a qual utiliza microesferas de poliestireno magnetizadas cobertas com anticorpos monoclonais ou policlonais que

se ligam ao microrganismo alvo especificamente e, posteriormente, são removidas de maneira seletiva por um campo magnético (OLSVIK et al., 1994).

Desta forma, este trabalho teve como objetivo principal avaliar o método mais sensível na detecção de *C. jejuni* em produtos de frango e estabelecer um protocolo para a utilização da técnica de imunoseparação magnética na detecção de *C. jejuni* em produtos de frango.

2 Artigos

2.1 Artigo 1

Eficiência de diferentes protocolos para isolamento de *Campylobacter jejuni* em alimentos

Talita Schneid Tejada, Cláudio Dias Timm

Submetido à Revista Ciência Animal Brasileira em 13 de maio de 2016

EFICIÊNCIA DE DIFERENTES PROTOCOLOS PARA ISOLAMENTO DE *Campylobacter jejuni* DE ALIMENTOS

RESUMO

Dentre os principais agentes de doenças transmitidas por alimentos em humanos, *Campylobacter jejuni* é o principal causador de gastroenterite bacteriana aguda e a carne de frango é uma importante fonte de infecção. *Campylobacter* é um microrganismo de difícil isolamento devido à composição do alimento, à variada microbiota competidora, ao baixo número de bactérias, à presença de células viáveis não cultiváveis e às difíceis condições de isolamento, como microaerofilia e meios de cultura específicos. As metodologias convencionais de isolamento muitas vezes não são eficientes, podendo levar a resultados errôneos. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar diferentes métodos utilizados na detecção de *C. jejuni* em produtos de frango. Carne moída experimentalmente contaminada com três diferentes diluições do microrganismo foi analisada com diferentes protocolos para isolamento de *C. jejuni*. Foram feitas semeaduras diretamente nos ágares mCCDA, Columbia e ágar sangue, e após pré-enriquecimento nos caldos Bolton ou Brucella. As colônias características de *Campylobacter* foram identificadas e os resultados comparados a fim de avaliar qual o método foi mais eficaz. Foi observado que a utilização do ágar mCCDA com pré-enriquecimento, tanto em caldo Brucella como em caldo Bolton, foi mais eficiente que os demais para isolamento de *C. jejuni*.

Palavras-chave: alimentos, patógenos, pré-enriquecimento, mCCDA.

EFFICIENCY OF DIFFERENT PROTOCOLS FOR *Campylobacter jejuni* ISOLATION FROM FOOD

ABSTRACT

Among the main agents of foodborne disease in humans, *Campylobacter jejuni* is the main cause of acute bacterial gastroenteritis and chicken meat is an important source of infection. *Campylobacter* is a microorganism difficult to isolate due to food composition, competitor microbiota, the low number of bacteria, the presence of non-cultivable viable cells and the difficult conditions of isolation as microaerophilia and specific culture media. The conventional methods are often not effective and may lead to erroneous results. Thus, this study aimed to evaluate different methods used to detect *C. jejuni* in poultry products. Ground beef experimentally contaminated with three different dilutions of the microorganism were analyzed with different protocols for isolation of *C. jejuni*. It was plated directly in agars mCCDA, Columbia and blood agar, and after preenrichment in Bolton or Brucella broth. The characteristics of *Campylobacter* colonies were identified and compared in order to assess which method was more effective. It has been observed that the use of agar mCCDA after preenrichment, in Brucella or in Bolton broth, was more efficient than the others for *C. jejuni* isolation.

Keywords: food, pathogens, preenrichment, mCCDA.

INTRODUÇÃO

Campylobacter é um dos principais agentes de doenças transmitidas por alimentos (DTA) em humanos, constituindo-se na segunda causa mais frequente de diarreias bacterianas nos Estados Unidos⁽¹⁾. Dentre as espécies do gênero, *C. jejuni* é a mais

comumente isolada de alimentos e as demais ocorrem com menor frequência^(2,3), sendo a carne de frango a principal fonte de transmissão desse patógeno⁽⁴⁾.

A difícil detecção de *Campylobacter* é um fator negativo no controle da sua disseminação. Esta dificuldade se deve principalmente à composição do alimento, à variada microbiota competidora, ao baixo número de células bacterianas e às difíceis condições de isolamento⁽⁵⁾. A característica mais marcante do gênero *Campylobacter* é a microaerofilia, exigindo baixa tensão de oxigênio para sua multiplicação. O crescimento é inibido quando a concentração de O₂ é menor que 3% ou maior que 15%, sendo a concentração ideal de 5%. Além disso, requerem cerca de 10% de CO₂ para sua multiplicação⁽⁶⁾. Outra característica importante é a faixa bastante estreita de temperatura que os campilobacteres classificados como termofílicos - espécies *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari* - se multiplicam, que varia entre 30°C e 47°C, com temperatura de multiplicação ótima de 42°C⁽⁷⁾. Esses microrganismos são altamente sensíveis ao sal e ao pH ácido, crescendo na faixa de pH ótimo próximo ao neutro (6,5-7,5) e com atividade mínima da água em cerca de 0,987⁽⁸⁾. Além disso, a possível presença de células de *Campylobacter* spp. viáveis não cultiváveis em resposta a condições de estresse nos alimentos é uma preocupação adicional, uma vez que o isolamento do microrganismo fica dificultado, exigindo etapas para recuperação das células injuriadas, apensar da bactéria poder causar enfermidade caso seja ingerida⁽⁹⁾.

Os métodos convencionais⁽¹⁰⁾, além de trabalhosos, exigem vários dias de análise e, muitas vezes, a presença de microbiota competitiva inibe o crescimento do *Campylobacter* podendo levar a resultados errôneos. Alguns autores^(11,12) relatam ser necessário o uso de meios de enriquecimento anteriormente a semeadura em placa a fim de recuperar células injuriadas; no entanto, outros autores^(13,14) afirmam que a utilização de pré-enriquecimento é desnecessária. Deste modo, este trabalho teve como objetivo avaliar o método mais eficaz no isolamento de *C. jejuni* de produtos de frango.

MATERIAL E MÉTODOS

Contaminação experimental de produtos de frango

Porções de 25 g de carne de frango moída foram contaminadas com 0,25 mL de inóculo contendo *C. jejuni* ATCC 33291 nas concentrações de 10⁴, 10³ e 10² UFC/mL, de forma a serem obtidas as concentrações finais de aproximadamente 10², 10¹ e 10⁰ UFC/25g de carne moída, respectivamente. As amostras de carne de frango moída foram analisadas

quanto à presença de *Campylobacter* antes da contaminação, utilizando protocolo recomendado pela U.S. Food and Drug Administration - FDA⁽¹⁵⁾. O controle negativo é a garantia de que não havia *Campylobacter* na amostra inicial.

O experimento foi realizado em triplicata.

Padrão-ouro

Foi realizado segundo FDA⁽¹⁵⁾, com modificação na incubação no pré-enriquecimento (42°C por 48 horas), a fim de padronizar a temperatura e tempo de incubação dos diferentes meios de cultura utilizados no trabalho. Brevemente, 25 g da carne moída foram acondicionados, em saco plástico estéril, a 100 mL de caldo Bolton (Himedia, Mumbai, India) suplementado com 10 mg de Cefoperazona, 10 mg de Vancomicina, 10 mg de Trimetoprim e 5 mg de Anfotericina (Himedia) e homogeneizados por 5min em *shaker*. Após foi realizada incubação a 42°C por 48 horas em jaras contendo gerador atmosférico de microaerofilia (Microaerobac, Probac do Brasil, São Paulo, Brasil). Passado este período, uma alíquota de 10 µL da cultura foi semeada na superfície de ágar Carvão Cefoperazona Deoxycolato modificado (mCCDA, Oxoid, Hampshire, Inglaterra) suplementado com 16 mg de Cefoperazona e 5 mg de Anfotericina B (Himedia) e incubada invertida em jarra de microaerofilia a 42°C por 48 horas, para posterior confirmação.

Metodologias Convencionais com uso de enriquecimento

Foram testados dois meios de cultura de enriquecimento. Esta etapa serve para a recuperação de células bacterianas injuriadas, o que poderia aumentar as chances de isolar *C. jejuni*.

Um dos meios utilizados como enriquecimento foi o caldo Brucella (Acumedia, Michigan, EUA) adicionado de 0,4% (m/v) de carvão ativado, 5% (m/v) de suplemento de solução redutora de oxigênio FBP⁽¹⁶⁾ e 1% (m/v) de suplemento *Campylobacter* I (Blaser-Wang) (Himedia). O outro caldo de enriquecimento testado foi o Bolton, suplementado conforme já descrito. Cada amostra de 25 g foi colocada em saco plástico estéril contendo 100 mL do caldo, homogeneizada durante 5min e incubada em microaerofilia a 42°C por 48 horas. Posteriormente, uma alíquota de 10 µL de cada cultura foi semeada na superfície de ágar base Columbia (Merck, Darmstadt, Germany) adicionado de 0,4% de carvão ativado, 5% de FBP e 1% de *Campylobacter* I. Além do ágar Columbia, também foi realizada semeadura

de uma alíquota na superfície de ágar sangue Tipo II (Acumedia) adicionado de 5% de sangue equino desfibrinado e 1% de *Campylobacter* I e ainda outra alíquota em ágar mCCDA suplementado conforme descrito anteriormente. Todas as placas foram incubadas invertidas em jarra de microaerofilia a 42°C por 48 horas.

Metodologias Convencionais sem uso de enriquecimento

Cada produto de frango foi colocado em saco plástico estéril contendo 100 mL de Água Peptonada Tamponada (APT, Acumedia) e homogeneizado durante 2min. Alíquotas de 10 µL desta solução foram semeadas na superfície de ágar base Columbia, ágar mCCDA e ágar Sangue tipo II, suplementados conforme descrito anteriormente. As placas semeadas foram incubadas invertidas em jarra de microaerofilia a 42°C por 48 horas para depois as colônias serem confirmadas.

Testes para confirmação da presença de *Campylobacter* sp. e *C. jejuni*

As colônias características de *Campylobacter* nos ágar mCCDA, Columbia e Sangue tipo II foram analisadas morfo-tintorialmente pela coloração de Gram. O gênero *Campylobacter* é constituído de bactérias Gram negativas com formato de bastonetes delgados espiralados ou em forma de “asa de gaivota” ou “S”; podendo apresentar forma filamentosa ou cocóide nos cultivos de longos períodos⁽¹⁷⁾. Foram realizadas provas de produção das enzimas oxidase e catalase, sendo a espécie *C. jejuni* oxidase e catalase positivas.

Após a identificação fenotípica das colônias características, as mesmas foram analisadas pela técnica da reação em cadeia da polimerase multiplex (multiplex-PCR) para confirmação da espécie *C. jejuni*, de acordo com protocolo descrito por Harmon et al.⁽¹⁸⁾.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todos os protocolos, tanto com como sem caldo de pré-enriquecimento, *C. jejuni* foi recuperado das amostras inoculadas com 10² UFC/g logo após a contaminação e com 24h de refrigeração, o que provavelmente se deveu à alta concentração de células bacterianas inoculadas (Tabela 1).

Tabela 1. Presença de *C. jejuni* em 25 g de carne moída de frango experimentalmente contaminada com diferentes concentrações bacterianas analisadas imediatamente após a contaminação (Hora 0) e após 24h de refrigeração (Hora 24).

Protocolos de isolamento	Concentrações bacterianas (n=3)					
	Hora 0			Hora 24		
	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ²	10 ¹	10 ⁰
Ágar mCCDA direto	+++	---	---	+++	---	---
Ágar Columbia direto	+++	++-	---	+++	++-	---
Ágar Sangue direto	+++	+-	+-	+++	---	---
Caldo Bolton e ágar mCCDA*	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Caldo Bolton e ágar Columbia	+++	-++	--+	+++	++-	---
Caldo Bolton e ágar Sangue	+++	-++	+-	+++	+-	---
Caldo Brucella e ágar mCCDA	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Caldo Brucella e ágar Columbia	+++	-++	--+	+++	---	---
Caldo Brucella e ágar Sangue	+++	++-	+-	+++	---	---

+ Presença de *C. jejuni* em 25g da amostra; - Ausência de *C. jejuni* em 25g da amostra; * Padrão-ouro.

Na concentração de 10¹ UFC/25 g, o microrganismo foi isolado das três amostras apenas quando foi utilizado mCCDA com pré-enriquecimento, tanto com caldo Brucella como com caldo Bolton, independentemente da amostra ser analisada imediatamente após a contaminação (hora 0) ou após 24 horas sob refrigeração. Por outro lado, na semeadura direta em ágar, o mCCDA foi o que apresentou o pior resultado, não havendo recuperação em nenhuma das amostras, tanto na hora 0 como após 24 horas. Entretanto, os resultados das semeaduras diretas em ágar também não foram satisfatórios com o uso dos ágar Columbia e Sangue, uma vez que com nenhum deles foi possível recuperar *C. jejuni* das três amostras contaminadas. No caso da semeadura direta em ágar Columbia, houve recuperação de duas amostras contaminadas com 10¹ UFC/25 g, mas o microrganismo não foi recuperado de nenhuma das amostras contaminadas com 10⁰ UFC/25 g. Isso pode ter ocorrido devido à grande multiplicação de bactérias contaminantes observadas nas placas, as quais podem ter inibido a multiplicação de *C. jejuni*, encontrado em concentração bem inferior nessas amostras.

A associação dos ágares Columbia e Sangue com pré-enriquecimentos não melhorou o seu desempenho na recuperação de *C. jejuni* das amostras contaminadas com 10^1 UFC/25 g, chegando mesmo a não haver recuperação em nenhuma das amostras após 24 horas de refrigeração, quando foi utilizado o caldo Brucella.

Na semeadura direta em ágar Sangue, assim como nos ágares Columbia e Sangue após pre-enriquecimento em Caldo Brucella, o microrganismo foi recuperado na hora 0 de pelo menos uma amostra em todas as concentrações usadas na contaminação experimental, mas na hora 24 *C. jejuni* só foi recuperado na maior concentração de contaminação (10^2 UFC/25 g). Neste caso, além da população bacteriana acompanhante, *Campylobacter* pode ter sido inibido pela temperatura de refrigeração. Lawley⁽⁸⁾ relata que estas bactérias podem sobreviver durante um curto período de tempo a temperaturas de refrigeração e que morrem lentamente em temperaturas congelantes. Além disso, células submetidas ao frio sofrem alterações tornando-se sensíveis à temperatura de 42°C e aos antibióticos polimixina e rifampicina⁽¹⁰⁾.

Na semeadura direta em ágar mCCDA, a bactéria foi recuperada apenas na maior concentração, entretanto quando este meio foi associado a pré-enriquecimento, seja com caldo Brucella ou com caldo Bolton, a recuperação de *C. jejuni* ocorreu em todas as amostras, mesmo naquelas contaminadas apenas com 10^0 UFC/25 g e após 24h de refrigeração, o que não aconteceu com os demais protocolos. Esses resultados diferem de outros estudos, como Medeiros et al.⁽¹³⁾, que relatam que o plaqueamento direto foi considerado o método mais rápido e eficiente, além de apresentar menor custo por não serem utilizados métodos de enriquecimento. No entanto, estes autores analisaram apenas carcaças de frango resfriadas naturalmente contaminadas, sem avaliar a população de *Campylobacter* em cada amostra, que poderia ser bastante alta, diferentemente do nosso trabalho, no qual a concentração inicial de *C. jejuni* em cada amostra de carne moída era conhecida.

Em 1984, Bolton et al.⁽¹⁹⁾ já relatavam que o uso de pré-enriquecimento no protocolo laboratorial aumentava a recuperação de *Campylobacter*. Trabalhos mais atuais^(11,12), ainda mostram que a utilização de caldos enriquecidos favorece a recuperação de células bacterianas injuriadas, assim como observado em nosso trabalho. Entre os caldos de pré-enriquecimento utilizados, o caldo Bolton teve melhor eficiência de recuperação em relação ao caldo Brucella, tendo em vista que o *C. jejuni* foi recuperado de 72,2% das amostras

(39/54) onde o pré-enriquecimento foi o caldo Bolton, enquanto que 66,7% (36/54) pode ser recuperado em caldo Brucella. Essa diferença na recuperação de células injuriadas provavelmente esteja relacionada à fonte nutritiva dos caldos, os tipos e a quantidade de nutrientes. As bactérias do gênero *Campylobacter* não fermentam carboidratos e as peptonas são incluídas no meio como fonte de nutrientes. O caldo Bolton tem na sua formulação extrato de levedura (5g/litro) e ácido alfa-cetoglutarico, um intermediário do ciclo do ácido tricarboxílico, já o caldo Brucella apenas extrato de levedura (2 g/litro) como fonte nutritiva. O ácido alfa-cetoglutarico é um composto de importante atividade biológica produzido na desaminação do glutamato e um intermediário no ciclo dos ácidos tricarboxílicos⁽¹⁰⁾. Outra possibilidade diz respeito à suplementação dos meios, já que no caldo Bolton utilizou-se sangue desfibrinado e no caldo Brucella carvão ativado e antioxidante. Estas substâncias adicionadas aos meios de cultura servem para prevenir o acúmulo e neutralizar os derivados do oxigênio produzido durante a multiplicação nos meios de cultura, como peróxido de hidrogênio, além de neutralizar os inibidores da trimetopina que são tóxicos para *Campylobacter*⁽²⁰⁾. No entanto, a utilização de sangue nos meios além de capturar os componentes tóxicos do oxigênio serve também como fonte de nutriente, assim como as peptonas⁽¹⁰⁾, deixando o meio mais rico para a multiplicação bacteriana. Uma terceira diferença entre os meios utilizados que pode ter influenciado as recuperações são os antimicrobianos, os quais reduzem a competição do *Campylobacter* com outras bactérias. O caldo Bolton é suplementado com cefoperazona, que inibe bactérias entéricas Gram-negativas e algumas Gram-positivas, vancomicina, que inibe bactérias Gram-positivas, trimetoprim, que inibe *Proteus* spp., e anfotericina que inibe fungos. Já, o caldo Brucella é suplementado apenas com anfotericina e cefoperazona, o que deixa o meio mais suscetível à multiplicação de contaminantes comuns em produtos cárneos.

Dentre os ágar seletivos, com uso de pré-enriquecimento, o que apresentou maior eficácia foi o mCCDA. Os ágar Columbia e Sangue não foram eficientes, o que provavelmente se deve à composição do meio, tendo em vista que as substâncias impiedentes adicionadas são as mesmas nos três ágar estudados. No ágar mCCDA, caldo nutriente 2 e caseína ácida hidrolisada fornecem fontes de nitrogênio e vitaminas. Já, no ágar Columbia são peptonas de caseína e carne, além de extratos de coração e levedura. No ágar Sangue tipo II, há peptona proteose, fígado e extracto de levedura. O caldo nutriente é

uma infusão altamente nutritiva de carne o que provavelmente torna o meio mais rico que o Columbia e o Ágar Sangue.

Não foi observada diferença entre os caldos de enriquecimento na pesquisa de *C. jejuni* quando utilizados juntamente com o ágar mCCDA. A rica composição do meio permitiu o isolamento das células recuperadas nos caldos, tanto Brucella como Bolton, o que nem sempre foi observado nos demais ágar.

CONCLUSÕES

O método utilizando pré-enriquecimento, seja caldo Brucella ou caldo Bolton, e posterior semeadura em meio seletivo mCCDA foi superior na recuperação de células de *C. jejuni* de produtos avícolas experimentalmente contaminados, em comparação ao plaqueamento direto e o uso de outros ágar, mesmo associados com pré-enriquecimento.

Referências Bibliográficas

1. CDC [Centers for Disease Control and Prevention]. National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases. *Campylobacter*, General information, 2014. Disponível em: <http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/campylobacter>.
2. Silva DT, Tejada TS, Blum-Menezes D, DIAS PA, TIMM CD. *Campylobacter* species isolated from poultry and humans, and their analysis using PFGE in southern Brazil. International Journal of Food Microbiology. 2016; 217:189–194. Disponível em: [doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.025](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.025).
3. Wei B, Cha S, Yoon R, Kang M, Roh J, Seo H, Lee J, Jang H. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. isolated from retail chicken and duck meat in South Korea. Food Control. 2016; 62:63-68. Disponível em: [doi:10.1016/j.foodcont.2015.10.013](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.10.013).
4. Perko-Mäkelä P, Alter T, Isohanni P, Zimmermann S, Lyhs U. Distribution of *Campylobacter jejuni* isolates from Turkey farms and different stages at slaughter using pulsed-field gel electrophoresis and flaA-short variable region sequencing. Zoonoses Public Health. 2011; 58 (6):388-398. Disponível em: [doi: 10.1111/j.1863-2378.2010.01383](https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2010.01383).
5. Silva DT, Tejada TS, Cunha CC, Lopes NA, Agostinetti A, Collares T, Leon PMM, Timm CD. Ocorrência de *Campylobacter* em carne de frango, fezes de frango e humanas e pesquisa dos genes *cdt*. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2014; 66(1):297-304. Disponível em: doi.org/10.1590/S0102-09352014000100040.
6. Doyle MP, Jones DM. Food-borne transmission and antibiotic resistance of *Campylobacter jejuni*. In: Nachamkin I, Blaser MJ, Tompkins LS. *Campylobacter jejuni*: current status and future trends. Washington: ASM Press, 1992, p. 45-48.
7. Park P. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. International Journal of Food Microbiology. 2002; 74(3):177-188. Disponível em: [doi:10.1016/S0168-1605\(01\)00678-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00678-X).
8. Lawley R. *Campylobacter*. Food Safety Watch. 2013. Disponível em: <http://www.foodsafetywatch.org/factsheets/campylobacter>.

9. Ghaffar NM, Connerton PL, Connerton IF. Filamentation of *Campylobacter* in broth cultures. *Frontiers in Microbiology*. 2015; 6:657. Disponível em: [doi:10.3389/fmicb.2015.00657](https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00657).
10. Brasil. Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Campylobacter*. Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 44p. Disponível em: <http://u.saude.gov.br/images/pdf/2015/janeiro/09/manual-tecnico-diagnostico-laboratorial-campylobacter.pdf>.
11. Chon J, Kim Y, Kim H, Kim D, Kim H, Song K, Seo K. Supplementation of Bolton broth with triclosan improves detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in chicken carcass rinse. *International Journal of Food Microbiology*. 2014; 81:37-39. Disponível em: [doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.006](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.006).
12. Williams LK, Jørgensen F, Grogono-Thomas R, Humphrey TJ. Enrichment culture for the isolation of *Campylobacter* spp: Effects of incubation conditions and the inclusion of blood in selective broths. *International Journal of Food Microbiology*. 2009; 130(2):131-134. Disponível em: [doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.018](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.018).
13. Medeiros VM, Bricio SML, Filgueiras ALL, Clementino MBM. Utilização de caldo Bolton no enriquecimento seletivo em comparação ao plaqueamento direto na pesquisa de *Campylobacter* spp. em carcaças resfriadas de frango. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. 2012; 71(3):456-461. Disponível em: <http://revistas.bvs-vet.org.br/rialutz/article/view/5255/4519>.
14. Rodgers JD, Lawes JR, Vidal AB, Ellis-Iversen J, Ridley A, Pleydell EJ, Powell LF, Toszeghy M, Stapleton K, Clifton-Hadley FA. Characteristics and comparative performance of direct culture, direct PCR and enumeration methods for detection and quantification of *Campylobacter* spp. in broiler caeca. *Veterinary Microbiology*. 2012; 159(3-4):390-396. Disponível em: [doi: 10.1016/j.vetmic.2012.04.011](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.04.011).
15. Hunt JM, Abeyta C, Tran T. *Campylobacter*. U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological analytical manual. Chapter 7. 2001. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm072616.htm>.
16. George HA, Hoffmann PS, Krieg NR, Smibert RM. Improved media for growth and aerotolerance of *Campylobacter fetus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1978; 8(1):36-41. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC275110>.
17. Nachamkin I. *Campylobacter jejuni*. In: Doyle MP, Beuchat LR. *Food Microbiology: fundamental and frontiers*. 3th ed. Washington: ASM Press, 2007. p.237-248.
18. Harmon KM, Ransom GM, Wesley IV. Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes*. 1997; 11(3):195-200. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9232618>.
19. Bolton FJ, Coates D, Hutchinson DN. The ability of *Campylobacter* supplements to neutralize photochemically induced toxicity and hydrogen peroxide. *Journal of Applied Bacteriology*. 1984; 56(1):151-157. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6706882>.
20. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA, Taniwaki MH, Santos RFS, Gomes RAR. *Campylobacter*. In: Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos. 3ed. São Paulo: Varela; 2007.

2.2 Artigo 2

Detecção de *Campylobacter jejuni* em produtos de frango utilizando separação imunomagnética

Talita Schneid Tejada, Rita de Cássia dos Santos da Conceição, Cláudio Dias Timm

Submetido à Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

Detecção de *Campylobacter jejuni* em produtos de frango utilizando separação imunomagnética

[*Detection of Campylobacter jejuni in chicken products using immunomagnetic separation*]

T. S. Tejada^I, R. C. S. Conceição^I, C. D. Timm^{I*}

^IInspecção de Produtos de Origem Animal, Universidade Federal de Pelotas

*Corresponding author. E-mail: timmm@ufpel.tche.br

RESUMO

Campylobacter jejuni é o principal causador de gastroenterite bacteriana aguda e a carne de frango tem se mostrado uma importante fonte de transmissão. Este microrganismo é de difícil isolamento e os métodos convencionais muitas vezes não são eficientes, podendo levar a resultados errôneos. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e testar a técnica de separação imunomagnética (IMS) na detecção de *C. jejuni* em produtos de frango. Micropartículas magnéticas ligadas a anticorpos policlonais anti-*C. jejuni* foram utilizadas para concentrar, *C. jejuni* antes da semeadura em ágar. O protocolo foi comparado com o método convencional. *C. jejuni* foi recuperado do alimento experimentalmente contaminado por ambos os métodos, entretanto, quando foi usada a IMS, a presença de microrganismos contaminantes nos meios de cultura foi menor. *C. jejuni* foi isolado de 7% das amostras de alimento naturalmente contaminadas, usando IMS, e de 3% pelo método convencional. *C. coli* foi isolado de uma amostra pelo método convencional, mas não foi detectado pelo protocolo com IMS. A técnica de IMS pode ser usada para isolamento de *C. jejuni* de alimentos, oferecendo a vantagem de detectar o microrganismo em amostras a partir das quais o isolamento não é obtido com o uso do método convencional.

Palavras-chave: campilobacteriose; saúde pública; alimento seguro; gastroenterite bacteriana.

ABSTRACT

Campylobacter jejuni is the main cause of acute bacterial gastroenteritis and chicken meat has shown to be an important source of infection. This microorganism is difficult to be isolated and the conventional methods are often inefficient and may lead to erroneous results. This

study aimed at developing and testing the technique of immunomagnetic separation (IMS) in the detection of *C. jejuni* in chicken products. Microparticles magnetically connected anti-*C. jejuni* polyclonal antibodies were used to concentrate *C. jejuni* before agar seeding. The protocol was compared with the conventional method. *C. jejuni* was recovered from experimentally contaminated food for both methods, however, when the IMS was used, the presence of contaminating microorganisms in the means of culture was smaller. *C. jejuni* was isolated of 7% of samples of food naturally contaminated, using IMS, and 3% by conventional method. *C. coli* was isolated from a sample by conventional method, but it was not detected by protocol with IMS. The technique of IMS can be used for isolation of *C. jejuni* of food, offering the advantage of detecting the microorganism in samples from which the isolation is not obtained with the use of conventional method.

Keywords: campylobacteriosis; public health; food safety; bacterial gastroenteritis.

INTRODUÇÃO

Campylobacteriose é uma zoonose de distribuição mundial. A doença normalmente dura cerca de uma semana e os indivíduos acometidos geralmente apresentam diarreia, cólicas, dor abdominal, náuseas e vômitos. *Campylobacter* termotolerantes, particularmente *C. jejuni* e, em menor grau, *C. coli*, são a principal causa de infecções gastrointestinais no mundo (DONISSON e ROSS, 2014). Em países não desenvolvidos, como o Brasil, existem poucos dados da incidência da doença, o que se deve ao reduzido número de pesquisas e notificações de casos e surtos (SILVA *et al.*, 2016).

O principal reservatório de *Campylobacter* são as aves domésticas, embora elas raramente apresentem sinais clínicos da doença, mas outros animais, incluindo bovinos e suínos, também são importantes fontes de transmissão (DONISSON e ROSS, 2014). Na indústria, durante o processamento dos frangos, pode haver contaminação da carne e subprodutos devido à presença da bactéria nos intestinos, pele e penas dos animais, ou mesmo de outras fontes, como utensílios e mãos dos manipuladores. *Campylobacter* pode ser encontrado em diversos pontos dentro da linha de abate, com isso, lotes livres de contaminação inicial podem se contaminar durante o processamento, mesmo que tenham sido abatidos em dias subsequentes (PERKO-MÄKELÄ *et al.*, 2011).

As técnicas convencionais de isolamento, além de serem trabalhosas, exigem vários dias de análise e, muitas vezes, a presença de microbiota competitiva inibe o crescimento de *Campylobacter*, podendo levar a resultados errôneos (THEOPHILO e JAKABI, 2008).

Diferentes métodos, como imunoenaios (PELLEGRIN *et al.*, 2011) e técnicas moleculares (ANDRADE *et al.*, 2010), têm sido desenvolvidas a fim de abreviar o tempo de detecção e aumentar a sensibilidade e a especificidade no isolamento de *Campylobacter* de alimentos. A separação imunomagnética (IMS) é uma técnica que tem sido proposta para substituir ou melhorar a eficácia de métodos convencionais de isolamento de diversos microrganismos (CUDJOE *et al.*, 1995; YU *et al.*, 2001; TRAM *et al.*, 2012). A IMS consiste no uso de microesferas de poliestireno magnetizadas revestidas com anticorpos específicos que servem para concentrar o microrganismo de interesse a fim de melhorar a sua detecção. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo desenvolver e testar a técnica de separação imunomagnética na detecção de *C. jejuni* em produtos de frango.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas cepas de diferentes espécies bacterianas comumente envolvidas em doenças transmitidas por alimentos a fim de avaliar a especificidade do imunoensaio. *Escherichia coli* enteroinvasiva ATCC 1739, *E. coli* enteropatogênica ATCC 1741, *E. coli* entero-hemorrágica ATCC 1740, *Enterobacter cloacae* ATCC 23355, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Yersinia enterocolitica* INCQS 00098 e *Shyella dysenteriae* ATCC 13313 foram semeadas em Caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Acumedia, Michigan, EUA) e incubadas *overnight* a 37°C em aerobiose e posteriormente semeadas em ágar MacConkey (MC, Kasvi, Itália) para confirmar a ausência de contaminantes. *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 e *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, após a cultura *overnight* em BHI, foram semeadas em ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD, Himedia, Mumbai, Índia), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 em ágar Baird-Parker (BP, Himedia), *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 nos ágares Palcam (PA, Himedia) e Oxford (OA, Himedia), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 em ágar Cetrimide (CA, Kasvi) e *Aeromonas hydrophila* INQS 00289 em ágar Dextrina Ampicilina (ADA, Himedia) com a mesma finalidade.

As cepas de *Campylobacter* utilizadas foram *C. coli* ATCC 33559, *C. jejuni* ATCC 33291, *C. jejuni* ATCC 33560 e dez cepas selvagens, cinco de *C. coli* e cinco de *C. jejuni*, isoladas previamente de produtos cárneos de frango por Silva *et al.* (2014). Estas cepas foram cultivadas em Caldo Brucella (Acumedia) por 48 horas a 37°C em microaerofilia e posteriormente repicadas em ágar Carvão Cefoperazona Deoxicolato modificado (mCCDA, Oxoid, Hampshire, Inglaterra).

Foram utilizadas micropartículas magnetizadas de 2,8 μm de diâmetro (Dynabeads® M-270 Amine, Invitrogen Dynal AS, Oslo, Noruega), Kit *BioMag® Plus amine protein coupling* (Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Alemanha) e anticorpos policlonais anti-*Campylobacter jejuni* (Thermo Scientific, USA). Estes reagentes foram preparados e estocados segundo as instruções do fabricante.

Uma alíquota de 100 μL da solução do kit *BioMag® Plus amine protein coupling* foi transferida para um *eppendorf*, onde foram adicionados 800 μL de tampão de lavagem piridina (PWB) juntamente com as micropartículas magnéticas aminofuncionais (MMP) (2×10^9 MMP/mL) e misturados vigorosamente em vórtex até que o sobrenadante estivesse limpo. O sobrenadante foi aspirado com o auxílio de uma micropipeta e descartado. Essa etapa de lavagem do sobrenadante foi repetida por três vezes a fim de eliminar impurezas indesejadas.

Posteriormente as lavagens, foram adicionadas 400 μL de glutaraldeído 5% no *eppendorf* com as partículas e incubados em *shaker* rotatório para agitação constante por três horas à temperatura ambiente para ativação das partículas. Depois da ativação, as partículas foram concentradas usando um separador magnético MultiSep (Polysciences Inc., USA) até que o sobrenadante estivesse limpo. O sobrenadante era aspirado com o auxílio de uma micropipeta e descartado. As MMP foram lavadas quatro vezes com 800 μL de PWB.

As MMP ativadas (2×10^9 MMP/mL) foram suspensas em 800 μL de PWB e mantidas à 4°C para uso posterior.

Os anticorpos foram conjugados às esferas, adicionando-se 25 μL de solução com anticorpo policlonal anti-*C. jejuni* (4 mg/mL) aos 800 μL de PWB com 2×10^9 MMP/mL. Após homogeneização, as partículas com os anticorpos foram incubadas em *shaker* rotatório para agitação constante à temperatura ambiente por 18-24h.

Logo após o período de incubação, usando o separador magnético, as partículas acopladas foram separadas do sobrenadante, que foi descartado. O *eppendorf* com as partículas acopladas, após adição de 800 μL de PWB e 400 μL de solução *quenching*, foi incubado em *shaker* rotatório à temperatura ambiente por 30 minutos. Depois disto, as MMP foram novamente separadas magneticamente e o sobrenadante descartado.

Após, foram realizadas lavagens com 800 μL de PWB, que eram adicionados às MMP e homogeneizados vigorosamente, sendo então as partículas acopladas separadas magneticamente com o auxílio do separador magnético e o sobrenadante aspirado com o auxílio de uma micropipeta e descartado.

Depois de realizada três vezes a etapa de lavagem, as partículas (2×10^9 MMP/mL) foram suspensas em 1 mL de PWB e estocadas a 2-8°C por no máximo 1 mês, para não perderem a atividade imunológica.

A ligação micropartícula-anticorpo foi avaliada por teste de aglutinação em lâmina com as cepas de referência utilizadas no experimento, a fim de avaliar a especificidade do anticorpo. Uma suspensão (2 µL) da colônia da bactéria testada foi colocada em uma lâmina de vidro e misturada com 2 µL da solução com as esferas sensibilizadas, observando-se precipitação, em caso positivo, ou uma suspensão translúcida, em caso negativo.

Anteriormente à contaminação experimental, foi verificada a concentração celular das culturas de *C. jejuni* em espectrofotômetro (610 nm), a fim de obter-se uma densidade populacional padronizada, e retiradas alíquotas para contagem padrão em ágar para confirmar o número real de bactérias adicionadas. A densidade ótica (DO) estabelecida foi de 0,45, a qual corresponde a 10^8 UFC/mL. Os caldos utilizados na verificação da DO foram Brucella e Bolton, e na contagem foram utilizados os ágares Columbia e mCCDA, em nenhum dos meios foram observadas diferenças na turbidez ou contagem. A relação DO x UFC/mL foi feita em triplicada em ambos meios e o resultado expresso pela média. Como branco no espectrofotômetro foi utilizado caldos sem crescimento bacteriano.

Seis amostras de 25 g de carne de frango moída foram contaminadas com três concentrações de *C. jejuni* (10^0 , 10^{-1} e 10^{-2} UFC/25g). Três delas foram analisadas logo após a contaminação e as outras três após 24h de refrigeração a 4°C.

As amostras de carne de frango antes da contaminação foram analisadas quanto à presença de *Campylobacter*, utilizando protocolo recomendado pela U.S. Food and Drug Administration – FDA (HUNT *et al.*, 2001). O controle negativo serve para determinar que não haja *Campylobacter* na amostra inicial.

Cem amostras de produtos de frango (25 sobrecoxas, 25 asas, 25 peitos e 25 fígados) foram adquiridas no comércio varejista e imediatamente conduzidas sob refrigeração ao laboratório para análise pela metodologia convencional e pela IMS.

Como padrão-ouro, foi utilizado o método convencional recomendado pela FDA (HUNT *et al.*, 2001). Brevemente, uma alíquota de 25 g da amostra foi pesada, acondicionada em saco plástico estéril, adicionada de 100 mL de Caldo Bolton (Himedia) suplementado com 10 mg de Cefoperazona, 10 mg de Vancomicina, 10 mg de Trimetoprim e 5 mg de Anfotericina (Himedia), homogeneizada por cinco minutos em *shaker* e incubada a 42°C por 48 horas em jarras contendo gerador atmosférico de microaerofilia – Microaerobac (Probac do Brasil, São Paulo, Brasil). Passado este período, uma alíquota (10 µL) desta cultura foi

semeada na superfície de ágar mCCDA suplementado com 16 mg de Cefoperazona e 5 mg de Anfotericina B (Himedia) e incubada invertida em jarra de microaerofilia a 42°C por 48 horas para posterior confirmação fenotípica e genotípica.

Para IMS, foram utilizados os protocolos publicados por TRAM *et al.* (2012) e YU *et al.* (2001), com modificações. Brevemente, foram utilizadas alíquotas de 1 mL da cultura em caldo Bolton e 20 µL de microesferas sensibilizadas, em um tubo tipo *eppendorf*. Após incubação à temperatura ambiente por 15 min em agitação constante, as microesferas foram separadas da forma líquida usando um separador magnético. Após 10 min, o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado, o magneto removido e as microesferas lavadas seis vezes com 1 mL de tampão PBS, ressuspensas em PBS, semeadas na superfície de ágar mCCDA com as adições já citadas no item anterior e incubadas em microaerofilia a 42°C por 48 horas. Por fim, foi realizada a confirmação fenotípica e genotípica.

As colônias características de *Campylobacter* no ágar foram analisadas morfo-tintorialmente pela coloração de Gram. O Gênero *Campylobacter* é constituído de bactérias Gram negativas com formato de bastonetes delgados espiralados ou em forma de “asa de gaivota” ou “S”; podendo apresentar forma filamentosa ou cocóide nos cultivos de longos períodos (NACHAMKIN, 2007).

Foram feitas as provas da produção das enzimas oxidase e catalase. *C. jejuni* é oxidase e catalase positivas.

Após a identificação fenotípica das colônias características, estas foram analisadas pela técnica da reação em cadeia da polimerase multiplex (multiplex-PCR) para confirmação da espécie *C. jejuni*, de acordo com protocolo descrito por Harmon *et al.* (1997). Foram utilizados dois pares de *primers*: o par pg 3/pg 50, que amplifica uma região altamente conservada relacionada aos genes da flagelina, tanto em *C. jejuni* como em *C. coli*, e o par C-1/C-4, que amplifica uma região específica presente somente em *C. jejuni*. Os produtos das amplificações, corados com GelRed (Uniscience, São Paulo, São Paulo, Brasil), foram analisados em eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As micropartículas magnéticas aminofuncionais foram ligadas covalentemente com os anticorpos usando o Kit *BioMag® Plus amine protein coupling* e posteriormente acopladas com o anticorpo policlonal anti-*C. jejuni*, conforme descrição anterior, e a ligação micropartícula-anticorpo foi avaliada por teste de aglutinação em lâmina. Não foi observada

reação cruzada com nenhum dos microrganismos testados. A precipitação, ou seja, reação positiva de aglutinação foi observada apenas nos testes com as cepas de *C. jejuni* ATCC 33291, ATCC 33560 e as cepas selvagens desta espécie. Estes resultados demonstram que os anticorpos foram conjugados com as esferas magnéticas e que as suas atividades imunológicas se mantiveram funcionais após o processo de revestimento. Também mostra a especificidade dos anticorpos, que não reagiram com nenhuma espécie diferente de *C. jejuni*.

C. jejuni foi recuperado de todas as amostras experimentalmente contaminadas submetidas à IMS, tanto na hora 0 como após 24h, nas diferentes concentrações, assim como quando foi utilizado o método convencional. No entanto, quando utilizada a IMS pode-se observar nas lâminas de coloração de Gram que houve presença de *Campylobacter* em maior número do que na metodologia convencional. Esse fato se deve provavelmente à ausência de contaminantes na IMS o que não ocorreu utilizando a metodologia convencional, onde foi observado grande número de outros microrganismos morfo-tinturialmente distintos de *Campylobacter*. TRAM *et al.* (2012) desenvolveram pela primeira vez um ensaio rápido e eficaz utilizando IMS-PCR direto com anticorpo monoclonal para detectar *C. jejuni* a partir de fezes de frango. Eles relataram ser possível detectar 10 UFC/ μ L de fezes sem pré-enriquecimento e reduzir bastante o tempo de análise, pois requer só a reação da PCR. No entanto, esta pesquisa difere do nosso trabalho em alguns aspectos: tipo de amostra, grau de detecção, não uso de caldo de pré-enriquecimento e tipo de anticorpo. Em nosso trabalho, foi possível detectar *C. jejuni* em concentrações bem menores (10^0 UFC/25 g) do que no estudo de TRAM *et al.* (2012) (10^4 UFC/mL), o que provavelmente tenha ocorrido pelo uso de pré-enriquecimento e anticorpo policlonal, tendo em vista que o pré-enriquecimento recupera células injuriadas e o anticorpo policlonal tem afinidade com diferentes regiões antigênicas da bactéria. YU *et al.* (2001) mesmo utilizando anticorpo policlonal, densidades celulares de 10^3 - 10^7 UFC de *C. jejuni*/g carne de frango na inoculação artificial e concentração de 10^6 - 10^7 esferas/mL para detecção, semelhante ao nosso trabalho, detectaram *C. jejuni* apenas em concentrações de 10^4 UFC/g, bem maiores do que as concentrações detectadas no nosso trabalho. Além disso, estes autores relataram que seus resultados não podem ser diretamente aplicados à prática porque sua pesquisa limitou-se apenas à inoculação artificial, sem realizar testes em produtos naturalmente contaminados.

C. jejuni foi isolado de sete (7%) amostras de frango naturalmente contaminadas, três asas, duas sobrecoxas, dois fígados e um peito, quando foi utilizada a IMS. Entretanto, somente três isolados, um de asa, um de sobrecoxa e outro de fígado, foram obtidos quando foi utilizado o método convencional.

A detecção de *C. jejuni* com IMS e o não isolamento da mesma amostra com o padrão-ouro demonstra que a técnica desenvolvida é mais sensível que a metodologia convencional, detectando o microrganismo em amostras que seriam dadas como negativas para *C. jejuni* pelo padrão-ouro. Outro fator importante é a especificidade da IMS. No gel de agarose (Fig. 1) pode-se observar que todas as amostras detectadas pela técnica desenvolvida neste trabalho foram confirmadas com sendo *C. jejuni* e a única amostra isolada pela metodologia convencional que não foi isolada com IMS é a que foi confirmada como *C. coli* pela não amplificação do fragmento C-1/C-4, que diferencia *C. coli* de *C. jejuni*.

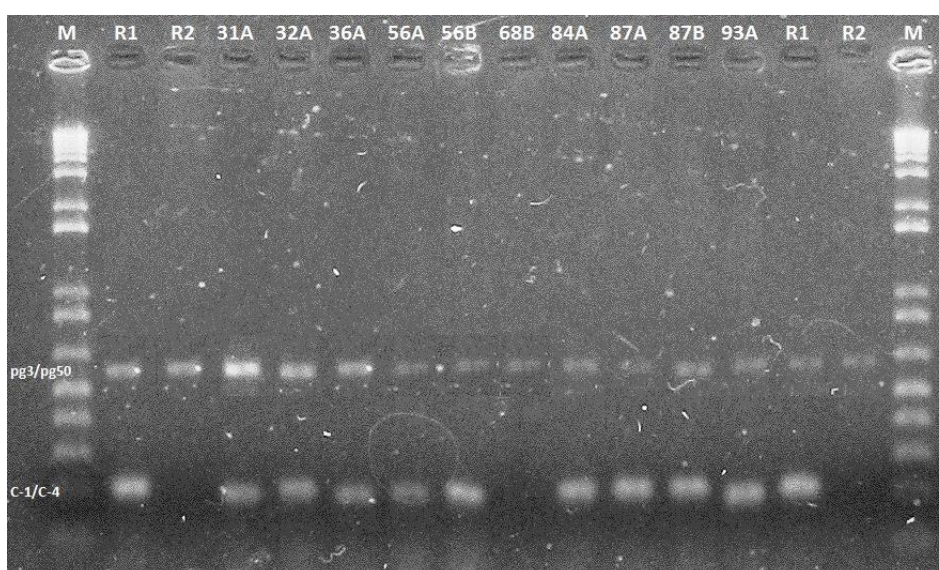


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação por multiplex-PCR de isolados de amostras de produtos de frango naturalmente contaminados com *Campylobacter*. M: Marcador de Peso Molecular; R1: Cepa de referência de *C. jejuni*; R2: Cepa de referência de *C. coli*; 31A: *C. jejuni* isolado de asa de frango por IMS; 32A: *C. jejuni* isolado de asa de frango por IMS; 36A: *C. jejuni* isolado de coxa de frango por IMS; 56A: *C. jejuni* isolado de asa de frango por IMS; 56B: *C. jejuni* isolado de asa de frango pelo padrão-ouro; 68B: *C. coli* isolado de coxa de frango pelo padrão-ouro; 84A: *C. jejuni* isolado de peito de frango por IMS; 87A: *C. jejuni* isolado de fígado de frango por IMS; 87B: *C. jejuni* isolado de fígado de frango pelo padrão-ouro; 93A: *C. jejuni* isolado de fígado de frango por IMS.

CONCLUSÕES

A técnica de separação imunomagnética pode ser usada para isolamento de *C. jejuni* de produtos de frango, oferecendo a vantagem de detectar o microrganismo em amostras a

partir das quais o isolamento não é obtido com o uso do método convencional. Adicionalmente, as culturas obtidas apresentam menor multiplicação de microrganismos contaminantes, o que dá maior segurança nos resultados.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, R. B.; GEMELLI, T.; DALL ONDER, L. P. *et al.* Métodos Diagnósticos para os patógenos alimentares: *Campylobacter* sp., *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 77, n. 4, p. 741-750, 2010.
- CUDJOE, K. S.; HAGTVEDT, T.; DAINITY, R. Immunomagnetic separation of *Salmonella* from foods and their detection using immunomagnetic particle (IMP) – ELISA. *International Journal of Food Microbiology*, v. 27, p. 11-25, 1995.
- DONISSON, A. M.; ROSS, C. M. Microbiological safety of meat | Thermotolerant *Campylobacter*. *Encyclopedia of Meat Sciences*, 2th, p. 382-388, 2014.
- HARMON, K. M.; RANSOM, G. M.; WESLEY, I. V. Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes*, v. 11, p. 195-200, 1997.
- HUNT, J.M.; ABEYTA, C.; TRAN, T. Chapter 7. *Campylobacter*. U.S. Food and Drug Administration. *Bacteriological analytical manual*. 2001. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm072616.htm>>. Acesso em: 20 mai. 2016.
- FITZGERALD, C.; NACHAMKIN, I. *Campylobacter* and *Aerobacter*. In: MURRAY, P.R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J.H. *et al.* Manual of Clinical Microbiology, 9 ed, Washington, 2007.
- NACHAMKIN, I. *Campylobacter jejuni*. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R. *Food Microbiology: fundamental and frontiers*. 3th ed. Washington: ASM Press, 2007. 831 p. 237-248.

OLSVIK, O.; POPOVIC, T.; SKJERVE, E. *et al.* Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 7, p. 43-54, 1994.

PELLEGRIN, A. O.; MIRANDA, K. L.; FIGUEIREDO, J. F. *et al.* Uso do ensaio imunoenzimático e imunoblotting para detecção de imunoglobulinas contra *Campylobacter fetus* em muco cérvico-vaginal de fêmeas bovinas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 31, n. 3, p. 247-254, 2011.

PERKO-MÄKELÄ, P.; ALTER, T.; ISOHANNI, P. *et al.* Distribution of *Campylobacter jejuni* isolates from Turkey farms and different stages at slaughter using pulsed-field gel electrophoresis and flaA-short variable region sequencing. *Zoonoses Public Health*, n. 58, p. 388-398, 2011.

SILVA, D. T.; TEJADA, T. S.; BLUM-MENEZES, D. *et al.* *Campylobacter* species isolated from poultry and humans, and their analysis using PFGE in southern Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, v. 217, p. 189-194, 2016.

SILVA, D. T.; TEJADA, T. S.; CUNHA, C. C. *et al.* Ocorrência de *Campylobacter* em carne de frango, fezes de frango e humanas e pesquisa dos genes *cdt*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 66, n. 1, 2014.

THEOPHILO, G. N. D.; JAKABI, M. *Campylobacter* spp.: Diagnóstico Laboratorial – Métodos clássicos e moleculares. *WHO Global Salm-Surv Nível III Capacitação Integrada*. p. 13-35, 2008. Disponível em:
<http://bvs.panalimentos.org/local/file/INCLUSIONES2008/2GSS_CURSO_CAPACITACA_O_NIVEL3_BRASILIA2008_estanaBVS/GSS_2008_pdf/GSS-III-Manual%20Campylobacter.pdf>. Acesso em: 20 mai. 2016.

TRAM, L. L. T.; CAO, C.; HOGBERG, J. *et al.* Isolation and detection of *Campylobacter jejuni* from chicken fecal samples by immunomagnetic separation PCR. *Food Control*, v. 24, p. 23-28, 2012.

YU, L. S. L.; UKNALIS, J.; TU, S. Immunomagnetic separation methods for the isolation of *Campylobacter jejuni* from ground poultry meats. *Journal of Immunological Methods*, v. 256, p. 11-18, 2001.

3 Considerações Finais

Dentre os métodos convencionais testados, pode-se observar que quando utilizado pré-enriquecimento, seja Caldo Brucella ou Caldo Bolton, e posterior semeadura em meio seletivo mCCDA a recuperação de células de *C. jejuni* em produtos avícolas resfriados, experimentalmente contaminados, é superior em comparação ao plaqueamento direto e o uso de outros ágar, mesmo associados com pré-enriquecimento.

Quanto à técnica de separação imunomagnética, conclui-se que pode ser usada para isolamento de *C. jejuni* em carne de frango, oferecendo vantagem sobre as demais técnicas testadas de detectar o microrganismo em amostras a partir das quais o isolamento não é obtido com o uso do método convencional.

Referências

ANDRADE, R. B.; GEMELLI, T.; DALL ONDER, L. P.; CRISTINA, K.; BRITO, T.; BARBOZA, A. A. L.; BRITO, B. G. Métodos Diagnósticos para os patógenos alimentares: *Campylobacter* sp., *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 4, p. 741-750, 2010.

ALVES, J.; HIROOKA, E. Y.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Development of a multiplex real-time PCR assay with an internal amplification control for the detection of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* spp. in chicken meat. **LWT - Food Science and Technology**, v. 72, p. 175-181, 2016.

BOJANIĆ, K.; MIDWINTER, A. C.; MARSHALL, J. C.; ROGERS, L. E.; BIGGS, P. J.; ACKE, E. Variation in the limit-of-detection of the ProSpecT *Campylobacter* microplate enzyme immunoassay in stools spiked with emerging *Campylobacter* species. **Journal of Microbiological Methods**, v. 127, p. 236-241, 2016.

BOLAN, R. S.; DALBÓ, K.; VARGAS, F. R.; MORETTI, G. R. F.; ALMEIDA, L. P.; ALMEIDA, G. K. P.; DIAS, P. V. L. Síndrome de Guillain-Barré. **Revista da AMRIGS**, v. 51, n. 1, p. 58-61, 2007.

BOLTON, D. J. *Campylobacter* virulence and survival factors. **Food Microbiology**, v. 48, p. 99–108, 2015.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Campylobacter***: gênero *Campylobacter*: diagnóstico laboratorial clássico e molecular/Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolfo Lutz. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 44p. Disponível em: <<http://u.saude.gov.br/images/pdf/2015/janeiro/09/manual-tecnico-diagnostico-laboratorial-campylobacter.pdf>>. Acesso em: 21 jun. 2016.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION [CDC]. National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases. ***Campylobacter***, General information, 2014. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/foodsafety/diseases/campylobacter/index.html> />. Acesso em: 21 jun. 2016.

CHON, J.; KIM, Y.; KIM, H.; KIM, D.; KIM, H.; SONG, K.; SEO, K. Supplementation of Bolton broth with triclosan improves detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in chicken carcass rinse. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, p. 37-39, 2014.

CUDJOE, K. S.; HAGTVEDT, T.; DAINITY, R. Immunomagnetic separation of *Salmonella* from foods and their detection using immunomagnetic particle (IMP) – ELISA. **International Journal of Food Microbiology**, v. 27, p. 11-25, 1995.

DONISSON, A. M.; ROSS, C. M. Microbiological safety of meat | Thermotolerant *Campylobacter*. **Encyclopedia of Meat Sciences**, 2th, p. 382-388, 2014.

DOYLE, M. P.; JONES, D. M. Food-borne transmission and antibiotic resistance of *Campylobacter jejuni*. In: NACHAMKIN, I.; BLASER, M. J.; TOMPKINS, L. S. ***Campylobacter jejuni: current status and future trends***, Washington, ASM Press, p. 45-48, 1992.

FITZGERALD, C.; NACHAMKIN, I. *Campylobacter* and *Aerobacter*. In: MURRAY, P.R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J.H.; LANDRY M. L.; PFALLER, M. A. **Manual of Clinical Microbiology**, 9 ed, Washington, 2007.

GHAFFAR, N. M.; CONNERTON, P. L.; CONNERTON, I. F. Filamentation of *Campylobacter* in broth cultures. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 657, 2015.

GEORGE, H. A.; HOFFMANN, P. S.; KRIEG, N. R.; SMIMBERT, R. M. Improved media for growth and aerotolerance of *Campylobacter fetus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 36-41, 1978.

GHAFFAR, N. M.; CONNERTON, P. L.; CONNERTON, I. F. Filamentation of *Campylobacter* in broth cultures. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 657, 2015.

GHARST, G.; OYARZABAL, O. A.; HUSSAIN, S. K. Review of current methodologies to isolate and identify *Campylobacter* spp. from foods. **Journal of Microbiological Methods**, n. 95, p. 84–92, 2013.

GONÇALVES, K. D. O.; YAMANAKA, E. H. U.; ALMEIDA, A. P. I.; CHANO, L. D. J.; RIBEIRO, A. B. Pesquisa de *Campylobacter* spp em carnes de frango comercializadas na cidade de Campo Mourão - PR. **Alimentos e Nutrição**, v. 23, n. 2, p. 211–216, 2012.

GOTTARDI, C. P. T. **Avaliação das condições higiênico-sanitárias do ambiente de manipulação de produtos fatiados de Origem Animal de redes de Supermercados de Porto Alegre**. 2000. 80f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

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

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

HUNT, J. M.; ABEYTA, C.; TRAN, T. U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological analytical manual. Chapter 7. **Campylobacter**. 2001. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm072616.htm>>. Acesso em: 21 jun. 2016.

LAWLEY, R. **Campylobacter**. Food Safety Watch. 2013. Disponível em: <<http://www.foodsafetywatch.org/factsheets/campylobacter/>>. Acesso em: 21 jun. 2016.

MATT, M.; NORDENTOFT, S.; KOPACKA, I.; PÖLZLER, T.; LASSNIG, H.; JELOVCAN, S.; STÜGER, H. P. Estimating sensitivity and specificity of a PCR for boot socks to detect *Campylobacter* in broiler primary production using Bayesian latent class analysis. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 128, p. 51-57, 2016.

MEDEIROS, V. M.; BRICIO, S. M. L.; FILGUEIRAS, A. L. L.; CLEMENTINO, M. B. M. Utilização de caldo Bolton no enriquecimento seletivo em comparação ao plaqueamento direto na pesquisa de *Campylobacter* spp. em carcaças resfriadas de frango. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 3, p. 456-461, 2012.

MOORHEAD, S. M.; DYKES, G. A. Survival of *Campylobacter jejuni* on beef trimmings during freezing and frozen storage. **Letters in Applied Microbiology**, v. 34, p. 72-76, 2002.

MORENO, Y.; HERNÁNDEZ, M.; FÉRRUS, M. A.; ALONSO, J. L.; BOTELLA, S. Direct detection of thermotolerant *Campylobacter* in chicken products by PCR and in situ hybridization. **Revista de Microbiologia**, n. 152, p. 577-582, 2001.

NACHAMKIN, I. *Campylobacter jejuni*. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R. **Food Microbiology**: fundamental and frontiers. 3th ed. Washington: ASM Press, 2007. 831 p. 237-248.

PARK, P. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, n. 3, p. 177-188, 2002.

PELLEGRIN, A. O.; MIRANDA, K. L.; FIGUEIREDO, J. F.; BARBOSA, E. F.; LAGE, A. P. Uso do ensaio imunoenzimático e imunoblotting para detecção de imunoglobulinas contra *Campylobacter fetus* em muco cérvico-vaginal de fêmeas bovinas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 3, p. 247-254, 2011.

PERKO-MÄKELÄ, P.; ALTER, T.; ISOHANNI, P.; ZIMMERMANN, S.; LYHS, U. Distribution of *Campylobacter jejuni* isolates from Turkey farms and different stages at slaughter using pulsed-field gel electrophoresis and flaA-short variable region sequencing. **Zoonoses Public Health**, n. 58, p. 388-398, 2011.

RODGERS, J. D.; LAWES, J. R.; VIDAL, A. B.; ELLIS-IVERSEN, J.; RIDLEY, A.; PLEYDELL, E. J.; POWELL, L. F.; TOSZEGHY, M.; STAPLETON, K.; CLIFTON-HADLEY, F. A. Characteristics and comparative performance of direct culture, direct PCR and enumeration methods for detection and quantification of *Campylobacter* spp. in broiler caeca. **Veterinary Microbiology**, v. 159, n. 3-4, p. 390-396, 2012.

ROLLINS, D. M.; COLWELL, R. R. Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 52, p. 231-538, 1986.

SALLOWAY, S.; MERMEL, L. A.; SEAMANS, M.; ASPINALL, G. O.; NAM SHIN, J. E.; KURJANCZYK, L. A.; PENNER, J. L. Miller-Fisher syndrome associated with *Campylobacter jejuni* bearing lipopolysaccharide molecules that mimic human ganglioside GD3. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 8, p. 2945-2949, 1996.

SILVA, D. T.; TEJADA, T. S.; BLUM-MENEZES, D.; DIAS, P. A.; TIMM, C. D. *Campylobacter* species isolated from poultry and humans, and their analysis using PFGE in southern Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 217, p. 189-194, 2016.

SILVA, D. T.; TEJADA, T. S.; CUNHA, C. C.; LOPES, N. A.; AGOSTINETTO, A.; COLLARES, T.; LEON, P. M. M.; TIMM, C. D. Ocorrência de *Campylobacter* em carne de frango, fezes de frango e humanas e pesquisa dos genes *cdt*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 1, 2014.

SILVA, J.; LEITE, D.; FERNANDES, M.; MENA, C.; GIBBS, P. A.; TEIXEIRA, P. *Campylobacter* spp. as foodborne pathogen: a review. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, p. 1-12, 2011.

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

STELLA, S.; SONCINI, G.; ZIINO, G.; PANEBIANCO, A.; PEDONESE, F.; NUVOLONI, R.; DI GIANNATALE, E.; COLAVITA, G.; ALBERGHINI, L.; GIACCONE, V. Prevalence and quantification of thermophilic *Campylobacter* spp. in Italian retail poultry meat: Analysis of influencing factors. **Food Microbiology**, v. 62, p. 232-238, 2017.

THEOPHILO, G. N. D.; JAKABI, M. *Campylobacter* spp.: Diagnóstico Laboratorial – Métodos clássicos e moleculares. **WHO Global Salm-Surv Nível III Capacitação Integrada**. p. 13-35, 2008. Disponível em: <http://bvs.panalimentos.org/local/file/INCLUSIONES2008/2GSS_CURSO_CAPACITACAO_NIVEL3_BRASILIA2008_estanaBVS/GSS_2008_pdf/GSS-III-Manual%20Campylobacter.pdf>. Acesso em: 20 mai. 2016.

TRAM, L. L. T.; CAO, C.; HOGBERG, J.; WOLFF, A.; BANG, D. D. Isolation and detection of *Campylobacter jejuni* from chicken fecal samples by immunomagnetic separation PCR. **Food Control**, v. 24, p. 23-28, 2012.

YU, L. S. L.; UKNALIS, J.; TU, S. Immunomagnetic separation methods for the isolation of *Campylobacter jejuni* from ground poultry meats. **Journal of Immunological Methods**, v. 256, p. 11-18, 2001.

WEI, B.; CHA, S.; YOON, R.; KANG, M.; ROH, J.; SEO, H.; LEE, J.; JANG, H. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. isolated from retail chicken and duck meat in South Korea. **Food Control**, v. 62, p. 63-68, 2016.

WILLIAMS, L. K.; JØRGENSEN, F.; GROGONO-THOMAS, R.; HUMPHREY, T. J. Enrichment culture for the isolation of *Campylobacter* spp: Effects of incubation

conditions and the inclusion of blood in selective broths. **International Journal of Food Microbiology**, v. 130, n. 2, p. 131-134, 2009.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION), 2011. ***Campylobacter*** – Fact sheet n° 930255. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/en/>>. Acesso em: 21 jun. 2016.

ZBRUN, M. V.; OLIVERO, C.; ROMERO-SCHARPEN, A.; ROSSLER, E.; SOTO, L. P.; ASTESANA, D. M.; BLAJMAN, J. E.; BERISVIL, A.; SIGNORINI, M. L.; FRIZZO, L. S. Antimicrobial resistance in thermotolerant *Campylobacter* isolated from different stages of the poultry meat supply chain in Argentina. **Food Control**, n. 57, p. 136-141, 2015.