

**VALÉRIA DE MELLO MEDEIROS**

**IMPLANTAÇÃO DE METODOLOGIA DE PESQUISA DE *CAMPYLOBACTER* spp. NO SETOR DE ALIMENTOS DO DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA DO INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE - INCQS**

**PPGVS/INCQS  
RIO DE JANEIRO  
2009**

**IMPLANTAÇÃO DE METODOLOGIA DE PESQUISA DE *CAMPYLOBACTER* spp. NO SETOR DE ALIMENTOS DO DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA DO INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE - INCQS**

**VALÉRIA DE MELLO MEDEIROS**

Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – Fundação Oswaldo Cruz.

ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup>. PAOLA CARDARELLI LEITE

**RIO DE JANEIRO**

**2009**

**IMPLANTAÇÃO DE METODOLOGIA DE PESQUISA DE *CAMPYLOBACTER* spp. NO SETOR DE ALIMENTOS DO DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA DO INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE - INCQS**

**VALÉRIA DE MELLO MEDEIROS**

Monografia submetida à Comissão Examinadora composta pelos professores e tecnologistas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Especialista em Controle da Qualidade em Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária.

Aprovado:

Prof<sup>a</sup>. \_\_\_\_\_  
Dra. Suely Aparecida Pimenta Fracalanza (INCQS)

Prof<sup>a</sup>. \_\_\_\_\_  
Dra. Ana Luzia Lauria Filgueiras (IOC)

Prof. \_\_\_\_\_  
Dr. Antonio Eugenio C. Cardoso Almeida (INCQS)

Prof<sup>a</sup>. Orientadora: \_\_\_\_\_  
Dra. Paola Cardarelli Leite

Rio de Janeiro, 08 de janeiro de 2009

## FICHA CATALOGRÁFICA

Medeiros, Valéria de Mello  
Implantação de Metodologia de Pesquisa de *Campylobacter*  
spp. no Setor de Alimentos do Departamento de Microbiologia  
do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde –  
INCQS/ Valéria de Mello Medeiros. Rio de Janeiro:  
INCQS/FIOCRUZ, 2009

x, 28f., il., tab.

Trabalho de conclusão de curso (Especialização em Vigilância  
Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de  
Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação  
em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2009.  
Orientadora: Dra. Paola Cardarelli Leite

1. *Campylobacter*. 2. Frango. 3. metodologia de detecção.

"É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar; é melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder. Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver ..."

Martin Luther King

## AGRADECIMENTOS

A Deus por permitir a realização deste trabalho.

Ao namorado Nelson Luiz da S. Pedreira, pela força, coragem e companheirismo.

A minha filha Renata Catharina, pela compreensão de minha ausência em alguns momentos de sua vida.

Aos meus pais, por terem feito de mim uma pessoa de coragem.

À todos os familiares, pela compreensão a mim dispensada.

À minha orientadora Professora Dra. Paola Cardarelli Leite pela confiança em mim depositada.

À Silvia Maria Lopes Bricio, pela preciosa ajuda, pois sem ela seria difícil a elaboração deste trabalho.

Aos amigos de Setor e aos que nele estiveram presentes, Carla, Márcia, Aline, Marcelo, Mariana e Samara, pelas dicas e otimismo transmitidos durante a realização deste trabalho.

Aos companheiros dos Setores de Meio de Cultura e Esterilização pela atenção aos meus pedidos.

Ao amigo Carlos Roberto Sobrinho do Nascimento, pela colaboração prestada.

Ao Dr. Ivano R. V. Filippis Capasso, pela gentileza de sua colaboração.

À querida amiga Anna Maria Barreto Fust, por orgulhar-se de mim e jamais permitir o meu desânimo.

Às coordenadoras, Kátia Christina Leandro Antunes e Maria Aparecida Affonso Boller, pelo excelente desempenho no Curso de Especialização.

Aos colegas de turma, pelos belos momentos compartilhados.

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

Aos integrantes da Biblioteca do INCQS pela ajuda a mim dispensada.

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

À equipe do IOC, especialmente à Ana Luzia Lauria Filgueiras, pela gentil acolhida em seu Laboratório e pelos ensinamentos, que foram de grande importância.

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo implantar metodologia para pesquisa de *Campylobacter* spp. no Setor de Alimentos do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS, utilizando a técnica recomendada pela “American Public Health Association” (APHA). Dez amostras de sobrecoxas resfriadas de frango foram adquiridas no mercado varejista do Município do Rio de Janeiro tais como: supermercados, feiras livres e abatedouro com inspeção estadual. Foi realizada a enxaguadura das amostras com Água Peptonada Tamponada (APT) seguida por plaqueamento direto em ágar Carvão Cefoperazone Desoxicolato modificado (mCCDA) e enriquecimento seletivo utilizando o Caldo Bolton em dupla concentração. A confirmação de *Campylobacter* spp. foi feita pelo teste de aglutinação em látex. Os resultados indicaram 07 amostras (70%) positivas para *Campylobacter* spp., demonstrando que a metodologia selecionada foi capaz de detectar o microrganismo. Todos os resultados positivos foram conseguidos pelo plaqueamento direto, sendo considerado melhor e mais rápido do que o enriquecimento seletivo. A metodologia em estudo foi de fácil execução, não oferecendo dificuldade nas diferentes etapas, sendo possível de ser implantada na maioria dos laboratórios de microbiologia de alimentos, desde que disponha dos insumos necessários para o isolamento do microrganismo. A alta ocorrência de *Campylobacter* spp. encontrada nesse trabalho indica que devem ser tomadas medidas de controle da disseminação desse microrganismo durante as principais etapas de abate e processamento de frango, a fim de minimizar os riscos a que a população está sujeita ao consumir esse produto.

Palavras-chave: *Campylobacter* spp., frango, metodologia de detecção.

## ABSTRACT

This study aimed to establish a methodology for the detection of *Campylobacter* spp. in food, using a technique recommended by the American Public Health Association (APHA), in the Sector of food analysis of the National Institute of Quality Control in Health – INCQS, Rio de Janeiro, Brazil. Ten samples of refrigerated chicken thighs were acquired in the retail market in Rio de Janeiro such as: supermarkets, free markets and slaughterhouse with state inspection. The samples were rinsed with sterile buffered peptone water (BPW) and plated directly onto selective modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate agar (mCCDA) and selective enrichment using Bolton broth in a two-fold concentration; the confirmation of *Campylobacter* spp. was performed by latex agglutination test. The results showed 7 out of 10 (70%) positive samples for *Campylobacter* spp., demonstrating that this methodology was able to detect the microorganism. All positive results were achieved by direct plating, and were considered better and faster than the selective enrichment method. The methodology in study was easy to execute, with no difficulties during its different steps, and can be easily to implant in most food microbiology laboratories, having the necessary reagents for the isolation of the microorganism. The high occurrence of *Campylobacter* found in this study indicates that measures must be taken to control the spread of this bacterium during the main stages of slaughter and chicken processing, in order to minimize the risks that the population is subject consuming this product.

Key words: *Campylobacter* spp., chicken, methodology of detection



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABEF - Associação Brasileira de Produtores e Exportadores de Frango  
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
APPCC – Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle  
APHA - American Public Health Association  
APT – Água Peptonada Tamponada  
ATCC – American Type Culture Collection  
CARMA - *Campylobacter* Risk Management and Assessment  
CDC – Centro de Controle e Prevenção de Doenças  
CECAL - Centro de Criação de Animais de Laboratório  
CT - Toxina Colérica  
DTA – Doenças Transmitidas por Alimentos  
EUA – Estados Unidos da América  
FBP – Sulfato Ferroso, Metabissulfito de Sódio e Piruvato de Sódio  
FDA – Food and Drug Administration  
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz  
ICMSF – International Commission on Microbiological Specification for Foods  
INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
LACEN – Laboratório Central de Saúde Pública  
Mb – Mega base  
NCTC – National of Culture Type Collection  
Pb – Pares de bases  
PCR – Reação em cadeia pela polimerase  
mCCDA – Ágar Carvão Cefoperazone Desoxicolato modificado  
pH - Potencial Hidrogeniônico  
µL - Microlitro  
RDC – Resolução da Diretoria Colegiada  
RNA - Ácido Ribonucléico  
SGB - Síndrome de Guillain-Barré  
TTC - Cloreto de trifetil tetrazólio  
UBA - União Brasileira de Avicultura  
VNC - Viável, mas não cultivável

## Lista de Figuras, Gráficos, Tabelas e Anexos.

Figura 1	Microscopia eletrônica de <i>Campylobacter jejuni</i> : Aparência de sacarolha e flagelo bipolar.....	3
Gráfico 1	Porcentagem de infecções por <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> de acordo com a faixa etária.....	5
Tabela 1	Propriedades das toxinas de <i>Campylobacter</i> .....	6
Gráfico 2	Casos de infecções transmitidas por alimentos por mês: CDC/USDA/FDA, 1996.....	8
Tabela 3	Consumo brasileiro de carne de frango.....	9
Tabela 4	Produção brasileira de carne de frango (ton.).....	10
Tabela 5	Resultado das análises de corte resfriado de frango de diferentes procedências.....	19
Anexo 1	Tabela 2	
Anexo 2	Esquema de análise	
Anexo 3	Meios de cultura	
Anexo 4	Soluções e reagentes	

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1. Microbiologia dos Alimentos.....	1
1.2. Doenças Transmitidas por Alimentos.....	1
1.3. <i>Campylobacter</i> spp.....	2
1.3.1. Histórico.....	2
1.3.2. Características de <i>Campylobacter</i> spp.....	2
1.3.3. Taxonomia.....	4
1.3.4. Campilobacteriose.....	4
1.3.5. Patogenia.....	6
1.3.6. Epidemiologia.....	6
1.3.7. Surtos.....	7
1.3.8. Isolamento.....	8
1.4. Frango.....	9
1.5. Justificativa.....	11
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	13
2.1. Objetivo geral.....	13
2.2. Objetivos específicos.....	13
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	14
3.1. Metodologia.....	14
3.1.1. Enxaguadura da amostra.....	14
3.1.2. Plaqueamento direto.....	15
3.1.3. Enriquecimento seletivo.....	15
3.1.4. Plaqueamento após enriquecimento seletivo.....	15
3.1.5. Seleção das colônias.....	16
3.1.6. Prova da catalase.....	16
3.1.7. Prova da oxidase.....	17
3.1.8. Teste de Aglutinação em Látex.....	17
<b>4. RESULTADOS</b> .....	19
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	21
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	24
<b>7. PESPPECTIVAS</b> .....	24
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:</b> .....	25

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Microbiologia dos Alimentos**

A Microbiologia dos alimentos como ciência teve um desenvolvimento muito rápido ao longo das últimas décadas. Algumas contribuições foram dadas por A. Kircher, que em 1658, foi o primeiro a sugerir a existência de relação entre a decomposição de carnes e leite à presença de “vermes” invisíveis a olho nu. L. Spallanzani, em 1765, derrubou a teoria da geração espontânea provando que o cozimento e o posterior armazenamento de caldo de carne cozida em recipiente fechado garantiam que o produto não se deteriorasse por bastante tempo (FRANCO e LANDGRAF, 2002). Em 1809, o confeitoiro francês Nicholas Appert comprovou os achados de Spallanzani ao descrever um processo de conservação de carnes em recipientes de vidro mantido em água fervente por diferentes períodos. Esta técnica foi patenteada em 1810 com o nome de appertização, que corresponde ao atual processamento de conservas enlatadas. (FRANCO e LANDGRAF, 2002).

Louis Pasteur, de 1854 a 1864, associou a deterioração dos alimentos com o desencadeamento de doenças específicas. A “pasteurização” como é conhecida hoje, foi aplicada pela primeira vez por volta de 1867-68, no aquecimento do vinho, para destruir organismos indesejáveis, deste modo Louis Pasteur foi nomeado o pai da Microbiologia de Alimentos. (HARTMAN, 2001).

### **1.2. Doenças Transmitidas por Alimentos**

As Doenças transmitidas por Alimentos ocorrem quando uma pessoa ingere alimentos com microrganismos ou suas toxinas, desencadeando sintomas muitas vezes não notificados aos órgãos de inspeção de alimentos, de controle e às agências de saúde (FORSYTHE, 2002).

Enfermidades de origem alimentar constituem um importante problema de Saúde Pública. Nas últimas décadas tem sido descrito o aparecimento de novos patógenos, a reemergência de bactérias patogênicas antigas, assim como o aumento da resistência desses microrganismos a agentes antimicrobianos. Esses fatos podem ser explicados pelas mudanças ocorridas nos procedimentos de produção de alimentos que atualmente apresentam consideráveis alterações, como mudanças nas práticas agrícolas, na criação de animais, nas novas tecnologias de produção e em novas técnicas de conservação de alimentos (SKOVGAARD, 2007).

Dentre os patógenos alimentares em evidência, *Campylobacter* spp. tem sido atualmente apontado como o principal na maioria dos países europeus e nos Estados Unidos (FORSYTHE, 2002). Na Inglaterra, *Campylobacter* spp. foi o microrganismo detectado com maior frequência em infecções intestinais (FORSYTHE, 2002).

### **1.3. *Campylobacter* spp.**

#### 1.3.1. Histórico

Segundo ALTEKRUSE e colaboradores (1999), em 1886 Escherich observou organismos parecidos com *Campylobacter* em amostras de fezes de crianças com diarreia e em 1913, McFaydean e Stockman identificaram *Campylobacter* em tecido fetal de aborto de ovino. JONES et al. (1931) identificaram *C. jejuni* como o agente causal da disenteria invernãl do bovino. KING (1957) descreveu o isolamento de um grupo de microrganismos curvos, móveis e microaerófilos que a autora denominou “relacionados a vibriões” em amostras de sangue de crianças com diarreia aguda. DEKEYSER et al. (1972) isolaram os “relacionados a vibriões” a partir de fezes de pacientes com enterite aguda. Em pouco tempo *Campylobacter* spp. foi estabelecido como um patógeno humano (ALTEKRUSE, et al., 1999).

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

#### 1.3.2. Características de *Campylobacter* spp.

O gênero *Campylobacter* pertence à família *Campylobacteriaceae* e compreendem bactérias delgadas, curvas espiraladas, gram-negativas, medindo 0,2 a 0,9 µm de largura e 0,5 a 5 µm de comprimento. Não formam esporos, e possuem uma motilidade característica em forma de saca-rolha produzida por um flagelo polar em uma ou ambas as extremidades da célula (NACHAMKIN, 2001). São oxidase-positiva e não fermentam nem oxidam carboidratos, sua energia é obtida pela utilização de aminoácidos e intermediários de quatro e seis carbonos do ciclo de

Krebs. Entre as espécies existe grande diversidade genotípica e fenotípica. (KONEMAM, 2001).

As espécies catalase-positivas estão mais associadas às doenças em humanos, entretanto, as espécies catalase-negativas, também podem causar doenças. As temperaturas de crescimento de *Campylobacter* variam entre 25°C e 43°C (STERN et. al., 2001)

*Campylobacter* é microaerófilo, porém algumas espécies podem crescer em anaerobiose e na presença de alguns substratos como nitrato e fumarato, e alguns requerem a presença de hidrogênio. (VARNAM, 1991). São sensíveis à dessecação, a altas condições de oxigênio e baixo pH (NACHAMKIN, 2001).

Essas bactérias podem ser destruídas a 60°C por 10 minutos, são inativadas a 4°C e são sensíveis ao congelamento de alimentos. Porém, através do congelamento rápido, as células sobreviventes podem permanecer viáveis por muitas semanas (FRANCO e LANDGRAF, 2002).

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

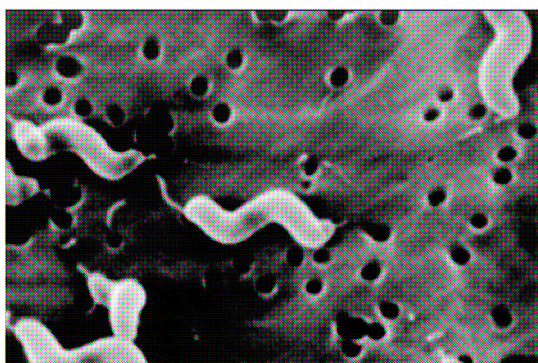


Figura 1 – Microscopia eletrônica de *Campylobacter jejuni*: Aparência de saca-rolha e flagelo bipolar  
Fonte: Altekruise et al. (1999).

### 1.3.3. Taxonomia

Em 1989 o gênero *Campylobacter* possuía 17 nomes oficialmente reconhecidos pelo Comitê Internacional de Bacteriologia Sistemática. (STERN et al., 2001).

Baseado em análises de seqüência de RNA ribossomal 16S, THOMPSON et al., em 1988, dividiram *Campylobacter* em três grupos homólogos, sendo o grupo I dividido em dois sub-grupos: Termofílicos, compreendendo *C.coli*, *C.jejuni*, *C.laridis* (nome proposto *C.lari*) e *C. upsaliensis*; e o sub-grupo clássico *C. fetus*, *C. hyointestinalis*, *C. sputorum*, *C. concisus* e *C. mucosalis*. Grupo II – *C. pylori*, *C. cinaedi* e *C. fennelliae* junto com *Wolinella succinoides*, e Grupo III - *C. cryoaerophila* e *C. nitrofigilis*. (VARNAM e EVANS, 1991).

SKIRROW em 1989 notou que os grupos I e III estavam de acordo com as características fenotípicas do gênero enquanto o grupo II tinha algumas diferenças. Foi proposto então um novo gênero, *Helicobacter*, para *C. pylori*, ficando as demais espécies do grupo II no gênero *Campylobacter*. NORMAN et al em 2001 também afirmaram que *Campylobacter pylori* era uma espécie afastada geneticamente do gênero *Campylobacter*, sendo classificada como *Helicobacter pylori*. (VARNAM e EVANS, 1991).

Em análise de eletroforese de campo pulsado, o tamanho do genoma de *C. jejuni* e *C. coli* foi determinado ser de 1.7 Mb, cerca de um terço do tamanho do genoma da bactéria *Escherichia coli*. Recentemente a seqüência genômica de *C. jejuni* NCTC 11168 foi completada, confirmando o tamanho de 1,642,481 pb (30,6% G+C) (NACHAMKIN, 2001).

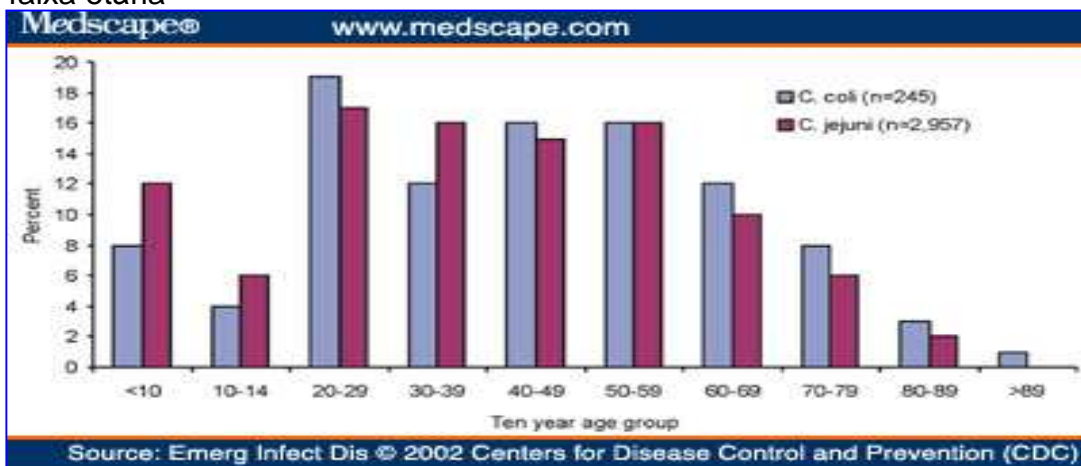
Dados mais recentes apontam para o gênero, 26 espécies e 11 subespécies (EUZEBY, 2008) e ainda HUMPHREY et al. (2007) mencionam dois biovars.

### 1.3.4. Campilobacteriose

A campilobacteriose é caracterizada por enterite causada por espécies de *Campylobacter*. A diarreia aguda com cólica abdominal é a forma mais comum da infecção. Pode ocorrer diarreia sanguinolenta podendo às vezes conter leucócitos e muco. Calafrios e febre também representam uma sintomatologia da doença, vômitos são raros. Pessoas de todas as idades podem ser acometidas pela doença, porém a severidade é maior em jovens, assim como as hospitalizações são mais

comuns nesta faixa etária, conforme gráfico 1 (VARNAM e EVANS, 1991; KONEMAM et al., 2001 e FRANCO e LANDGRAF, 2002).

Gráfico 1. Porcentagem de infecções por *C. jejuni* e *C. coli* de acordo com a faixa etária



Fonte: CDC-2002 (Disponível em: [www.medscape.com/.../13/331364/441364 fig.html](http://www.medscape.com/.../13/331364/441364 fig.html) – acesso em 26/10/2008)

A dose infectante de *C. jejuni* é baixa, podendo uma quantidade menor que 1000 células causar um quadro de campilobacteriose (NACHAMKIN, 2001). A doença tem a duração de 2 a 5 dias podendo alguns indivíduos apresentar sintomas até o décimo dia de infecção. O quadro de campilobacteriose pode simular apendicite, devido às dores abdominais e levar indivíduos a cirurgias desnecessárias (NACHAMKIN, 2001).

Um fator agravante na transmissão da doença é que pacientes convalescentes podem continuar excretando o microrganismo nas fezes durante duas semanas a um mês (KONEMAM et al., 2001).

Dentre as espécies, *C. jejuni* é reconhecida como a principal causa de gastroenterite bacteriana aguda podendo levar a sérias conseqüências, dentre as quais se destacam a Síndrome de Guillain-Barré (SGB), que consiste na desmielinização do material neuronal resultando em paralisia neuromuscular aguda. Estima-se que ocorra um caso de SGB em cada 1000 casos de campilobacteriose. Mais de 40% dos pacientes com SGB têm evidência de infecção recente por *Campylobacter* spp., podendo 5% chegar ao óbito. A Síndrome de Reiter é outra conseqüência decorrente da infecção por essa bactéria, que ocorre em cerca de 1% dos pacientes, 7 a 10 dias após o início da diarreia e se caracteriza por dor nas articulações que pode durar vários meses ou se tornar crônica (ALTEKRUSE et al, 1999).



### 1.3.5. Patogenia

O *C. jejuni* coloniza a porção distal do íleo e cólon do trato intestinal humano. Após a colonização da mucosa e a aderência à superfície das células intestinais o microrganismo altera o mecanismo de absorção das células epiteliais, por ação direta, pela invasão e produção de toxina, ou por ação indireta devido à resposta inflamatória. A produção da enzima catalase favorece a permanência da bactéria dentro da célula do hospedeiro protegendo-a do estresse oxidativo causado pelos lisossomos (FORSYTHE, 2002).

Acredita-se que a patogenicidade de *Campylobacter* spp. seja multifatorial, a produção de toxinas é um desses fatores. *C. jejuni* produz uma enterotoxina termolábil, semelhante à toxina colérica (CT), e citotoxinas (Tabela 1). Após a penetração na mucosa intestinal *C. jejuni* multiplica-se na lâmina própria. (FRANCO e LANDGRAF, 2002).

Tabela 1: Propriedades das toxinas de *Campylobacter*

	Enterotoxina	Citotoxina
Peso Molecular	60 a 70.000	> 30.000
Inativação ao aquecimento	56°C/1hora 96°C/10min	100°C/30min
pH de inativação	pH 4 (parcial) pH 2.8 (total)	Não conhecido Não conhecido
tripsina	Não conhecido	Sensível

Fonte: Varnam e Evans, 1991

### 1.3.6. Epidemiologia

Bactérias do gênero *Campylobacter* são encontradas em aves domésticas, gado, suínos, ovinos, roedores e pássaros. (tabela 2 - anexo 1). Animais domésticos também são reservatórios. São isolados de água, leite, carnes, vegetais e moluscos contaminados (NACHAMKIN, 2001).

Os frangos são as maiores fontes potenciais dessas bactérias. A maioria dos casos esporádicos de infecção por *Campylobacter* é devido à ingestão de alimentos a base de frango mal cozido ou através da contaminação cruzada durante a manipulação de alimentos crus contaminados (FORSYTHE, 2002).

*Campylobacter jejuni*, *C. coli* e *C. lari* colonizam o trato intestinal de animais de sangue quente, contaminando a carne na hora do abate. São identificados como

principais causas de diarreia humana, portanto a presença dessas espécies em alimentos representa um risco potencial para a saúde humana. (STERN et al, 2001). *Campylobacter jejuni* e *C.coli* são as espécies de maior importância como agentes de enfermidades em humanos e estão associadas a quadros esporádicos de diarreia, em decorrência da ingestão de alimentos imprópriamente manipulados ou mal cozidos (NACHAMKIN, 2001).

A incidência nos Estados Unidos é de cerca 2,4 milhões de pessoas infectadas por ano (CDC, 2007). O aumento da incidência deste microrganismo apresenta relevância clínica e econômica. Nos Estados Unidos estima-se um custo de 1,5 a 8,0 bilhões de dólares devido a infecções causadas por *Campylobacter* (FORSYTHE, 2002).

Na Inglaterra a frequência de *Campylobacter* vem aumentando ultimamente e está sobrepondo a de *Salmonella* spp. No Brasil as atenções estão voltadas para *Campylobacter* spp., visto que a ocorrência de gastroenterite aguda e crônica, principalmente em crianças, é evidente (FRANCO e LANDGRAF, 2002).

Alguns países têm desenvolvido projetos que visam estudos da avaliação de risco e meios para a redução de *Campylobacter*. O projeto *Campylobacter* Risk Managment and Assessment (CARMA) desenvolvido pela Holanda integra vários órgãos governamentais e industriais (HAVELAAR, 2005).

### 1.3.7. Surtos

De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) a caracterização de surto é realizada através da ocorrência de dois ou mais casos da doença associada ao consumo de um mesmo alimento, pelos dados epidemiológicos e pela confirmação em laboratório. Entretanto o desenvolvimento dos sintomas da doença pode variar de acordo com o estado de saúde de cada indivíduo (FRANCO e LANDGRAF, 2002).

De 1978 a 1996 o CDC informou 111 surtos de enterite relacionados com *Campylobacter*, afetando 9.913 pessoas nos EUA (CDC, 2007).

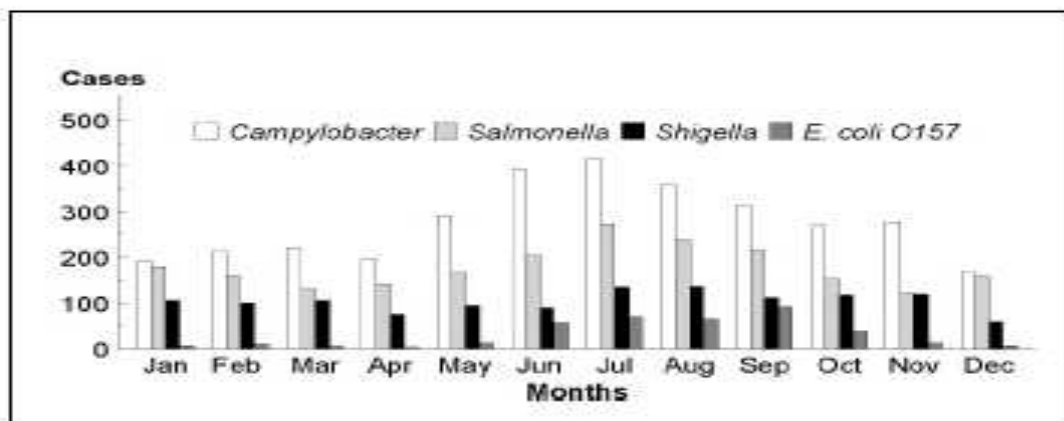
No Reino Unido dos pacientes hospitalizados devido à ingestão de alimentos, 82% foram devido a campilobacteriose (ADAK et al., 2002)

Em 2000 ocorreram aproximadamente 360.000 casos de infecções por *Campylobacter* na Inglaterra e região de Gales. (ADAK et al., 2002)

Na Holanda considera-se que ocorram 80.000 casos por ano (HUMPHREY et al., 2007).

No gráfico 2 observam-se os casos de gastroenterite confirmados em laboratório nos Estados Unidos em 1996, sendo 46% de campylobacteriose, seguido por 28% de salmonelose, 17% de shigelose e 5% de infecções por E. coli 0157 (ALTEKRUSE et al., 1999).

Gráfico 2. Casos de infecções transmitidas por alimentos por mês: CDC/USDA/FDA, 1996.



Fonte: Altekruise et al. 1999.[12]

### 1.3.8. Isolamento

Por ser um microrganismo microaerófilo, o *Campylobacter* é considerado de difícil cultivo. Três fatores são fundamentais para o seu isolamento: o uso de meios seletivos, a incubação em atmosfera de microaerofilia e a temperatura de 42°C no isolamento primário. (KUANA et al., 2008).

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

A maioria dos meios sólidos utiliza entre 5 e 15% de sangue desfibrinado de carneiro ou lisado de cavalo. O sangue lisado é necessário para neutralizar os antagonistas do trimetoprim que é utilizado em muitos meios (CORRY et. al., 1995). O sangue é também utilizado para neutralizar os efeitos tóxicos derivados do oxigênio. O carvão e a hemina também podem ser utilizados a fim de evitar danos nas células pelos componentes tóxicos da fórmula (CORRY et. al., 1995).

A adição de antibióticos (Anexo 3) aos meios de cultura é necessária para inibir a microbiota fecal competidora e favorecer o crescimento de *Campylobacter* (KUANA et al., 2008).

A confirmação do isolado como *Campylobacter* spp. pode ser feita pelo teste de aglutinação em látex, que consiste em um processo reativo contra o antígeno-alvo. Anticorpos contidos nas partículas de látex aglutinam na presença de células microbianas, resultando na formação de grumos visíveis. (ENTIS et. al., 2001)

#### 1.4. Frango

Segundo dados da Associação Brasileira de Produtores e Exportadores de Frango – ABEF o consumo de frango no Brasil vem aumentando a cada ano conforme dados da tabela 3.

Tabela 3. Consumo brasileiro de carne de frango

Ano	kg/hab.	Varição (%)
1989	12.73	-
1990	13.60	6,83
1991	14.96	10
1992	15.74	5,21
1993	17.87	13,53
1994	19.06	6,66
1995	23.21	21,77
1996	22.05	-4,97
1997	23.83	8,07
1998	26.31	10,41
1999	29.14	2,13
2000	29.91	2,64
2001	31.82	6,39
2002	33.81	9,41
2003	33,34	-1,4
2004	33,89	1,65
2005	35,48	4,69
2006	35,68	0,56

ABEF - Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos

Cada brasileiro consome em média 38 quilos de frango por ano. Em 1994, eram 19 quilos por pessoa, segundo a União Brasileira de Avicultura (UBA). Segundo Érico Pozzer, vice-presidente da UBA, o frango conquistou mais espaço no prato por ter preço mais acessível. Isso foi possível pelo aumento da produção com eficiência e novas tecnologias (ZERO HORA, 2008).

O consumo mundial de frango deverá crescer nos próximos anos mais do que a demanda por carne de porco e até a bovina. A principal razão é que a carne de aves vai continuar a ser mais barata, uma vez que os preços recordes das rações

vão elevar ainda mais o preço da carne vermelha acredita Robert Feldman, chefe de pesquisa econômica do Morgan Stanley, em Tóquio (GAZETA MERCANTIL, 2008).

O aumento do consumo se deve também a procura por dietas de baixa caloria. A gordura presente no frango encontra-se na pele e na cavidade abdominal e a facilidade de sua remoção aparece como uma vantagem para obtenção de um produto mais saudável (ICMSF, 2005).

Quando se fala de produção e exportação de frango, o Brasil é um dos países com maior destaque no cenário mundial. Com expectativa de 11 milhões de toneladas para 2008, somos o terceiro maior produtor de carne de frango, atrás apenas de Estados Unidos (16,5 milhões de toneladas) e da China (12,5 milhões), dois dos principais exportadores do produto, respondendo por 45% das exportações mundiais. O sucesso da carne de frango brasileira é tão grande que ela é consumida em mais de 150 países. (NEVES, 2008). Dados da ABEF sobre a produção nacional de frango, mostrados na tabela 4, indicam um aumento progressivo entre os anos de 1989 a 2006.

Tabela 4. Produção brasileira de carne de frango (tonelada)

Ano	Mercado Interno	Exportação	Total
1989	1.811.396	243.891	2.055.287
1990	1.968.069	299.218	2.267.358
1991	2.200.211	321.700	2.521.911
1992	2.350.567	371.719	2.726.992
1993	2.709.500	433.498	3.142.998
1994	2.929.997	481.029	3.411.026
1995	3.616.705	428.988	4.050.449
1996	3.482.767	568.795	4.051.561
1997	3.811.569	649.357	4.460.925
1998	4.262.231	612.477	4.874.708
1999	4.755.492	770.551	5.526.044
2000	5.069.777	906.746	5.976.523
2001	5.486.408	1.249.288	6.735.696
2002	5.917.000	1.599.923	7.516.923
2003	5.920.908	1.922.042	7.842.950
2004	6.069.334	2.424.520	8.493.854
2005	6.535.185	2.761.966	9.297.151
2006	6.622.587	2.712.959	9.335.546

Fonte: ABEF - Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos

Obs.: Não estão computadas as exportações de produtos industrializados

*Campylobacter* spp. são freqüentemente isolados de carne de frango recém-abatido, como também de miúdos como fígado e moela (FRANCO e LANDGRAF, 2002).

Embora os frangos possam excretar  $10^4$  a  $10^8$  células de *Campylobacter* spp. por grama de fezes, eles são portadores assintomáticos. A fonte de contaminação da carne de frango é essencialmente o conteúdo intestinal que pode entrar em contato com a carcaça durante o transporte e no abate (FRANCHIN et al., 2005)

CARVALHO et al. (2002) realizaram um estudo com o objetivo de detectar os principais pontos de risco de contaminação dos frangos por *Campylobacter* durante o abate em um abatedouro industrial no estado de São Paulo. Foram analisadas 291 amostras e *Campylobacter jejuni* foi isolado em oito (26,6%) de 30 amostras de água do tanque de esaldamento, 19 (61,29%) de 31 amostras da água de lavagem das carcaças após evisceração, 21 (42%) de 50 amostras de fezes frescas, 19 (38%) de 50 amostras de fígado, 19 (38%) de 50 amostras de penas colhidas após a depenagem e 18 (36%) de 50 amostras de carcaças colhidas após a evisceração. Os autores apontam como pontos críticos, as etapas de evisceração e depenagem das aves.

### 1.5. Justificativa

A legislação brasileira que determina os padrões microbiológicos para alimentos, Resolução RDC 12 de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), ainda não estabelece critério microbiológico para *Campylobacter* spp.. Dessa forma, poucos são os laboratórios brasileiros envolvidos no controle microbiológico de alimentos que possuem uma metodologia de detecção de *Campylobacter* spp. implantada na sua rotina.

Devido ao amplo consumo de carne de frango e a freqüência com que este produto está exposto à contaminação por *Campylobacter* spp. é urgente a necessidade de se ter uma metodologia eficaz implantada na rotina dos laboratórios de microbiologia de alimentos. Porém, devido às dificuldades de isolamento aliado ao alto custo da metodologia e a ausência de critério microbiológico para *Campylobacter* spp. na legislação brasileira, muitos laboratórios ainda não estão munidos desta preciosa ferramenta.

A missão do INCQS é “contribuir para a promoção e recuperação da saúde e prevenção de doenças, atuando como referência nacional para as questões científicas e tecnológicas relativas ao controle da qualidade de produtos, ambientes e serviços vinculados à Vigilância Sanitária”.

Diante da missão do INCQS, se faz necessário implantar uma metodologia capaz de avaliar a qualidade microbiológica da carne de frango no que se refere à presença de *Campylobacter* spp., a fim de minimizar os riscos a que a população está sujeita ao consumir esse produto, além de alertar a Vigilância Sanitária sobre a disseminação do microrganismo.

A implantação da metodologia para pesquisa de *Campylobacter* spp. em cortes de frango resfriado no Setor de Alimentos de Departamento de Microbiologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde permitirá, em futuro próximo, a implementação de ações de grande impacto para o país. Como por exemplo, a capacitação dos profissionais dos Laboratórios Centrais de Saúde Pública - LACEN para a criação de um sistema de monitoramento neste tipo de produto, ao nível nacional.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Implantar metodologia de pesquisa de *Campylobacter* spp. em amostras de carne resfriada de frango utilizando a técnica recomendada pela “American Public Health Association” (APHA)

### **2.2. Objetivos específicos**

- Pesquisar a presença de *Campylobacter* spp. em dez amostras de sobrecoxas resfriadas de frango pela metodologia a ser implantada,
- Avaliar a ocorrência de *Campylobacter* spp. em relação à origem das amostras: feiras livres, supermercados e abatedouro com inspeção estadual;
- Realizar a pesquisa de *Campylobacter* spp. nas amostras, através da técnica de plaqueamento direto e através do enriquecimento seletivo e avaliar os resultados obtidos.



### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

Foram analisadas dez amostras de sobrecoxas resfriadas de frango, no período de maio a agosto de 2008.

As amostras foram adquiridas no Município do Rio de Janeiro em três tipos de estabelecimentos comerciais: três amostras de um abatedouro com inspeção estadual, três amostras em feiras-livres e quatro amostras em supermercados sendo de diferentes marcas comerciais oferecidas para consumo neste município. Todos os produtos encontravam-se, no momento da coleta, dentro das especificações (temperatura, validade, embalagem, etc.) estabelecidas pela legislação vigente para este tipo de produto Resolução RDC nº 259 de 20/09/2002 (BRASIL, 2002), com exceção das amostras adquiridas em feiras-livres que se encontravam expostas e sem refrigeração no momento da aquisição.

As amostras foram transportadas para o laboratório em caixas isotérmicas com gelo e mantidas em geladeira até o momento da análise.

As análises foram realizadas no Setor de Alimentos do Departamento de Microbiologia do INCQS/FIOCRUZ.

Foi realizada pesquisa de *Campylobacter* spp. de acordo com a metodologia recomendada pelo capítulo 31 do Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods – APHA – 4ª Edition, 2001.

O esquema da metodologia analítica, a formulação dos meios de cultura e reagentes utilizados nesse estudo encontram-se descritos nos anexos 2, 3 e 4, respectivamente.

#### **3.1. Metodologia**

##### **3.1.1. Enxaguadura da amostra**

A superfície externa da embalagem contendo a amostra foi higienizada utilizando gaze embebida em álcool 70%, a embalagem foi aberta com bisturi estéril e a amostra foi transferida para saco plástico estéril. Foi adicionado 100 mL de Água Peptonada Tamponada (APT) (Merck) e a enxaguadura foi realizada de maneira uniforme em toda a superfície da amostra por aproximadamente 1 minuto. O caldo da enxaguadura foi transferido para um erlenmeyer estéril de 250 mL.

### 3.1.2. Plaqueamento direto

O caldo de enxaguadura foi semeado com auxílio de alça bacteriológica em superfície de duas placas de Agar mCCDA (Oxoid) obedecendo a forma “T”(George et al.,1978).

Foram transferidos 0,1 mL do caldo de enxaguadura para a superfície de duas placas de mCCDA e espalhado com alça de Drigalsky.

Foi adicionado 1 mL do caldo de enxaguadura para um tubo contendo 9mL de APT (diluição  $10^{-1}$ ); homogeneizado em agitador tipo “vortex” e transferido 0,1 mL para a superfície de duas placas de mCCDA e espalhado com alça de Drigalsky (diluição  $10^{-2}$ )

### 3.1.3. Enriquecimento seletivo

Foram transferidos 25 mL de caldo Bolton (Oxoid) em dupla concentração para garrafas de vidro temperado com tampa de rosca com capacidade de 100 mL, foi acrescentado 0,5 mL do suplemento para caldo Bolton e 2,5 mL do sangue lisado de cavalo.

Foi transferido 25 mL do caldo de enxaguadura para o caldo Bolton preparado com a tampa levemente afrouxada.

As placas de mCCDA semeadas foram colocadas em posição invertida juntamente com as garrafas contendo o caldo Bolton inoculado em jarra de anaerobiose com o gerador de microaerofilia Anaerocult C (Merck) e fechada imediatamente a seguir. A jarra foi incubada a  $42 \pm 0,2$  °C por  $48 \pm 2$  horas.

### 3.1.4. Plaqueamento após enriquecimento seletivo

Após o período de incubação, sem homogeneizar o caldo Bolton uma alça bacteriológica foi introduzida até 1/3 de profundidade, sendo semeada em superfície de ágar mCCDA, obedecendo a forma “T”.

As placas foram colocadas em posição invertida em jarra de anaerobiose com o gerador de microaerofilia (Merck) e fechada imediatamente. A jarra foi incubada a  $42 \pm 0,2$  °C por  $48 \pm 2$  horas.

Foi realizado o controle dos meios de cultura empregado utilizando os microrganismos: *Campylobacter jejuni* ATCC33560 (controle positivo) e *Escherichia coli* ATCC 25922 (controle negativo), obtidos da coleção de cultura do INCQS.

### 3.1.5. Seleção das colônias

A morfologia das colônias foi comparada com o crescimento da cepa de referência de *Campylobacter jejuni* semeada.

As colônias de *Campylobacter* apresentam um brilho d'água e geralmente são espariadas. O crescimento com essas características foi considerado suspeito de *Campylobacter* spp.

De cada crescimento suspeito foi preparado esfregaço em lâmina e corado pelo método de Gram utilizando a fucsina como contra-corante. A característica morfotintorial das células foi observada ao microscópio.

As bactérias do Gênero *Campylobacter* aparecem como bastonetes Gram negativos delgados e extremamente pequenos, em forma de vírgula, de "S" ou lembrando asas de gaivotas.

Quando ao microscópio era verificado que o crescimento não estava puro, era repicado com alça bacteriológica em superfície de ágar Columbia (Merck) (Anexo 3) contendo 5% de sangue desfibrinado de carneiro, solução de antibióticos e solução de FBP (anexo 4), obedecendo a forma "T" e incubadas a 42°C por 48 horas em atmosfera de microaerofilia para tentar obter um crescimento puro.

Podem ocorrer modificações na morfologia das células de *Campylobacter* para formas arredondadas, cocóides, estágio que não possibilita o crescimento "in vitro", impedindo sua caracterização definitiva.

Quando isso acontecia, o crescimento era repicado com alça bacteriológica em superfície de ágar Columbia (Merck) (Anexo 3) com 5% de sangue desfibrinado de carneiro e solução de FBP (Anexo 4), obedecendo a forma "T" e incubado a 42°C por 24-48 horas em atmosfera de microaerofilia, na tentativa de reverter as células para a forma original.

Do crescimento em que se confirmou à morfologia celular no Gram, uma alçada foi retirada e repicada, por estriamento, para outra placa de ágar mCCDA, a fim de se obter um maior crescimento. Após a incubação em microaerofilia a 42 °C por 48 horas, foram realizadas as provas da catalase e oxidase.

### 3.1.6. Prova da catalase

Com o auxílio de uma alça bacteriológica foi transferida uma porção do crescimento da cultura para a superfície de uma lâmina de microscópio limpa e seca, foi adicionada ao crescimento uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%.

Foi observada a produção de bolhas de gás (teste positivo), pois bactérias do Gênero *Campylobacter* que apresentam reação positiva para o teste da catalase são as de maior interesse em microbiologia de alimentos.

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

### 3.1.7. Prova da oxidase

Em uma placa de Petri vazia e estéril, foi colocado um pedaço de papel de filtro e com o auxílio de um palito de madeira também estéril foi colocada uma porção do crescimento bacteriano no papel de filtro e adicionadas duas gotas da solução a 1% do reagente oxalato de para-amino-dimetilanilina (MERCK). O aparecimento de uma coloração vermelho intenso em 10 segundos foi considerado positivo. Bactérias do Gênero *Campylobacter* apresentam reação positiva para o teste da oxidase.

As provas acima foram realizadas com as cepas de *Campylobacter jejuni* ATCC33560 (controle positivo) e *Escherichia coli* ATCC 25922 (controle negativo), obtidos da coleção de cultura do INCQS.

### 3.1.8. Teste de Aglutinação em Látex

Do crescimento que confirmou a morfologia celular no Gram e as provas da catalase e oxidase, foi realizado o teste de aglutinação em látex utilizando o kit Dryspot Campylobacter (Oxoid).

Os reagentes foram retirados da geladeira e mantidos em bancada até atingirem a temperatura ambiente (18-25°C).

Foi colocado um tubo 10x75mm em um suporte para tubos e adicionada uma gota do reagente de extração nº 1.

Da placa de ágar Columbia ou de ágar mCCDA reisoladas foi retirado um número de colônias suficiente para preencher o diâmetro interno de uma alça descartável de 5 µL. A alça com o crescimento foi colocada em contato com a gota do reagente nº 1 e homogeneizado cuidadosamente. A alça foi deixada no reagente nº 1 durante três minutos.

Após esse período, foram adicionadas duas gotas do reagente de extração nº 2 ao extrato e misturado com a alça utilizada anteriormente.

Foi colocado uma gota (50 $\mu$ L) do extrato neutralizado no círculo teste e uma gota no círculo controle. Foi utilizada a espátula que vem no kit para misturar o extrato no látex desidratado do círculo controle até ficar completamente suspenso espalhando de forma a cobrir a área da reação. Utilizando a mesma espátula foi repetido o processo no círculo teste.

Foram realizados movimentos giratórios suaves no cartão durante no máximo 3 minutos procurando sinais de aglutinação em condições normais de iluminação.

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

Ao término do teste os cartões de reação foram descartados com segurança em recipiente contendo desinfetante.

O resultado foi considerado positivo nas reações de aglutinação das partículas de látex que ocorreram em até 3 minutos. A ausência de aglutinação neste intervalo indica resultado negativo.

Nota: O resultado é considerado não interpretável quando o reagente controle mostrar sinais de aglutinação, o que indica que a cultura apresenta auto-aglutinação.

Nota: Os isolados confirmados, foram armazenados em agar Brucella semi-sólido durante quinze dias em estufa a 35°C.

## 4. RESULTADOS

As 10 amostras de sobrecoxas resfriadas de frango foram submetidas à análise de acordo com a metodologia a ser implantada (Esquema - Anexo 2).

Os resultados revelaram a presença de *Campylobacter* spp. em sete (70%) das 10 amostras processadas demonstrando que a metodologia selecionada foi capaz de detectar *Campylobacter* spp.

Das amostras utilizadas no estudo, três foram compradas em um mesmo abatedouro com inspeção estadual, três em feiras-livres e quatro em supermercados e foram denominadas como: A, B, C, D, E, F, G, H, I, J (tabela 5).

Tabela 5: Resultado da pesquisa de *Campylobacter* spp. em amostras de corte resfriado de frango de diferentes procedências.

Amostra	Procedência	Resultado
A	Abatedouro	Positivo
B	Feira-livre	Positivo
C	Supermercado	Positivo
D	Abatedouro	Positivo
E	Supermercado	Positivo
F	Supermercado	Negativo
G	Supermercado	Negativo
H	Abatedouro	Positivo
I	Feira-livre	Positivo
J	Feira-livre	Negativo

*Campylobacter* spp. foi isolado em 100% das amostras de abatedouro, em 66,7% das amostras de feiras livres e em 50% das amostras de supermercados.

Os resultados positivos para *Campylobacter* spp. nas sete amostras de sobrecoxas resfriadas de frango, foram obtidos na etapa de plaqueamento direto, que segue a etapa da enxaguadura (Esquema – Anexo 2) e confirmadas no teste da catalase, da oxidase e do Látex.

A semeadura no ágar mCCDA feita a partir do caldo Bolton, revelou um abundante crescimento de microbiota acompanhante que provavelmente se sobrepôs ao crescimento característico de *Campylobacter* spp., dificultando a visualização de colônias típicas e conseqüentemente o isolamento.

A metodologia foi de fácil execução, não oferecendo dificuldade nas diferentes etapas, sendo possível de ser implantada na maioria dos laboratórios de

microbiologia de alimentos, desde que disponha dos insumos necessários e treinamento adequado para o isolamento do patógeno.

## 5. DISCUSSÃO

No presente estudo, foram analisadas dez amostras de sobrecoxas resfriadas de frango, sendo encontradas sete (70%) amostras positivas para *Campylobacter* spp. Este resultado está de acordo com KUANA (2005), que encontrou *Campylobacter* spp. em 81,8% das amostras de 22 lotes de frango de corte analisados. Resultados superiores foram encontrados por FREITAS e NORONHA (2007) que analisaram carnes e miúdos de frango expostos ao consumo em Belém do Pará e das 16 amostras analisadas 93,7% estavam contaminadas por *Campylobacter* spp.

Resultados inferiores foram encontrados por CARVALHO et al. (2002) que analisaram 50 amostras de carcaça de frango após a evisceração em um abatedouro industrial em São Paulo e encontraram 18 (36%) amostras contaminadas por *Campylobacter jejuni*. DIAS et. al. (1990) em Belo Horizonte, analisaram 100 amostras de carcaças de frango (50 de abatedouros industriais e 50 de abatedouros clandestinos) e encontraram 2,0% e 38,3% respectivamente contaminadas por *Campylobacter jejuni*, diferenças que segundo o autor, podem estar associadas às baixas condições de higiene em abatedouros clandestinos. No entanto, FREITAS e NORONHA (2007) não encontraram diferença no isolamento de *Campylobacter* entre amostras oriundas de abate clandestino ou sob inspeção em Belém do Pará.

No presente trabalho, as amostras foram adquiridas em feiras livres, supermercados e abatedouro com inspeção estadual. *Campylobacter* spp. foi isolado em 100% das amostras de abatedouro, em 66,7% das amostras de feiras livres e em 50% das amostras de supermercados.

FRANCHIN et al (2005), avaliaram as fontes de contaminação por *Campylobacter* termofílico em carne de frango antes do abate, em 8 aviários de diferentes produtores da região Sul do Brasil. O microrganismo foi encontrado em 22 dos 24 lotes de aves destinados ao abate (91,7%). Tendo como principais fontes a cloaca, as penas e a cama dos frangos.

Este microrganismo está presente no conteúdo intestinal dos frangos em número elevado e podem resultar em contaminação das carcaças e das plantas de processamentos, oferecendo riscos à saúde do consumidor (CARVALHO et al., 2002).



PEYRAT et. al. (2008) estudaram a recuperação de *Campylobacter* antes e após a limpeza e desinfecção das superfícies de quatro abatedouros na França. Os autores verificaram que *Campylobacter* foi isolado em 73% das superfícies nos abatedouros estudados antes da limpeza e desinfecção, após esse procedimento, foi isolado em 18% das superfícies de três dos quatro abatedouros, mostrando que o microrganismo pode sobreviver ao processo de limpeza e desinfecção e que as superfícies de abatedouros são potenciais fontes de contaminação.

Segundo MYLIUS et al. (2007), infecções de origem alimentar podem ser originadas de produtos contaminados antes da sua aquisição ou que desenvolvem um alto nível de contaminação durante sua estocagem. Além disso, é possível que durante a preparação dos alimentos ocorra contaminação dos utensílios de cozinha tais como: tábuas de carne, facas e vasilhames. Este processo é denominado contaminação cruzada.

A exposição do consumidor ao *Campylobacter* é inevitável se a carne do frango não for manuseada higienicamente, isto é, devido à contaminação cruzada da carne contaminada para alimentos prontos para o consumo, ou pela cocção insuficiente do alimento. (ROSENQUIST et. al ,2006, COX et. al. 2006).

Outra fonte importante de contaminação são os manipuladores de alimentos que podem ser portadores assintomáticos. Uma pesquisa realizada por TOSIN e MACHADO (1995) em Florianópolis-SC revelou que de um total de 177 manipuladores de alimentos de cozinhas hospitalares e institucionais, 6,2% eram portadores assintomáticos de *Campylobacter* e esses funcionários não eram afastados de suas atividades, mesmo apresentando quadro clínico de diarreia. Esse fato caracteriza a falta de conscientização das pessoas encarregadas de cuidarem do bem estar coletivo, especialmente se considerarmos que os alimentos são veículos de doenças quando manipulados por pessoas com pouca ou nenhuma habilidade em práticas higiênicas e, portanto, devem ser tomados cuidados preventivos e de controle sistemático de portadores desse microrganismo, quando na função de manipuladores de alimentos, especialmente em cozinhas hospitalares.

Existe uma ampla variedade de metodologias aprovadas internacionalmente para detecção de *Campylobacter* utilizadas em todo o mundo, incluindo ou não etapas de enriquecimento seletivo, seguidos de inoculação em ágar seletivos (KUANA, 2008). A escolha da metodologia para este estudo foi baseada em sua praticidade em relação às demais.

SCHERER et al. (2006) compararam a preparação da amostra para análise pela enxaguadura e pela pesagem de 25 gramas de coxa de frango e posterior plaqueamento direto e Número Mais Provável (NMP). Eles verificaram que o número de bactérias foi maior na enxaguadura associada ao plaqueamento direto. Concordando com os autores, o preparo da amostra utilizado no presente trabalho foi pela técnica da enxaguadura com Água Peptonada Tamponada (APT) e foi observado que o plaqueamento direto com o ágar mCCDA também recuperou melhor as células de *Campylobacter* do que o enriquecimento seletivo com o Caldo Bolton em dupla concentração.

KUANA et. al. (2008) analisaram 96 carcaças de frango através de inoculação direta (ID) e pelo método de pré-enriquecimento (PE). Foi utilizado o caldo Bolton no pré-enriquecimento, seguido de inoculação em ágar mCCDA, para o isolamento direto foi utilizado o ágar Bolton com cloreto de trifetil tetrazólio (TTC), sempre em microaerofilia. Para confirmação dos isolados foi utilizado o teste de aglutinação em látex. Os resultados de 99% de carcaças positivas para *Campylobacter* pelo PE e de 97,9% pelo ID, não evidenciaram diferenças significativas. Portanto, os autores indicam os dois métodos como eficazes para a identificação de *Campylobacter*. Entretanto, devido à antecipação dos resultados em 24 horas, eles recomendam adotar o método de isolamento direto.

O resultado de 99% no pré-enriquecimento encontrado por KUANA et al. (2008) é muito diferente do encontrado neste estudo em que o caldo Bolton não apresentou resultados satisfatórios para detecção de *Campylobacter* spp., podendo ser devido a utilização de 25 mL do meio em dupla concentração com 25 mL da água de enxaguadura o que resultou em uma quantidade muito grande da microbiota acompanhante, dificultando a visualização de colônias suspeitas de *Campylobacter*. Todos os resultados positivos encontrados foram conseguidos pelo plaqueamento direto, sendo considerado melhor e mais rápido do que o enriquecimento seletivo.

A alta ocorrência de *Campylobacter* encontrada nesse trabalho, apesar do número pequeno de amostras, indica que devem ser tomadas medidas de controle e disseminação desse microrganismo durante as principais etapas de abate e processamento de frango, a fim de minimizar os riscos a que a população está sujeita ao consumir esse produto.

## 6. CONCLUSÕES

- A metodologia selecionada para este estudo foi capaz de detectar *Campylobacter* spp. em sete (70%) das dez amostras de sobrecoxas resfriadas de frango analisadas.
- *Campylobacter* spp. foi isolado em 100% das amostras de abatedouro com inspeção estadual, em 66,7% das amostras de feira livre e em 50% das amostras de supermercado;
- Todos os resultados positivos foram conseguidos pelo plaqueamento direto, sendo considerado melhor e mais rápido do que o enriquecimento seletivo;
- A metodologia em estudo foi de fácil execução, não oferecendo dificuldade nas diferentes etapas, sendo possível de ser implantada na maioria dos laboratórios de microbiologia de alimentos, desde que disponha dos insumos necessários e treinamento adequado para o isolamento do microrganismo,
- A alta ocorrência de *Campylobacter* encontrada nesse trabalho, apesar do número pequeno de amostras, indica que devem ser tomadas medidas de controle e disseminação desse microrganismo durante as principais etapas de abate e processamento de frango, a fim de minimizar os riscos a que a população está sujeita ao consumir esse produto.

## 7. PERSPECTIVAS

Realizar novos estudos com maior número de amostras para verificar a ocorrência de *Campylobacter* spp. em carne de frango resfriado exposta ao consumo humano e identificar as espécies através de PCR utilizando primers específicos.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

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

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

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

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

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

CDC – Centers for Disease Control and Prevention – Department of Health and Human Services. Disponível em <http://www.cdc.gov/ncidod/dbm> . Acesso em: 03/03/2008

CONSUMO de frango vai superar o de carne. **Gazeta Mercantil**, São Paulo, 23 mai. 2008. Disponível em: <http://indexet.gazetamercantil.com.br/arquivo/2008/05/23/92/Consumo-de-frango-vai-superar-o-de-carne.html>. Acesso em 18 nov. 2008.

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

COX, N.A. et al. Natural presence of *Campylobacter* spp. in various internal organs of commercial broiler breeder hens. **Avian Diseases**, v. 50 p., 450-453, 2006.

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

DIAS, T. C.; QUEIROZ, D. M. M.; MENDES, E. N.; PERES, J. N. **Chicken carcasses as a source of *Campylobacter jejuni* in Belo Horizonte, Brazil**. *Rev. Inst. Med. Trop.*, São Paulo, v.32, n.6, p. 414-418, 1990.

DOBRA o consumo de frango. **Zero Hora**, Porto Alegre, 21 jul. 2008. Disponível em <http://zerohora.clicrbs.com.br/zerohora/jsp/default2.jsp?uf=1&local=1&source=a2057818.xml&template=3898.dwt&edition=10308&section=63>. Acesso em 18 nov. 2008.

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

EUZÉBY, J.P.: List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - Genus *Campylobacter*. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/c/campylobacter.html>. Acesso em: 10 dez. 2008.

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

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

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

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

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

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

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

HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 1 ed. Williams & wikins, Baltimore, MD. Vol. 1, 1984.

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

ICMSF. **Microorganisms in foods 6: microbial ecology of food commodities**. 2 ed. New York:Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2005, 763 p.

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

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

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

KUANA, S. L. **Campylobacter na produção e processamento de frangos de corte: prevalência, contagem, fatores de risco e perfil de resistência antimicrobiana**. Porto Alegre: UFRGS, 2005. 93p. il. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre/Rio Grande do Sul.

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

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

MYLIUS, S. D.; NAUTA, M. J.; HAVELLAR, A. H. Cross-Contamination during food preparation: A mechanistic model applied to chicken-borne *Campylobacter*. **Risk Analysis**, v. 27, n. 4, p. 803813, 2007.

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

NEVES, T. Brasil lidera na exportação de frango e é o 3º maior produtor. Avicultura, Portugal, 04 set. 2008. Disponível em: [http://www.avicultura.com.pt/index.php?option=com\\_content&task=view&id=587&Itemid=59](http://www.avicultura.com.pt/index.php?option=com_content&task=view&id=587&Itemid=59). Acesso em: 18 nov. 2008.

PEYRAT, M. B.; SOUMET, C.; MARIS, P.; SANDERS, P. Recovery of *Campylobacter jejuni* from surfaces of poultry slaughterhouses after cleaning and disinfection procedures: Analysis of a potential source of carcass contamination. **International Journal of Food Microbiology**, v.124, n.2, p. 188-194, 2008.

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

SCHERER, K.; BARTELT, E.; SOMMERFELD, C.; HILDEBRANDT, G. Comparison of different sampling techniques and enumeration methods for the isolation and quantification of *Campylobacter* spp. in raw retail chicken legs. **Int. Journal of Food Microbiology**. v.108, p.115-119, 2006.

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

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

TOSIN, I.; MACHADO, R. A. Ocorrência de *Campylobacter* spp. entre manipuladores de alimentos em cozinhas hospitalares de localidade urbana da região Sul do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 29, n. 6, p. 472-477, 1995.

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

## ANEXO 1. TABELA 2

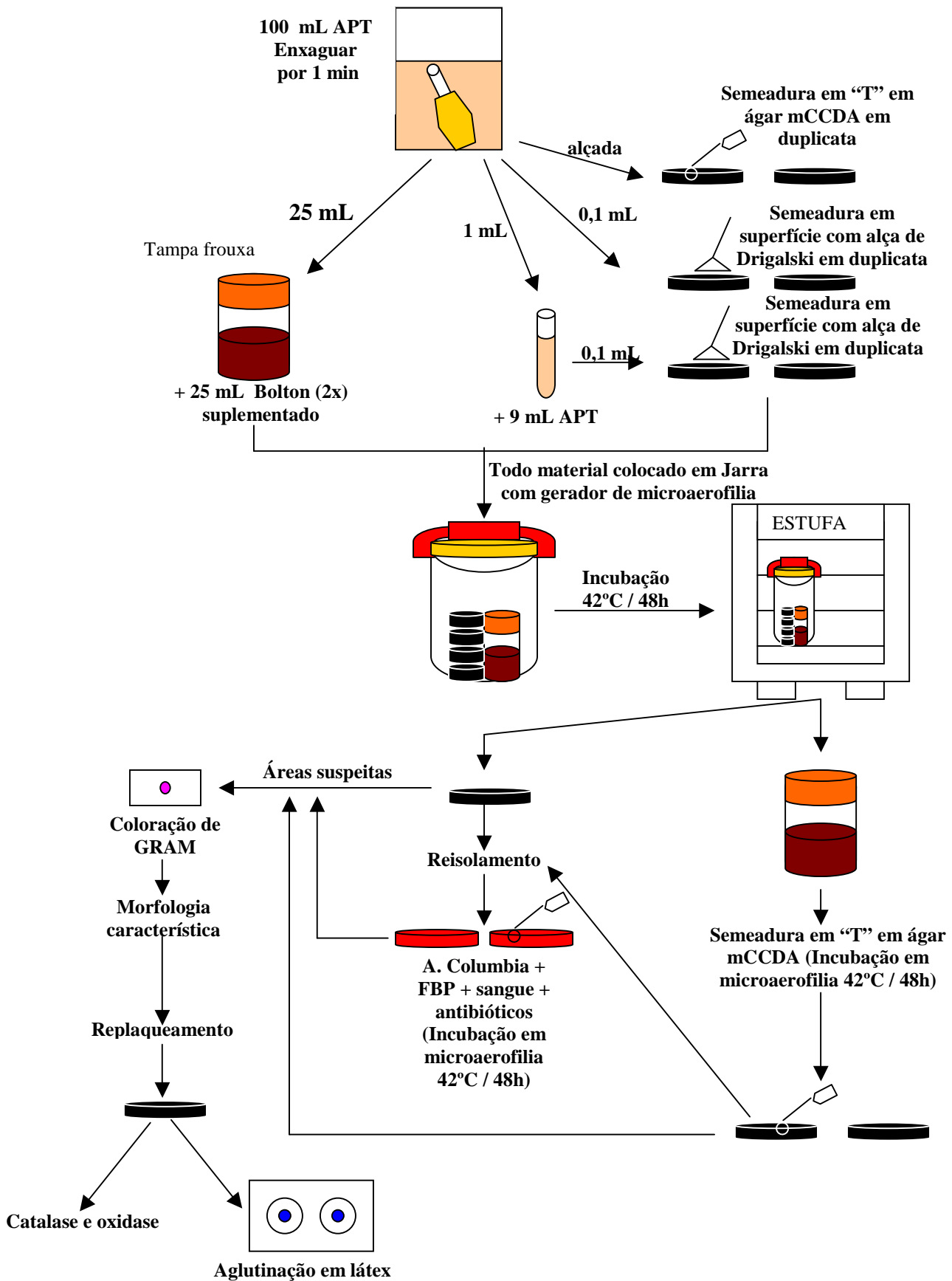
**Tabela 2:** Reservatórios e doenças associadas às espécies de *Campylobacter*

Espécies	Reservatórios	Doenças Homem	Doenças Animais
<i>C. coli</i>	Porco, frango, gado, ovelha, aves	Gastrenterites e septicemia	Gastrenterites
<i>C. concisus</i>	Homem	Doença periodontal e gastrenterites	Nenhuma até o presente
<i>C. curvus</i>	Homem	Doença periodontal e gastrenterites	Nenhuma até o presente
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	Gado e ovelha	Septicemia, gastrenterites, aborto, meningite	Aborto espontâneo em avino e bovinos
<i>C. fetus</i> subsp. <i>veneralis</i>	Gado	Septicemia	Infertilidade bovina
<i>C. gracilis</i>	Homem	Doença periodontal, epiema e abscessos	Nenhuma até o presente
<i>C. helveticus</i>	Cães e gatos	Nada até o presente	Gastrenterites felina e canina
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>hyointestinalis</i>	Porco, gado, hamister e veado	Gastrenterites	Enterite bovina e suína
<i>C. . hyointestinalis</i> subsp. <i>lawsonii</i>	Porco	Nada até o presente	Não conhecido
<i>C. hyolei</i>	Porco	Nada até o presente	Enterite proliferativa em suíno
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	Homem	Gastrenterites, gastritis e septicemia	Nada até o presente
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	Frango. Porco, gado, ovelha, cachorro, gato, água, aves, coelho e insetos	Gastrenterites, septicemia, meningite, aborto, proctites, GBS	Gastrenterites e hepatites aviárias
<i>C. lari</i>	Aves, frango, água, case, gatos, macacos, cavalos,	Septicemia e gastrenterites	Gastrenterites aviárias
<i>C. mucosalis</i>	Porcos	Nada até o presente	Enterite necrótica suína e ileíte
<i>C. rectus</i>	Homem	Doença periodontal	Nada até o presente
<i>C. showae</i>	Homem	Doença periodontal	Nada até o presente
<i>C. sputorum</i> biovar. <i>spu torum</i>	Homem, gado e porcos	Abscessos e gastrenterites	Nada até o presente
<i>C. sputorum</i> biovar. <i>Faecalis</i>	Ovelha e búfalos	Nada até o presente	Nada até o presente
<i>C. upsaliensis</i>	Cães e gatos	Gastrenterites, septicemias e abscessos	Gastrenterites felina e canina
<i>C. insulaenigrae</i>	Foca e golfinho	Nada até o presente	Nada até o presente
<i>C. lanienae</i>	Gado, porcos e humanos	Nada até o presente	Nada até o presente
<i>C. hominis</i>	Humanos	Gastrenterites em imonocomprometidos	Nada até o presente

Fonte: Humphrey, O'Brien, Madsen. International Journal of Food Microbiology 117 (2007)p. 239



## ANEXO 2. ESQUEMA DE ANÁLISE



### ANEXO 3 – MEIOS DE CULTURA

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

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

Peptona -----	10 g
Cloreto de sódio -----	5 g
Fosfato de sódio dibásico -----	3,5 g
Fosfato de potássio monobásico -----	1,5 g
Água destilada -----	1000 mL

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

pH final: 7,2 ± 0,2 a 25°C.

Nota:

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

#### b) – Ágar mCCDA

Caldo Nutriente Nº 2-----	25.0 g
Carvão Bacteriológico-----	4.0 g
Hidrolisado de Caseína-----	3.0 g
Desoxicolato de sódio-----	1.0 g
Sulfato ferroso-----	0.25g
Piruvato de sódio-----	0.25g
Ágar-----	12.0g
Água purificada-----	1000 mL

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

pH final 7,4 ± 0,2 a 25°C.

Suplemento contendo agentes seletivos para mCCDA (SR 155 E) - DIFCO

Cefoperazone-----	16 mg
Anfotericina B-----	5 mg
Água purificada-----	2 mL

Dissolver os agentes seletivos do suplemento na água purificada.

#### Meio final

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

Nota:

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

c) – Columbia Base para Agar sangue

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

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

pH final 7,3 ± 0,2 a 25°C.

d) – Caldo Bolton dupla concentração

Peptona de carne-----	10.0 g
Hidrolisado de Lactalbumina -----	5.0 g
Extrato de levedura-----	5.0 g
Cloreto de sódio-----	5.0 g
Ácido alfa – cetoglutárico-----	1.0 g

Piruvato de sódio-----	0,5 g
Metabissulfito de sódio-----	0,5 g
Carbonato de sódio-----	0,6 g
Hemina-----	0,01 g
Água purificada-----	500 mL

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

pH final: 7,4 ± 0,2 a 25°C.

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

Cefoperazone-----	10 mg
Vancomicina-----	10 mg
Trimethoprin-----	10 mg
Cycloheximide-----	25 mg
Água purificada-----	2,5 mL
Etanol-----	2,5 mL

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

Meio final

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

e) – Meio Brucella semi-sólido

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

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

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

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

## ANEXO 4. SOLUÇÕES E REAGENTES

### a) – Sangue lisado de cavalo

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

### b) – Sangue desfibrinado de carneiro

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

### c) – Solução de FBP

Sulfato ferroso -----	0,5 g
Metabissulfite de sódio-----	0,5 g
Piruvato de sódio-----	0,5 g
Água destilada-----	100 mL

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

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

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

Esterilização por filtração. Manter em freezer ( $-20^{\circ}\text{C}$ ).

e) – Solução de Fucsina Básica a 0,5%

Fucsina Básica-----	0,5 g
Etanol a 95%-----	20 mL
Água purificada q.s.p.-----	100 mL

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

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

Oxalato de para-amino-dimetilanilina <sup>(N/H)</sup> -----	0,5 g
Água destilada/deionizada-----	50 mL

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