

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**Comportamento do *Campylobacter jejuni* em diferentes substratos e comparação entre metodologias convencionais e métodos imunoenzimáticos para sua recuperação.**

**LILIAN STRANGHETTI JORGE**  
**Bióloga**

**PROF. DR. JOSÉ LUIZ PEREIRA**  
**Orientador**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

**CAMPINAS, 2005.**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

J768c Jorge, Lilian Stranghetti  
Comportamento do *Campylobacter jejuni* em diferentes substratos e comparação entre metodologias convencionais e métodos imunoenzimáticos para sua recuperação / Lilian Stranghetti Jorge. – Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: José Luiz Pereira  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. *Campylobacter jejuni*. 2. Microbiologia. 3. Imunoensaio - Método. 4. Metodologia. 5. Leite. I. Pereira, Jose Luiz. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(ckn/fea)

Palavras-chave em inglês (Keywords): *Campylobacter jejuni*, Microbiology, Immunoassay – Method, Methodology, Milk

Área de concentração: Microbiologia

Titulação: Mestre em Ciência de alimentos

Banca examinadora: José Luiz Pereira

Arnaldo Yoshiteru Kuaye

Lúcia Regina Durrant

Data de defesa: 23/02/05

## **Banca Examinadora**

---

Prof. Dr. José Luiz Pereira  
Orientador – DCA – FEA – UNICAMP

---

Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye  
Membro – DTA – FEA – UNICAMP

---

Prof. Dra. Lúcia Regina Durrant  
Membro – DCA – FEA – UNICAMP

---

Dra. Valéria C. A. Junqueira  
Membro – ITAL

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. José Luiz Pereira pela orientação, apoio e profissionalismo;

Aos membros da banca examinadora pelas correções e sugestões;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pelo financiamento do projeto, processo nº. 2002/13319-0;

Ao Conselho Nacional de Pesquisa - CNPq pela concessão da bolsa de estudos durante o mestrado;

À Norma Teruko Miya pelo ensinamento técnico em microbiologia;

Ao Ivano de Filippis chefe do laboratório de Materiais de Referências do INCQS - Fiocruz pela prontidão em enviar a cultura do microrganismo, sem o qual o trabalho não seria realizado;

À minha família pelo apoio, incentivo e amor;

Ao Alexandre pela compreensão, pela ajuda e companhia nos fim de semana de trabalho, pelo imenso carinho e os melhores momentos de descontração;

Às amigas Karen e Liliane pelas sugestões, pelo carinho e amizade e pelos preciosos momentos de descontração;

A todos que acreditaram e colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

**Muito Obrigada!**

## Sumário

Resumo.....	xii
Abstract.....	xiii
1 Introdução.....	1
2 Revisão Bibliográfica.....	2
2.1 História, nomenclatura e taxonomia.....	2
2.2 Características dos microrganismos do gênero <i>Campylobacter</i> .....	4
2.2.1 Morfologia.....	4
2.2.2 Características culturais e bioquímicas.....	5
2.2.3 Resistência aos antibióticos.....	7
2.3 Epidemiologia.....	9
2.3.1 Distribuição nos animais.....	9
2.3.2 Distribuição no ambiente.....	12
2.3.3 Distribuição nos alimentos.....	13
2.3.4 Controle e prevenção nos alimentos.....	17
2.3.5 Modo de transmissão ao homem.....	17
2.3.6 Incidência da Campilobacteriose no Mundo.....	18
2.3.7 Incidência da Campilobacteriose no Brasil.....	22
2.4 Campilobacteriose.....	24
2.5 Métodos de análise em microbiologia.....	27
3 Objetivos.....	29
3.1 Objetivo geral.....	29
3.2 Objetivo específico.....	29
4 Material e Métodos.....	30
4.1 Microrganismo.....	30

4.2 Meios de cultura.....	30
4.2.1 Caldo Brucella.....	30
4.2.2 Brucella suplementado.....	30
4.2.3 Brucella sangue.....	30
4.2.4 Caldo Bolton.....	31
4.2.5 Caldo Bolton suplementado I.....	31
4.2.6 Caldo Bolton suplementado II.....	31
4.2.7 Meio CCDA.....	31
4.2.8 Caldo TCEB.....	31
4.2.9 Meio PCA.....	32
4.2.10 Água Salina Peptonada.....	32
4.2.11 Meio AHB (Abeyta-Hunt-Bark Agar).....	32
4.3 Equipamentos.....	32
4.4 Padronização do Inóculo.....	33
4.5 Inoculação.....	34
4.6 Descrição do experimento.....	34
4.7 Microaerofilia.....	35
4.8 Análises Microbiológicas.....	35
4.8.1 Técnica do número mais provável (NMP) para detecção e enumeração de <i>Campylobacter</i> sp.....	36
4.8.1.1 Fluxograma da Técnica do NMP.....	37
4.8.2 Metodologia para isolamento de <i>Campylobacter</i> sp do BAM preconizada pelo FDA.....	38
4.8.2.1 Fluxograma da metodologia do BAM preconizada pelo FDA para análise em meio de cultura.....	39
4.8.2.2 Fluxograma da metodologia do BAM preconizada pelo FDA para análise em leite C e leite UHT.....	40
4.8.3 <i>Campylobacter</i> Visual Immunoassay – ELISA (TECRA).....	41
4.8.3.1 Fluxograma de realização do kit <i>Campylobacter</i> Visual Immunoassay.....	43
4.8.4 Vidas <i>Campylobacter</i> – ELFA (bioMérieux).....	45

4.8.4.1 Fluxograma de execução do kit Vidas <i>Campylobacter</i> .....	46
4.8.5 Contagem de mesófilos e psicrotrófilos aeróbios totais.....	48
4.8.5.1 Fluxograma para contagem de mesófilos e psicrotrófilos totais.....	49
4.9 Morfologia e Série Bioquímica para identificação.....	50
4.10 Análise estatística dos resultados.....	52
5 Resultados e Discussão.....	54
5.1 Contagem de mesófilos e psicrotrófilos aeróbios totais em leite tipo C e leite tipo UHT.....	54
5.2 Comportamento de <i>Campylobacter jejuni</i> nos diferentes tempos de incubação, concentração de inóculo e substratos utilizados.....	55
5.3 Comparação das metodologias utilizadas.....	64
6 Conclusão.....	72
7 Referências Bibliográficas.....	73
ANEXO A – Resultados das análises de <i>Campylobacter jejuni</i> .....	93
ANEXO B – Tabela utilizada para técnica do Número Mais Provável.....	99
ANEXO C – Estatística.....	100

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b> – Contagem de mesófilos aeróbios totais de leite tipo C.....	54
<b>Tabela 2</b> – Comparação do NMP de <i>C. jejuni</i> nas diferentes marcas utilizadas para leite C e leite UHT.....	56
<b>Tabela 3</b> – Comparação do NMP de <i>C. jejuni</i> nos três diferentes tipos de substratos utilizadas para análise.....	57
<b>Tabela 4</b> – Comparação do NMP de <i>C. jejuni</i> nos três diferentes tipos de substratos, comparados dois a dois.....	58
<b>Tabela 5</b> – Comparação de percentagem do NMP de <i>C. jejuni</i> nas diferentes concentrações de inóculo para cada tipo de substrato utilizado.....	61
<b>Tabela 6</b> – Comparação de percentagem da estimativa do NMP de <i>C. jejuni</i> nos diferentes tempos de incubação utilizados para cada tipo de substrato utilizado.....	63
<b>Tabela 7</b> – Comparação das metodologias ELFA, ELISA e NMP com a metodologia do BAM, no meio de cultura.....	65
<b>Tabela 8</b> – Comparação das metodologias ELFA, ELISA e NMP com a metodologia do BAM, no leite UHT.....	66
<b>Tabela 9</b> – Comparação das metodologias ELFA, ELISA e NMP com a metodologia do BAM, no leite C.....	67
<b>Tabela 10</b> – Comparação das metodologias ELFA, ELISA e NMP com a metodologia do BAM.....	68
<b>Tabela 11</b> – Comparação entre as metodologias imunoenzimáticas ELFA e ELISA, no meio de cultura.....	69
<b>Tabela 12</b> – Comparação entre as metodologias imunoenzimáticas ELFA e ELISA, no leite UHT.....	69
<b>Tabela 13</b> – Comparação entre as metodologias imunoenzimáticas ELFA e ELISA, no leite C.....	69
<b>Tabela 14</b> – Comparação entre as metodologias imunoenzimáticas ELFA e ELISA.....	70



## Lista de Gráficos

- Gráfico 1** – Isolamento de *Campylobacter jejuni* pela técnica do NMP nos diferentes substratos utilizados, na concentração  $1,5 \times 10^3$  após 24 horas de incubação..... 59
- Gráfico 2** – Isolamento de *Campylobacter jejuni* pela técnica do NMP nos diferentes substratos utilizados na concentração  $1,5 \times 10^2$  após 24 horas de incubação..... 59
- Gráfico 3** – Isolamento de *Campylobacter jejuni* pela técnica do NMP nos diferentes substratos utilizados na concentração  $1,5 \times 10^3$  após 48 horas de incubação..... 60
- Gráfico 4** – Isolamento de *Campylobacter jejuni* pela técnica do NMP nos diferentes substratos utilizados na concentração  $1,5 \times 10^2$  após 48 horas de incubação..... 60
- Gráfico 5** – Isolamento de *Campylobacter jejuni* pela técnica do NMP nas diferentes concentrações  $1,5 \times 10^2$  e  $1,5 \times 10^3$ , em leite C, após 24 horas de incubação..... 62
- Gráfico 6** – Isolamento de *Campylobacter jejuni* pela técnica do NMP nos diferentes tempos de incubação (24 e 48 horas), em meio de cultura..... 64

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> – Densimat <sup>®</sup> .....	33
<b>Figura 2</b> – Jarras para microaerofilia.....	35
<b>Figura 3</b> – ELISA tipo sanduíche direto.....	41
<b>Figura 4</b> – Kit <i>Campylobacter</i> Visual Immunoassay – TECRA.....	42
<b>Figura 5</b> – Cartão de cor do kit <i>Campylobacter</i> Visual Immunoassay para leitura dos resultados.....	42
<b>Figura 6</b> – Esquema barrete.....	45
<b>Figura 7</b> – Sistema mini VIDAS.....	46
<b>Figura 8</b> – Esquema ELFA.....	47

## Lista de Quadros

<b>Quadro 1</b> – Resultados das análises em meio de cultura após 24 horas de incubação.....	93
<b>Quadro 2</b> – Resultados das análises em meio de cultura após 48 horas de incubação.....	94
<b>Quadro 3</b> – Resultados das análises em leite tipo UHT após 24 horas de incubação.....	95
<b>Quadro 4</b> – Resultados das análises em leite tipo UHT após 48 horas de incubação.....	96
<b>Quadro 5</b> – Resultados das análises em leite tipo C após 24 horas de incubação.....	97
<b>Quadro 6</b> – Resultados das análises em leite tipo C após 48 horas de incubação.....	98

## Resumo

*Campylobacter* sp, principalmente *C. jejuni* e *C. coli* são reconhecidos mundialmente como agentes causadores de gastroenterites bacteriana, sendo responsáveis em alguns países, por um maior número de casos diarréicos do que, por exemplo, *Salmonella* sp. São microrganismos de natureza zoonótica que requerem condições de microaerofilia para a sua proliferação, sendo geralmente transmitidos por alimentos. O presente estudo teve por objetivos avaliar o comportamento de *Campylobacter jejuni* quando inoculado em diferentes substratos: leite tipo C, leite UHT e meio de cultura Bolton, em diferentes tempos de incubação e comparar metodologias convencionais e métodos que utilizam reações imunoenzimáticas para sua detecção. Para isso foram utilizadas quatro diferentes metodologias: técnica do Número Mais Provável (NMP); metodologia descrita pelo Bacteriological Analytical Manual (BAM) preconizada pelo FDA (Food and Drug Administration); *Campylobacter* Visual Immunoassay (TECRA diagnostic) e Vidas *Campylobacter* (bioMérieux). Os resultados mostraram que ocorre interferência da microbiota natural do leite C no crescimento de *C. jejuni* e que no meio Bolton o isolamento do microrganismo ocorre mais facilmente no período de 24 horas de incubação do que em 48 horas, provavelmente devido à escassez de nutrientes. Além disso, não houve grandes diferenças em relação às quatro metodologias utilizadas, sendo os métodos imunoenzimáticos mais rápidos para informação do resultado final e de fácil manipulação.

**Palavras chaves:** *Campylobacter jejuni*, métodos microbiológicos, imunoensaio.

## Abstract

*Campylobacter* sp, mainly *C. jejuni* and *C. coli*, are worldwide recognized as the most common cause of bacterial gastroenteritis. The rate of *Campylobacter* infections has been increasing, with the number of cases often exceeding those of salmonellosis. These microorganisms are commonly found as commensals in animals, principally birds. They are microaerophilic, very small, Gram negative rods and are transmitted by the consumption of contaminated food and water. The purpose of this study was to evaluate the behavior of *C. jejuni* when inoculated in different substratum as type C pasteurized milk, UHT milk and Bolton Broth (Oxoid), for different times of incubation; and to compare four microbiological methods as the Most Probable Number (MPN), the methodology described by the Bacterial Analytical Manual (BAM), *Campylobacter* Visual Immunoassay (TECRA diagnostic) and Vidas *Campylobacter* (bioMérieux). The results showed that the natural microbiota of type C milk interferes with the proliferation of *C. jejuni*. Besides that, the isolation of this microorganism occurred more easily following 24 hours incubation period than 48 hours, probably due to the shortage of nutrients. Moreover, there were no considerable differences regarding the four methodologies used, but the immunoenzymatic methods are the most efficient ones to deliver the final results and are easier to handle.

**Key Words:** *Campylobacter jejuni*, microbiological methods, immunoassay.

## 1 Introdução

Microrganismos são encontrados em quase todos os nichos do Planeta e nosso suprimento alimentar não é exceção. Alimentos são facilmente contaminados por microrganismos na natureza e ao longo da cadeia alimentar, manipulação e processamento. Após ter sido contaminado, o alimento serve como substrato para o crescimento de microrganismos. Se houver condições próprias de crescimento podem até mudar as características físico-químicas dos alimentos causando a sua deterioração e por vezes podem também ser responsáveis por intoxicações e infecções alimentares (PELCZAR, 1996).

O conhecimento cada vez mais amplo sobre a transmissão de doenças através dos alimentos tem determinado que um número cada vez maior de países considere a necessidade de submeter esses produtos a certas provas ou estudos destinados a avaliar a sua inocuidade e qualidade (ICMSF, 1984).

Embora as estatísticas brasileiras sejam precárias em relação às notificações da incidência de enfermidades microbianas de origem alimentar, acredita-se que estas sejam bastante elevadas (FRANCO e LANDGRAF, 2003). O mesmo raciocínio aplica-se aos microrganismos do gênero *Campylobacter*, não só devido à ausência de relatos no Brasil e em países em desenvolvimento talvez por não haver programas nacionais de vigilância e notificação obrigatória da campilobacteriose, bem como pela falta de rotina nos laboratórios de análise para detecção e isolamento de *Campylobacter* sp, uma vez que nem mesmo a legislação brasileira menciona a necessidade desta informação.

Paralelamente, nota-se a necessidade de aperfeiçoamento e desenvolvimento de técnicas eficientes e rápidas na detecção e isolamento de microrganismos, inclusive para *Campylobacter*.

## 2 Revisão Bibliográfica

### 2.1 História, nomenclatura e taxonomia

A primeira descrição de bactérias do gênero *Campylobacter* ocorreu em 1886, quando Escherich verificou a presença desses microrganismos em fezes de crianças com enfermidades diarréicas (ALTERKRUSE et al., 1999; PARK, 2002; FROST, 2001; AFSSA, 2004). Em 1913, Mc Fadigan e Stockman demonstraram a presença de microrganismos vibríóides microaerófilos em fetos de ovelhas abortados (KARMALI e SKIRROW apud BUTZLER, 1984; AFSSA, 2004).

Alguns anos mais tarde, Smith e Taylor, ao investigarem aborto infeccioso em bovinos, isolaram, o que parecia ser a mesma bactéria e propuseram o nome “*Vibrio fetus*” (KARMALI e SKIRROW apud BUTZLER, 1984; AFSSA, 2004). Jones, Orcutt e Little, em 1931, isolaram de fezes de bezerros com diarreia, uma bactéria também vibríóide, até então desconhecida, mas muito semelhante ao “*Vibrio fetus*” que recebeu o nome de “*Vibrio jejuni*”. Em 1944, Doyle isolou víbrios microaerófilos relacionados a diarreias em suínos e nomeou-os de “*Vibrio coli*” (KARMALI e SKIRROW apud BUTZLER, 1984; AFSSA, 2004), já em 1957, King descreveu víbrios semelhantes aos encontrados anteriormente e relacionou-os então aos víbrios (“related vibrios”) (KARMALI e SKIRROW apud BUTZLER, 1984). Esses microrganismos foram classificados como *Vibrio* por apresentarem morfologia e mobilidade semelhantes às bactérias desse gênero.

Em 1946, Levy descreveu um surto da doença causada por esses microrganismos, ocorrido na cidade de Illinois em maio de 1938, associado ao consumo de leite cru, envolvendo 355 pessoas e “*Vibrio jejuni*” pôde ser isolado e identificado a partir do sangue dos pacientes. Esse é hoje reconhecido como o primeiro relato de infecções por *Campylobacter* em humanos (BUTZLER, 2004). Em 1947, “*Vibrio fetus*” foi também isolado do sangue de mulheres grávidas com

febre sem motivo aparente e que, após quatro semanas, abortaram naturalmente (KARMALI e SKIRROW apud BUTZLER, 1984).

Somente em 1963, Sebald e Véron definiram o gênero *Campylobacter* (do grego *campylo* = curvo e *bacter* = bastão) para incluir esses microrganismos originalmente classificados no gênero *Vibrio*, mas que possuíam características diferentes e marcantes como microaerofilia para crescimento, não oxidação nem fermentação de carboidratos e por apresentarem uma relação das bases G + C em percentual molar de 30 a 38 mols% em seu DNA (VANDAMME e DE LEY, 1991; AFSSA, 2004).

Com o desenvolvimento de novos métodos de isolamento e meios seletivos durante a década de 70, começaram a ser diagnosticados os primeiros casos da doença diarreica transmitida pelos campilobacteres em humanos (KETLEY, 1997; FROST, 2001; AFSSA, 2004). Até 1972 somente 12 casos de infecções causadas por “related vibrios” eram conhecidos: sete bebês, duas crianças e três adultos (KARMALI e SKIRROW apud BUTZLER, 1984).

Em 1991, foi proposto por VANDAMME e DE LEY (1991) uma nova família, denominada *Campylobacteriaceae*, para incluir os microrganismos dos gêneros *Campylobacter* e *Arcobacter*, que antes faziam parte da família *Spirillaceae* (SMIBERT apud BUCHANAN e GIBBONS, 1974). Atualmente são descritas 13 espécies de *Campylobacter*, sendo que duas delas possuem duas subespécies cada e uma espécie possui três biovars, como relatado a seguir (HOLT et al., 2000).

*Campylobacter cinaedi*

*Campylobacter coli*

*Campylobacter concisus*

*Campylobacter cryaerophila*

*Campylobacter fennelliae*



*Campylobacter fetus* subsp. *fetus*  
*Campylobacter fetus* subsp. *Venerealis*  
*Campylobacter hyointestinalis*  
*Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni*  
*Campylobacter jejuni* subsp. *doylei*  
*Campylobacter lari*  
*Campylobacter mucosalis*  
*Campylobacter nitrofrigillis*  
*Campylobacter sputorum* biovar *bubulus*  
*Campylobacter sputorum* biovar *fecalis*  
*Campylobacter sputorum* biovar *sputorum*  
*Campylobacter upsaliensis*

## **2.2 Características dos microrganismos do gênero *Campylobacter***

### **2.2.1 Morfologia**

Os campilobacteres são bastonetes pequenos, curvos ou espiralados, muito finos, possuindo 0,2 a 0,5 µm de largura por 0,5 a 5 µm de comprimento, podendo se apresentar sob formas espirais filamentosas longas de até 8 µm de comprimento. Aparecem na forma da letra S, lembrando vírgulas e asas de gaivotas quando duas células formam uma pequena corrente. São bactérias não esporuladas, Gram negativas, que apresentam mobilidade em forma de saca-rolha ou vaivém devido à flagelação monopolar ou bipolar monotríquia, ou seja, apresentam um flagelo em uma ou ambas as extremidades da célula (KETLEY, 1997; HOLT et al., 2000; FRANCO e LANDGRAF, 2003).

A morfologia celular de algumas espécies do gênero, como *C. jejuni* e *C. coli*, quando em condições desfavoráveis ao crescimento, apresentam variação de sua característica vibrióide para uma forma cocóide (BEUMER et al., 1992;

BOVILL e MACKEY, 1997; JONES, 2001). Essa transição ocorre normalmente na fase estacionária do crescimento e com maior rapidez em condições de aerobiose ou anaerobiose (BOVILL e MACKEY, 1997). Durante a conversão para uma morfologia cocóide, as células de *Campylobacter* não são detectáveis por metodologias convencionais, uma vez que são incapazes de se multiplicarem nos meios de cultura normalmente utilizados (BOVILL e MACKEY, 1997; THOLOZAN et al., 1999; JONES, 2001).

A existência dessa forma viável, mas não cultivável (VNC), pode explicar o porquê das infecções ocorrerem sem que haja a detecção da fonte de contaminação (BOVILL e MACKEY, 1997). JONES et al. (1991) demonstraram que células de *Campylobacter jejuni* em estado viável, mas não cultivável (cocóide) foram capazes de infectar camundongos.

Em meio sólido, os campilobacteres apresentam colônias pequenas com no máximo 4-5 mm de diâmetro, redondas, lisas, convexas, brilhantes e translúcidas. Geralmente, possuem bordas perfeitas, são incolores ou acinzentadas. Podem apresentar bordas irregulares e espalhadas (HUNT et al., 2002; ICMSF, 1996).

### **2.2.2 Características culturais e bioquímicas**

Os microrganismos do gênero *Campylobacter* são microaerófilos, necessitando de baixa tensão de oxigênio para sua multiplicação. As concentrações de oxigênio e de dióxido de carbono necessárias podem variar de 3 a 15% e 2 a 10% respectivamente, sendo 5% a concentração ideal de oxigênio (ICMSF, 1996; FORSYTHE, 2002; HOLT et al., 2000; VLIET e KETLEY, 2001; FRANCO e LANDGRAF, 2003).

A adição de sulfato ferroso, metabissulfito de sódio e piruvato de sódio (FBP) ao meio de cultura pode facilitar o crescimento de *Campylobacter* catalase

positiva, em concentração de 15 a 21% de oxigênio. Esses suplementos atuam destruindo ânions superóxidos e o peróxido de hidrogênio, que inibem o crescimento de campilobacteres. Do mesmo modo, meios de cultura contendo sangue também aumentam a aerotolerância dessas bactérias devido às enzimas catalase e superóxido dismutase presentes no sangue (SMIBERT apud KRIEG, 1984; ALMEIDA, 1984). Algumas espécies podem crescer em condições de anaerobiose quando adicionado ao meio de cultura sais de ácido fumárico ou fórmico e em atmosfera de H<sub>2</sub>. Há também o exemplo de uma espécie fixadora de nitrogênio, o *C. nitrofigillis* (HOLT et al., 2000).

Os campilobacteres são organismos quimiorganotróficos, com metabolismo essencialmente respiratório que não fermentam nem oxidam carboidratos e também não apresentam atividade metabólica sobre lipídeos. Utilizam aminoácidos ou componentes intermediários do ciclo do ácido tricabóxico para obtenção de energia (HOLT et al., 2000; FRANCO e LANDGRAF, 2003). São catalase e oxidase positivas, reduzem nitrato a nitrito, mas, não hidrolisam a uréia e a gelatina e nem produzem pigmentos (HOLT et al., 2000). Quando cultivados em ágar sangue não apresentam produção de hemolisinas (APHA, 2001).

Os microrganismos do gênero *Campylobacter* são considerados mesófilos, ou seja, crescem em temperaturas que podem variar de 5° a 47°C, obtendo um crescimento ótimo na faixa de 30° a 45°C (FORSYTHE, 2002). Algumas espécies, como exemplo, *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari*, são consideradas termófilas por apresentarem temperatura ótima de crescimento na faixa de 42-43°C, não crescendo abaixo de 25°C (ICMSF, 1996; FORSYTHE, 2002, HOLT et al., 200; FRANCO e LANDGRAF, 2003; PARK, 2002).

Essas bactérias são bastante sensíveis ao congelamento e às altas temperaturas, sendo facilmente destruídas por pasteurização e cocção adequada dos alimentos, apresentando um valor D<sub>55°C</sub> de 0,7 a 1 minuto. Não são capazes de se multiplicarem, mas sobrevivem melhor à temperatura de refrigeração (0-10°C)

do que em temperaturas pouco mais altas (PARK et al., 1991; ICMSF, 1996; PARK, 2002; FORSYTHE, 2002; FRANCO e LANDGRAF, 2003; AFSSA, 2004).

A atividade de água necessária para o crescimento de *Campylobacter* é de 0,99 (FORSYTHE, 2002), sendo possível um crescimento acima de 0,97. São extremamente sensíveis à desidratação e ao sal (PARK et al., 1991; ICMSF, 1996, FORSYTHE, 2002; FRANCO e LANDGRAF, 2003). Podem crescer na ausência de NaCl e apresentam um melhor desenvolvimento na presença de 0,5% desse sal, sendo que algumas espécies conseguem crescer na concentração de até 2% de NaCl (AFSSA, 2004). Quanto ao pH, os campilobacteres possuem melhor crescimento entre 6,5 a 7,5, sendo possível o crescimento em valores de pH que variam de 4,9 a 9,5 (FORSYTE, 2002).

O cloro utilizado no tratamento de água ou em soluções empregadas na lavagem de carcaças possui uma ação antimicrobiana frente ao *C. jejuni*, observando-se que a exposição de uma suspensão contendo entre  $10^6$  a  $10^7$  UFC/mL durante um minuto em solução contendo 5 ppm de cloro foi suficiente para total inativação, observando-se o mesmo efeito com 2,5 ppm por 30 minutos (DOYLE apud BUTZLER, 1984).

### **2.2.3 Resistência aos antibióticos**

Apesar de a campilobacteriose ser uma doença autolimitante, alguns antibióticos são administrados nos casos em que os sintomas perduram por mais de uma semana; em pacientes imunodeprimidos e em casos de septicemia. Geralmente são utilizados ciprofloxacina (fluoroquinolona), ácido nalidíxico (quinolona) e eritromicina (macrolídeo) (ALTERKRUSE et al., 1999; GUPTA et al., 2004; ENGBERG et al., 2004).

Estudos mostram que as cepas de *Campylobacter* sp estão se tornando resistentes a esses antibióticos, principalmente aos do grupo fluoroquinolona, devido ao uso freqüente na medicina humana e veterinária e também na produção de rações para animais. Pessoas infectadas com cepas resistentes podem apresentar os sintomas prolongados da doença e dificultar o tratamento em casos de bacteriemia o que leva esses pacientes a necessitarem mais freqüentemente de hospitalização (ALTERKRUSE et al., 1999; GUPTA et al., 2004; ENGBERG et al., 2004; WHO, 2002).

Na França observou-se que a resistência aos antibióticos ácido nalidíxico, ciprofloxacina e eritromicina dentre os campilobacteres isolados aumentou de 5% em 1988 para 25% em 2000 (AFSSA, 2002). Dados referentes aos EUA demonstraram que a resistência à ciprofloxacina passou de 13% em 1997 a 19% em 2001 (GUPTA et al., 2004). Na Nigéria, em 1984, 82% das cepas de *Campylobacter* sp eram sensíveis à eritromicina, sendo que após dez anos apenas 20,8% o são (COKER e ADEFESO apud COKER et al., 2002). Na Tailândia a resistência à ciprofloxacina entre os campilobacteres teve um aumento de zero antes de 1991 para 84% em 1995 (HOGE et al., 1998) e na Áustria a resistência à ciprofloxacina aumentou de zero em 1988 para 34,1% em 1997 (HEIN et al., 2003).

Já na Austrália, onde o uso de fluoroquinolona na produção de ração para animais é proibido, a incidência de campilobacteres resistentes a esses antibióticos é extremamente baixa (UNICOMB et al., 2003).

Segundo FERNANDEZ et al. (2000) no Chile foram testadas 108 cepas de campilobacteres quanto à resistência aos antibióticos eritromicina, tetraciclina, gentamicina, ciprofloxacina, ampicilina e aztreonama e verificaram que 6,5% apresentavam resistência à ampicilina; 1,8% à tetraciclina; 100% à aztreonama e nenhuma cepa foi resistentes aos demais antibióticos. Na Itália, PEZZOTTI et al.

(2003) verificaram a alta taxa de cepas de *C. coli* isoladas de humanos, bovinos e carne de aves, resistentes à eritromicina, à enrofloxacina e ciprofloxacina.

No Brasil, AQUINO et al. (2002) estudaram a resistência aos antibióticos em 44 cepas de *Campylobacter* sp (*C. jejuni* e *C. coli*) isoladas de humanos e animais e verificaram que 13,6% apresentavam resistência à tetraciclina; 18,2% à ampicilina; 18,2% à eritromicina; 18,2% à ciprofloxacina; 25% à norfloxacina e 56,8% à sulfonamida.

Alguns autores sugerem a utilização de antibióticos do grupo dos macrolídeos, como eritromicina e azitromicina ao invés de fluoroquinolonas, por serem novas drogas, mais eficazes contra enfermidades causadas por *Campylobacter* sp (GUPTA et al., 2004).

## **2.3 Epidemiologia**

A epidemiologia do *Campylobacter* é extremamente complexa, uma vez que esses microrganismos são amplamente distribuídos no ambiente e na cadeia alimentar (FERNADEZ apud TRABULSI et al., 2002; FROST, 2001). Os microrganismos pertencentes a esse gênero são encontrados em órgãos reprodutores, trato gastrointestinal e cavidade oral de humanos e animais (HOLT et al., 2000).

### **2.3.1 Distribuição nos animais**

*Campylobacter jejuni* e *C. coli*, as principais espécies causadoras de gastroenterite em humanos, são microrganismos comensais do trato gastrointestinal de uma grande variedade de animais de sangue quente, sendo isolados de bovinos, suínos, gatos, cães, roedores e principalmente aves

(BUTZLER e OOSTEROM, 1991; FRANCO e LANDGRAF, 2003). Na maioria dos casos, esses animais atuam como hospedeiros sem apresentar sintomas das enfermidades (PARK et al., 1991; YANG et al., 2003).

Os microrganismos do gênero *Campylobacter* foram isolados de animais domésticos ou selvagens, sadios como relatado por TRESIERRA-AYALA e FERNANDEZ (1997) que analisaram 100 macacos domesticados e 100 selvagens no Peru, na cidade de Iquitos, onde o consumo da carne desses animais é freqüente, isolando *C. jejuni* e *C. coli* em 31,9% e 20,9% das amostras, respectivamente. Na mesma região, *Campylobacter* sp foi isolado em 54% dos 100 frangos domésticos e em 35% dos 100 frangos criados em confinamento analisados por TRESIERRA-AYALA et al. (1995), sendo *C. jejuni* a espécie mais frequentemente isolada.

TRESIERRA-AYALA e BENDAYAN (1998) determinaram a freqüência de *Campylobacter* sp em Psittaciformes silvestres capturados na região amazônica do Peru que são geralmente tratadas como animais de estimação por famílias dessa região. Campilobacteres foram isolados em 7% dos 142 animais estudados, sendo *C. jejuni* subsp. *jejuni* o mais freqüentemente isolado.

Estudos realizados na região do sul do Chile, de 392 diferentes espécies de aves selvagens, analisadas quanto à presença de *Campylobacter* sp, 24,2% foram positivas, sendo *C. jejuni* subsp. *jejuni* mais freqüentemente isolado seguido por *C. coli* e *C. lari* (FERNANDEZ et al., 1996). Ainda na mesma região, 300 frangos foram estudados e a presença de *Campylobacter* sp foi verificada em 25,7%, sendo a maioria *C. jejuni* (FERNANDEZ e TORRES, 2000).

*Campylobacter* sp foi isolado em 14,4% de 97 frangos de fazendas comerciais da cidade de Accra, em Ghana (SACKEY et al., 2001). Foi demonstrado na Dinamarca por HALD et al. (2004) que insetos transportavam o microrganismo para a área de confinamento de aves através do sistema de

ventilação, provocando assim uma alta disseminação do microrganismo entre os animais. PEZZOTTI et al. (2003) examinaram, na Itália, bovinos, suínos e aves antes do abate e constataram a presença de campilobacteres termófilos em 53,9% dos 89 bovinos; 63,5% dos 104 suínos e em 82,9% das 158 aves estudadas.

Por outro lado há relatos de doenças em animais como, por exemplo, abortos em bovinos e ovelhas causados por *C. fetus* subsp. *venerealis* e *C. fetus* subsp. *fetus*, respectivamente; e mastite bovina causada por *Campylobacter* sp entre outros agentes (LANGONI, 1997; PARK et al., 1991; MADIGAN et al., 1997).

A campilobacteriose genital bovina, causada pelo *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* é responsável por prejuízos econômicos na bovinocultura por causar morte embrionária e esterilidade das fêmeas. STYNEM et al. (2003) estudaram a frequência de infecção por *C. fetus* em rebanhos leiteiros com problemas reprodutivos, na região de Varginha – MG e encontraram 25,5% dos animais infectados.

Nas décadas de 50 e 60, *C. jejuni* foi considerado o causador de hepatites em aves com oito semanas de idade, na América do Norte e Europa, o que ocasionava 35% de redução na produção de ovos e 10-15% de mortalidade (CORRY e ATABAY, 2001).

Os campilobacteres podem também causar enfermidades diarreicas em animais. MODOLO et al. (1999) estudaram em São Paulo a incidência de campilobacteres em suínos com e sem diarreia, sendo esses microrganismos isolados em 43% dos 100 animais diarreicos e 34% dos 100 animais sadios analisados, sugerindo a influência dessa bactéria no processo diarreico.



### 2.3.2 Distribuição no ambiente

Os campilobacteres não se multiplicam com facilidade fora do organismo hospedeiro e são muito sensíveis às condições ambientais como temperatura, concentração de oxigênio na atmosfera, radiação ultravioleta e desidratação (AFSSA, 2004).

Como uma estratégia de sobrevivência, esses microrganismos multiplicam-se numerosamente e são eliminados nas fezes dos animais, o que favorece a sobrevivência no meio ambiente e facilitaria a infecção de outros hospedeiros (JONES, 2001). Assim, a contaminação ambiental torna-se inevitável e a presença de campilobacteres no meio ambiente pode ser considerada um sinal de recente contaminação fecal, sendo encontrado nos despejos de esgotos as maiores fontes (PARK et al., 1991; JONES, 2001). É necessário ressaltar que o tratamento adequado de esgotos reduz de 88 a 99% o número desses microrganismos (JONES, 2001).

Esses microrganismos podem estar presentes em rios, lagos, reservatórios, lençóis freáticos e na água de abastecimento da população (JONES, 2001; ICMSF, 1996), podendo sobreviver por tempo mais prolongado quando em temperaturas mais baixas (ICMSF, 1996; SKIRROW, 1991), como demonstrado por LAURIA-FILGUEIRAS e HOFER (1998) durante estudo realizado em plantas de tratamento de esgoto na cidade do Rio de Janeiro que mostrou uma incidência do microrganismo em 43,4% de 390 amostras coletadas. No Reino Unido, em Reading, FRICKER e PARK (1989) analisaram 345 amostras de água de rios e 436 amostras de despejos de esgotos e encontraram, respectivamente, 30,4% e 96,6% dessas contaminadas por *Campylobacter sp.* Na China, YANG et al. (2003) encontraram uma taxa de 13,7% de positividade para *Campylobacter jejuni* em 300 amostras de água de superfície e lençóis freáticos.

SCHONBERG-NORIO et al. (2004) mostraram que banhar-se em águas de fontes naturais pode ser uma das causas de infecção por *Campylobacter* sp, devido à presença dessas bactérias nessas águas e a baixa dose infecciosa necessária para que ocorra a enfermidade. Campilobacteres foram também isolados em 45% das 182 amostras de areia de praia coletadas em diferentes locais do Reino Unido (BOLTON et al., 1999).

### **2.3.3 Distribuição nos alimentos**

Devido à presença dos campilobacteres e outros microrganismos no trato gastrointestinal dos animais, a carcaça e seus produtos são facilmente contaminados durante o abate (KETLEY, 1997). No caso das aves, principal fonte de transmissão da doença ao homem, a depenação e a evisceração são as operações em que ocorre maior aumento da contaminação. A higienização dos locais de abate e a manipulação é sem dúvida o fator mais importante no controle da contaminação da carne fresca (SILVA, 1998), segundo BUTZLER e OOSTEROM (1991) *C. jejuni* é encontrado em 50-80% das carnes de frango e derivados.

Estudos realizados em diversos países demonstram a taxa de isolamento do microrganismo em amostras de carnes de diferentes tipos animais como relatado por ZANETTI et al. (1996) que, na Itália, isolaram *Campylobacter* sp em 37,5% das 32 amostras de carnes de frango estudadas; 20% das 30 amostras de carnes de Peru; 3,7% de 27 amostras de carne de Porco e 2,4% de 41 amostras de lingüiças de carne de porco. Também na Itália, PEZZOTTI et al. (2003) isolaram campilobacteres termófilos em 1,3% das 151 amostras de carne vermelha; 10,3% das 175 amostras de carne de porco e 81,3% das 155 amostras de carnes de frangos.

Na Espanha, 198 amostras de carne de frango foram estudadas, sendo a presença de *Campylobacter* encontrada em 49,5% dessas (DOMINGUEZ et al., 2002). Na Inglaterra, JORGENSEN et al. (2002) analisaram 101 amostras de carnes de frango, e obtiveram em 92% a presença de *Campylobacter* sp. Um estudo realizado por FRICKER e PARK (1989) em Reading, Reino Unido, verificou a presença de *Campylobacter* sp em 55,5% das 728 amostras de carnes de frango, 47% das 689 vísceras, 23,6% das 127 carnes bovinas, 18,4% das 158 carnes de porco, 15,5% das 103 carnes de cordeiro, 14,6% das 89 amostras de furtos do mar e 2,3% das 86 carnes cozidas analisadas.

Um estudo realizado no Texas (EUA) encontrou 85% das amostras de fígado de frango e 89% das amostras de moela de frango, analisados logo após a evisceração, contaminados por *C. jejuni* (*C. fetus* subsp. *jejuni*), sendo que 52% e 48% destas, respectivamente, apresentaram número mais provável (NMP) acima de 1.100 por g. Foram analisadas também cinco amostras de moela de frango congelada, sendo que em apenas uma foi encontrado o microrganismo com NMP de 5 por g e uma amostra de moela de Peru, das 86 analisadas apresentou contaminação por *C. jejuni* na proporção de 9 NMP/g (CHRISTOPHER et al., 1982).

Na China, YANG et al. (2003) estudaram amostras de peito, asa, coração, coxa e moela de frangos, encontrando em 30,7% de 300 amostras a presença de *C. jejuni*. No Chile, FERNANDEZ e PISÓN (1996) encontraram 92,2% carnes congeladas de frango das 126 amostras analisadas, vendidas em supermercados, contaminadas por *Campylobacter* sp, sendo *C. coli* (78,6%) a espécie mais freqüentemente isoladas.

No Brasil, ALMEIDA (1984) analisou 120 carcaças frescas de animais de abate, sendo 40 de frangos, 40 de suínos e 40 de bovinos. O autor encontrou *Campylobacter jejuni* (*C. fetus* subsp. *jejuni*) em 47,5% das amostras de frango e

35,31% das amostras de suínos, não isolando o microrganismo de carcaças de bovinos analisadas.

Também no Brasil, CARVALHO (1998) encontrou a presença de *Campylobacter* sp em uma amostra (0,25%) de fígado dentre 25 estudadas e uma amostra (0,05%) de coração, dentre cinco estudadas. O método utilizado foi a técnica do NMP para determinação da população, sendo encontrado 780 NMP/25g na amostra de fígado e 2.800 NMP/25g na amostra de coração. Ainda no Brasil, *Campylobacter* foi isolado em 64,58% das 48 amostras analisadas de carne bovina, chouriço resfriado, coração resfriado de frango, coxa congelada de pato, coxa resfriada de frango, coxa congelada de peru, fígado resfriado de frango, hambúrguer bovino congelado, leite bovino e ovo integral (GONÇALVES e FRANCO, 2002).

O leite também pode ser contaminado com microrganismos do gênero *Campylobacter* e a presença dessas bactérias nesse alimento pode ser explicada pela ocorrência de contaminação fecal e condições precárias de higiene durante a ordenha dos animais (BUTZLER e OOSTEROM, 1991; FRANCO e LANDGRAF, 2003). Outra causa é a mastite bovina causada por *Campylobacter* sp (LANGONI et al., 1997; FRANCO e LANDGRAF, 2003; SKIRROW, 1991).

Na China, 300 amostras de leite cru coletadas de diferentes fazendas leiteiras, foram analisadas quanto à presença de *C. jejuni*, sendo a bactéria encontrada em 27,3% das amostras (YANG et al., 2003). JAYARAO e HENNING (2001) isolaram *C. jejuni* em 9,2% das 131 amostras de leite cru analisadas.

Outros alimentos como legumes, verduras e frutas, geralmente consumidos crus, também podem apresentar contaminação significativa por *Campylobacter* sp. Essa contaminação pode ser proveniente da utilização de fertilizantes naturais e água contaminada durante o plantio (BUTZLER e OOSTEROM, 1991) ou da contaminação cruzada devido à falta de higiene e utilização inadequada de

utensílios de cozinha (COKER et al., 2002; SKIRROW, 1991; PARK et al., 1991). Um pedaço de carne crua contaminada pode deixar 10 mil células de *Campylobacter* sp por cm<sup>2</sup> em uma superfície de trabalho (FORSYTHE, 2002).

Na Índia, 56 amostras de diferentes vegetais foram analisadas revelando a presença de *C. jejuni* somente em uma amostra de espinafre e uma de feno-grego (KUMAR et al., 2001). Campilobacteres foram também isolados em três amostras de cogumelos das 200 analisadas em Wisconsin, EUA (DOYLE e SCHOENI, 1986) e de frutos do mar (GRIFFIN, 1983).

A contaminação dos alimentos pode ocorrer também através das pessoas envolvidas com a manipulação dos alimentos, que não possuem conhecimento adequado sobre os cuidados higiênicos sanitários necessários durante a elaboração dos produtos. Assim, a presença de portadores assintomáticos de *Campylobacter* sp torna-se possível a ocorrência de contaminação cruzada de alimentos (TOSIN e MACHADO, 1995).

TOSIN e MACHADO (1995) estudaram em Florianópolis, SC a ocorrência de *Campylobacter* sp em manipuladores de alimentos e constataram que 2,2% desses, em cozinhas hospitalares eram portadores, principalmente de *C. coli* e, 10,5% dos manipuladores de cozinhas industriais eram portadores de *Campylobacter* sp, sendo 55,6% deles portadores de *C. jejuni* e 44,4% de *C. coli*.

A maioria das toxinfecções alimentares pode ser prevenida pela aplicação de princípios básicos de higiene, sendo isto possível por meio de educação e treinamento dos manipuladores de alimento; inspeção dos estabelecimentos para assegurar que as práticas de higiene estejam implantadas e análises microbiológicas para verificar a presença ou ausência de patógenos e toxinas. As práticas higiênicas podem ser alcançadas com a adoção da Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) e Boas Práticas de Fabricação (BPF) que

podem ser aplicados ao longo da cadeia alimentar, desde a produção primária ao consumo final (FORSYTHE, 2002).

#### **2.3.4 Controle e prevenção nos alimentos**

Os microrganismos do gênero *Campylobacter* não são formadores de esporos e são rapidamente destruídos pela ação do calor. Sendo assim, os principais mecanismos de controle, para eliminar a presença dessas bactérias nos alimentos são cozimentos adequados (60°C por 45 minutos); pasteurização do leite (72°C por 15 segundos); prevenção da contaminação cruzada causada por carnes (FORSYTHE, 2002) e higienização do local e utensílios (HUMPHREY et al., 2001), tendo em vista que essas bactérias não sobrevivem por muito tempo no ambiente (PARK et al., 1991). A utilização das Boas Práticas de Fabricação (BPF) são princípios básicos e fundamentais para o controle adequado destes e de tantos outros microrganismos patogênicos em alimentos (FORSYTHE, 2002).

#### **2.3.5 Modo de transmissão ao homem**

A transmissão da doença ao homem pode ser direta ou indireta. De maneira direta, o contato com animais, produtos de origem animal ou mesmo com portadores assintomáticos ou não de *Campylobacter* sp são considerados riscos de infecção. A transmissão indireta, mais freqüente, ocorre pela ingestão de água não tratada e alimentos contaminados, principalmente carnes de frango e leite cru (PARK et al., 1991; PHILLIPS, 1995; SKIRROW, 1991; TALIBART et al., 2000; PEZZOTTI et al., 2003).

Outros fatores de risco descritos na literatura são alimentar-se de vegetais crus como tomate e pepino; água engarrafada (EVANS et al., 2003; KUMAR et al., 2001); alimentos prontos para consumo (MELDRUM e RIBEIRO, 2003);

SKIRROW, 1991); banhos em fontes de águas naturais (SCHONBERG-NORIO et al., 2004) e freqüentar regiões endêmicas (PHILLIPS, 1995).

A maioria dos casos de campilobacteriose é esporádica e devida ao consumo de alimentos preparados de forma higienicamente inadequadas ou ao consumo de produtos de aves. Já a maioria dos surtos está associada ao consumo de leite cru ou água não clorada (TALIBART et al., 2000; KÁLMÁN et al., 2000; FROST, 2001; FORSYTHE, 2002; CDC, 2002a; PARK, 2002).

O leite cru foi tido como fonte de infecção em 30 de um total de 80 surtos relatados ao Center for Disease Control and Prevention (CDC) entre os anos de 1973 e 1992 (ALTERKRUSE et al., 1999; HEADRICK et al., 1998). Além disso, o leite cru estava envolvido no primeiro relato de um surto de campilobacteriose humana ocorrido em 1946 (BUTZLER, 2004; LOVETT et al., 1983). Os surtos causados pela ingestão de leite cru geralmente estão associados com visitas às fazendas, como exemplo, excursões escolares (ALTEKRUSE et al., 1999).

### **2.3.6 Incidência da Campilobacteriose no Mundo**

Apesar de ter sido primeiramente descrito em 1886, o papel do *Campylobacter* como agente causador de gastroenterite humana somente foi reconhecido com o desenvolvimento de métodos de isolamento e meios seletivos durante a década de 70 (KETLEY, 1997; FROST, 2001). Desde então, a taxa de incidência da infecção por esta bactéria está aumentando em todo mundo, ultrapassando, em alguns países, os números de casos de Salmonellose e Shigellose (COKER et al., 2002; CDC, 2002b; BORCK et al., 2002).

Nos Estados Unidos são reportados por ano ao FOODNET (Rede de vigilância ativa de doenças de origem alimentar) 15 casos para cada 100 mil pessoas na população, mas muitos casos dessa doença não são diagnosticados.

Estima-se que a campilobacteriose afete mais de um milhão de pessoas todos os anos, ou seja, 0,5% da população dos EUA e que 100 pessoas morram por ano, mesmo que comumente essa doença não leve ao óbito (CDC, 2002a). A área de cobertura do FOODNET abrange nove estados, cerca de 25,4 milhões de habitantes, representando 10% da população dos Estados Unidos. Em 2002 foram relatados 5.059 casos de campilobacteriose pelo FOODNET (FOODNET, 2004). A perspectiva do FOODNET é de que até 2010 a incidência da campilobacteriose seja reduzido para 12,3 casos a cada 100 mil habitantes (MMWR, 2004).

Na Califórnia, em 1984, das 28 pessoas que ingeriram leite cru e sorvete fabricado com esse leite durante visita à fazenda, 12 desenvolveram diarreia (MMWR, 2002a). No ano seguinte, na mesma cidade, outro surto envolvendo 23 pessoas que consumiram leite cru ocorreu também durante visita à fazenda, (MMWR, 2002b). Em dezembro de 2001 o leite obtido em uma fazenda local foi, mais uma vez, o veículo de transmissão da campilobacteriose em Wisconsin, EUA, envolvendo 75 pessoas, de dois a 63 anos (MMWR, 2003c). Outro surto de gastroenterite causada por *Campylobacter jejuni* ocorreu em Utah, EUA, envolvendo 13 pessoas que consumiram leite cru durante uma refeição servida aos atletas de uma escola da cidade (PETERSON, 2003).

Em agosto de 1996 em Oklahoma, EUA ocorreu um surto envolvendo alface e lasanha contaminadas por carne de frango crua, 14 pessoas manifestaram infecção por *Campylobacter* sp (MMWR, 2003b).

No Canadá foram registrados pelo “National Notifiable Diseases Summary program” (NNDS) 11.503 casos de campilobacteriose no ano de 1999, (CCDR, 2003). Dos surtos relatados no Japão em 1997, um total de 2.648 pessoas foram infectadas por *Campylobacter* (ONO e YAMAMOTO, 1999).

Desde 1981, quando nove mil casos foram registrados, até os dias de hoje, *Campylobacter* sp é a maior causa de gastroenterite no Reino Unido com mais de



60 mil casos em 1999 (GILLESPIE et al., 2002) e 62.867 casos em 2000 (FOODSTANDARDS, 2002), nesse mesmo ano estima-se que ocorreram 86 mortes devido a essa doença (MELDRUM e RIBEIRO, 2003). Na Inglaterra e País de Gales foram registrados pelo Public Health Laboratory Service Communicable Disease Surveillance Centre (CDSC) 55 mil casos em 1999 (FROST, 2001; RIBEIRO; FROST, 2000), 53.800 casos em 2000 (JORGENSEN et al., 2002) e 56 mil casos em 2001 (TAM et al., 2003). Ainda na Inglaterra há o registro do maior surto de campilobacteriose, ocorrido em março de 1979, com duração de três semanas, envolvendo 2.500 crianças que consumiram leite distribuído para as escolas na cidade de Luton (JONES et al., 1981).

Na França, os dados disponíveis não permitem quantificar precisamente a incidência da campilobacteriose. Em 2002 foram verificados 867 casos, sendo 79% envolvendo *C. jejuni* e em 2003 ocorreram mais de dois mil casos segundo a rede de vigilância epidemiológica criada recentemente (AFSSA, 2004). Entre 1992 e 1997 ocorreram 69 surtos de enfermidades transmitidas por alimentos tendo o leite e seus derivados como veículo de transmissão, destes apenas um surto foi de campilobacteriose, envolvendo 19 casos (BUYSER et al., 2001). Em Laval, na França foi relatado um caso de diarreia, bacteriemia, endocardite e meningite em um agricultor de 57 anos, tendo como agente *C. fetus*, este fato foi atribuído aos seus hábitos alimentares inadequados como o consumo de leite cru e contato com bovinos (JAN et al., 2000).

Na Espanha, em 1999, 5.191 casos da doença foram reportados ao “Sistema de Información Microbiológica” (SIM) constatando uma taxa de isolamento de 129 casos a cada 1.000.000 de habitantes (DOMÍNGUEZ et al., 2002). Em 2002, dos 649 casos correspondentes a patógenos alimentares, 196, ou seja, 30,2% foram do gênero *Campylobacter* (MARTÍNEZ e ACEITERO, 2004).

Na Dinamarca, a incidência dessa doença aumenta a cada ano desde 1992 quando foram registrados 1.129 casos, alcançando no ano 2000 o registro de 82

casos a cada 100 mil habitantes (BORCK et al., 2002; WEDDERKOPP et al., 2001) e em 2001 o registro de 4.620 casos com uma incidência de 86 casos a cada 100 mil habitantes (NEIMANN et al., 2003).

Na Holanda estima-se que 300 mil casos da doença e 90 mortes ocorram por ano, mas somente uma pequena parte desses casos, cerca de 5.800, seja realmente confirmada. Nesse país são raros os surtos de campilobacteriose. Entre 1987 e 1994, somente oito foram identificados pelos serviços de inspeção alimentar. (HAVELAAR et al., 2000).

Em outros países desenvolvidos como na Bélgica foram registrados 6.514 casos no ano de 1999 (VELLINGA e BUTZLER apud WHO, 2002), na Suécia 5.580 casos em 1995 (STUDAHL e ANDERSSON, 2000), em Styria, Áustria, 70 casos para cada 100 mil habitantes em 2000 (HEIN et al., 2003), em 1999, 2.027 casos de campilobacteriose foram confirmados na Noruega (NESBAKKEN et al., 2003) e 3.303 casos foram informados pelo NIDR (National Infectious Disease Register) na Finlândia (VIERIKKO et al., 2004).

Na Alemanha foi descrito um surto de campilobacteriose envolvendo leite cru, em abril de 1999 em que, durante uma visita escolar a uma fazenda, 14 crianças e 5 professores manifestaram os sintomas da campilobacteriose (LIEFTUCHT, 2002). Um outro surto, envolvendo no mínimo 52 pessoas ocorreu em uma fazenda na Hungria em abril de 1998, após o consumo de leite cru (KÁLMÁN et al., 2000).

A Austrália possui uma incidência anual da campilobacteriose de 125 casos para cada 100 mil habitantes (UNICOMB et al., 2003). Entre 1980 e 1995 foram registrados cinco surtos envolvendo *C. jejuni* dentre 68 surtos ocorridos envolvendo nove patógenos (SAFEFOOD, 2004). Na Nova Zelândia ocorreu um surto em setembro de 1990 envolvendo 44 pessoas, de 3 a 51 anos, que

consumiram água não clorada ou filtrada em um camping na cidade de Christchurch (MMWR, 2003a).

Os países em desenvolvimento, em geral, não possuem programas nacionais de vigilância que verifiquem a incidência da campilobacteriose, portanto, valores em termos de números de casos na população não existem (COKER et al., 2002).

Em toda América Latina há somente alguns registros da doença. Em Peñas del Rio, Cuba, foi registrado um surto de campilobacteriose envolvendo 21 pessoas que consumiram um tipo de mingau, natilla, em uma escola no ano 1999 (SIRVETA, 2002). No Chile foi relatado por FERNANDEZ et al. (2003) o primeiro caso de gastroenterite aguda, ocorrido devido ao *C. jejuni* subsp. *doylei*.

### **2.3.7 Incidência da Campilobacteriose no Brasil**

No Brasil poucos são os surtos e casos dessa doença que estão registrados. Em dezembro de 1997 ocorreu na cidade de Descalvado – SP um surto de *Salmonella* Enteritidis associado à *Campylobacter* spp, registrado pelo Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE, 2002). Em dezembro de 2001, foi registrado, na cidade de Luis Antônio – SP, um surto de *Campylobacter* associado à *E. coli* O158 e *Cryptosporidium* spp envolvendo 11 pessoas (CVE, 2003a) e, em abril de 2003 foi também notificado ao CVE um surto de *Campylobacter*, envolvendo três pessoas, na cidade de Ribeirão Preto – SP (CVE, 2003b).

Alguns casos de campilobacteriose foram relatados em trabalhos que pretendiam estudar a incidência da bactéria *Campylobacter* spp como causa de diarreia. Durante um estudo na cidade do Rio de Janeiro, em 1979, nove casos da doença foram diagnosticados, em crianças com menos de um ano de idade, dentre 186 casos examinados (RICCIARDI et al., 1979). Em Pernambuco, 80

casos de diarreia foram estudados em 1982, constatando 15 casos de campilobacteriose causada por *C. jejuni* (MAGALHÃES et al., 1982).

O primeiro caso de campilobacteriose registrado tendo como agente o *C. jejuni* subsp. *doylei*, ocorrido em 1997 no Brasil, na cidade de São Paulo, foi relatado por FERNÁNDEZ et al. (1997).

Outro caso da enfermidade foi descrito durante um estudo sobre a frequência de patógenos emergentes relacionados com doenças transmitidas por alimentos, entre 1998 e 2000, na cidade de Botucatu – SP (FRANCESCATO et al., 2002).

Em Ribeirão Preto – SP, 1836 casos de diarreia foram estudados entre os anos de 1994 e 1997, sendo que *Campylobacter* spp foi o terceiro patógeno mais freqüentemente isolado (5,4% - 99 casos), com predominância do *C. jejuni* (MEDEIROS et al., 2001).

Muitos surtos e casos de campilobacteriose podem não ser reconhecidos por várias razões, primeiramente devido ao longo período de incubação que inviabiliza muitas vezes a identificação da fonte de exposição. Outro problema é a necessidade de condições microaerófilas para o crescimento desses microrganismos, o que pode vir a causar injúria, tornando difícil a sua recuperação em meios de cultura convencionais. Além disso, metodologias para detecção de *Campylobacter* sp não são rotineiramente empregadas nos laboratórios de análise, principalmente nos países em desenvolvimento (THE CAMPYLOBACTER SENTINEL SURVEILLANCE SCHEME COLLABORATORS, 2003).

É importante ressaltar que a comparação entre as taxas de isolamento de *Campylobacter* sp nos diversos países não pode ser realizada devido ao uso de diferentes metodologias e à ausência de programas de vigilância e notificação da doença nos países em desenvolvimento.

## 2.4 Campilobacteriose

A doença infecciosa causada pelos microrganismos do gênero *Campylobacter* recebe o nome de campilobacteriose e é caracterizada por uma gastroenterite cujos sintomas principais são dores abdominais, diarreia que pode ser profusa, aquosa e freqüentemente sanguinolenta, febre e dores de cabeça (ICMSF, 1996; CDC, 2002a; COKER et al., 2002; FORSYTHE, 2002). Também podem ocorrer náusea, emese e dores no corpo (BAD BUG BOOK, 2002; WHO, 2002; ICMSF, 1996).

Duas espécies são consideradas a principal causa da campilobacteriose em humanos: *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* (BORCK et al., 2002; COKER et al., 2002; STUDAHL e ADERSSON, 2000; TAM et al., 2003a), sendo que outras espécies como *C. lari* e *C. upsaliensis* já foram relacionadas como agentes causadores da doença (KETLEY, 1997; FORSYTHE, 2002).

Complicações como bacteriemia, septicemia e síndrome de Guillain-Barré (GBS) podem também ocorrer (KETLEY, 1997; PHILLIPS, 1995). A GBS é uma reação auto-imune do corpo, que afeta os nervos periféricos, causando fraqueza, paralisia e ocasionalmente a morte (ERS, 2002). O primeiro caso de GBS associado à *Campylobacter* ocorreu em 1982 (TAM et al., 2003b). Há estimativas de que um caso de GBS ocorra para cada mil casos de campilobacteriose e que 20 a 40% dos casos de GBS sejam provenientes de uma infecção por *Campylobacter* (ERS, 2002; ALTEKRUSE et al., 1999; CDC, 2002a; ALLOS, 1997).

Outras complicações como hepatite, pancreatite, abortos, síndrome uro-hemolítica e artrites reativas também podem ocorrer (WHO, 2002; BAD BUG BOOK, 2002).

A dose infectante de *C. jejuni*, necessária para que a doença se manifeste é considerada muito pequena, entre 500 e 800 microrganismos (BLACK et al., 1988; BAD BUG BOOK, 2002; CDC, 2002a; YANG et al., 2003), podendo ser menor que 500 (AQUINO et al., 1995).

O período de incubação pode variar de 2 a 10 dias e a enfermidade pode perdurar por uma semana (ICMSF, 1996; FORSYTHE, 2002; FRANCO e LANDGRAF, 2003).

A literatura tem mostrado que em países em desenvolvimento *Campylobacter* sp é isolado com maior frequência em crianças diarreicas com menos de dois anos de idade, sendo mais raro em adultos. Essa bactéria é isolada muitas vezes juntamente com outros patógenos em pacientes com diarreia, ao contrário dos países desenvolvidos em que infecções envolvendo vários agentes raramente ocorrem. Nesses países a doença atinge igualmente todas as idades e possui maior incidência no verão e outono (COKER et al., 2002).

O mecanismo de patogenicidade do *C. jejuni* e *C. coli* envolve diversos fatores de virulência, incluindo mobilidade, quimiotaxia, adesão, habilidade de invasão das células hospedeiras e produção de toxinas (KELLY, 2001; FORSYTHE, 2002; VLIET e KETLEY, 2001).

As bactérias colonizam a porção distal do íleo e do cólon do trato gastrointestinal humano utilizando-se de sua mobilidade, conferida pelo flagelo, e quimiotaxia para atravessar a camada de muco e atingir as células intestinais. Ao atingir essas células, a bactéria utiliza-se do flagelo e da camada de lipopolissacarídeo (LPS) para aderir à superfície das células epiteliais e invadi-las, perturbando assim, a capacidade de absorção normal do intestino e danificando as funções das células epiteliais (FORSYTHE, 2002; VLIET e KETLEY, 2001; KETLEY, 1997). A produção de fímbrias pelos campilobacteres foi descrita na

literatura, quando essas bactérias crescem na presença de sais biliares (DOIG et al., 1996).

A camada de lipopolissacarídeo (LPS), encontrada em bactérias Gram negativas, é um importante fator de virulência envolvendo adesão (VLIET e KETLEY, 2001). O LPS possui uma estrutura molecular complexa e é composto por três segmentos ligados covalentemente. O lipídeo A que ancora a molécula na membrana externa da célula e é tóxica; região do centro ou polissacarídeo central, formado por moléculas de açúcares e ácidos graxos; e região O composta de unidades variantes de açúcares. É também conhecido como antígeno somático (O), sendo responsável por muitas das propriedades sorológicas das bactérias Gram negativas (FORSYTHE, 2002). A porção lipídica de um LPS é também conhecida como uma endotoxina (PELCZAR, 1996).

A diarreia pode ocorrer tanto pela invasão das células epiteliais como pela produção de toxinas. Foi verificada pelo menos a produção de três toxinas distintas. A toxina citolética distendida que afeta o ciclo celular da célula hospedeira impedindo a realização da divisão celular (mitose). Isso acarreta perda da função das células epiteliais do intestino e gera os sintomas de diarreia. A enterotoxina termossensível, semelhante à toxina colérica é uma toxina protéica secretada extracelularmente que altera o metabolismo hidrossalino da célula pela ativação da enzima adenilato ciclase, responsável pela formação de AMP cíclico, desencadeando uma série de reações metabólicas na célula que levam à liberação de eletrólitos e água causando acúmulo de líquido no lúmen intestinal e diarreia. Também são produzidas citotoxinas que causam danos às células, invadindo-as e inibindo a síntese protéica (KETLEY, 1997; FORSYTHE, 2002, VLIET & KETLEY, 2001; PARK, 2002).

Das toxinas produzidas as de maior importância são a enterotoxina termossensível, semelhante à toxina colérica e citotoxinas (FORSYTHE, 2002; FRANCO e LANDGRAF, 2003).

## 2.5 Métodos de análise em microbiologia

A metodologia para contagem de microrganismos em placa é uma das mais utilizadas pelos laboratórios de análises de alimentos por proporcionarem a enumeração de diferentes grupos de microrganismos, dependendo do meio de cultura e condições de incubação a serem utilizados (FORSYTHE, 2002; FRANCO e LANDGRAF, 2003).

A técnica do número mais provável (NMP), também chamada técnica dos tubos múltiplos, é outra maneira bastante utilizada pelos laboratórios de microbiologia de alimentos para estimar a contagem de alguns tipos de microrganismos. O NMP é determinado pelo número de tubos positivos em cada uma das diluições, tendo como base a tabela estatística de Hoskins (FRANCO e LANDGRAF, 2003).

Métodos qualitativos de isolamento de microrganismos geralmente envolvem uma etapa de enriquecimento em caldo, seguido de plaqueamento em meios seletivos e a identificação é feita baseada no comportamento bioquímico do microrganismo frente aos mais diversos substratos, ou seja, a capacidade desses microrganismos de realizar reações bioquímicas (LINE et al., 2001).

Alguns patógenos bacterianos são capazes de entrar em um estágio dormente em que as células não são mais cultiváveis, mas permanecem viáveis e virulentas. Esse estado viável, mas não cultivável (VNC) foi demonstrado em *Salmonella* spp, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* e *Vibrio cholerae*. Esses patógenos representam um perigo potencial à saúde e são de interesse em microbiologia de alimentos. A partir disto os métodos usuais podem não estar recuperando todos os patógenos de alimentos e águas, sendo importante a utilização de métodos alternativos como os baseados em imunologia (ELISA) e seqüência de DNA (PCR) (FORSYTHE, 2002).



Segundo HAJDENWURAL (1998) os métodos rápidos surgiram a partir da década de 70 em consequência da necessidade de se reduzir o tempo de análise nos laboratórios de microbiologia, aumentando-se a produtividade do trabalho realizado. Tais métodos apresentam uma série de vantagens como redução do tempo de análise, significando menor retenção do produto na indústria, diminuição dos custos, simplificação nas tarefas de realização da análise, facilidade de leitura dos resultados e especificidade, além de maior sensibilidade de alguns métodos quando comparados com os métodos convencionais.

Alguns métodos rápidos, baseados em técnicas imunoenzimáticas, são processos modificados, semi ou totalmente automatizados, que possibilitam resultados rápidos, seguros, sensíveis e específicos nas áreas de detecção de antígenos e toxinas bacterianas.

A utilização desses métodos permite aumentar o número de amostras analisadas por dia, mesmo que o tempo de incubação de alguns deles seja similar ao dos métodos convencionais (VASAVADA, 1993).

Segundo FENG (1995) os métodos rápidos podem ser utilizados somente para controle, sendo que resultados negativos são considerados como definitivos, mas resultados positivos são considerados presuntivos e devem ser confirmados por métodos padrões.

### **3 Objetivos**

#### **3.1 Objetivo geral**

- Avaliar o comportamento de *Campylobacter jejuni* quando inoculado em diferentes substratos: leite tipo C, leite tipo UHT (Ultra High Temperature) e meio de cultura, em diferentes tempos de incubação.

#### **3.2 Objetivo específico**

- Comparar metodologias convencionais, a técnica do Número Mais Provável (NMP) e a metodologia para isolamento de *Campylobacter* sp do “Bacteriological Analytical Manual” (BAM) preconizada pelo FDA (Food and Drug Administration), com metodologias que utilizam reações imunoenzimáticas, *Campylobacter* Visual Immunoassay e Vidas *Campylobacter*, para a detecção de *Campylobacter*.

## **4 Material e Métodos**

### **4.1 Microrganismo**

*Campylobacter jejuni* (American Type Culture Collection – ATCC – 33560), fornecida pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz.

### **4.2 Meios de cultura**

#### **4.2.1 Caldo Brucella**

Meio Brucella Broth (BBL) preparado de acordo com as instruções do fabricante.

#### **4.2.2 Brucella suplementado**

Meio Brucella Broth adicionado de 0,15% de ágar (Oxoid); 0,05% de piruvato de sódio (Hechst do Brasil); 10 mg de vancomicina (Sigma); 5 mg de trimethoprim (Sigma); 2.500 UI de polimixina B (Sigma); 2 mg de anfotericina (Sigma) e 15 mg de cefalotina (Sigma) por litro de meio.

#### **4.2.3 Brucella sangue**

Meio Brucella Broth adicionado de 10% de sangue fresco de cavalo (Biotério Boa Vista); 1,5% de agar; 10 mg de vancomicina (Sigma); 5 mg de trimethoprim (Sigma); 2.500 UI de polimixina B (Sigma); 2 mg de anfotericina (Sigma) e 15 mg de cefalotina (Sigma) por litro de meio.

#### **4.2.4 Caldo Bolton**

Meio Bolton Selective Enrichment Broth (Oxoid) preparado de acordo com as instruções do fabricante.

#### **4.2.5 Caldo Bolton suplementado I**

Meio Bolton Selective Enrichment Broth (Oxoid) suplementado com 5 mL de sangue fresco de cavalo e uma mistura dos antibióticos em 500 mL de meio: 10 mg de cefoperazone, 10 mg de vancomicina, 10 mg de trimethoprim e 25 mg de cycloheximide (Bolton Broth Selective Supplement – OXOID).

#### **4.2.6 Caldo Bolton suplementado II**

Meio Bolton Selective Enrichment Broth (Oxoid) suplementado uma mistura dos antibióticos em 500 mL de meio: 10 mg de cefoperazone, 10 mg de vancomicina, 10 mg de trimethoprim e 25 mg de cycloheximide (Bolton Broth Selective Supplement – OXOID).

#### **4.2.7 Meio CCDA**

Meio *Campylobacter* Blood-free Selective Agar base (Oxoid) suplementado com os antibióticos a seguir em 500 mL de meio: 16 mg de cefoperazone, 5 mg de anfotericina B (CCDA Selective Supplement - Oxoid) e 5 mg de rifampicina (Sigma).

#### **4.2.8 Caldo TCEB**

Meio TECRA *Campylobacter* Enrichment Broth (TCEB) adicionado de 0,12g de sulfato ferroso heptahidratado (Merck) e uma mistura de três antibióticos,

trimetropim, rifampicina, polimixina B (TECRA *Campylobacter* Selective Supplement - TCSS).

#### **4.2.9 Meio PCA**

Meio Agar Padrão para contagem (Difco), preparado de acordo com as instruções do fabricante.

#### **4.2.10 Água Salina Peptonada**

Diluyente para homogeneização e diluição de amostras preparado com 8,5 g de NaCl e 1,0 g de peptona em um litro de água destilada.

#### **4.2.11 Meio AHB (Abeyta-Hunt-Bark Agar)**

Meio Heart Infusion Agar (Difco) adicionado de 2g de extrato de levedura (Oxoid) por litro de meio.

### **4.3 Equipamentos**

- Potenciômetro de pH, Corning Digital 110 de escala expandida em resolução de 0,01;
- Centrífuga refrigerada RC5 C, Sorval Instruments;
- Balança semi-analítica digital BEC 1000, ACATEC;
- Estufa C. B. retilínea, Fanem Ltda.;
- Estufa de secagem e esterilização Mod. 320 – SE, Fanem Ltda.;
- Câmara de fluxo laminar vertical, Veco;
- Autoclave Mod. 104, Fabbe Ltda.;
- Mini Vidas<sup>®</sup>, biolab-Mérieux S/A;
- Densimat<sup>®</sup>, biolab-Mérieux S/A;

- Estufa incubadora para B. O. D. Mod 347F, Fanem Ltda.;
- Agitador de tubos TE 162, Tecnal;
- Destilador de água Mod. MA 252 – Marconi.

#### 4.4 Padronização do Inóculo

A cepa de *Campylobacter jejuni* (ATCC 33560) foi ativada em meio sólido Bolton Selective Enrichment (Oxoid). Um inóculo de  $1,5 \times 10^2$  e outro de  $1,5 \times 10^3$  UFC/mL foram padronizados com a utilização do densitômetro Densimat<sup>®</sup> de acordo com a escala de McFarland, segundo as instruções do fabricante (Figura 1).



**Figura 1 – Densimat<sup>®</sup>**

#### 4.5 Inoculação

Os inóculos padronizados conforme item 4.4, foram utilizados em leite tipo C, leite UHT e meio Bolton. Após a inoculação, os substratos foram incubados em câmara de incubação com refrigeração a 7°C por 48 horas, sendo retirada uma amostra para análise em 24 horas.

#### 4.6 Descrição do experimento

O experimento foi realizado no período de fevereiro a julho de 2004. Três tipos de substratos (270 mL), leite C, leite UHT (Ultra High Temperature) e meio Bolton, foram inoculados com *Campylobacter jejuni* (30 mL) nas concentrações  $1,5 \times 10^2$  e  $1,5 \times 10^3$  UFC/mL e incubados por 48 horas a 7°C. Após 24 e 48 horas foram realizadas as análises microbiológicas visando detecção e isolamento de *Campylobacter*, empregando-se quatro metodologias diferentes (item 4.8). Foram realizadas oito repetições de cada substrato inoculado, sendo que para o leite C e o Leite UHT utilizou-se duas marcas diferentes, portanto quatro repetições de cada uma delas (marcas A e B para leite UHT e F e G para leite C). As repetições foram numeradas de 1 a 48, sendo as 16 primeiras relacionadas ao meio Bolton, as de número 17 a 32 ao leite UHT e as de 33 a 48 são repetições de leite tipo C (Anexo 1).

- Leite UHT, marcas A e B, inoculados na concentração  $1,5 \times 10^2$  UFC/mL
- Leite UHT, marcas A e B, inoculados na concentração  $1,5 \times 10^3$  UFC/mL
- Leite tipo C, marcas F e G, inoculados na concentração  $1,5 \times 10^2$  UFC/mL
- Leite tipo C, marcas F e G, inoculados na concentração  $1,5 \times 10^3$  UFC/mL
- Meio de cultura inoculado na concentração  $1,5 \times 10^2$  UFC/mL
- Meio de cultura inoculado na concentração  $1,5 \times 10^3$  UFC/mL

#### 4.7 Microaerofilia

A atmosfera microaerófila, utilizada durante o experimento, foi realizada com a utilização de jarras para anaerobiose GasPack system de 7,5 litros (BBL) (Figura 2) e sachet para anaerobiose Anaerogem™ (NA 25 – Oxoid).



**Figura 2** – Jarras para microaerofilia.

#### 4.8 Análises Microbiológicas

As análises microbiológicas, visando o isolamento e a quantificação de *Campylobacter* sp, foram realizadas após 24 e 48 horas de incubação dos substratos inoculados, utilizando-se quatro metodologias: técnica do Número Mais Provável (NMP) para detecção e enumeração de *Campylobacter* sp; metodologia para isolamento de *Campylobacter* sp de acordo com o “Bacteriological Analytical Manual” (BAM) preconizada pelo FDA (Food and Drug Administration); *Campylobacter* Visual Immunoassay que utiliza a técnica ELISA (TECRA diagnostic) e Vidas *Campylobacter* que utiliza a técnica ELFA (BioMérieux). Foi realizada também a contagem de mesófilos e psicrófilos totais nos leites tipo UHT e tipo C, para se ter uma idéia da microbiota natural inicial.

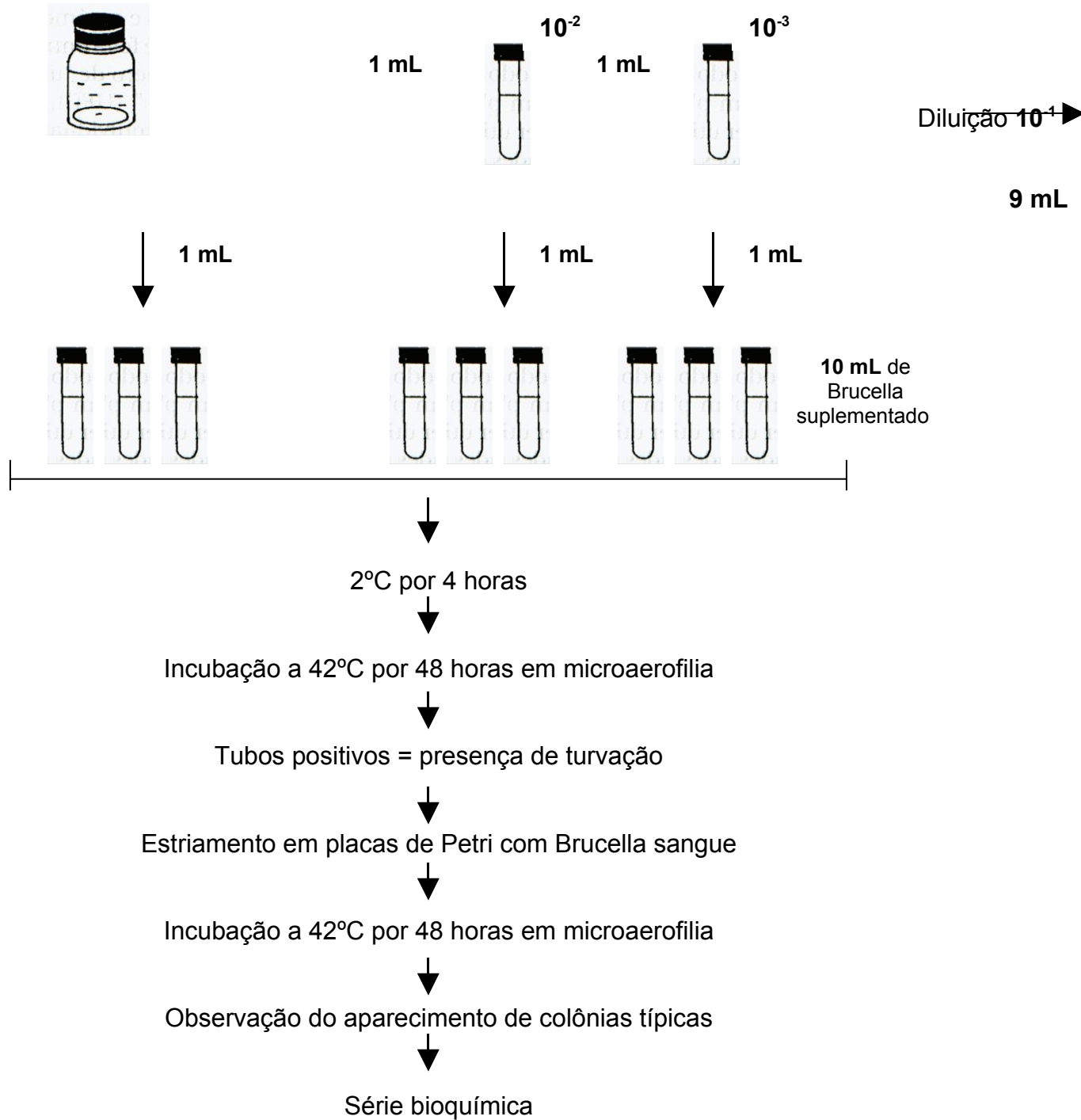


#### **4.8.1 Técnica do número mais provável (NMP) para detecção e enumeração de *Campylobacter* sp**

Para a realização dessa metodologia, 25 mL dos substratos inoculados foram homogeneizados em 225 mL de Caldo Brucella, correspondente à primeira diluição. Foram inoculadas diluições decimais (1mL) de cada amostra, em três tubos contendo 10 mL de Brucella suplementado. Os tubos inoculados foram mantidos por 4 horas a 2°C e posteriormente incubados a temperatura de 42°C por 48 horas em microaerofilia. Os tubos que apresentaram resultado positivo, evidenciado por turbidez, foram inoculados em placas de Petri contendo Brucella sangue. Incubou-se a 42°C por 48 horas em condições de microaerofilia. A partir de colônias isoladas foram feitos os testes bioquímicos descritos no item 4.9 para a identificação do microrganismo (CARVALHO, 1998; CHRISTOPHER et al., 1982). Os resultados foram confrontados com a tabela do NMP e expressos em NMP/mL (Anexo B).

#### 4.8.1.1 Fluxograma da Técnica do NMP

25 mL da amostra + 225 mL de Caldo Brucella

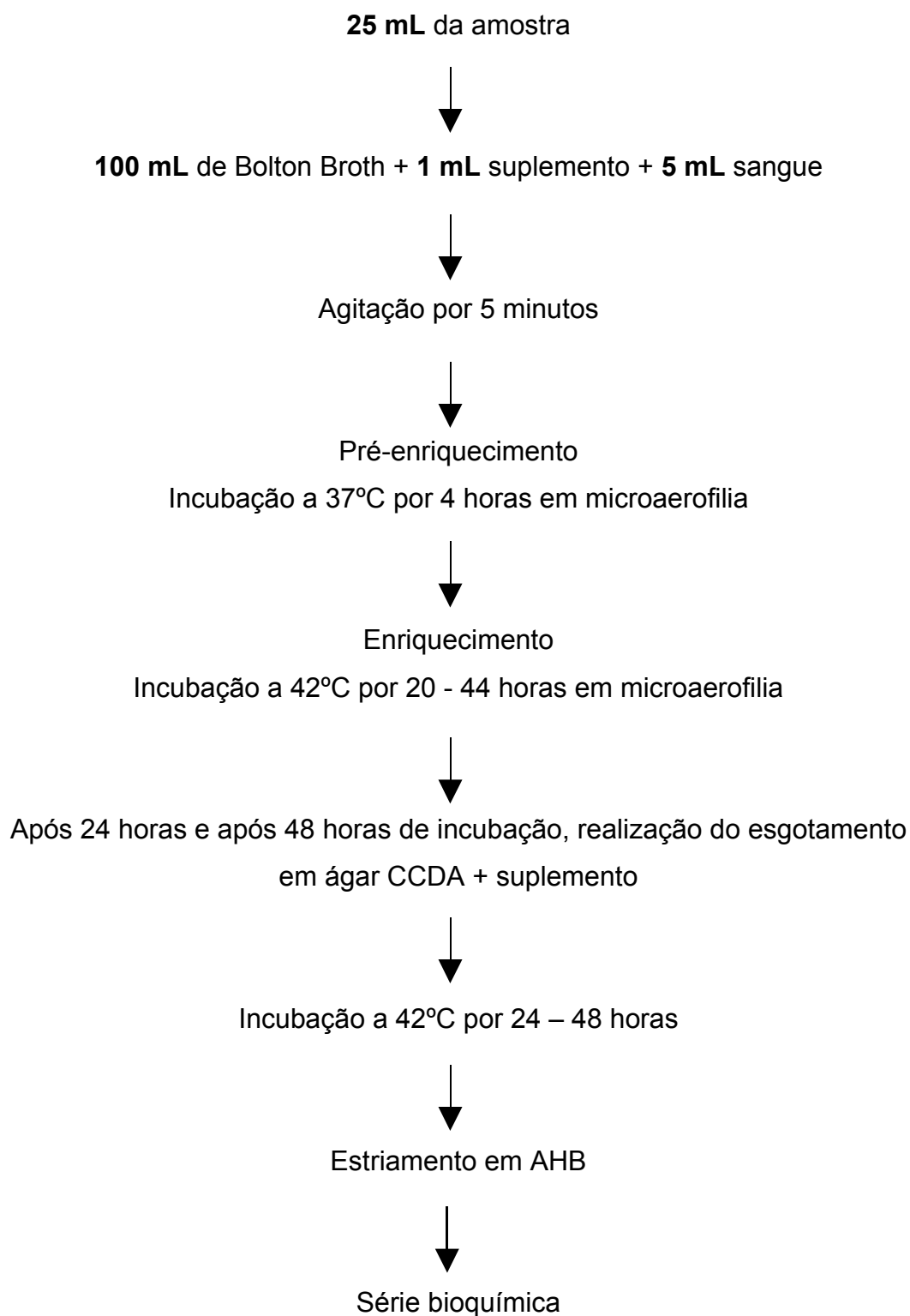


#### **4.8.2 Metodologia para isolamento de *Campylobacter* sp do BAM preconizada pelo FDA**

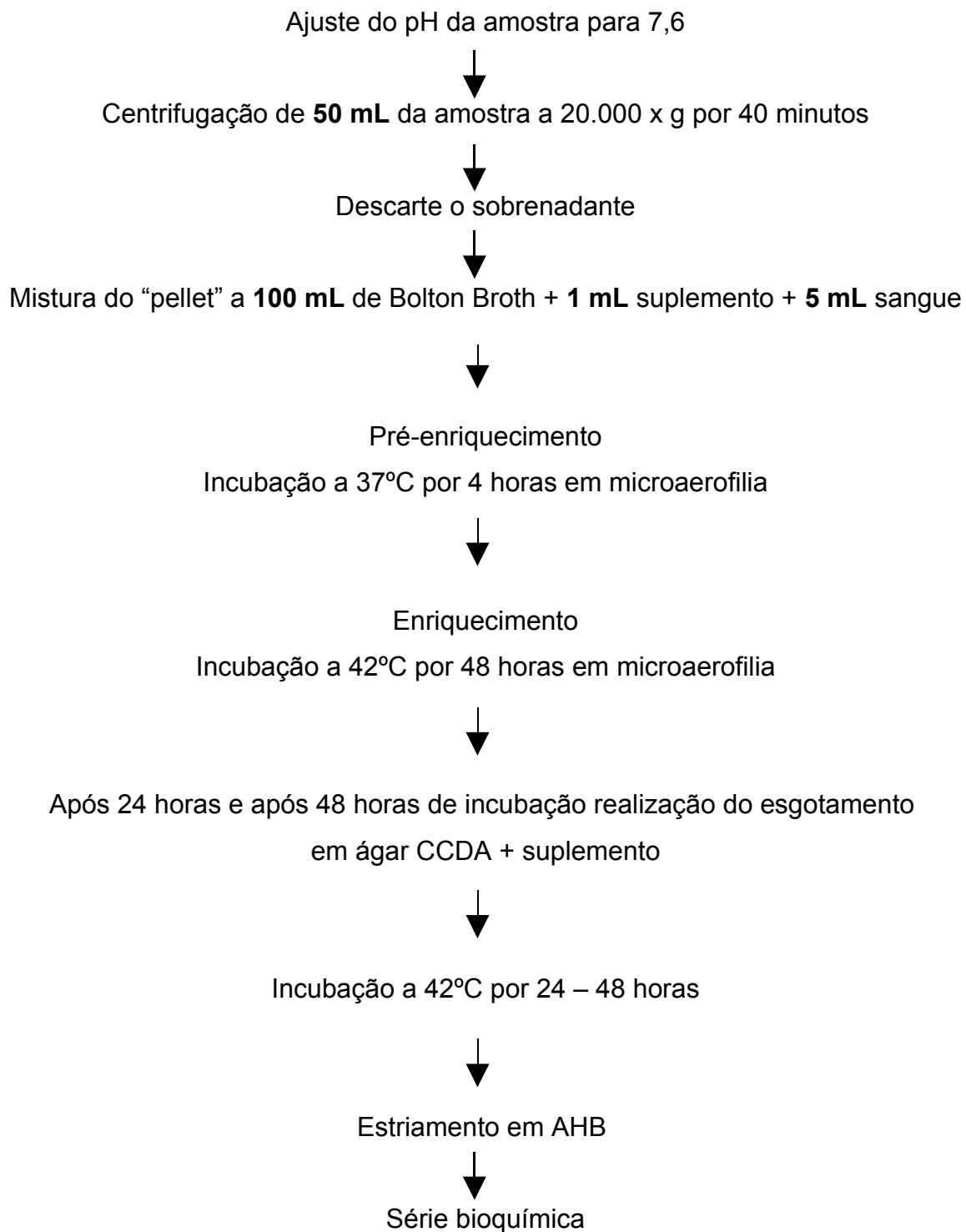
Nas repetições do substrato meio Bolton, 25 mL foram adicionados em 100 mL de caldo Bolton suplementado I. Nas repetições dos substratos leite C e leite UHT, o pH foi ajustado para 7,6 e então 50 mL foram centrifugados a 20.000 x g por 40 minutos. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” misturado a 100 mL de caldo Bolton suplementado I.

Incubou-se o caldo Bolton suplementado I adicionado da amostra a 37°C por 4 horas em microaerofilia, correspondendo ao pré-enriquecimento e após incubou-se a 42°C por 48 horas o que correspondeu à etapa de enriquecimento. A partir deste os microrganismos foram isolados por esgotamento em meio CCDA. Este procedimento foi realizado após 24 e 48 horas de incubação sendo as placas incubadas a 42°C por 48 horas em microaerofilia. Após o isolamento as colônias típicas foram submetidas aos testes bioquímicos descritos no item 4.9 para identificação do microrganismo (HUNT et al., 1998).

#### 4.8.2.1 Fluxograma da metodologia do BAM preconizada pelo FDA para análise em meio de cultura

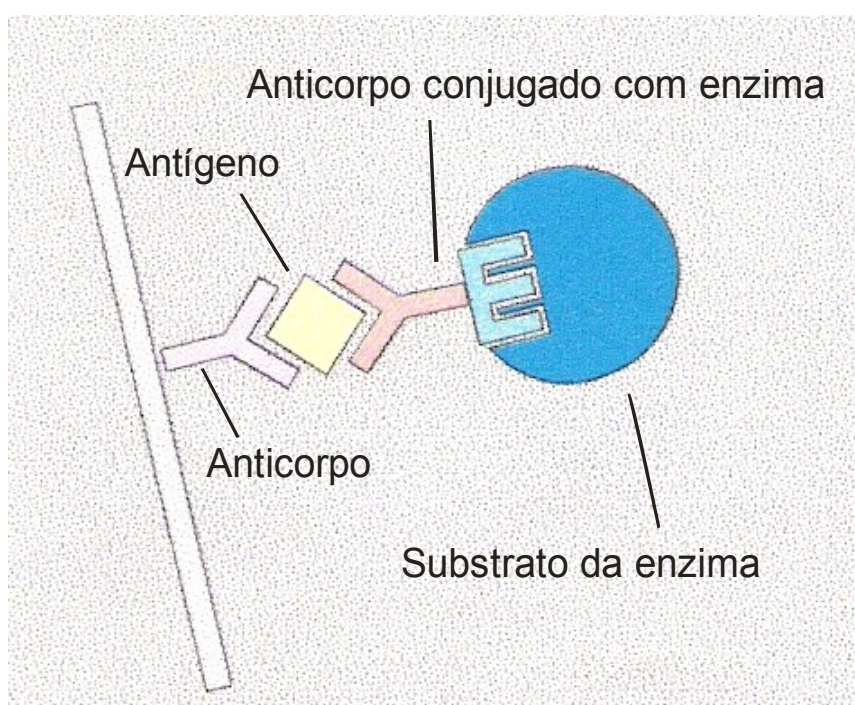


#### 4.8.2.2 Fluxograma da metodologia do BAM preconizada pelo FDA para análise em leite C e leite UHT



#### 4.8.3 *Campylobacter* Visual Imunoensaio – ELISA (TECRA)

TECRA *Campylobacter* Imunoensaio Visual é um método imunoenzimático rápido e específico que utiliza a técnica ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) do tipo sanduíche direto para detecção de *Campylobacter*. O princípio deste teste baseia-se no fato da formação de um complexo antígeno-anticorpo que se liga a uma enzima e esta a um substrato, gerando um produto colorido (Figura 3).



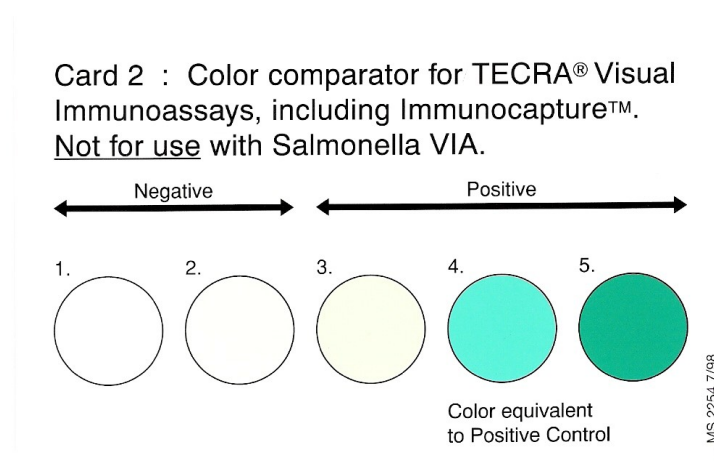
**Figura 3 – ELISA tipo sanduíche direto**

O teste foi realizado de acordo com as instruções do fabricante do kit (Figura 4), não sendo necessário ambiente microaerófilo para incubação na etapa de enriquecimento. A leitura dos resultados foi realizada com a utilização do cartão de cor (Figura 5). Quando o resultado foi positivo realizou-se a confirmação pelo

isolamento do microrganismo em meio CCDA e posterior identificação pela série bioquímica descrita no item 4.9 (TECRA, 2001).



**Figura 4** – Kit *Campylobacter* Visual Immunoassay - TECRA



**Figura 5** – Cartão de cor do kit *Campylobacter* Visual Immunoassay para leitura dos resultados

#### 4.8.3.1 Fluxograma de realização do kit *Campylobacter* Visual Immunoassay

25 mL da amostra + 225 mL de TCEB + 0,5 mL de suplemento TCSS



Incubar a 42°C por 40 – 48 horas sem microaerofilia



**ELISA**

##### **Passo 1 – Tratamento térmico da amostra.**

Transferir 1 mL da amostra enriquecida para um tubo com rosca. Adicionar 50 µL do aditivo da amostra, agitar e aquecer a 100°C por 15 minutos. Resfriar a temperatura ambiente para realização do teste.

##### **Passo 2 – Preparação das microplacas**

Remover a quantidade de cavidades móveis requeridas de acordo com o número de amostras, somadas dos controles positivo e negativo e encaixar as mesmas firmemente na microplaca.

##### **Passo 3 – Adição das amostras**

Utilizando ponteiros estéreis, transferir 200 µL dos controles e amostras em cavidades individuais, anotando sua identificação. Cobrir a microplaca com um filme plástico e incubar por 60 minutos a 35 – 37°C.



#### **Passo 4 – Primeira lavagem**

Esvaziar as cavidades, invertendo a microplaca rapidamente várias vezes, até remoção do líquido residual, pressionando a placa em papel absorvente. Cobrir as cavidades com a solução de lavagem, esvaziando-as seguidamente por três vezes. Evitar a formação de bolhas.

#### **Passo 5 – Adição do conjugado**

Adicionar 200  $\mu$ L de conjugado a cada cavidade. Cobrir com o filme plástico e incubar por 30 minutos a 35 – 37°C.

#### **Passo 6 – Segunda lavagem**

Esvaziar as cavidades e lavar por quatro vezes como no passo 4.

#### **Passo 7 – Adição do substrato**

Adicionar 200  $\mu$ L de substrato. Incubar a temperatura ambiente 20 – 25°C por no mínimo 15 minutos. Observar se o controle positivo apresenta coloração equivalente à figura 4 do cartão de leitura. Movimentar gentilmente a placa para melhor distribuição da cor.

#### **Passo 8 – Adição da solução stop**

Adicionar 20  $\mu$ L da solução stop a cada cavidade movimentando gentilmente a placa.

#### **Passo 9 – Leitura dos resultados**

Utilizar o cartão de cor.

#### 4.8.4 Vidas *Campylobacter* – ELFA (bioMérieux)

Sistema VIDAS CAM<sup>®</sup> é um teste qualitativo que permite a detecção de antígenos de *Campylobacter* em alimentos pela técnica ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay), após a etapa de enriquecimento. A tecnologia ELFA é um ensaio imunológico similar ao ELISA, apresentando como diferença o substrato, o 4 metil umbeliferil fosfato (4MUP) que, após ser hidrolisado pela enzima fosfatase alcalina, transforma-se em Umbeliferona emitindo fluorescência a 450 nm, quando excitada a 370 nm que é medida pelo próprio equipamento.

Na etapa de enriquecimento, 25 mL dos substratos inoculados foram homogeneizados em 225 mL de caldo Bolton suplementado II, incubando-se a 42°C por 48 horas em microaerofilia. Após essa etapa, 2 mL desse caldo foram aquecidos em banho-maria a 100°C por 15 minutos. Em seguida 0,5 mL foram transferidos para o barrete VIDAS CAM (Figura 6) e o sistema, totalmente automatizado (Figuras 7 e 8), forneceu o resultado em aproximadamente 70 minutos. Quando o resultado foi positivo realizou-se a confirmação pelo isolamento do microrganismo em meio CCDA e posterior identificação pela série bioquímica descrita no item 4.9 (BIOLAB, s.d.).

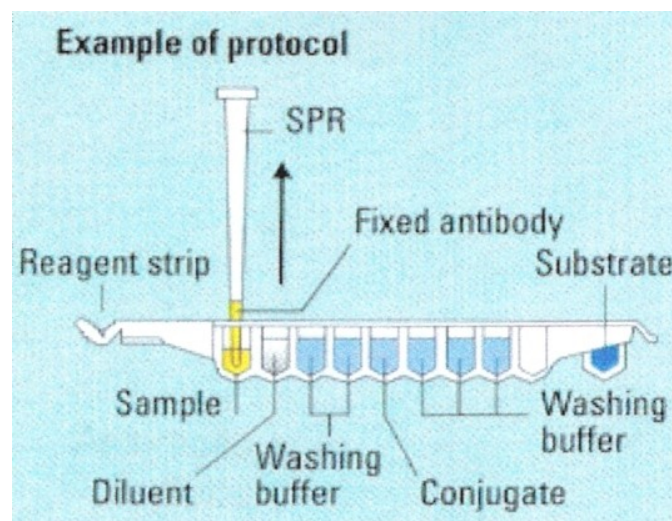


Figura 6 – Esquema barrete



**Figura 7 – Sistema mini VIDAS**

#### **4.8.4.1 Fluxograma de execução do kit Vidas *Campylobacter***

25 mL da amostra + 225 mL de caldo Bolton + 2 mL suplemento + 11 mL sangue



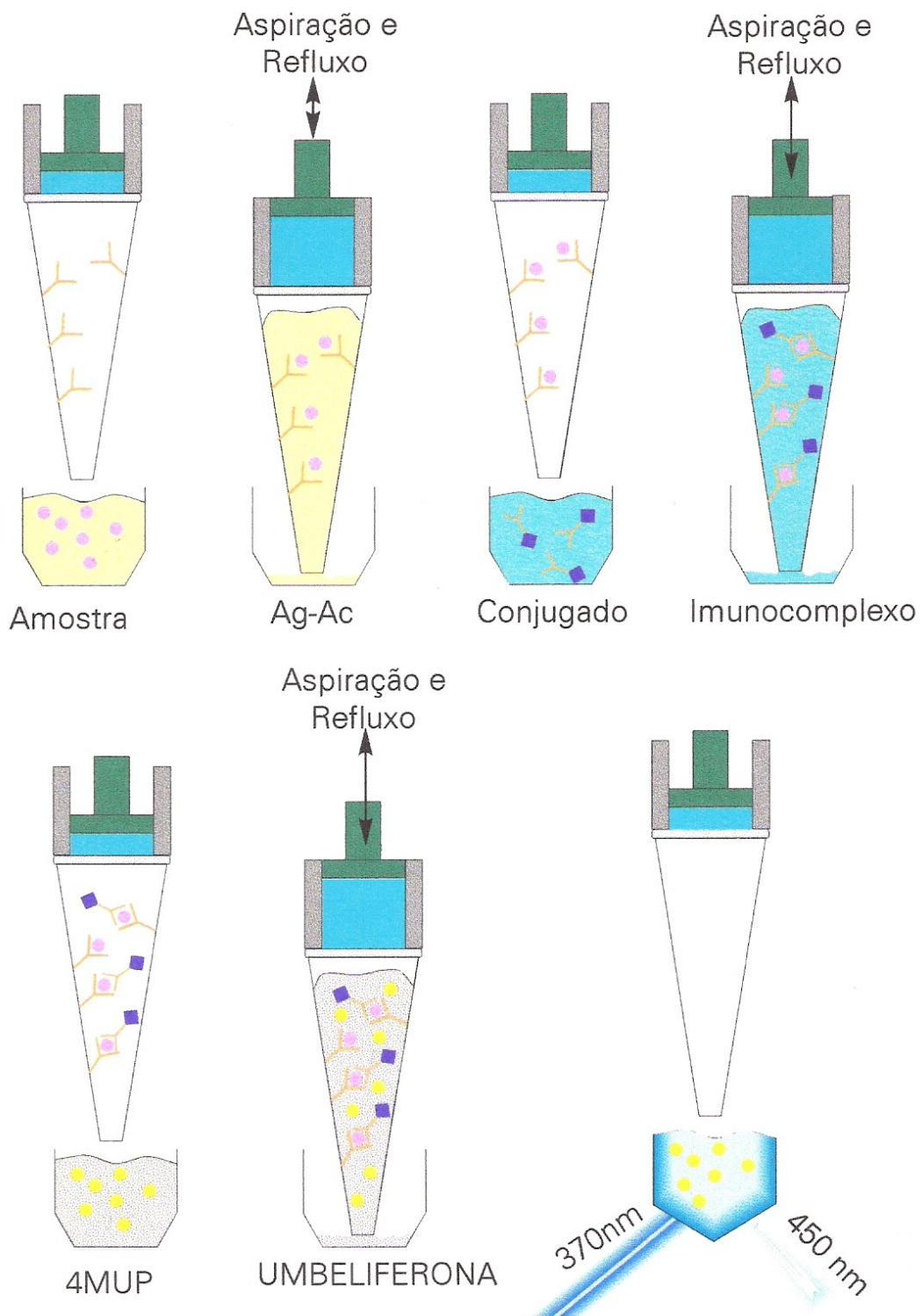
Incubar a 42°C por 48 horas em microaerofilia



Transferir 2 mL do preparado para um tubo de rosca e aquecê-lo em banho-maria a 100°C por 15 minutos. Resfriar a temperatura ambiente e agitar para eliminar qualquer formação de sedimento.



Transferir 0,5 mL para o barrete VIDAS CAM e coloca-la no equipamento



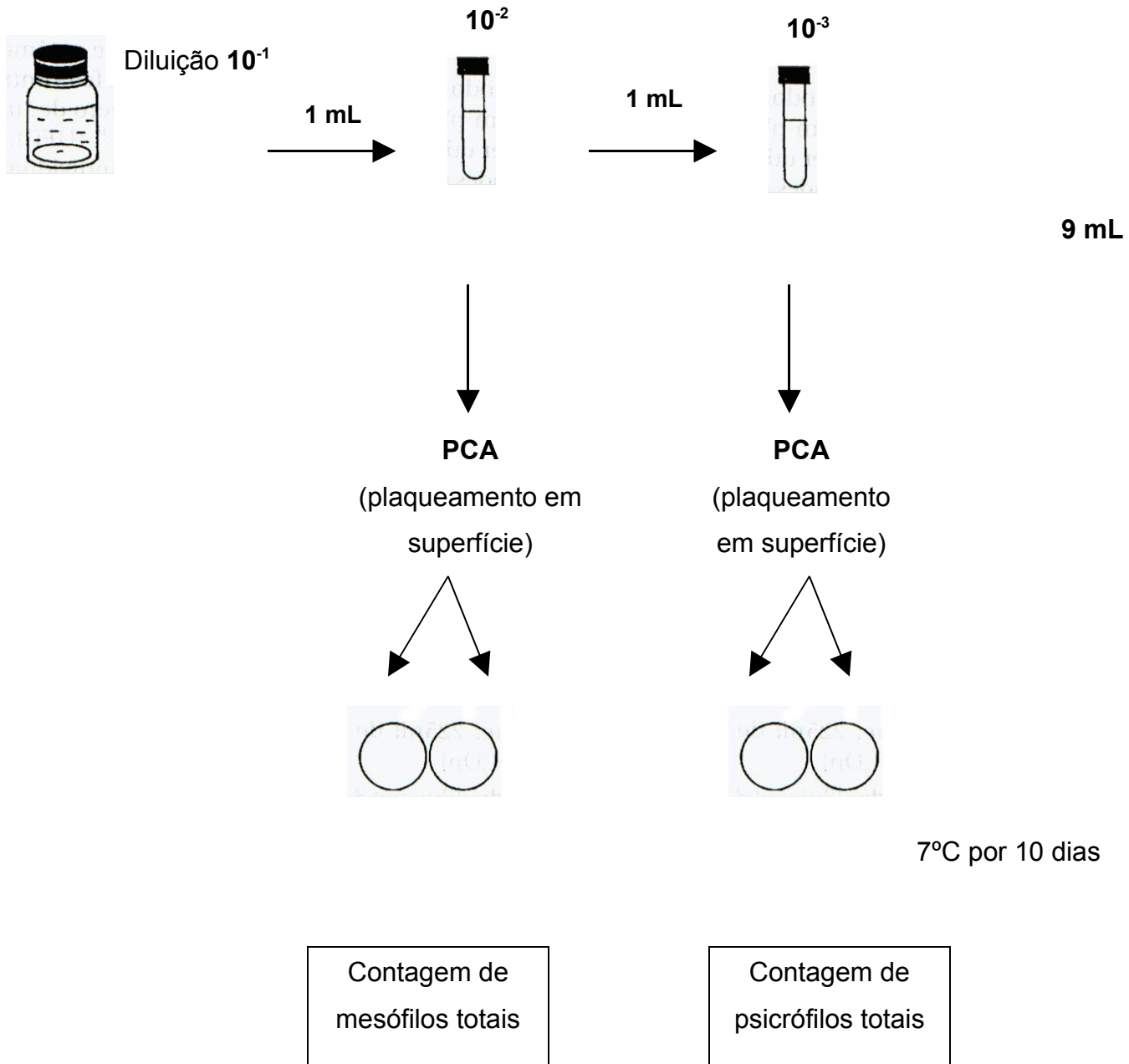
**Figura 8 – Esquema ELFA**

#### **4.8.5 Contagem de mesófilos e psicrotrófilos aeróbios totais**

Para contagem de mesófilos e psicrotrófilos aeróbios totais 25 mL da amostra (leite tipo C e UHT) foram homogeneizados em 225 mL de salina peptonada correspondendo à primeira diluição. Diluições decimais seriadas foram preparadas e uma alíquota de 0,1 mL de cada diluição foi inoculada em placas contendo meio PCA, pelo método de plaqueamento em superfície e duplicata. Incubou-se a 32°C por 48 horas para contagem de mesófilos e 7°C por 10 dias para análise de psicrotrófilos aeróbios. O número de colônias contadas foi expresso em UFC/mL (APHA, 2001).

#### 4.8.5.1 Fluxograma para contagem de mesófilos e psicrófilos totais

25 mL da amostra + 225 mL de Salina Peptonada



#### 4.9 Morfologia e Série Bioquímica para identificação

Os testes bioquímicos foram realizados de acordo com o método do BAM para isolamento e identificação de *Campylobacter* sp (HUNT et al., 1998).

- **Morfologia por coloração de Gram** (utilizou-se 0,5% de carbol fucsina como contra-corante)
  
- **Teste de Catalase** – transferiu-se uma alçada da cultura para uma gota de peróxido de hidrogênio a 3% em uma lâmina de microscopia. Observou-se o aparecimento de borbulhamento imediato, caracterizando teste positivo. Esse teste é utilizado para verificar se a bactéria em questão possui a enzima catalase, capaz de degradar o peróxido de hidrogênio.
  
- **Teste de Oxidade** – transferiu-se uma alçada da cultura para uma tira de papel filtro, em seguida pingou-se algumas gotas de reagentes de oxidase (N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylenediamine·2HCl) e observou-se o aparecimento da cor azul, indicando resultado positivo. Esse teste foi utilizado para verificar a presença da enzima citocromo oxidase que é responsável pelo transporte de elétrons na cadeia respiratória até o oxigênio.
  
- **Teste de mobilidade em lâmina** – uma alçada da cultura foi transferida para uma gota de água em uma lamínula que foi invertida sobre uma lâmina escavada de modo que a gota ficasse pendente. Observou-se ao microscópio o movimento característico da bactéria, em saca rolha ou vaivém.
  
- **Crescimento a 25°C e 42°C** – estriou-se uma alçada da cultura em placas de AHB (Abeyta Hunt Bark ágar – ágar infusão de coração - Difco) adicionado de extrato de levedura (Oxoid) e incubou-se a 25°C e a 42°C por três dias em microaerofilia para visualização de crescimento, indicando resultado positivo e não crescimento, indicando resultado negativo.

- **Teste de redução de nitrato** – uma alçada da cultura foi inoculada em tubos contendo meio Bolton semi-sólido adicionado de 0,01% de citrato de sódio e 1% de nitrato de potássio (Merck). Incubou-se a 37°C por 5 dias. Após esse período, 5 gotas de cada um dos reagentes de nitrato (A = solução de ácido sulfanílico; B = solução de dimetil- $\alpha$ -naftilamina) foram adicionados em cada tubo e observou-se o aparecimento de coloração vermelha, caracterizando teste positivo. Esse teste foi utilizado para verificar a capacidade do microrganismo em reduzir nitrato a nitrito.
  
- **Teste da produção de H<sub>2</sub>S em ágar tríplice açúcar ferro (TSI)** – uma alçada da cultura foi inoculada, por picada e estrias na rampa, em tubos contendo meio TSI inclinado. Incubou-se a 37°C por cinco dias e observou-se o escurecimento do meio, devido à precipitação de sulfeto de ferro (teste positivo) ou não (teste negativo). A bactéria *C. jejuni* não apresenta reação positiva para esse teste no meio TSI.
  
- **Teste de produção de H<sub>2</sub>S em tiras de acetato de chumbo** - inoculou-se uma alçada da cultura em tubos contendo meio Bolton semi-sólido adicionado de 0,01% de citrato de sódio (Reagen) e 0,02% de cisteína (Merck). Colocou-se uma tira de papel filtro embebida em uma solução saturada de acetato de chumbo (Reagen), presa na boca do tubo ao rosquear. Incubou-se a 37°C por 3 dias e observou-se a ocorrência do escurecimento da tira indicando teste positivo.
  
- **Crescimento em MacConkey ágar** – inoculou-se uma alçada da cultura em uma placa de Petri contendo o meio MacConkey e incubou-se a 37°C por 3 dias. Observou-se crescimento indicando resultado positivo. Esse é um meio seletivo para crescimento de bactérias Gram negativas e possui cristal violeta e misturas de sais biliares em sua composição.



- **Crescimento em 1% de glicina** – adicionou-se uma alçada da cultura em tubos contendo meio Bolton semi-sólido adicionado de 0,01% de citrato de sódio e 1% de glicina. Incubou-se a 37°C por três dias e observou-se o crescimento indicando resultado positivo.
  
- **Teste da utilização da glicose** – dois tubos contendo meio OF, um contendo 1% de uma solução de glicose a 10% e outro não, foram inoculados com uma alçada da cultura. Incubou-se a 37°C por cinco dias. *Campylobacter* spp não fermenta nem oxida a glicose ou qualquer outro açúcar, portanto não há alteração na coloração dos tubos.
  
- **Crescimento a 3,5% de NaCl** - uma alçada da cultura foi inoculada em tubos contendo meio Bolton semi-sólido adicionado de 0,01% de citrato de sódio (Reagen) e 3,5% de cloreto de sódio (Merck). Incubou-se a 37°C por três dias. E observou-se a ocorrência ou não de crescimento. Nenhum *Campylobacter* spp cresce na presença de 3,5% desse sal.

#### 4.10 Análise estatística dos resultados

A estimativa da população de *Campylobacter* realizada pelo método do NMP foi avaliada através de média, desvio-padrão, mediana e outras técnicas de estatística descritiva. Para a comparação entre os três tipos de substratos utilizados, tempo de incubação e concentrações de inóculo, foram utilizados os testes não paramétricos (devido aos dados não apresentarem distribuição normal) de Mann Whitney ou Kruskal Wallis seguido de Mann Whitney quando existiam mais de duas categorias a serem testadas. Foram realizados gráficos do tipo Box-Plot para ilustrar as comparações realizadas que apresentaram diferença estatisticamente significativa (ALTMAN, 1991).

Para os métodos qualitativos (BAM, ELISA e ELFA) foi utilizada inicialmente a distribuição de frequências (n), além de Sensibilidade, Especificidade, Valor Preditivo Positivo e Valor Preditivo Negativo para cada comparação entre as metodologias de interesse. O nível de significância assumido para o trabalho foi de 5%, portanto foi aceito como significativo valor de p menores que 0,05 (ALTMAN, 1991).

## 5 Resultados e Discussão

### 5.1 Contagem de mesófilos e psicrotrófilos aeróbios totais em leite tipo C e leite tipo UHT

Foi verificada a ausência de psicrotrófilos aeróbios nas amostras de leite tipo C e leite UHT analisadas. Quanto à análise de mesófilos aeróbios totais, verificou-se ausência nas amostras de leite tipo UHT e presença nos leites tipo C. As contagens, em UFC/mL são mostradas na tabela 1.

**Tabela 1** – Contagem de mesófilos aeróbios totais de leite tipo C.

<i>Número da repetição</i>	<i>Leite tipo C utilizado para posterior inoculação de C. jejuni</i>	<i>Contagem de mesófilos aeróbios - UFC/mL</i>
33	Leite C – marca F	$9,9 \times 10^3$
34	Leite C – marca F	$6,4 \times 10^3$
35	Leite C – marca F	$1,66 \times 10^4$
36	Leite C – marca F	$1,58 \times 10^4$
37	Leite C – marca G	$1,74 \times 10^4$
38	Leite C – marca G	$6,7 \times 10^4$
39	Leite C – marca G	$1,18 \times 10^4$
40	Leite C – marca G	$1,01 \times 10^5$
41	Leite C – marca F	$1,12 \times 10^4$
42	Leite C – marca F	$8,3 \times 10^3$
43	Leite C – marca F	$9,4 \times 10^3$
44	Leite C – marca F	$1,01 \times 10^4$
45	Leite C – marca G	$1,41 \times 10^4$
46	Leite C – marca G	$1,46 \times 10^4$
47	Leite C – marca G	$1,22 \times 10^4$
48	Leite C – marca G	$1,22 \times 10^4$

As contagens de mesófilos aeróbios variaram de  $6,4 \times 10^3$  a  $1,01 \times 10^5$  nas 16 amostras de leite tipo C analisadas, estando de acordo com a contagem estabelecida pela legislação brasileira, ou seja, as contagens de bactérias aeróbias mesófilas em leite pasteurizado tipo C não devem exceder  $3 \times 10^5$  UFC/mL (BRASIL, 1997).

Este trabalho não encontrou nenhuma amostra de leite tipo C com contaminação acima do permitido pela legislação brasileira, diferentemente dos resultados obtidos em São José do Rio Preto – SP por HOFFMANN et al. (1999) que encontraram apenas uma amostra de leite C, das 14 analisadas, acima do estabelecido pela legislação, variando de  $3,5 \times 10^1$  a  $4,8 \times 10^5$ . No Estado do Rio de Janeiro CORDEIRO et al. (2002) encontraram em algumas amostras desse tipo de leite contagens acima dos padrões legislativos, variando de  $1,5 \times 10^5$  a  $1,5 \times 10^6$ . Noventa e oito amostras de leite C foram analisadas no Rio Grande do Sul, sendo que 1,14% destas apresentavam contagens de mesófilos aeróbios acima de  $3 \times 10^5$  UFC/mL (TIMM et al., 2003). CARDOSO e ARAÚJO (2003) verificaram que 4% das 98 amostras de leite tipo C, analisadas no Distrito Federal, também estavam acima dos padrões da legislação brasileira, sendo consideradas insatisfatórias quanto às condições de higiene.

## **5.2 Comportamento de *Campylobacter jejuni* nos diferentes tempos de incubação, concentração de inóculo e substratos utilizados**

Os resultados das análises microbiológicas para detecção e isolamento de *C. jejuni* realizadas durante o experimento, assim como os valores percentuais, podem ser visualizados nos quadros de números 1 a 6 no anexo A. No anexo C, encontram-se explicações sobre a estatística utilizada para comparação das metodologias.

De acordo com a tabela 2 não houve diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ) entre as marcas A e B utilizadas para os testes em leite UHT e nem entre F e G utilizadas para leite C. Portanto, podemos considerá-las homogêneas, não sendo um ponto de interferência nas análises.

**Tabela 2** – Comparação do NMP de *C. jejuni* nas diferentes marcas utilizadas para leite C e leite UHT.

Tempo de incubação	Concentração de inóculo	Tipo de substrato	Marcas	Valor -p
24	1.5x10 <sup>3</sup>	Leite UHT	A X B	0.0646
	1.5x10 <sup>2</sup>	Leite UHT	A X B	1.0000
48	1.5x10 <sup>3</sup>	Leite UHT	A X B	0.0646
	1.5x10 <sup>2</sup>	Leite UHT	A X B	0.8873
24	1.5x10 <sup>3</sup>	Leite C	F X G	0.4098
	1.5x10 <sup>2</sup>	Leite C	F X G	1.0000
48	1.5x10 <sup>3</sup>	Leite C	F X G	0.5263
	1.5x10 <sup>2</sup>	Leite C	F X G	1.0000

Teste de Mann Whitney

Pode-se observar, analisando a tabela 3, que houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) ao comparar o número mais provável de *Campylobacter jejuni* nos três diferentes substratos, nos diferentes tempos de incubação e concentrações de inóculo. De acordo com os resultados obtidos, demonstrados na tabela 4, o meio de cultura não apresentou diferença estatística em relação ao leite UHT ( $p > 0,05$ ), mas diferiu estatisticamente quando comparado ao leite C, em todas as condições de tempo de incubação e concentração de inóculo. A relação leite UHT x leite C também apresentou diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) (Gráficos 1, 2, 3 e 4).

**Tabela 3** – Comparação do NMP de *C. jejuni* nos três diferentes tipos de substratos utilizados para análise.

Tempo de incubação	Concentração	Tipo de substrato	Valor -p
--------------------	--------------	-------------------	----------

<b>incubação</b>	<b>de inóculo</b>		
24	1.5x10 <sup>3</sup>	Meio* X UHT X leite C	0.0025
	1.5x10 <sup>2</sup>	Meio* X UHT X leite C	0.0001
48	1.5x10 <sup>3</sup>	Meio* X UHT X leite C	0.0002
	1.5x10 <sup>2</sup>	Meio* X UHT X leite C	0.0002

Teste de Kruskal Wallis

\*Meio = Caldo Bolton

O leite C apresentou contagem total de mesófilos aeróbios variando de  $6,4 \times 10^3$  até  $1,01 \times 10^5$  (tabela 1), antes da inoculação de *C. jejuni*. Essa microbiota natural do leite tipo C pode influenciar no crescimento e comportamento de *C. jejuni*, pois compostos resultantes do metabolismo desses microrganismos podem ser tóxicos para o microrganismo inoculado, além de este ser mal competidor, uma vez que não estava em condições ideais para seu crescimento, ou seja, a incubação ocorreu à temperatura de 7°C, em atmosfera normal. Dessa maneira, o NMP quando utilizado o leite C como substrato foi bastante baixo ou não se conseguiu o isolamento, pois provavelmente os campilobacteres inoculados não sobreviveram em quantidades viáveis para serem detectados pela metodologia, além da interferência de outras bactérias durante a análise.

**Tabela 4** – Comparação do NMP de *C. jejuni* nos três diferentes tipos de substratos, comparados dois a dois.

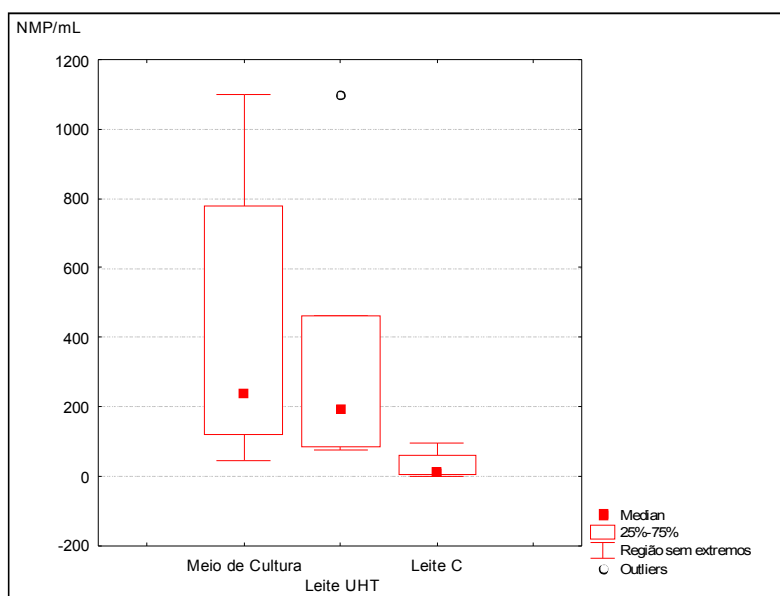
<b>Tempo de incubação</b>	<b>Concentração de inóculo</b>	<b>Tipo de substrato</b>	<b>Valor -p</b>
---------------------------	--------------------------------	--------------------------	-----------------

24	1.5x10 <sup>3</sup>	Meio* X UHT	0.7153
		Meio* X Leite C	0.0088
		UHT X Leite C	0.0135
48	1.5x10 <sup>2</sup>	Meio* X UHT	0.0679
		Meio* X Leite C	0.0030
		UHT X Leite C	0.0029
24	1.5x10 <sup>3</sup>	Meio* X UHT	0.1223
		Meio* X Leite C	0.0048
		UHT X Leite C	0.0042
48	1.5x10 <sup>2</sup>	Meio* X UHT	0.1323
		Meio* X Leite C	0.0030
		UHT X Leite C	0.0030

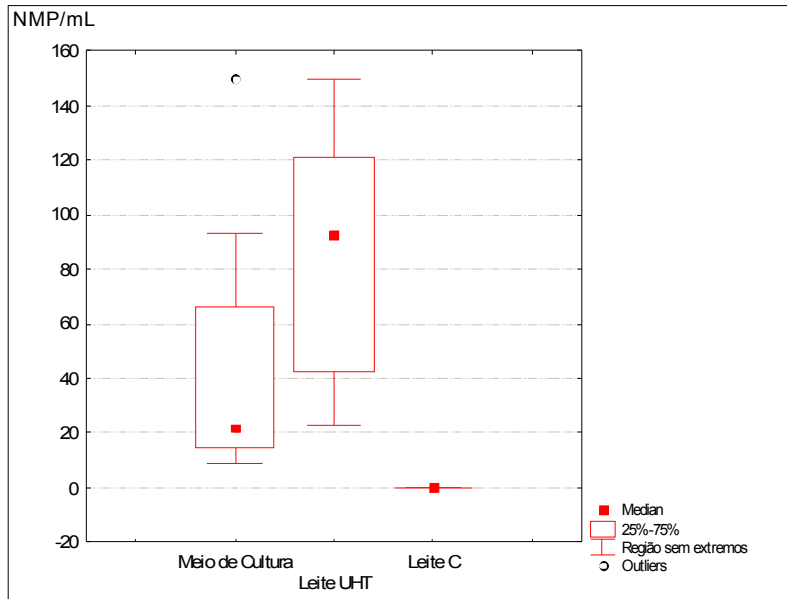
---

Teste de Mann Whitney  
\*Meio = Caldo Bolton

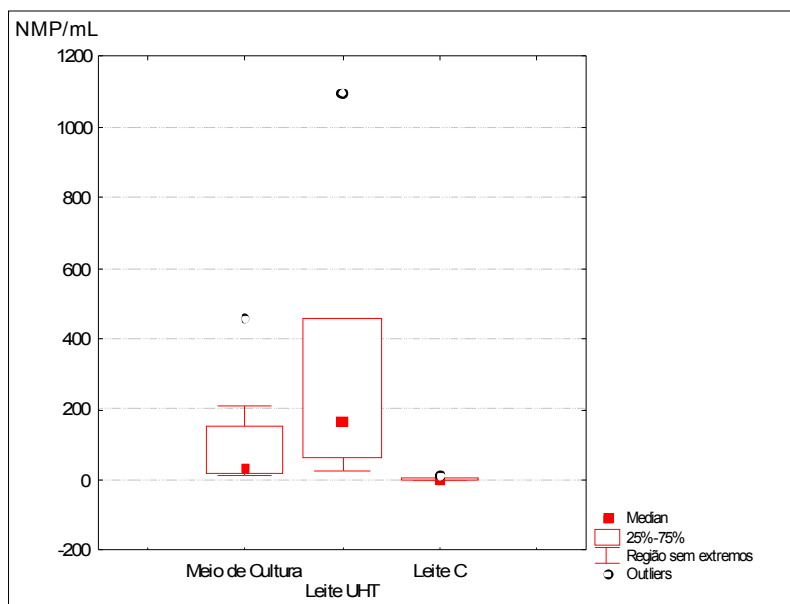
**Gráfico 1** – Isolamento de *Campylobacter jejuni* pela técnica do NMP nos diferentes substratos utilizados, na concentração 1,5x10<sup>3</sup> após 24 horas de incubação.



**Gráfico 2** – Isolamento de *Campylobacter jejuni* pela técnica do NMP nos diferentes substratos utilizados na concentração  $1,5 \times 10^2$  após 24 horas de incubação.

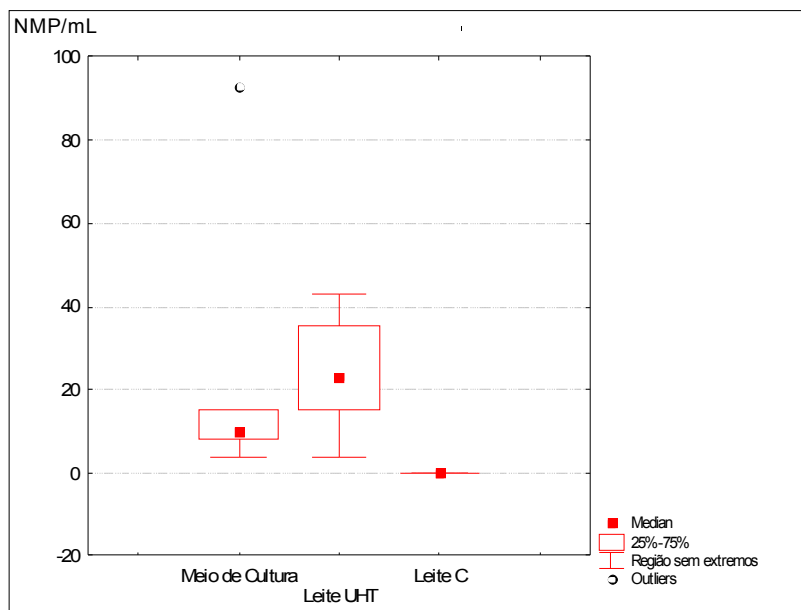


**Gráfico 3** – Isolamento de *Campylobacter jejuni* pela técnica do NMP nos diferentes substratos utilizados na concentração  $1,5 \times 10^3$  após 48 horas de incubação.





**Gráfico 4** – Isolamento de *Campylobacter jejuni* pela técnica do NMP nos diferentes substratos utilizados na concentração  $1,5 \times 10^2$  após 48 horas de incubação.



Comparando-se a percentagem do número mais provável de *C. jejuni* nas diferentes concentrações de inóculo ( $1,5 \times 10^2$  e  $1,5 \times 10^3$ ) para cada tipo de substrato, nos diferentes tempos de incubação (tabela 5), verificou-se que somente no leite C, nas análises realizadas após 24 horas de incubação em câmara de refrigeração houve diferença significativa ( $p=0,0124$ ) (Gráfico 5). No leite UHT e no meio de cultura não foram encontradas diferenças significativas entre os inóculos utilizados.

**Tabela 5** – Comparação de percentagem do NMP de *C. jejuni* nas diferentes concentrações de inóculo para cada tipo de substrato utilizado.

Tempo de incubação	Tipo de substrato	Concentração de inóculo	Valor -p
--------------------	-------------------	-------------------------	----------

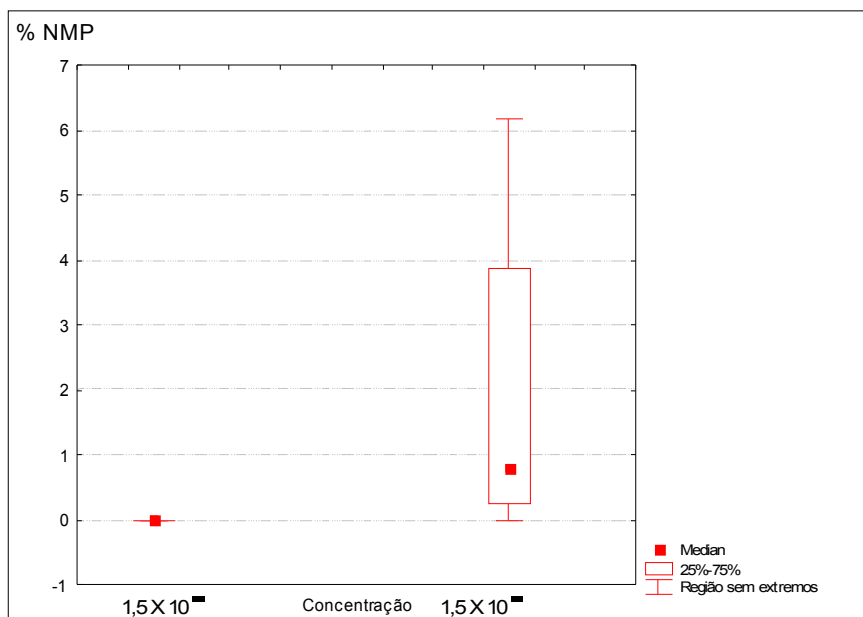
24	Caldo Bolton	$1,5 \times 10^3 \times 1,5 \times 10^2$	0.9586
	UHT	$1,5 \times 10^3 \times 1,5 \times 10^2$	0.0696
	Leite C	$1,5 \times 10^3 \times 1,5 \times 10^2$	0.0124
48	Caldo Bolton	$1,5 \times 10^3 \times 1,5 \times 10^2$	0.2084
	UHT	$1,5 \times 10^3 \times 1,5 \times 10^2$	0.9587
	Leite C	$1,5 \times 10^3 \times 1,5 \times 10^2$	0.0963

---

Teste de Mann Whitney

A baixa concentração de inoculo ( $1,5 \times 10^2$ ) aliado à competição gerada no leite C pelos microrganismos da microbiota natural, impediu a recuperação de *C. jejuni*, não sendo possível o seu isolamento a partir desse substrato nos dois tempos de incubação utilizados. Enquanto que na concentração  $1,5 \times 10^3$ , ou seja, maior quantidade de microrganismos inoculados, as chances de sobrevivência de *C. jejuni* foram maiores, facilitando a sua recuperação, mesmo que em quantidades pequenas (Gráfico 5).

**Gráfico 5** – Isolamento de *Campylobacter jejuni* pela técnica do NMP nas diferentes concentrações  $1,5 \times 10^2$  e  $1,5 \times 10^3$ , em leite C, após 24 horas de incubação.



Os tempos de incubação em câmara de refrigeração a 7°C (24 e 48 horas) utilizados no experimento, não influenciaram na percentagem do número mais provável de *C. jejuni* encontrado nos leites C e UHT (tabela 6), porém, no meio de cultura houve diferença estatisticamente significativa ( $p=0,006$ ) entre 24 e 48 horas de incubação.

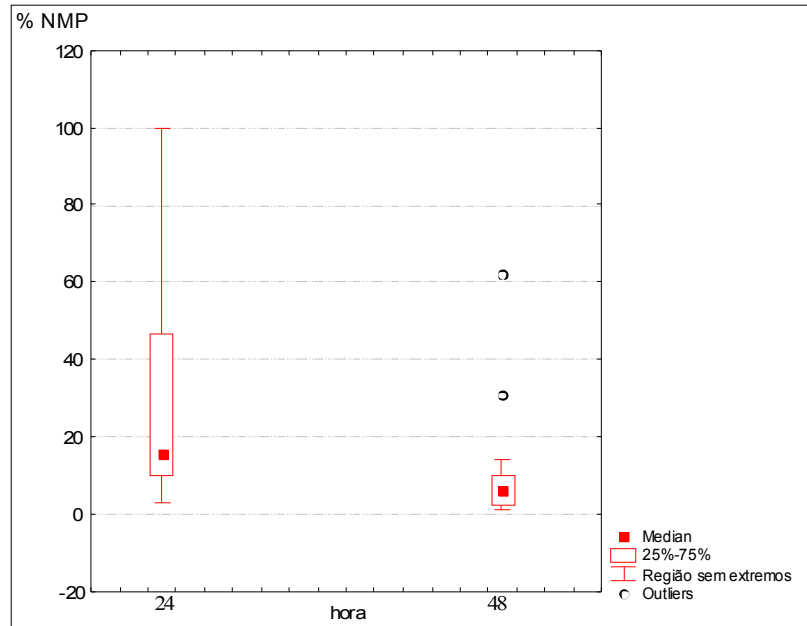
**Tabela 6** – Comparação de percentagem da estimativa do NMP de *C. jejuni* nos diferentes tempos de incubação utilizados para cada tipo de substrato utilizado.

<b>Tipo de substrato</b>	<b>Tempo de incubação</b>	<b>Valor -p</b>
Caldo Bolton	24 X 48	0.0060
UHT	24 X 48	0.0706
Leite C	24 X 48	0.1638

## Teste de Mann Whitney

O meio de cultura é uma mistura de nutrientes necessários ao crescimento microbiano, contém a fonte de energia e todos os elementos imprescindíveis à vida das células, ou seja, proporcionam condições perfeitas para o crescimento do microrganismo em questão. Quando a bactéria é inoculada, utiliza os nutrientes para manutenção e multiplicação. Após 24 horas, esses nutrientes tornam-se escassos e os microrganismos diminuem gradualmente a velocidade de multiplicação até que se anule. Sendo assim, após 48 horas a percentagem de isolamento de *Campylobacter jejuni* pelo método do NMP ocorre com mais dificuldade, ocasionando a diferença estatística significativa encontrada entre os tempos de incubação utilizados.

**Gráfico 6** – Isolamento de *Campylobacter jejuni* pela técnica do NMP nos diferentes tempos de incubação (24 e 48 horas), em meio de cultura.



### 5.3 Comparação das metodologias utilizadas

O método para detecção e isolamento de *Campylobacter* sp pelo BAM foi considerado como padrão ouro por ser uma metodologia oficialmente padronizada, preconizada pelo FDA. Quando comparados com esse método, a técnica do NMP e o ELFA apresentaram maior acerto geral (eficácia=96,9%) que o método ELISA (eficácia=93,8%), nas análises em que o meio de cultura foi utilizado como substrato (tabela 7). Para prever a positividade as três metodologias utilizadas obtiveram o mesmo acerto (VPP=96,9% e 96,8%). Pode-se dizer também que a sensibilidade, ou seja, a proporção de verdadeiros positivos foi de 100% para o método ELFA e técnica do NMP e de 96,8% para o método ELISA, revelando uma proporção de 3,2% de falsos negativos para esse método.

**Tabela 7** – Comparação das metodologias ELFA, ELISA e NMP com a metodologia do BAM, no meio de cultura.

Meio de Cultura	BAM		TOTAL	VPP	VPN	Sens	Espec	Eficácia	
	Positivo n	Negativo n							
ELFA	Positivo	31	1	32	96.9	não calc.	100.0	0.0	96.9
	Negativo	0	0	0					
	<b>Total</b>	<b>31</b>	<b>1</b>	<b>32</b>					
ELISA	Positivo	30	1	31	96.8	0.0	96.8	0.0	93.8
	Negativo	1	0	1					
	<b>Total</b>	<b>31</b>	<b>1</b>	<b>32</b>					
NMP	Positivo	31	1	32	96.9	não calc.	100.0	0.0	96.9
	Negativo	0	0	0					
	<b>Total</b>	<b>31</b>	<b>1</b>	<b>32</b>					

Quando o substrato utilizado para análise foi o leite UHT (tabela 8), o teste que apresentou maior acerto geral foi a técnica do NMP (eficácia = 100%), enquanto o método ELISA apresentou 90,6% e o ELFA 87,5% de acerto geral. As três metodologias obtiveram 100% de acerto para prever a positividade, mas a técnica do NMP foi pouco mais sensível, revelando uma proporção de 100% verdadeiro positivo, enquanto que o método ELISA obteve 90,6%, ou seja, 9,4% de falsos negativos e o ELFA 87,5%, revelando 12,5% de falsos negativos.

**Tabela 8** – Comparação das metodologias ELFA, ELISA e NMP com a metodologia do BAM, no leite UHT.

Leite UHT	BAM		TOTAL	VPP	VPN	Sens	Espec	Eficácia
	Positivo n	Negativo n						
<b>ELFA</b>	Positivo	28	28	100. 0	0.0	87.5	não calc.	87.5
	Negativo	4	4					
	<b>Total</b>	<b>32</b>	<b>0</b>	<b>32</b>				
<b>ELISA</b>	Positivo	29	29	100. 0	0.0	90.6	não calc.	90.6
	Negativo	3	3					
	<b>Total</b>	<b>32</b>	<b>0</b>	<b>32</b>				
<b>NMP</b>	Positivo	32	32	100. 0	não calc.	100.0	não calc.	100.0
	Negativo	0	0					
	<b>Total</b>	<b>32</b>	<b>0</b>	<b>32</b>				

Por fim, quando utilizado o leite tipo C (tabela 9) o método ELFA apresentou um maior acerto geral (81,3%), mas para prever a positividade a técnica do NMP obteve maior acerto (VPP=100%). Nesse caso, para prever a negatividade, apesar de baixo valor, a técnica do NMP também obteve maior acerto (VPN = 17,4%). Apesar disso, a sensibilidade foi de apenas 32,1%, ou seja, foi encontrado um alto percentual (67,9%) de falsos negativos. O acerto geral (eficácia) do método ELISA foi de 75% e da técnica do NMP foi de 40,6%.

**Tabela 9** – Comparação das metodologias ELFA, ELISA e NMP com a metodologia do BAM, no leite C.

Leite C	BAM		TOTAL	VPP	VPN	Sens	Espec	Eficácia	
	Positivo n	Negativo n							
ELFA	Positivo	26	4	30	86.7	0.0	92.9	0.0	81.3
	Negativo	2	0	2					
	<b>Total</b>	<b>28</b>	<b>4</b>	<b>32</b>					
ELISA	Positivo	24	4	28	85.7	0.0	85.7	0.0	75.0
	Negativo	4	0	4					
	<b>Total</b>	<b>28</b>	<b>4</b>	<b>32</b>					
NMP	Positivo	9	0	9	100.0	17.4	32.1	100.0	40.6
	Negativo	19	4	23					
	<b>Total</b>	<b>28</b>	<b>4</b>	<b>32</b>					

De um modo geral (tabela 10), podemos dizer que, em relação ao método para detecção e isolamento de *Campylobacter* sp do BAM, a metodologia que apresentou maior acerto geral foi a ELFA com 88,5% de eficácia, seguido do método ELISA com 86,5% e da técnica do NMP com 79,2%. Para prever tanto a positividade (VPP = 98,6%) quanto à negatividade (VPN = 17,4%) a técnica do NMP apresentou maior acerto. Entretanto o método ELFA foi mais sensível (93,4%) apresentando menor valor de falsos negativos (6,6%) e a técnica do NMP a mais específica, pois obteve uma proporção de verdadeiros negativos de 80,0%, revelando assim 20,0% de falsos positivos, demonstrando ser inferior às outras metodologias utilizadas para isolamento de *C. jejuni*.

**Tabela 10** – Comparação das metodologias ELFA, ELISA e NMP com a metodologia do BAM.



		FDA		TOTAL	VPP	VPN	Sens	Espec	Eficácia
		Positivo n	Negativo n						
<b>ELFA</b>	Positivo	85	5	90	94,4	0.0	93,4	0.0	88,5
	Negativo	6	0	6					
	<b>Total</b>	<b>91</b>	<b>5</b>	<b>96</b>					
<b>ELISA</b>	Positivo	83	5	88	94,3	0.0	91,2	0.0	86,5
	Negativo	8	0	1					
	<b>Total</b>	<b>91</b>	<b>5</b>	<b>96</b>					
<b>NMP</b>	Positivo	72	1	73	98,6	17,4	79,1	80,0	79,2
	Negativo	19	4	23					
	<b>Total</b>	<b>91</b>	<b>5</b>	<b>96</b>					

Comparando-se as duas metodologias baseadas em reações imunoenzimáticas utilizadas podemos dizer que a concordância entre elas foi de 96,9% no meio de cultura havendo apenas uma análise discordante (tabela 11). Devido a nenhum dos dois métodos serem considerados padrão ouro, não é possível dizer qual dos dois obteve o resultado correto. No leite UHT a concordância foi de 90,6% , havendo três análises discordantes (tabela 12) e no leite tipo C o acerto entre as metodologias foi de 93,8%, sendo encontrada duas análises discordantes (tabela 13). No geral, houve um acerto de 93,8% entre as metodologias, sendo que seis análises foram discordantes (tabela 14).

**Tabela 11** – Comparação entre as metodologias imunoenzimáticas ELFA e ELISA, no meio de cultura.

Meio de Cultura	ELISA		TOTAL	VPP	VPN	Sens	Espec	Eficácia
	Positivo n	Negativo n						

<b>ELFA</b>	Positivo	31	1	32	96.9	não calc.	100.0	0.0	96.9
	Negativo	0	0	0					
	<b>Total</b>	<b>31</b>	<b>1</b>	<b>32</b>					

**Tabela 12** – Comparação entre as metodologias imunoenzimáticas ELFA e ELISA, no leite UHT.

Leite UHT	ELISA		TOTAL	VPP	VPN	Sens	Espec	Eficácia
	Positivo n	Negativo n						
Positivo	27	1	28	96.4	50.0	93.1	66.7	90.6
Negativo	2	2	4					
<b>Total</b>	<b>29</b>	<b>3</b>	<b>32</b>					

**Tabela 13** – Comparação entre as metodologias imunoenzimáticas ELFA e ELISA, no leite C.

Leite C	ELISA		TOTAL	VPP	VPN	Sens	Espec	Eficácia
	Positivo n	Negativo n						
Positivo	28	2	30	93.3	100.0	100.0	50.0	93.8
Negativo	0	2	2					
<b>Total</b>	<b>28</b>	<b>4</b>	<b>32</b>					

**Tabela 14** – Comparação entre as metodologias imunoenzimáticas ELFA e ELISA.

	ELISA		TOTAL	VPP	VPN	Sens	Espec	Eficácia
	Positivo n	Negativo n						

	Positivo	86	4	90	95,6	66,7	97,7	50,0	93,8
<b>ELFA</b>	Negativo	2	4	6					
	<b>Total</b>	<b>88</b>	<b>8</b>	<b>96</b>					

A metodologia descrita pelo BAM é uma técnica convencional um tanto laboriosa, em que é necessário no mínimo oito dias para a obtenção de um resultado, além da necessidade de grande quantidade de vidraria e preparação de meio de cultura, porém é uma metodologia oficial, preconizada por órgão competente, o FDA.

O teste do NMP é extremamente laborioso, pois utiliza maior quantidade de vidraria e meios de cultura, requerendo tempo para a preparação e execução das análises. O resultado também é demorado, sendo obtido em aproximadamente oito dias.

Por outro lado, as metodologias envolvendo reações de antígeno – anticorpo são técnicas mais rápidas e suficientemente seguras quando comparadas com as tradicionais. O resultado é obtido em aproximadamente quatro dias, pois a confirmação dos resultados positivos ainda se faz necessária, isolando-se o microrganismo em meios de cultura seletivos e realizando-se a série bioquímica.

O método ELISA da TECRA é baseado em reações imunoenzimáticas que possui como facilidade o fato de não ser preciso o uso de jarras para atmosfera microaerófila para incubação, porém esta é uma técnica realizada manualmente o que facilita a contaminação ou erro de realização e interpretação dos resultados da análise.

Outro método imunoenzimático utilizado foi o ELFA (mini VIDAS, bioMérieux) que apesar de a etapa de enriquecimento ser realizada em incubação

com microaerofilia, a partir do momento em que a amostra é colocada no equipamento mini VIDAS, não há o contato do manipulador, diminuindo assim, os riscos de erros durante as análises.

Para a escolha da metodologia a ser empregada, deve-se levar em conta também o custo das análises. O maior problema ainda no caso do método ELFA, é o custo do equipamento mini VIDAS, imprescindível para a realização das análises, pois o custo dos kits, tanto da TECRA, quanto do mini VIDAS são praticamente iguais. Cabe ressaltar que todas as metodologias utilizadas no experimento são consideradas de alto custo, pois tanto os meios de cultura quanto os reagentes e antibióticos utilizados são caros.

Este é talvez o primeiro estudo realizado no Brasil apresentando comparações entre diferentes metodologias de detecção de *Campylobacter* sp, principalmente dos métodos que envolvem reações imunoenzimáticas, sendo encontrado apenas o relato de um estudo realizado por NESBAKKEN et al. (2002), na Noruega, que comparou os métodos de PCR (Reação de Polimerase em Cadeia) (BUGS'n BEADS), o ELISA (VIDAS CAM) e o método tradicional de isolamento do Nordic Committee on Food Analysis (NCFA) e verificou que não houve diferença estatística entre eles.

## 6 Conclusão

- As amostras de leite C e UHT analisadas apresentaram-se de acordo com a legislação brasileira para contagem de psicrófilos e mesófilos aeróbios totais.
- A microbiota natural do leite tipo C influenciou no isolamento e estimativa da população de *Campylobacter jejuni*, principalmente quando inoculado em menor concentração.
- Das metodologias utilizadas a técnica do NMP demonstrou ser de qualidade inferior às outras três metodologias.
- As metodologias baseadas em reações imunoenzimáticas demonstraram resultados semelhantes à metodologia preconizada pelo FDA, portanto podem ser utilizadas para reduzir o tempo de análise, desde que os resultados sejam confirmados pelo isolamento em meios de cultura seletivos tradicionais.

## 7 Referências Bibliográficas \*

AFSSA. **Apréciation des risques alimentaires liés aux campylobacters.**

Application au couple poulet / *Campylobacter jejuni*. Disponível em:

<<http://www.afssa.fr/Ftp/Afssa/22174-22175.pdf>>. Acesso em: 11 ago. 2004.

ALLOS, B. M. Association between *Campylobacter* infection and Guillain-Barré syndrome. **The Journal of Infectious Disease**, v. 176, p. S125-S128, 1997.

(Suplemento 2).

ALMEIDA, P. F. **Ocorrência de *Campylobacter fetus* subspécie *jejuni* em carcaças de frangos, suínos e bovinos.** Campinas, 1984. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade estadual de Campinas.

ALTMAN, D.G. **Practical Statistics for Medical Research.** London: Chapman and Hall, 1991. 661p.

ALTEKRUSE, S. F.; STERN, N.; FIELDS, P. I.; SWERDLOW, D. L.

*Campylobacter jejuni* – an emerging foodborne pathogen. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, n. 1, jan./fev. 1999.

APHA – American public Health Association. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** DOWNES, F. P.; ITO, K. (ed.). 4ª ed.

Washington, D. C., 2001. 600 p.

AQUINO, M. H. C.; FRANCO, R. M.; TIBANA, A. *Campylobacter jejuni* na avicultura: importância e métodos de controle. **Higiene Alimentar**, v. 9, n. 36, p. 17-19, mar./abr. 1995.

\* De acordo com a NBR 6023/200 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas.  
AQUINO, M. H. C. FILGUEIRAS, A. L. L.; FERREIRA, M. C. S.; OLIVEIRA, S. S.; BASTOS, M. C.; TIBANA, A. Antimicrobial resistance and plasmid profiles of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from human and animal sources. **Letters in Applied Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 149-153, 2002.

BAD BUG BOOK. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. ***Campylobacter jejuni***. Disponível em:  
<<http://cfsan.fda.gov/~mow/chap4.html>>. Acesso em: 04 mar. 2002.

BEUMER, R. R.; VRIES, J.; ROMBOUTS, F. M. *Campylobacter jejuni* non-culturable coccoid cells. **International Journal of Food Microbiology**, v. 15, n.1/2, p. 153-163, 1992.

BIOLAB Mérieux. **Manual mini VIDAS**. Jacarepaguá: Design gráfico da Crazy World Design, [s.d.]. 69 p.

BLACK, R. E.; LEVINE, M. M.; CLEMENTS, M. L.; HUGHES, T.P.; BLASER, M. J. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. **Journal of Infectious Diseases**, v. 157, n. 3, p. 472-479, 1988.

BOLTON, F. J.; SUEMAN, S. B. MARTIN, K.; WAREING, D. R.; HUMPHREY, T. J. presence of *Campylobacter* and *Salmonella* in sand from bathing beaches. **Epidemiology and Infection**, v. 122, n. 1, p. 7-13, 1999.

BORCK, B.; STRYHN, A. K.; ERBOLL, A. K.; PEDERSEN, K. Thermophilic *Campylobacter* spp. in turkey samples: evaluation of two automated enzyme immunoassays and conventional microbiological techniques. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n. 3, p. 574-582, mar. 2002.

BOVILL, R. A.; MACKEY, B.M. Resuscitation of 'non-culturable' cells from aged cultures of *Campylobacter jejuni*. **Microbiology**, v. 143, p. 1575-1581, maio 1997.

BRASIL. Leis, decretos, resoluções, portarias. Portaria n. 451 de 19 de setembro de 1997, da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Aprova o regulamento técnico princípios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos e seus anexos I, II e III. **Diário Oficial**, Brasília, 22 set. 1997, seção I, p. 21005-21012.

BUTZLER, J. P.; OOSTEROM, J. *Campylobacter*: pathogenicity and significance in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 1-8, jan. 1991.

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

BUYSER, M. L.; DUFOUR, B.; MAIRE, M. LAFARGE, V. Implication of milk and milk products in food-borne disease in France and in different industrialised countries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, n. 1/2, p. 1-17, jul. 2001.

CARDOSO, L.; ARAÚJO, W. M. C. Parâmetros de qualidade em leites comercializados no distrito federal no período de 1997-2001. **Higiene Alimentar**, v. 17, n. 114/115, p. 34-40, nov./dez. 2003.

CARVALHO, A. C. F. B. Determinação no NMP de *Campylobacter* sp em vísceras comestíveis de frangos resfriados. **Higiene Alimentar**, v. 12, n. 55, p. 63-65, maio/jun. 1998.

CCDR. Canada communicable disease report. Human ***Campylobacter* cases**. Disponível em: <[http://www.hc-sc.gc.ca/pphb-dgspsp/publicat/ccdr-rmtc/03vol29/29s1/29s1\\_4e.html](http://www.hc-sc.gc.ca/pphb-dgspsp/publicat/ccdr-rmtc/03vol29/29s1/29s1_4e.html)>. Acesso em: 10 nov. 2003.



CDC. Center for Disease Control and Prevention. Division of Bacterial and Mycotic Diseases. **Apresenta textos sobre *Campylobacter***. Disponível em: <[http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/campylobacter\\_g.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/campylobacter_g.htm)>. Acesso em: 23 abr. 2002a.

CDC. Center for Disease Control and Prevention. 2000 FOODNET Annual Report. **Apresenta dado sobre casos de doenças transmitidas por alimentos**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/foodnet/annual/2000table/2a.htm>>. Acesso em: 27 set. 2002b.

CHRISTOPHER, F. M.; SMITH, G. C.; VANDERZANTI, C. Examination of poultry giblets, raw milk and meat for *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*. **Journal of Food protection**, v.45, n. 3, p. 260-262, fev. 1982.

COKER, A. O.; ISOKPEHI, R. D.; THOMAS, B. N.; AMISU, K. O.; OBI, C. L. Human campylobacteriosis in developing countries. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 3, p. 237-243, mar. 2002.

COKER, A. O.; ADEFESO, A. O. The changing patterns of *Campylobacter jejuni* / *coli* in Lagos, Nigeria after ten years. *East African Medical Journal*, v. 71, p. 437-440, 1994. In: COKER, A. O.; ISOKPEHI, R. D.; THOMAS, B. N.; AMISU, K. O.; OBI, C. L. Human campylobacteriosis in developing countries. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 3, p. 237-243, mar. 2002.

CORDEIRO, C. A. M.; CARLOS, L. A.; MARTINS, M. L. L. Qualidade microbiológica de leite pasteurizado tipo C, proveniente de micr-usinas de Campos dos Goytacazes, RJ. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 92/93, p. 41-44, jan./fev. 2002.

CORRY, J. E. L.; ATABAY, H. I. Poultry as a source of *Campylobacter* and related organisms. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 96S-114S, jun. 2001. (Suplemento 6).

CVE - Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. **Surtos de doenças transmitidas por alimentos notificados ao CVE, Estado de São Paulo, 1997.** Disponível em:  
<[http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/DTA\\_TAB197.htm](http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/DTA_TAB197.htm)>. Acesso em: 17 jun. 2002.

CVE - Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. **Surtos de doenças transmitidas por água e alimentos notificados à Divisão de DDTHA – CVE/SES-SP por semana epidemiológica, DIR e município – Estado de São Paulo – ano 2001.** Disponível em:  
<[ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc\\_tec/hidrica/Surto\\_DTA01.xls](ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/Surto_DTA01.xls)>. Acesso em: 03 mar. 2003a.

CVE - Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. **Surtos de doenças transmitidas por água e alimentos notificados à Divisão de DDTHA – durante o ano de 2003 por semana epidemiológica e município – Dados preliminares.** Disponível em:  
<[ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc\\_tec/hidrica/Surto\\_DTA01.xls](ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/Surto_DTA01.xls)>. Acesso em: 12 nov. 2003b.

DOIG, P.; YAO, R. J.; BURR, D. H.; GUERRY, P.; TRUST, T. J. An environmentally regulated pilus-like appendage involved in *Campylobacter* pathogenesis. **Molecular Microbiology**, v. 20, n. 4, p. 885-894, maio 1996.

DOMÍNGUEZ, C.; GOMEZ, I.; ZUMALACÁRREGUI, J. Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in retail chicken meat in Spain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 72, n. 1/2, p. 165-168, jan. 2002.

DOYLE, M. P. *Campylobacter* in food. In: BUTZLER, J. P. ***Campylobacter infection in man and animals***. Boca Raton: CRC Press, 1984. Cap. 14. p. 163-180.

DOYLE, M. P.; SCHOENI, J. L. Isolation of *Campylobacter jejuni* from retail mushrooms. **Applied Environmental Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 449-450, fev. 1986.

ENGBERG, J.; NEIMANN, J.; NIELSEN, E. M.; AARESTRUP, F. M.; FUSSING, V. Infections in Denmark: Risk Factors and Clinical Consequences. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 6, p. 1056-1063, jun. 2004.

ERS. Economic Research Service U.S. Department of Agriculture. **Apresenta textos sobre economia de doenças transmitidas por alimentos**. Disponível em: <<http://ers.usda.gov/briefing/foodbornedisease/otherpathogens>>. Acesso em: 19 jun. 2002.

EVANS, M. R.; RIBEIRO, C. D.; SALMON, R. L. Hazards of healthy living: bottled water and salad vegetables as risk factors for *Campylobacter* infection. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 10, p. 1219-1225, out. 2003.

FENG, P. Rapid methods for detecting foodborne pathogens. In: Food and Drug Administration. **Bacteriological Analytical Manual**. 8ª ed. Gaithersburg: AOAC Internacional, 1995. v. 1.

FERNÁNDEZ, H.; GESCHE, W.; MONTEFUSCO, A.; SCHLATTER, R. Wild birds as reservoir of thermophilic enteropathogenic *Campylobacter* species in southern Chile. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 6, p. 699-700, nov./dez. 1996.

FERNÁNDEZ, H.; PISÓN, V. Isolation of thermotolerant species of *Campylobacter* from commercial chicken livers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 29, n. 1, p. 75-80, fev. 1996.

FERNÁNDEZ, H.; NETO, U. F.; OGATHA, S. Acute diarrhea associated with *Campylobacter jejuni* subsp. *doylei* in São Paulo, Brasil. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 16, n. 11, p. 1098-1099, nov. 1997.

FERNÁNDEZ, H.; MANSILLA, M.; GONZÁLEZ, V. Antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* assessed by E-test and double dilution agar method in southern Chile. . **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 2, p. 247-249, mar./abr. 2000.

FERNÁNDEZ, H.; TORRES, N. *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* en tres grupos de gallinas de diferente origen geográfico del sur de Chile. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 32, n. 2, p. 241-244, 2000.

FERNÁNDEZ, H. Família Campylobacteriaceae. In: TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. 3ª. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2002. Cap. 34. p. 255-262.

FERNÁNDEZ, H.; RODRIGUEZ, R.; BARUDI, C.; LOBOS, M. A case of acute diarrhea due to the emerging pathogen *Campylobacter jejuni* subsp *doylei* in southern Chile. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 52-54, jan./abr. 2003.

FOODNET. **Apresenta textos sobre doenças transmitidas por alimentos.**

Disponível em:

<[http://www.cdc.gov/foodnet/annual/2002/2002executive\\_summary.pdf](http://www.cdc.gov/foodnet/annual/2002/2002executive_summary.pdf)>. Acesso em: 05 out. 2004.

FOODSTANDARDS. **Measuring foodborne illness levels**. Disponível em: <[www.foodstandards.gov.uk/science/sciencetopics/microbiology/58736](http://www.foodstandards.gov.uk/science/sciencetopics/microbiology/58736)>. Acesso em: 25 abr. 2002.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**, Porto Alegre: Artmed, 2002. 424 p.

FRANCESCATO, R. F.; SEBASTIÃO, P. C. A.; SANTOS, H. H. P. dos. Frequência de patógenos emergentes relacionados com doenças transmitidas por alimentos em áreas selecionadas no estado de São Paulo – julho de 1998 a julho de 2000. **Revista Net – DTA**, n. 2, p. 45-53, jan. 2002.

FRANCO, B. D. G. M.; LANGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2003. 182 p.

FRICKER, C. R.; PARK, R. W. A. A two-year study of the distribution of 'thermophilic' campylobacters in human, environmental and food samples from the Reading area with particular reference to toxin production and heat-stable serotype. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, p. 477-490, 1989.

FROST, J. A. Current epidemiological issues in human campylobacteriosis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 85s-95s, jun. 2001. (Suplemento 6).

GILLESPIE, I. A.; O'BRIEN, S. J.; FROST, J. A.; ADAK, G. K.; HORBY, P.; SWAN, A. V.; PAINTER, M. J.; NEAL, K. R.; CAMPYLOBACTER SENTINEL SURVEILLANCE SCHEME COLLABORATORS. A case-case comparison of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* infection: a tool for generating hypotheses. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 937-942, set. 2002.

GRIFFIN, M. R.; DALLEY, E.; FITZPATRICK, M.; AUSTIN, S. H. Campylobacter gastroenteritis associated with raw clams. **Journal of Medical Association**, v. 80, p. 607-609, 1983.

GONÇALVES, P. M. R.; FRANCO, R. M. Avaliação de meios de enriquecimento para a pesquisa de *Campylobacter jejuni* em produtos de origem animal. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 98, p. 79-84, jul. 2002.

GUPTA, A.; NELSON, J. M.; BARRETT, T. J.; TAUXE, R. V.; ROSSITER, S. P.; FRIEDMAN, C. R.; JOYCE, K. W.; SMITH, K. E.; JONES, T. F.; HAWKINS, M. A.; SHIFERAW, B.; BEEBE, J. L.; VUGIA, D. J.; RABATSKY-EHR, T.; BENSON, J. A.; ROOT, T. P.; ANGULO, F. J. Antimicrobial resistance among *Campylobacter* strains, United States, 1997-2001. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 6, p. 1102-1109, jun. 2004.

HAJDENWURAL, J. R.; SOUZA, H. M. Avaliação do método SimPlate para contagem de coliformes totais e *E. coli* em leite fluido. **Indústria de laticínios**, v. 3, n. 18, p. 71-77, set./out. 1998.

HALD, B.; SKOVBGARD, H.; BANG, D. D.; PEDERSEN, K.; DYBDAHL, J.; JESPERSEN, J. B.; MADSEN, M. Flies and *Campylobacter* infection of broiler flocks. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 8, p. 1490-1492, ago. 2004.

HAVELAAR, A. H.; WIT, M. A. S.; KONINGSVELD, R. KEMPEN, E. Health burden in the Netherlands due to infection with thermophilic *Campylobacter* spp. **Epidemiology and Infection**, v. 125, n. 3, p. 505-522, 2000.

HEADRICK, M. L.; KORANGY, S.; BEAN, N. H.; ANGULO, F. J.; ALTEKRUSE, S. F.; POTTER, M. E.; KLONTZ, K. C. The epidemiology of raw milk – associated foodborne disease outbreaks reported in the United States, 1973 through 1992. **American Journal of Public Health**, v. 88, n. 8, p. 1219-1221, ago. 1998.

HEIN, I.; SCHNECK, C.; KNOGLER, M.; FEIERL, G.; PLESS, P.; KOFER, J.; ACHMANN, R.; WAGNER, M. *Campylobacter jejuni* isolated from poultry and humans in Styria, Austria: epidemiology and ciprofloxacin resistance.

**Epidemiology and Infection**, v. 130, n. 3, p. 377-386, 2003.

HOFFMANN, F. L.; GARCIA-CRUZ, C. H.; VINTURIM, T.M.; FAZIO, M. S. Microbiologia do leite pasteurizado tipo C, comercializado na região de São José do Rio Preto – SP. **Higiene Alimentar**, v. 13, n. 65, p. 51-54, 1999.

HOGUE, C. W.; GAMBEL, J. M.; SRIJAN, A.; PITARANGSI, C.; ECHEVERRIA, P. Trends in antibiotic resistance among diarrheal pathogens isolated in Thailand.

**Clinical Infectious diseases**, v. 26, n. 2, p. 341-345, fev. 1998.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T.

**Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9ª ed. Philadelphia: The Williams & Wilkins, 2000. Grupo 2. p. 39-64: Aerobic/microaerophilic, motile, helical/vibrioid Gram-negative bacteria.

HUMPHREY, T. J.; MARTIN, K. W.; SLADER, J. DURHAM, K. *Campylobacter* spp. in the kitchen: spread and persistence. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 115S-120S, jun. 2001. (Suplemento 6).

HUNT, J. M.; ABEYTA, C.; TRAN, T. *Campylobacter*. In: In: Food and Drug Administration. **Bacteriological Analytical Manual**. 8ª ed. Gaithersburg: AOAC Internacional, 1995. v. 1.

ICMSF - INTERNATIONAL COMMISSION IN MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Micro-organismos de los alimentos 1: técnicas de análisis microbiológico**. Zaragoza: Acribia, 1984. 431 p.

ICMSF - INTERNATIONAL COMMISSION IN MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microrganisms in food 5** - Characteristics of microbial pathogens. Londres: Blackie Academic & Professional, 1996. Cap. 4. p. 45-65: *Campylobacter*.

JAN, D. SORTAIS, A.; ATTIOGBE, M.; GESLIN, C.; PIOLET, M. C. Bactériémie, endocardite et méningite à *Campylobacter fetus* chez un agriculteur. **Medicine et Maladies Infectieuses**, v. 30, n. 3, p. 173-174, mar. 2000.

JAYARAO, B. M.; HENNING, D. R. Prevalence of foodborne pathogens in bulk tank milk. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 10, p. 2157-2162, 2001.

JONES, P. H.; WILLIS, A. T.; ROBINSON, D. A.; SKIRROW, M. B.; JOSEPHS, D. S. *Campylobacter* enteritis associated with the consumption of free school milk. **Journal of Hygiene**, v. 87, p. 155-162, 1981.

JONES, D. M.; SUTCLIFFE, E. M.; CURRY, A. Recovery of viable but non-culturable *Campylobacter jejuni*. **Journal of General Microbiology**, v. 137, n. 10, p. 2477-2482, out. 1991.

JONES, K. *Campylobacters* in water, sewage and the environment. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 68S-79S, jun. 2001. (Suplemento 6).

JORGENSEN, F.; BAILEY, R.; WILLIAMS, S.; HENDERSON, P.; WAREING, D. R. A.; BOLTON, F. J.; FROST, J. A.; WARD, L.; HUMPHREY, T. J. Prevalence and numbers of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. on raw, whole chickens in relation to sampling methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 76, n.1/2, p. 151-164, jun. 2002.



KÁLMÁN, M.; SZOLLOSI, E.; CZERMANN, B.; ZIMÁNYI, M.;SZEKERES, S.; KÁLMÁN, M. Milkborne *Campylobacter* infection in Hungary. **Journal of food Protection**, v. 63, n. 10, p. 1426-1429. 2000.

KARMALI, M. A.; SKIRROW, M. Taxonomy of the genus *Campylobacter*. In: BUTZLER, J. P. ***Campylobacter* infection in man and animals**. Boca Raton: CRC Press, 1984. Cap. 1. p. 1-20.

KELLY, D. J. The physiology and metabolism of *Campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 16S-24S, jun. 2001. (Suplemento 6).

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

KUMAR, A.; AGARWAL, R. K.; BHILEGAONKAR, K. N.; SHOME, B. R.; BACHHIL, V. N. Occurrence of *Campylobacter jejuni* in vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, n. 1/2, p. 153-155, jul. 2001.

LANGONI, H.; MACHADO, G. J.; SAVOLDI, F.; CAMARGO, M. J. B. *Campylobacter* sp como agente de mastite bovina: aspectos de saúde pública. **Higiene Alimentar**, v. 11, n. 50, p. 42-44, jul./ago. 1997.

LAURIA-FILGUEIRAS, A. L.; HOFER, E. Diversity of *Campylobacter* isolates from three activated sludge systems. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 3, p. 295-298, maio/jun. 1998.

LIEFTUCHT, A. An outbreak of *Campylobacter* infection associates with a farm in Germany. **Eurosurveillance Weekly**, v. 3, n. 48, 1999. Disponível em: <<http://www.eurosurveillance.org/ew/1999/991125.asp#1>>. Acesso em 18 maio 2002.

LINE, J. E.; STERN N. J.; LATTUADA, C. P.; BENSON, S. T. Comparison of methods for recovery and enumeration of *Campylobacter* from freshl processed broilers. **Journal of Food Protection**, v. 64, v. 7, p. 982-986, 2001.

LOVETT, J. FRANCIS, D. W.; HUNT, J. M. Isolation of *Campylobacter jejuni* from raw milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 459-462, ago. 1983.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock Biology of Microorganisms**. 8 ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1997. 986p.

MAGALHÃES, M.; ANDRADE, M. A.; SILVA, G. P. Simple and inexpensive method for culturing *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*. **Revista de Microbiologia**, v. 13, n. 2, p. 124-125, abr./jun. 1982.

MARTÍNEZ, P. L.; ACEITERO, J. M. R. Situación de los patógenos gastrointestinales en Extremadura en el primer semestre de 2002 según notificaciones realizadas al sistema de información microbiológica. Disponible em: <[http://www.sanidaddigital.org/archivos%20pdf/in\\_pat.PDF](http://www.sanidaddigital.org/archivos%20pdf/in_pat.PDF)>. Acesso em: 20 abr.2004.

MEDEIROS, M. I. C.; NEME, S. N.; SILVA, P.; CAPUANO, D. M.; ERRERA, M. C.; FERNANDES, S. A.; VALLE, G. R.; AVILA, F. A. Etiology of acute diarrhea among children in Ribeirão Preto – SP, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, n. 1, p. 21-24, jan./fev. 2001.

MELDRUM, R. J.; RIBEIRO, C. D. *Campylobacter* in ready-to-eat foods: the result of a 15-month survey. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 11, p. 2135-2137, nov. 2003.

MMWR. Epidemiologic notes and reports *Campylobacter* outbreak associated with certified raw milk products – California. **Morbidity and Mortality Weekly Report**,

v. 33, n. 39, p. 562, out. 1984. Disponível em:

<<http://www.cdc.gov/mmwr/mmwrhtml/00000412.htm>>. Acesso em: 15 ago. 2002a.

MMWR. Epidemiologic notes and reports *Campylobacter* outbreak associated with raw milk provided on a dairy tour – California. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 35, n. 19, p. 311-312, maio 1986. Disponível em:

<<http://www.cdc.gov/mmwr/mmwrhtml/00000734.htm>>. Acesso em: 15 ago. 2002b.

MMWR. *Campylobacter* enteritis – New Zealand, 1990. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 40, n. 7, p. 562, fev. 1991. Disponível em:

<<http://www.cfsan.fda.gov/~mow/Nzcampy.html>>. Acesso em: 20 abr. 2003a.

MMWR. Outbreak of *Campylobacter* enteritis associated with cross-contamination of food – Oklahoma, 1996. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 47, n. 7, p. 129-131, fev. 1998. Disponível em:

<<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00051427.htm>>. Acesso em: 15 jun. 2003b.

MMWR. Outbreak of *Campylobacter jejuni* infections associated with drinking unpasteurized milk produced through a cow-leasing program – Wisconsin, 2001. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 51, n. 25, p. 548-549, jun. 2002.

Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/PDF/wk/mm5125.pdf>>. Acesso em: 18 ago. 2003c.

MMWR. Preliminary Food Net Data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food – selected sites, United States, 2003.

**Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 53, n. 16, p. 338-343, abr. 2004.

Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5316a2.htm>>. Acesso em: 25 jun. 2004.

MODOLO, J. R.; MARGATO, L. F. F.; GOTTSCHALK, A. F.; LOPES, C. A. M. incidence of *Campylobacter* in pigs with and without diarrhea. **Revista de Microbiologia**, v. 30, n. 1, p. 19-2, 1999.

NEIMANN, J.; ENGBERG, J.; MOLBAK, K.; WEGENER, H. C. A case-control study of risk factors for sporadic *Campylobacter* infections in Denmark. *Epidemiology and Infections*, v. 130, n. 3, p. 353-366, 2003.

NESBAKKEN, T.; ECKNER, K.; HOIDAL, H. K.; ROTTERUD, O. J. Occurrence of *Yersinia enterocolitica* and *Campylobacter* spp in slaughter pigs and consequences for meat inspection, slaughtering, and dressing procedures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 80, n. 3, p. 231-240, 2003.

ONO, K.; YAMAMOTO, K. Contamination of meat with *Campylobacter jejuni* in Saitama, Japan. **International Journal of Food Microbiology**, v. 47, p. 211-219, 1999.

PARK, R. W. A.; GRIFFITHS, P. L.; MORENO, G. S. Sources and survival of campylobacters: relevance to enteritis and the food industry. **Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement**, v. 70, p. 97s-106s. 1991.

PARK, S. F. 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.

PELCZAR JR, J. M. **Microbiologia**: conceitos e aplicações, 2ª ed. São Paulo: Makron Books, 1996. v. 2. Cap. 30. p. 372-397: Microbiologia de Alimentos.

PETERSON, M. C. *Campylobacter jejuni* enteritis associated with consumption of raw milk. **Journal of Environmental Health**, v. 65, n. 9, p. 20-21, maio, 2003.

- PEZZOTTI, G.; SERAFIM, A.; LUZZI, I.; MIONI, R.; MILAN, M.; PERIN, R. Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejuni* na *Campylobacter coli* in animals and meat in northeastern Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, n. 3, p. 281-287, 2003.
- PHILLIPS, C. A. Incidence, epidemiology and prevention of foodborne *Campylobacter* species. **Trends in Food Science & Technology**, v.6, n. 3, p. 83-87, mar. 1995.
- RIBEIRO, C. D.; FROST, J. A. Family clusters of campylobacter infection. **Communicable Disease and Public Health**, v. 3, n. 4, p.274-276, dez. 2000.
- RICCIARDI, I. D.; FERREIRA, M. C. S.; OTTO, S. S.; OLIVEIRA, N.; SABRA, A.; FONTES, C. F. Thermophilic *Campylobacter* – associated diarrhea in Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas**, v. 12, n. 2-3, p. 189-191, jun. 1979.
- SACKEY, B. A.; MENSAH, P.; COLLISON, E.; SAKYI-DAWSON, E. *Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella* and *Escherichia coli* in live and dressed poultry from metropolitan Accra. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 21-28, 2001.
- SAFEFOOD. ***Campylobacter jejuni***. Disponível em: <<http://www.safefood.net.au/content.cfm?sid=466>>. Acesso em: 13 mar. 2004.
- SCHONBERG-NORIO, D.; TAKKINEN, J.; HANNINEN, M. L.; KATILA, M. L.; KAUKORANTA, S. S.; MATTILA, L.; RAUTELIN, H. Swimming and *Campylobacter* infections. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 8, p. 1474-1477, ago. 2004.
- SILVA, J. A. Microrganismos patogênicos em carne de frangos. **Higiene Alimentar**, v. 12, n. 58, p. 9-14, nov./dez. 1998.

SIRVETA - Sistema Regional de Información para la Vigilancia de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos. **Apresenta dado sobre enfermidades transmitidas por alimentos.** Disponível em:

<<http://www.panalimentos.org/sirveta/e/Salida2.asp?frmAnDesde=1993&frmAnHasta=2002&frmTipo=B&frmPais=Todos&frmEnfermedad=Campilobacteriosis&frmAlimento=Todos&frmLocal=Todos&frmInf=uno&Accept=Aceptar>>. Acesso em: 26 out. 2002.

SKIRROW, M. B. Epidemiology of *Campylobacter enteris*. **International Journal of Food Microbiology**, v.12, n. 1, p. 9-16, 1991.

SMIBERT, R. M. Genus II. *Campylobacter*. In: BUCHANAN, R. E.; GIBBONS, N. E. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 8<sup>a</sup> ed. Baltimore: The Williams & Wilkins, 1974. p. 207-212.

SMIBERT, R. M. *Campylobacter*. In: KRIEG, N. R. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: The Williams & Wilkins, 1984. V. 1, p. 111-118.

STUDAHL, A.; ANDERSSON, Y. Risk factors for indigenous campylobacter infection: a Swedish case-control study. **Epidemiology and Infection**, v. 125, n. 2, p. 269-275. 2000.

STYNEN, A. P. R.; PELLEGRIN, A. O.; FÓSCOLO, C. B.; FIGUEIREDO, J. F.; CANELLA FILHO, C.; LEITE, R. C.; LAGE, A. P. Campilobacteriose genital bovina em rebanhos leiteiros com problemas reprodutivos da microrregião de Varginha – Minas gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 6, p. 766-769, 2003.

TALIBART, R.; DENIS, M.; CASTILLO, A.; CAPPELIER, J. M.; ERMEL, G. Survival and recovery of viable but noncultivable forms of *Campylobacter* in

aqueous microcosm. **International Journal of Food Microbiology**, v. 55, n. 1/3, p. 263-267. 2000.

TAM, C. C.; O'BRIEN, S. J.; ADAK, G. K.; MEAKINS, S. M.; FROST, J. A. *Campylobacter coli* – an important foodborne pathogen. **Journal of Infection**, v. 47, n. 1, p. 28-32, 2003a.

TAM, C. C.; RODRIGUES, L. C.; O'BRIEN, S. Guillain-Barré syndrome associated with *Campylobacter jejuni* infection in England, 200-2001. *Clinical Infectious Diseases*, v. 37, n. 2, p. 307-310, jul. 2003b.

TECRA International Pty Ltd. **Campylobacter Visual Immunoassay**. Austrália: set. 2001. 14 p.

THE *CAMPYLOBACTER* SENTINEL SURVEILLANCE SCHEME COLLABORATORS. Point source outbreaks of *Campylobacter jejuni* infection – are they more common than we think and what might cause them? **Epidemiology and Infection**, v. 130, n. 3, p. 367-375, 2003.

TIMM, C. D.; GONZALS, H. L.; OLIVEIRA, D. S.; BUCHLE, J.; ALEXIS, M. A.; COELHO, F. J. O.; PORTO, C. Avaliação da qualidade microbiológica do leite pasteurizado integral, produzido em microusinas da região sul do Rio Grande do Sul. **Higiene Alimentar**, v. 17, n. 106, p. 100-104, mar. 2003.

TRESIERRA-AYALA, A.; FERNANDEZ H.; BENDAYAN, M. E.; PEREYRA, G.; BERNUY, A. Aislamiento de espécies termotolerantes de *Campylobacter* em dos poblaciones de pollos criados com y sin confinamiento. **Revista de Saúde pública**, v. 29, n. 5, p. 389-92, out. 1995.

TRESIERRA-AYALA, A.; FERNANDEZ H. Occurrence of thermotolerant *Campylobacter* species in domestic and wild monkeys from Peru. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 44, n. 1, p. 61-64, mar. 1997.

TRESIERRA-AYALA, A.; BENDAYAN, M. E. Thermotolerant *Campylobacter* species isolated from psittaciformes in the peruvian amazon region. **Instituto Medicina Tropical de São Paulo**, v. 40, n. 4, p. 263-264, jul./ago. 1998.

THOLOZAN, J. L.; CAPPELIER, J. M.; TISSIER, J. P.; DELATTRE, G.; FEDERIGHI, M. Physiological characterization of viable-but-nonculturable *Campylobacter jejuni* cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1110-1116, mar. 1999.

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.

UNICOMB, L.; FERGUSON, J.; RILEY, T. V.; COLLIGNON, P. Fluoroquinolone Resistance in *Campylobacter* absent from isolates, Australia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 11, p. 1482-1483, nov. 2003.

VANDAME, P.; DE LEY, J. Proposal for a new family, Campylobacteriaceae. **Internation Journal of Systematic Bacteriology**, v. 41, n. 3, p. 451-455, jul. 1991.

VASAVADA, P. C. Rapid Methods and Automation in Dairy Microbiology. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 10, p. 3101-3113, out. 1993.

VIERIKKO, A.; HANNINEN, M. L.; SIITONEN, A.; RUUTU, P.; RAUTELIN, H. Domestically acquired *Campylobacter* infections in Finland. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 1, p. 127-130, jan. 2004.



VLIET, A. H. M.; KETLEY, J. M. Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 45S-56S, 2001. (Suplemento).

VELLINGA, A.; BUTZLER, J. P. Country report Campylobacteriosis in humans – Belgium. In: WHO – World Health Organization. Department of Communicable Disease Surveillance and Response. The increasing incidence of human campylobacteriosis. Report and proceedings of a WHO Consultation of Experts. Disponível em: <<http://www.who.int/emc-documents/zoonoses/whocdscsraph20017c.html>>. Acesso em: 12 set. 2002.

WEDDERKOPP, A. et al. Pre-harvest surveillance of *Campylobacter* and *Salmonella* in Danish broiler flocks: a 2-year study. **International Journal of Food Microbiology**, v.68, n. 1/2, p. 53-59, 2001.

WHO. World Health Organization. ***Campylobacter***. Disponível em: <<http://who.int/inf-fs/en/fact255.html>>. Acesso em: 20 abr. 2002.

YANG, C.; JIANG, Y.; HUANG, K. ZHU, C.; YIN, Y. Application of real-time PCR for quantitative detection of *Campylobacter jejuni* in poultry, milk and environmental water. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 265-271, out. 2003.

ZANETTI, F.; VAROLI, O.; STAMPI, S.; DE LUCA, G. Prevalence of thermophilic *Campylobacter* and *Arcobacter butzleri* in food of animal origin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, n. 2/3, p. 315-321, 1996.

## ANEXO A – Resultados das análises de *Campylobacter jejuni*

Quadro 1 – Resultados das análises de *Campylobacter jejuni* em meio de cultura após 24 horas de incubação.

<b>Número repetição</b>	<b>Tipo de substrato</b>	<b>BAM (FDA)</b>	<b>ELFA (VIDAS)</b>	<b>ELISA (TECRA)</b>	<b>NMP NMP/mL</b>	<b>NMP (%)</b>
1	Meio de cultura 10 <sup>3</sup>	+	+	+	460	30,67
2	Meio de cultura 10 <sup>3</sup>	+	+	+	93	6,20
3	Meio de cultura 10 <sup>3</sup>	+	+	+	1.100	73,33
4	Meio de cultura 10 <sup>3</sup>	+	+	+	1.100	73,33
5	Meio de cultura 10 <sup>3</sup>	+	+	+	43	2,87
6	Meio de cultura 10 <sup>3</sup>	+	+	+	150	10,00
7	Meio de cultura 10 <sup>3</sup>	+	+	+	240	16,00
8	Meio de cultura 10 <sup>3</sup>	+	+	+	240	16,00
9	Meio de cultura 10 <sup>2</sup>	+	+	+	23	15,33
10	Meio de cultura 10 <sup>2</sup>	+	+	+	93	62,00
11	Meio de cultura 10 <sup>2</sup>	+	+	+	150	100,00
12	Meio de cultura 10 <sup>2</sup>	+	+	+	21	14,00
13	Meio de cultura 10 <sup>2</sup>	+	+	+	15	10,00
14	Meio de cultura 10 <sup>2</sup>	+	+	+	39	26,00
15	Meio de cultura 10 <sup>2</sup>	+	+	+	9	6,00
16	Meio de cultura 10 <sup>2</sup>	+	+	+	15	10,00

**Quadro 2 – Resultados das análises de *Campylobacter jejuni* em meio de cultura após 48 horas de incubação.**

<b>Número repetição</b>	<b>Tipo de substrato</b>	<b>BAM (FDA)</b>	<b>ELFA (VIDAS)</b>	<b>ELISA (TECRA)</b>	<b>NMP NMP/mL</b>	<b>NMP (%)</b>
1	Meio de cultura 10 <sup>3</sup>	+	+	+	210	14,00
2	Meio de cultura 10 <sup>3</sup>	+	+	+	21	1,40
3	Meio de cultura 10 <sup>3</sup>	+	+	+	460	30,67
4	Meio de cultura 10 <sup>3</sup>	+	+	+	28	1,87
5	Meio de cultura 10 <sup>3</sup>	+	+	+	20	1,33
6	Meio de cultura 10 <sup>3</sup>	+	+	+	15	1,00
7	Meio de cultura 10 <sup>3</sup>	+	+	+	43	2,87
8	Meio de cultura 10 <sup>3</sup>	+	+	+	93	6,20
9	Meio de cultura 10 <sup>2</sup>	neg.	+	+	15	10,00
10	Meio de cultura 10 <sup>2</sup>	+	+	neg.	15	10,00
11	Meio de cultura 10 <sup>2</sup>	+	+	+	93	62,00
12	Meio de cultura 10 <sup>2</sup>	+	+	+	11	7,33
13	Meio de cultura 10 <sup>2</sup>	+	+	+	4	2,67
14	Meio de cultura 10 <sup>2</sup>	+	+	+	9	6,00
15	Meio de cultura 10 <sup>2</sup>	+	+	+	9	6,00
16	Meio de cultura 10 <sup>2</sup>	+	+	+	7	4,67

**Quadro 3 – Resultados das análises de *Campylobacter jejuni* em leite tipo UHT após 24 horas de incubação.**

<b>Número repetição</b>	<b>Tipo de substrato</b>	<b>BAM (FDA)</b>	<b>ELFA (VIDAS)</b>	<b>ELISA (TECRA)</b>	<b>NMP NMP/mL</b>	<b>NMP (%)</b>
17	Leite UHT 10 <sup>3</sup> – marca A	+	+	+	93	6,20
18	Leite UHT 10 <sup>3</sup> – marca A	+	+	+	75	5,00
19	Leite UHT 10 <sup>3</sup> – marca A	+	+	+	75	5,00
20	Leite UHT 10 <sup>3</sup> – marca A	+	+	+	150	10,00
21	Leite UHT 10 <sup>3</sup> – marca B	+	+	+	460	30,67
22	Leite UHT 10 <sup>3</sup> – marca B	+	+	+	240	16,00
23	Leite UHT 10 <sup>3</sup> – marca B	+	+	+	460	30,67
24	Leite UHT 10 <sup>3</sup> – marca B	+	+	+	1.100	73,33
25	Leite UHT 10 <sup>2</sup> – marca A	+	+	+	93	62,00
26	Leite UHT 10 <sup>2</sup> – marca A	+	+	+	43	28,67
27	Leite UHT 10 <sup>2</sup> – marca A	+	+	+	150	100,00
28	Leite UHT 10 <sup>2</sup> – marca A	+	+	+	43	28,67
29	Leite UHT 10 <sup>2</sup> – marca B	+	+	+	23	15,33
30	Leite UHT 10 <sup>2</sup> – marca B	+	+	+	150	100,00
31	Leite UHT 10 <sup>2</sup> – marca B	+	+	+	93	62,00
32	Leite UHT 10 <sup>2</sup> – marca B	+	neg.	+	93	62,00

**Quadro 4 – Resultados das análises de *Campylobacter jejuni* em leite tipo UHT após 48 horas de incubação.**

<b>Número repetição</b>	<b>Tipo de substrato</b>	<b>BAM (FDA)</b>	<b>ELFA (VIDAS)</b>	<b>ELISA (TECRA)</b>	<b>NMP NMP/mL</b>	<b>NMP (%)</b>
17	Leite UHT 10 <sup>3</sup> – marca A	+	+	+	93	6,20
18	Leite UHT 10 <sup>3</sup> – marca A	+	+	+	39	2,60
19	Leite UHT 10 <sup>3</sup> – marca A	+	+	+	23	1,53
20	Leite UHT 10 <sup>3</sup> – marca A	+	+	+	93	6,20
21	Leite UHT 10 <sup>3</sup> – marca B	+	+	+	460	30,67
22	Leite UHT 10 <sup>3</sup> – marca B	+	+	+	240	16,00
23	Leite UHT 10 <sup>3</sup> – marca B	+	+	+	460	30,67
24	Leite UHT 10 <sup>3</sup> – marca B	+	+	neg.	1.100	73,33
25	Leite UHT 10 <sup>2</sup> – marca A	+	neg.	neg.	43	28,67
26	Leite UHT 10 <sup>2</sup> – marca A	+	+	+	23	15,33
27	Leite UHT 10 <sup>2</sup> – marca A	+	+	+	23	15,33
28	Leite UHT 10 <sup>2</sup> – marca A	+	+	+	15	10,00
29	Leite UHT 10 <sup>2</sup> – marca B	+	+	+	4	2,67
30	Leite UHT 10 <sup>2</sup> – marca B	+	neg.	neg.	15	10,00
31	Leite UHT 10 <sup>2</sup> – marca B	+	+	+	28	18,67
32	Leite UHT 10 <sup>2</sup> – marca B	+	neg.	+	43	28,67

**Quadro 5 – Resultados das análises de *Campylobacter jejuni* em leite tipo C após 24 horas de incubação.**

<b>Número repetição</b>	<b>Tipo de substrato</b>	<b>BAM (FDA)</b>	<b>ELFA (VIDAS)</b>	<b>ELISA (TECRA)</b>	<b>NMP NMP/mL</b>	<b>NMP (%)</b>
33	Leite C 10 <sup>3</sup> – marca F	+	+	+	7	0,47
34	Leite C 10 <sup>3</sup> – marca F	+	+	+	93	6,20
35	Leite C 10 <sup>3</sup> – marca F	+	+	+	15	1,00
36	Leite C 10 <sup>3</sup> – marca F	+	+	+	23	1,53
37	Leite C 10 <sup>3</sup> – marca G	+	+	+	93	6,20
38	Leite C 10 <sup>3</sup> – marca G	+	+	+	9	0,60
39	Leite C 10 <sup>3</sup> – marca G	+	+	+	< 3	0,00
40	Leite C 10 <sup>3</sup> – marca G	+	+	+	< 3	0,00
41	Leite C 10 <sup>2</sup> – marca F	+	+	+	< 3	0,00
42	Leite C 10 <sup>2</sup> – marca F	+	+	+	< 3	0,00
43	Leite C 10 <sup>2</sup> – marca F	+	+	+	< 3	0,00
44	Leite C 10 <sup>2</sup> – marca F	+	+	+	< 3	0,00
45	Leite C 10 <sup>2</sup> – marca G	neg.	+	+	< 3	0,00
46	Leite C 10 <sup>2</sup> – marca G	+	+	+	< 3	0,00
47	Leite C 10 <sup>2</sup> – marca G	neg.	+	+	< 3	0,00
48	Leite C 10 <sup>2</sup> – marca G	+	+	+	< 3	0,00

**Quadro 6 – Resultados das análises de *Campylobacter jejuni* em leite tipo C após 48 horas de incubação.**

<b>Número repetição</b>	<b>Tipo de substrato</b>	<b>BAM (FDA)</b>	<b>ELFA (VIDAS)</b>	<b>ELISA (TECRA)</b>	<b>NMP NMP/mL</b>	<b>NMP (%)</b>
33	Leite C 10 <sup>3</sup> – marca F	+	+	+	4	0,27
34	Leite C 10 <sup>3</sup> – marca F	+	+	+	15	1,00
35	Leite C 10 <sup>3</sup> – marca F	+	+	+	< 3	0,00
36	Leite C 10 <sup>3</sup> – marca F	+	+	+	< 3	0,00
37	Leite C 10 <sup>3</sup> – marca G	+	+	+	< 3	0,00
38	Leite C 10 <sup>3</sup> – marca G	+	+	neg.	4	0,27
39	Leite C 10 <sup>3</sup> – marca G	+	+	+	< 3	0,00
40	Leite C 10 <sup>3</sup> – marca G	+	+	+	< 3	0,00
41	Leite C 10 <sup>2</sup> – marca F	+	neg.	neg.	< 3	0,00
42	Leite C 10 <sup>2</sup> – marca F	+	+	+	< 3	0,00
43	Leite C 10 <sup>2</sup> – marca F	+	neg.	neg.	< 3	0,00
44	Leite C 10 <sup>2</sup> – marca F	+	+	neg.	< 3	0,00
45	Leite C 10 <sup>2</sup> – marca G	neg.	+	+	< 3	0,00
46	Leite C 10 <sup>2</sup> – marca G	+	+	+	< 3	0,00
47	Leite C 10 <sup>2</sup> – marca G	neg.	+	+	< 3	0,00
48	Leite C 10 <sup>2</sup> – marca G	+	+	+	< 3	0,00

**ANEXO B – Tabela utilizada para técnica do Número Mais Provável**

**For 3 tubes each at 0.1, 0.01, and 0.001 g inocula, the MPNs per gram and 95 percent confidence intervals.**

Pos. tubes			MPN/g	Conf. lim.		Pos. tubes			MPN/g	Conf. lim.	
0.10	0.01	0.001		Low	High	0.10	0.01	0.001		Low	High
0	0	0	<3.0	--	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	--



## ANEXO C – Estatística

### Medidas de Proporções e Probabilidades (ALTMAN, 1991)

A tabela a seguir permite o cálculo de diversas estatísticas.

		Padrão Ouro		
		POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
Método	POSITIVO	<b>a</b> <i>verdadeiro positivo</i>	<b>b</b> <i>falso positivo</i>	<b>a + b</b>
	NEGATIVO	<b>c</b> <i>falso negativo</i>	<b>d</b> <i>verdadeiro negativo</i>	<b>c + d</b>
	TOTAL	<b>a + c</b>	<b>b + d</b>	<b>a + b + c + d</b>

#### Sensibilidade (S)

É a proporção de verdadeiros positivos entre todos os resultados. Expressa a probabilidade de um teste dar positivo quando o padrão ouro for positivo. É calculada por:

$$S = \frac{a}{a + c}$$

#### Especificidade (E)

É a proporção de verdadeiros negativos entre todos os resultados. Expressa a probabilidade de um teste dar negativo quando o padrão ouro for negativo. É calculada por:

$$E = \frac{d}{b + d}$$

#### Valor Preditivo Positivo (VPP)

É a proporção de verdadeiros positivos entre todas as análises com resultado positivo. É calculado por:

$$\text{VPP} = \frac{a}{a + b}$$

### **Valor Preditivo Negativo (VPN)**

É a proporção de verdadeiros negativos entre todas as análises com resultado negativo. É calculado por:

$$\text{VPN} = \frac{d}{c + d}$$

### **Eficácia (A)**

É proporção de acertos de um teste, os verdadeiros positivos e os verdadeiros negativos. É calculado por:

$$A = \frac{a + d}{a + b + c + d}$$