

Utilização de caldo Bolton no enriquecimento seletivo em comparação ao plaqueamento direto na pesquisa de *Campylobacter* spp. em carcaças resfriadas de frango

Use of Bolton broth for selective enrichment and comparative analysis of its performance with direct plating methodology for isolating *Campylobacter* spp. from chilled chicken carcasses

RIALA6/1490

Valeria de Mello MEDEIROS^{1*}, Silvia Maria Lopes BRICIO¹, Ana Luzia Lauria FILGUEIRAS², Maysa Beatriz Mandetta CLEMENTINO¹

*Endereço para correspondência: ¹Laboratório de Microbiologia de Produtos, Setor de Alimentos, Departamento de Microbiologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, FIOCRUZ. Avenida Brasil, 4.365, Mangueiras, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, CEP: 21040-900. Tel: (21) 3865-5161. E-mail: valeria.medeiros@incqs.fiocruz.br

²Laboratório de Zoonoses Bacterianas, Setor de *Campylobacter*, Departamento de Bacteriologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ

Recebido: 14.07.2011 – Aceito para publicação: 16.05.2012

RESUMO

O objetivo deste estudo foi comparar o enriquecimento seletivo e o plaqueamento direto no isolamento das espécies termofílicas de *Campylobacter* spp. em 30 amostras de carcaças de frango resfriadas adquiridas em supermercados, feiras livres e abatedouros no município do Rio de Janeiro, no período de julho de 2009 a julho de 2010. Foi realizada a enxaguadura da carcaça com água peptonada tamponada a 1% para recuperação das bactérias. Para o plaqueamento direto, foram utilizados ágar carvão cefoperazone desoxicolato modificado e ágar campy-cefex. Para o enriquecimento seletivo, foi empregado o caldo Bolton em concentrações simples e dupla. Foi detectada a presença de *Campylobacter* spp. em 21 amostras (70%), sendo 6 (28,6%) de abatedouros (3 com Serviço de Inspeção Estadual e 3 sem inspeção), 8 (38,1%) de supermercados e 7 (33,3%) de feiras livres. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos nesses estabelecimentos. As 21 amostras positivas foram isoladas do plaqueamento direto, 2 (9,5%) foram isoladas também no caldo Bolton simples e nenhuma no caldo Bolton duplo. O plaqueamento direto foi considerado o método mais rápido e eficiente, e apresenta menor custo que o enriquecimento seletivo na recuperação de *Campylobacter* spp. em carcaças resfriadas de frango.

Palavras-chave. *Campylobacter* spp., caldo Bolton, mCCDA, Campy-Cefex.

ABSTRACT

This study aimed at comparing the use of selective enrichment and direct plating for isolating the thermophilic species of *Campylobacter* spp. from 30 samples of chilled chicken carcasses purchased in supermarkets, marketplaces and slaughterhouses in the Rio de Janeiro city, from July 2009 to July 2010. Chicken carcasses were rinsed out with 400 mL of 1% buffered peptone water for bacteria recovering. Charcoal Cefoperazone Deoxycholate agar and Campy Cefex agar were used for direct plating. Selective enrichment was performed employing Bolton broth in single and double concentrations. The presence of *Campylobacter* spp. was detected in 21 samples (70%), being 6 (28.6%) from slaughterhouses (3 with State inspection service and 3 without inspection), 8 (38.1%) from supermarkets and 7 (33.3%) from marketplaces. No statistically significant differences were found among the results obtained from different establishments. Of 21 positive samples, 2 (9.5%) were isolated from single Bolton broth and none of them was positive in double Bolton broth. Therefore, the direct plating was considered easier, faster and more cost-effective than the selective enrichment methodology for recovering *Campylobacter* spp. from chilled chicken carcasses.

Keywords. *Campylobacter* spp., Bolton broth, mCCDA, Campy-Cefex.

INTRODUÇÃO

Nas últimas quatro décadas, as espécies de *Campylobacter* spp. têm sido reconhecidas como patógenos emergentes e despontaram como importantes agentes de gastroenterites de origem alimentar em várias partes do mundo¹. Dados de países desenvolvidos apontam que as infecções causadas por algumas espécies do gênero *Campylobacter* têm sido relatadas como uma das principais causas de gastroenterites em grande parte dos países europeus². Nos Estados Unidos, ocorrem cerca de 2,4 milhões de casos por ano³.

O gênero *Campylobacter* pertence à família *Campylobacteraceae* e é constituído de bastonetes delgados, curvos espiralados, gram-negativos e microaerófilos. Não formam esporos, não são hemolíticos e possuem uma motilidade característica em forma de saca-rolhas, produzida por um flagelo polar em uma ou ambas as extremidades da célula⁴. As espécies do gênero *Campylobacter* estão amplamente distribuídas na natureza, e a maioria está apta a habitar o trato intestinal de animais de sangue quente, sendo encontradas frequentemente em aves domésticas, bovinos, suínos, ovinos, roedores, pássaros, cães e gatos⁵. *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari* e *C. upsaliensis* representam o grupo de bactérias denominadas termofílicas, devido à temperatura ótima de crescimento oscilar entre 42 °C e 43 °C, sendo que *C. jejuni* e *C. coli* constituem as espécies mais frequentemente isoladas de enterites humanas^{2,5}.

A campilobacteriose no homem ocorre em decorrência da ingestão de alimentos imprópriamente manipulados ou mal cozidos. A grande maioria dos casos ocorre de forma isolada, com eventos esporádicos, não caracterizando um surto⁴. Os frangos são os maiores reservatórios dessas bactérias, e as espécies termofílicas estão mais associadas à doença, por suportar a temperatura do trato intestinal das aves, que é em torno de 41 °C. A contaminação de carcaças de frangos em abatedouros e o consumo de alimentos à base de frango mal cozido, além da contaminação cruzada durante a manipulação de alimentos crus, são considerados os principais fatores de risco para infecções^{5,6,7}.

A doença é caracterizada por diarreia aguda, dor abdominal e cólica, podendo ocasionalmente ocorrer diarreia sanguinolenta contendo leucócitos e muco. Calafrios, náuseas e febre também representam uma sintomatologia da doença, mas os vômitos são raros. Um fator agravante na transmissão da doença é que

pacientes convalescentes podem continuar excretando o micro-organismo nas fezes durante duas semanas a um mês⁸. Infecções por *C. jejuni* podem levar a sérias consequências pós-infeciosas, dentre as quais se destaca a Síndrome de Guillain-Barré, que consiste em uma polineuropatia inflamatória desmielinizante, resultando em paralisia neuromuscular aguda².

Esses organismos microaerófilos são mais exigentes e possuem crescimento mais lento que outros enteropatógenos bacterianos e requerem condições especiais de crescimento, uma vez que são sensíveis ao oxigênio, característica que dificulta o seu cultivo⁹. As células de *Campylobacter* spp. respondem ao estresse causado pela presença de oxigênio, temperatura baixa ou falta de nutrientes, mudando a sua morfologia para formas cocoides, entrando em um estado viável não cultivável e sendo incapazes de crescer em meios seletivos de isolamento, mas podendo ser transmitidas e causar infecção em humanos^{10,11}. Três fatores são fundamentais para o seu isolamento: o uso de meios seletivos, a incubação em atmosfera de microaerofilia e a temperatura de 42 °C no isolamento primário¹².

O uso de suplementos, como sulfato ferroso, metabissulfito de sódio e piruvato de sódio, aumenta a aerotolerância do micro-organismo por meio da redução dos componentes tóxicos derivados do oxigênio, como peróxido de hidrogênio, oxigênio simples e íons superóxido. Muitos meios seletivos contêm alguns ou todos esses compostos em concentrações variadas¹².

Existem vários métodos descritos para a pesquisa de *Campylobacter* em alimentos, incluindo ou não etapas de enriquecimento seletivo seguido de inoculação em ágar seletivos¹³. A maioria dos meios de enriquecimento para *Campylobacter* contém uma base rica em nutrientes, antibióticos para inibir competidores e ingredientes para amenizar os efeitos tóxicos do oxigênio¹². O *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*⁵ recomenda a utilização do plaqueamento direto e do enriquecimento seletivo com o caldo Bolton em concentração dupla, o *Bacteriological Analytical Manual*¹⁴ e a Norma ISO 10.272-1:2006¹⁵ recomendam a utilização do caldo Bolton em concentração simples.

O objetivo deste trabalho foi comparar o isolamento de *Campylobacter* spp. por plaqueamento direto e pela utilização de enriquecimento seletivo com caldo Bolton em concentração simples e dupla em carcaças resfriadas de frango.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram adquiridas trinta amostras de carcaças resfriadas de frango, de diferentes marcas comerciais oferecidas para consumo no Município do Rio de Janeiro, no período de julho de 2009 a julho de 2010. A coleta foi realizada no dia anterior ou no mesmo dia da análise, em três tipos de estabelecimentos comerciais: supermercados (n = 10), feiras livres (n = 10) e abatedouros (n = 10), sendo quatro com Serviço de Inspeção Estadual (SIE) e seis sem inspeção. No momento da coleta, as amostras encontravam-se dentro das especificações (temperatura, validade, embalagem) estabelecidas pela legislação vigente para esse tipo de produto, definidas pela Resolução RDC nº 259, de 20 de setembro de 2002¹⁶, com exceção das amostras de abatedouros sem inspeção e as adquiridas em feiras livres, que não possuíam rotulagem e não estavam refrigeradas.

As amostras foram transportadas em recipiente isotérmico contendo gelo e mantidas entre 2–8 °C até o momento da análise. A análise das amostras foi realizada no Setor de Alimentos do Departamento de Microbiologia do INCQS/Fiocruz.

Preparo da amostra

A pesquisa de *Campylobacter* spp. foi realizada de acordo com a metodologia descrita no capítulo 31 do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*⁵, com a inclusão do caldo Bolton em concentração simples^{14,15}.

No preparo inicial da amostra, foi utilizada a técnica da enxaguadura com um volume de 400 mL de água peptonada 1% tamponada.

Plaqueamento direto

Foi realizado o plaqueamento por esgotamento em estria de uma alça bacteriológica diretamente da água da enxaguadura das amostras. Foram utilizadas placas em duplicata com os meios ágar Carvão Cefoperazone Desoxicolato modificado (mCCDA-Oxoid) e ágar Campy-cefex¹⁷ (BBL), e incubados em atmosfera de microaerofilia utilizando o gerador CampyGen (Oxoid) a 42 °C por 48 horas.

Enriquecimento seletivo

Foram utilizados 25 mL do caldo Bolton (Oxoid) em dupla concentração, com suplemento seletivo

contendo cefoperazona, trimetoprim, vancomicina e cicloheximida e 5% de sangue lisado de cavalo adicionado de 25 mL da água da enxaguadura. Em paralelo, foi utilizado 45 mL de caldo Bolton em concentração simples com os mesmos suplementos seletivos, adicionado de 5 mL da água da enxaguadura. Após a incubação a 42 °C por 48 horas em atmosfera de microaerofilia, o crescimento de cada caldo foi semeado, com uma alça bacteriológica, em duas placas com os ágares descritos na etapa anterior.

Todas as etapas foram realizadas paralelamente com as cepas de *Campylobacter jejuni* INCQS 00262 ATCC 33560 (controle positivo) e *Escherichia coli* INCQS 00033 ATCC 25922 (controle negativo), obtidos da coleção de culturas do INCQS.

Identificação de *Campylobacter* spp.

Os isolados que apresentaram crescimento sugestivo de *Campylobacter* spp. foram submetidos à coloração de Gram e às provas bioquímicas de oxidase e catalase. A confirmação de gênero foi realizada pelo teste de aglutinação em látex utilizando o kit Dryspot *Campylobacter* (Oxoid).

Análise estatística

As diferenças estatisticamente significativas entre as amostras de supermercados (n = 10), feiras livres (n = 10) e abatedouros (n = 10) foram calculadas pelo teste de Cochran (bilateral) ao nível de significância de 0,05. A análise comparativa entre as técnicas de plaqueamento direto e enriquecimento seletivo e da recuperação entre os ágares mCCDA e campy-cefex foi determinada pelo teste de Fisher seguido do cálculo de Odds Ratio. Essas análises foram realizadas no programa Bioestat 5.0 (2007).

RESULTADOS

Isolamento de *Campylobacter* spp. por plaqueamento direto

O plaqueamento direto, a partir da água da enxaguadura, nos meios seletivos ágar campy-cefex e mCCDA, demonstrou a presença de *Campylobacter* spp. em 21 (70%) das carcaças de frango analisadas. Destes 21 isolados, 13 (62%) foram obtidas no ágar campy-cefex e mCCDA concomitantemente, 3 (14%) somente no campy-cefex e 5 (24%) somente no mCCDA (Tabela 1).

Tabela 1. Isolamento de *Campylobacter* spp. em amostras de carcaças resfriadas de frango

Procedência das amostras	Enriquecimento seletivo (caldo Bolton simples)			Plaqueamento direto			Total de amostras positivas por meio de isolamento		Total de amostras analisadas
	+ mCCDA ¹	+ CC ²	Amostras positivas	+ mCCDA	+ CC	Amostras positivas	+ mCCDA	+ CC	
Mercado	1	1	1	6	5	8	7	6	10
Abatedouro	0	1	1	5	3	6	5	4	10
Feira	0	0	0	6	6	7	6	6	10
Total	1	2	2 ^a	17	14	21 ^b	18	16	30

¹ ágar carvão cefoperazone desoxicolato modificado; ² ágar Campy-Cefex; ^{a,b} valores significativamente diferentes (teste de Fisher, $p < 0,0001$).

Isolamento de *Campylobacter* spp. por enriquecimento seletivo

Das 21 amostras contaminadas com *Campylobacter* spp., somente 2 (9,5%) foram obtidas a partir do caldo Bolton simples e nenhuma do caldo Bolton em dupla concentração (Tabela 1). A etapa de enriquecimento seletivo com caldo Bolton nas concentrações simples e dupla seguida de esgotamento em ágar mCCDA e campy-cefex apresentou abundante crescimento de microbiota acompanhante.

Identificação de *Campylobacter* spp.

A coloração de Gram demonstrou a presença de bastonetes Gram negativos, delgados e em forma de asas de gaivota nos 21 isolados, que também apresentaram a produção das enzimas catalase e oxidase. Os 21 isolados foram confirmados como *Campylobacter* spp. pelo teste de aglutinação em látex.

Análise estatística

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as amostras de supermercados ($n = 10$), feiras livres ($n = 10$) e abatedouros ($n = 10$). Das 21 amostras analisadas que apresentaram contaminação por *Campylobacter* spp., 8 (38,1%) foram provenientes de carcaças coletadas em supermercados, 7 (33,3%) em feiras livres e 6 (28,6%) em abatedouros. Das 6 amostras positivas obtidas em abatedouros, 3 foram de estabelecimento com SIE e 3, sem inspeção. Em relação ao plaqueamento direto e enriquecimento seletivo, foi demonstrado que as técnicas são significativamente diferentes (teste de Fisher, $p < 0,0001$). O cálculo de Odds Ratio foi 30, ou seja, as chances de isolamento pelo plaqueamento direto foram 30 vezes superiores às chances de isolamento pelo enriquecimento seletivo. Na comparação da recuperação dos ágar mCCDA e campy-cefex, foi demonstrado que não houve diferença

significativa entre os referidos meios seletivos (teste de Fisher foi de 0,6965, ou seja, $p > 0,05$).

DISCUSSÃO

A recuperação de *Campylobacter* spp. em carnes resfriadas de frango depende da sensibilidade da metodologia adotada. Neste estudo, a recuperação de *Campylobacter* spp. foi significativamente superior ($p < 0,05$) pelo método do plaqueamento direto em ágar campy-cefex e mCCDA, em relação ao enriquecimento seletivo. Enquanto a recuperação pelo plaqueamento direto detectou *Campylobacter* spp. em 70% (21/30) das amostras, o enriquecimento seletivo revelou a presença dos mesmos em apenas 6,6% (2/30). Resultado semelhante foi obtido por Medeiros¹⁸, que utilizou o plaqueamento direto em ágar mCCDA e o enriquecimento seletivo em caldo Bolton duplo e isolou 70% de *Campylobacter* spp. apenas por meio do plaqueamento direto. Outros autores também verificaram que a recuperação por plaqueamento direto em mCCDA foi significativamente superior (41%) comparada com o enriquecimento seletivo em caldo Bolton simples (24,2%)¹⁹.

Resultados contraditórios foram observados por Franchin et al.²⁰, que conseguiram isolar *Campylobacter* spp. em 91,7% das amostras utilizando enriquecimento com o caldo Bolton em concentração simples, assim como Johnsen et al.²¹, que isolaram *Campylobacter* spp. em 100% das amostras de frango de corte analisadas utilizando o caldo Bolton seguido pelo isolamento no ágar mCCDA. Outro estudo, porém, demonstrou a presença de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango pelos dois métodos, com exceção de duas carcaças que só apresentaram esses contaminantes após o enriquecimento em caldo Bolton¹². Esse dado foi reforçado pela análise comparativa entre esses métodos, demonstrando que ambos foram homogêneos e sensíveis para detecção de *Campylobacter* spp. em amostras de

carcaças de frango. Entretanto, devido à antecipação dos resultados em 24 horas, os autores recomendam a utilização do plaqueamento direto²².

Os resultados obtidos neste estudo revelaram a presença de crescimento abundante de outras bactérias acompanhantes após o enriquecimento em caldo Bolton simples e duplo, o que prejudicou a visualização de colônias típicas de *Campylobacter* spp. Outros estudos confirmaram essa observação ao demonstrarem o crescimento excessivo de *Escherichia coli* e outras bactérias intestinais, após a utilização do caldo Bolton, mascarando a visualização das colônias de *Campylobacter* nas placas de ágar mCCDA^{23,24}. Esse grupo de pesquisadores levantou a hipótese de que o caldo Bolton contém quantidades limitadas de compostos seletivos, sendo insuficiente para inibir a microbiota acompanhante de *Campylobacter* spp. em amostras muito contaminadas, uma vez que *Campylobacter* spp. têm uma taxa de crescimento menor que outras espécies bacterianas e são considerados fracos competidores fora do nicho intestinal¹⁹.

No presente estudo, não houve diferença estatisticamente significativa entre os meios de isolamento utilizados. O mesmo foi observado em um estudo onde foram avaliados seis meios sólidos para detecção de *Campylobacter* e não foram verificadas diferenças significativas entre cinco deles, incluindo campy-cefex e mCCDA²⁵. Os autores também observaram que a utilização de meios de isolamento contendo grande número de antibióticos como o ágar campy-line pode prejudicar a recuperação de *Campylobacter* spp.²⁵.

Em relação aos locais de coleta, não houve diferença significativa no isolamento de *Campylobacter* spp. entre as amostras de feiras livres, hipermercados e abatedouros. Dados similares foram obtidos por outros autores a partir do isolamento de *Campylobacter* spp. em carcaças e miúdos de frango coletadas em abatedouros clandestinos, feiras livres e supermercados, e em sobrecoxas resfriadas provenientes de hipermercados e feiras livres, respectivamente^{26,27}. Outra evidência foi a detecção de *Campylobacter* spp. em carne de frango oriunda de estabelecimentos contendo Serviço de Inspeção Federal ou Estadual²⁸. Esses dados podem estar relacionados com os diferentes mecanismos de colonização e com a enorme variedade de fontes de *Campylobacter* spp.²⁹. Outro fator que pode estar relacionado com esses dados é a presença de aves no abatedouro com penas e pele, contendo fezes devido à aglomeração durante o transporte. Essas aves carregam micro-organismos para o ambiente

de processamento, o que pode levar à contaminação cruzada. Esses são alguns dos fatores que podem justificar a detecção desses micro-organismos em diferentes tipos de produtos e estabelecimentos.

No que se refere à variabilidade na recuperação de *Campylobacter* spp., os resultados apresentados, acrescidos de dados da literatura, sugerem que os métodos de análise influenciam consideravelmente, uma vez que existem muitos fatores envolvidos no favorecimento e ou inibição do isolamento^{12,18-21}. Percentuais superiores e inferiores àqueles encontrados nesta investigação têm sido relatados^{20,26,28,30}. Fatores como a susceptibilidade às condições adversas como congelamento, aditivos, microbiota acompanhante e tensão de oxigênio podem interferir na recuperação de *Campylobacter* spp.³⁰. Além disso, o aumento na concentração de cloro na água de processamento das aves, aliado à melhora das condições de higiene, promovem a diminuição da contaminação^{31,32}. Por outro lado, algumas cepas podem apresentar resistência aos antimicrobianos usados na desinfecção e contaminar as carcaças durante o processamento³³.

CONCLUSÃO

O método do plaqueamento direto em meios seletivos mCCDA e campy-cefex foi superior na recuperação de *Campylobacter* spp. em carcaças resfriadas de frango em comparação com o enriquecimento seletivo. Por isso, o plaqueamento direto oferece resultados mais rápidos e de menor custo para os laboratórios.

Não foi verificada diferença significativa no isolamento de *Campylobacter* spp. entre os ágar mCCDA e campy-cefex. Em relação à procedência, não foram observadas diferenças significativas quanto à presença de *Campylobacter* spp. nos três locais de coleta. O mesmo ocorreu em relação aos estabelecimentos com inspeção sanitária ou isento desse serviço.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos o professor Sergio Alves da Silva pela valiosa colaboração na realização das análises estatísticas e ao Marcelo Luiz Lima Brandão pelas sugestões na finalização do artigo.

REFERÊNCIAS

1. Butzler JP. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. *Clin Microbiol Infect*. 2004;10:868-76.

2. Moore JE, Corcoran D, Dooley JSG, Fanning S, Lucey B, Matsuda M, et al. *Campylobacter*. *Vet Res*. 2005;36:351-82.
3. Viray M, Lynch M. *Campylobacter* Enteritis. Infectious diseases related to travel. Center for Diseases Control and Prevention; Yellow Book chap. 3; 2011 [acesso 2011 Out 11]. Disponível em: [http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2012/chapter-3-infectious-diseases-related-to-travel/campylobacter-enteritis.htm].
4. Nachamkin I. *Campylobacter jejuni*. In: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ. *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*. Washington (DC): ASM Press; 2001. Chap. 9, p. 179-92.
5. Stern NJ, Line JE, Chen HC. *Campylobacter* In: Downes FP, Ito K. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, Washington (DC): APHA; 2001. Chap. 31, p. 301-10.
6. Rozynek E, Dzierzanowska-Frangat K, Jozwiak P. Prevalence of potential virulence markers in Polish *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates obtained from hospitalized children and from chicken carcasses. *J Med Microbiol*. 2005;54:615-9.
7. Rizal A, Kumar A, Vidyarthi AS. Prevalence of pathogenic genes in *Campylobacter jejuni* isolated from poultry and human. *Internet J Food Saf*. 2010;12:29-34. Disponível em: [http://www.internetjfs.org/articles/ijfsv12-5.pdf].
8. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger, Winn Jr. WC. *Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido*. 5. ed. Rio de Janeiro (RJ): Medsi; 2001.
9. Oyofe BA, Thornton SA, Burr DH, Trust TJ, Pavlovskis OR, Guerry P. Specific detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by Using Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol*. 1992;30(10):2613-9.
10. Forsythe SJ. *Microbiologia da Segurança Alimentar*. Porto Alegre (RS): Artmed; 2002.
11. Lee MD, Newell DG. *Campylobacter* in poultry: filling an ecological niche. *Avian Dis*. 2006;50:1-9.
12. Kuana SL, Santos LR, Rodrigues LB, Borsoi A, Kellermenn A, Salle CTP, et al. Ocorrência de *Campylobacter* em lotes de frangos de corte e nas carcaças correspondentes. *Ciênc Anim Bras*. 2008;9(2):480-6.
13. Line JE. Development of a selective differential agar for isolation and enumeration of *Campylobacter* spp. *J Food Prot*. 2001;64:1711-5.
14. Hunt JM, Abeyta C, Tran T. *Campylobacter*. In: *Bacteriological Analytical Manual*. FDA CFSAN; 2001 [acesso 2010 nov 12]. Disponível em: [http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-7.html].
15. International Organization for Standardization. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of Campylobacter spp.* 10272-1:2006. Part 1: Detection method; Part 2: Colony count technique. Central Secretariat, Geneva.
16. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 259, de 20 de setembro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico sobre Rotulagem de Alimentos Embalados. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 21 set 2002, Seção 1.
17. Elsa AM, Jennifer AH. Media, Reagents and Stains. In: Downes FP, Ito K. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Washington (DC): APHA; 2001. Chap. 63, p. 601-48.
18. Medeiros VM. Implantação de metodologia de pesquisa de *Campylobacter* spp. no Setor de Alimentos do Departamento de Microbiologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro. [monografia especialização]. Rio de Janeiro (RJ): Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/Fundação Oswaldo Cruz; 2009.
19. Habib I, Sampers I, Uyttendaele M, Berkvens D, De Zutter L. Baseline Data from a Belgium-wide survey of *Campylobacter* species contamination in chicken meat preparations and considerations for a reliable monitoring program. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74(17):5483-9.
20. Franchin PR, Aidoo KE, Batista CRV. Sources of poultry meat contamination with thermophilic *Campylobacter* before slaughter. *Braz J Microbiol*. 2005;36:157-62.
21. Johnsen G, Kruse H, Hofshagen M. Genotyping of *Campylobacter jejuni* from Broiler Carcasses and slaughterhouse Environment by Amplified Fragment Length Polymorphism. *Poult Sci*. 2006;85:2278-84.
22. Kuana SL, Santos LR, Beatriz Salle CTP, Moraes HLS, Nascimento VP. Pré-enriquecimento e isolamento direto para identificação de *Campylobacter* em swabs cloacais e carcaças de frango. *Acta Sci Vet*. 2008b;36(1):21-4.
23. Jasson V, Sampers I, Botteldoorn N, López-Gálvez F, Baert L, Denayer S, et al. Characterization of *Escherichia coli* from raw poultry in Belgium and impact on the detection of *Campylobacter jejuni* using Bolton broth. *Int J Food Microbiol*. 2009;135:248-53.
24. Musgrove MT, Berrang ME, Byrd JA, Stern NJ, Cox NA. Detection of *Campylobacter* spp. in Ceca and Crops with and without Enrichment. *Poult Sci*. 2001;80:825-8.
25. Oyarzabal OA, Macklin KS, Barbaree JM, Miller RS. Evaluation of Agar Plates for Direct Enumeration of *Campylobacter* spp. from Poultry Carcass Rinses. *Appl Environm*. 2005;76(6):3351-4.
26. Freitas JA, Noronha GN. Ocorrência de *Campylobacter* spp. em carne e miúdos de frango expostos ao consumo em Belém, Pará. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2007;59(3):813-5.
27. Carvalho AF, Silva DM, Azevedo SS, Piatti RM, Genovez ME, Scarcelli E. Detecção dos genes da toxina cotoletal distensiva em estirpes de *Campylobacter jejuni* isoladas de carcaças de frangos. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2010;62(5):1054-61.
28. Cortez ALL, Carvalho ACBF, Scarcelli L, Miashiro S, Vidal-Martins AMC, Burger KP. Survey of chicken abattoir for the presence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2006;48(6):307-10.
29. Carvalho ACBF, Lima VHC, Pereira G T, Schocken-Iturrino RP. *Campylobacter* em granja avícola. *Rev Port Ciênc Vet*. 2001;96(540):191-5.
30. Scarcelli E, Miyashiro S, Campos FR. Detecção de *Campylobacter jejuni* em carcaças e cortes de frangos pela reação da polimerase em cadeia. *Hig Alim*. 2005;19:71-6.
31. Prencipe V, Parisiani G, Calistri P. Thermotolerant *Campylobacter* in poultry meat marketed in the Abruzzo and Molise regions of Italy: prevalence and contaminations levels. *Vet Ital*. 2007;43:157-65.
32. Mead CG, Hudson WR, Hinton MH. Effects of changes in processing to improve hygiene control on contamination of poultry carcasses with *Campylobacter*. *Epidemiol Infect*. 1995;115:495-500.
33. Peyrat MB, Soumet C, Maris P, Sanders P. Recovery of *Campylobacter jejuni* from surfaces of poultry slaughterhouses after cleaning and disinfection procedures: Analysis of a potential source of carcass contamination. *Int J Food Microbiol*. 2008;124(2):188-94.