

Universidade Federal de Minas Gerais
Escola de Veterinária da UFMG
Programa de Pós-graduação em Ciência Animal

Luciana Pimenta Reis

Utilização das metodologias imunoenzimática e reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção e caracterização de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango de corte

Belo Horizonte

2015

Luciana Pimenta Reis

Utilização das metodologias imunoenzimática e reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção e caracterização de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango de corte

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para Obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal

Área de concentração: Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal

Orientadora: Prof^a Silvana de Vasconcelos Cançado

Co-orientador: Prof. Andrey Pereira Lage

Belo Horizonte

2015

Reis, Luciana Pimenta, 1987-

R375u Utilização das metodologias imunoenzimática e reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção e caracterização de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango / Luciana Pimenta Reis. – 2015.

62 p. : il.

Orientadora: Silvana Vasconcelos Cançado

Co-orientador: Andrey Pereira Lage

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

Inclui bibliografia

1. *Campylobacter* – Teses. 2. Frango de corte – Carcaças – Teses. 3. Alimentos de origem animal – Análise – Teses. 4. Teste imunoenzimático – Teses. 5. Reação em cadeia de polimerase – Teses. I. Cançado, Silvana Vasconcelos. II. Lage, Andrey Pereira. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

CDD – 664.07

Agradecimentos

Em primeiro lugar à Deus, que tornou tudo isso possível. Que me proporcionou paciência e sabedoria nos momentos mais atribulados e me presenteou com alegria a cada passo concluído com êxito.

Aos meus pais. Cleina e Ebenezer, pelo zelo, incentivo, dedicação e exemplo.

Aos meus irmãos, Rodrigo e Liliane, pela paciência e apoio.

Ao Luciano pelo carinho e companherismo.

À minha orientadora, Professora Silvana, ao meu co-orientador, Professor Andrey, pela confiança, aprendizado e oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

À Liliane pela dedicação, disponibilidade e amizade.

Aos companheiros do Laboratório de Segurança Microbiológica de Alimentos (LSMA) do IMA e do Laboratório de Bacteriologia Aplicada (LBA) da UFMG pela ajuda em momentos importantes desta caminhada.

Aos professores e funcionários do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal, especialmente Professor Tadeu e Professora Lilian, pelas orientações.

Ao Colegiado de pós-graduação em Ciência Animal da EV/UFMG, ao Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para esta conquista.

Agradeço de coração.

*Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e
de repente você estará fazendo o impossível.*

São Francisco de Assís

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. Histórico	15
2.2. Características de <i>Campylobacter</i> spp	16
2.3. Mecanismos de virulência e patogenicia	18
2.4. Epidemiologia	19
2.5. Campilobacteriose em Aves	20
2.6. Fontes de contaminação	21
2.7. Efeito do resfriamento e congelamento na sobrevivência do <i>Campylobacter</i> spp.	22
2.8. Métodos para detecção e identificação de <i>Campylobacter</i> spp.	24
2.8.1. Isolamento e identificação de <i>Campylobacter</i> spp.	24
2.8.2. Métodos imunoenzimáticos	27
2.8.3. Métodos moleculares	29
2.8.3.1. PCR	29
2.8.3.2. PCR em tempo real	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1. Amostras	33
3.2. Pesquisa de <i>Campylobacter</i> spp	33
3.2.1. Preparo de amostras	33
3.2.2. Técnica imunoenzimática	34
3.2.3. PCR e PCR em tempo real para a detecção de <i>Campylobacter</i> spp.	35
3.2.3.1. Amostras bacterianas de referência	35
3.2.3.2. Extração de DNA	36
3.2.3.3. PCR	36
3.2.3.4. PCR em tempo real para a detecção de <i>Campylobacter</i> spp.	38
3.3. Delineamento Experimental	39
4. RESULTADOS	39
4.1. Curva de sensibilidade analítica da análise de PCR	39
4.2. Curva de sensibilidade analítica da técnica de PCR em tempo real	40

4.3. Ocorrência de <i>Campylobacter</i> spp. em carcaças de frangos de corte	41
4.4. Comparação entre os métodos imunoenzimático e moleculares para pesquisa de <i>Campylobacter</i> spp	43
4.5. Comparação entre a presença de <i>Campylobacter</i> spp. em carcaças de frangos de corte resfriadas e congeladas	44
5. DISCUSSÃO	46
5.1. Detecção de <i>Campylobacter</i> spp. realizada pelo método Imunoenzimático VIDAS® 39	46
5.2. Detecção de <i>Campylobacter</i> spp. em carcaças de frango por PCR	47
5.3. Detecção de <i>Campylobacter</i> spp. em carcaças de frango por PCR em tempo real	48
5.4. Comparação entre a detecção de <i>Campylobacter</i> spp. em carcaças de frango pelos métodos imunoenzimático VIDAS®, PCR e PCR em tempo real	49
5.5. Comparação da presença de <i>Campylobacter</i> spp. em carcaças de frangos de corte resfriadas e congeladas	50
6. CONCLUSÃO	51
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
μL	Microlitro
μM	Micromolar
BAM	<i>Manual Analítico</i> Bacteriológico
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CDT	Toxina de distensão citoletal
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTA	Doenças Transmitidas por alimentos
EFSA	Agência Europeia de Segurança dos Alimentos
ELFA	Enzyme Linked Fluorescent Assay
EUA	Estados Unidos da América
fg	Femtograma
g	Gramma
IMA	Instituto Mineiro de Agropecuária
ISO	International Standard Organization (Organização Internacional de Padrões)
kb	Kilo (1000) pares de bases
LBA	Laboratório de Bacteriologia Aplicada
Log	Logaritmo
LSMA	Laboratório de Segurança Microbiológica em Alimentos
m-CCDA	Ágar Carvão Cefoperazona Desoxicolato Modificado
MgCl	Cloreto de magnésio
mM	Milimolar
mL	Mililitro
ng	Nanograma
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pmol	Picomol
pg	Picograma
SGB	Síndrome de Guillain-Barré
TSA	Ágar triptona de soja
TTC	Cloreto de Trifeniltetrazólio
UI	Unidade internacional
UFC	Unidade Formadora de Colônias
VNC	Viável não cultivável

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diluições de DNA extraído de <i>C.jejuni</i> NCTC 11351 e <i>C.coli</i> NCTC 11366 utilizadas nas Curvas de Sensibilidade Analítica da PCR e da PCR em tempo real	37
Tabela 2. Resultados da pesquisa da presença de de <i>Campylobacter</i> spp., <i>C. jejuni</i> (Cj) e <i>C. coli</i> (Cc) em carcaças de frango de corte comercializadas em temperaturas de congelamento e resfriamento realizadas pelas técnicas imunoenzimática (VIDAS [®]), PCR e PCR em tempo real (qPCR	42
Tabela 3. Resultados da pesquisa da presença de <i>Campylobacter</i> spp. em carcaças de frango de corte comercializadas em temperaturas de congelamento e resfriamento realizadas pelas técnicas imunoenzimática (VIDAS [®]), PCR e PCR em tempo real (qPCR)	44
Tabela 4. Resultado da comparação da análise da presença de <i>Campylobacter</i> spp em carcaças de frangos de corte comercializada nas temperaturas de resfriamento e congelamento analisadas pelas técnicas imunoenzimática (VIDAS [®]) e PCR em tempo real total (qPCR)	45
Tabela 5. Resultado da comparação entre carcaças de frangos de corte comercializada nas temperaturas de resfriamento e congelamento analisadas pela técnica de PCR em tempo real (qPCR) específica para <i>Campylobacter jejuni</i> (qPCR Cj) e <i>Campylobacter coli</i> (qPCR Cc)	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Curva de sensibilidade analítica da PCR	40
Figura 2. Curva padrão da PCR em tempo real para quantificação com DNA de <i>C.jejuni</i> diluído em base 10 de 20ng a 200fg, correspondente a 10^7 a 10^2 bactérias/mL, respectivamente. R^2 : 0,997 e Eff%: 91,661	40
Figura 3. Curva padrão da PCR tempo real para quantificação com DNA de <i>C.coli</i> diluído em base 10 de 20ng a 200fg, correspondente a 10^7 a 10^2 bactérias/g, respectivamente. R^2 : 0,999 e Eff%: 95,214	41
Figura 4. Exemplo dos resultados da PCR. Marcador de 100bp (Invitrogen); amostras 81 a 86; CN-controle negativo; C.c- <i>Campylobacter coli</i> ; e C.j.- <i>Campylobacter jejuni</i>	42
Figura 5. Exemplo dos resultados da PCR em tempo real para <i>Campylobacter jejuni</i> amostras de frango congeladas e resfriadas	43
Figura 6. Exemplo dos resultados da PCR em tempo real para <i>Campylobacter coli</i> amostras de frango congeladas e resfriadas	43

RESUMO

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) são consideradas um grande problema de saúde pública mundial e dentre os micro-organismos que podem ser veiculados destacam-se as bactérias do gênero *Campylobacter* spp. Com o objetivo de detectar, caracterizar e avaliar a incidência de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango de corte congeladas e resfriadas foram analisadas, por três metodologias distintas (ensaio imunoenzimático, reação em cadeia da polimerase - PCR e PCR em tempo real), 86 amostras de carcaças de frangos de corte (43 resfriadas e 43 congeladas) coletadas em um abatedouro de aves sob inspeção federal. Das 86 amostras analisadas pelo método do ensaio imunoenzimático, apenas quatro (4,65%) apresentaram resultado positivo para *Campylobacter* spp., e estas quatro positivas eram amostras resfriadas. Pela metodologia da PCR nenhuma amostra foi considerada positiva para este micro-organismo, porém, os iniciadores utilizados nesta metodologia não foram considerados ideais. Entretanto, quando foi utilizada a técnica da PCR em tempo real, 24 (55,81%) amostras resfriadas e 21 (48,84%) amostras congeladas apresentaram resultados positivos para *Campylobacter* spp. Das amostras analisadas pelo PCR em tempo real, 40 (46,51%) foram positivas para *Campylobacter jejuni*, 15 (17,44%) foram positivas para *Campylobacter coli* e em 10 (11,63%) amostras foram detectados tanto *Campylobacter jejuni* quanto *Campylobacter coli*. Não foram observadas diferenças significativas na presença de *Campylobacter* spp. em carcaças resfriadas e congeladas. Foi concluído que a técnica de PCR é considerada de eleição para detecção desse patógeno em carcaças de frango de corte.

Palavras - chaves: *Campylobacter*, PCR, frango de corte, DTA

ABSTRACT

Foodborne diseases are considered a worldwide public health problem, and bacteria of the *Campylobacter* spp. type are among the micro-organisms that can be transmitted. In order to detect, describe and measure the presence of *Campylobacter* spp., 86 chicken carcasses (43 cooled and 43 frozen) collected at a federally inspected slaughterhouse were analyzed. Three different methods were used (immunosorbent assay, Polymerase Chain Reaction - PCR and real-time PCR). Of the 86 samples analyzed with the immunosorbent assay only four (4.65%) tested positive for the *Campylobacter* spp., and these four positive samples were cooled. Using the PCR method, no samples tested positive; however, the primers used in this method were not considered ideal. Nonetheless, when the real-time PCR method was used, 24 (55.81%) cooled samples and 21 (48.84%) frozen samples tested positive for *Campylobacter* spp. Out of the samples analyzed in real-time PCR, 40 (46.51%) tested positive for *Campylobacter jejuni*, 15 (17.44%) tested positive for *Campylobacter coli*, and in 10 (11.63%) samples both *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* were detected. There was no observable difference in the presence of *Campylobacter* spp. between cooled and frozen carcasses. We conclude that the real-time PCR method is optimal for the detection of this pathogen in chicken carcasses.

Keywords: *Campylobacter*, PCR, chicken carcass, foodborne diseases

1. INTRODUÇÃO

Atualmente o Brasil é o terceiro maior produtor de carne de frango do mundo, ficando atrás apenas dos EUA e da China. Em 2012 a produção brasileira foi de 12,645 milhões de toneladas, e do volume total produzido 8,727 milhões de toneladas (69%) foi destinado ao consumo interno e 3,918 milhões de toneladas (31%) foi destinado à exportação. Este volume exportado colocou o Brasil como maior exportador do mundo de carne de frango (União..., 2013). Desta maneira, é possível observar que o Brasil caminha para se tornar uma liderança mundial no agronegócio, porém, para se consolidar nessa atividade é preciso ampliar sua competência para atuar de modo eficiente no controle das cadeias de produção agropecuária e para garantir a qualidade e a segurança dos produtos.

Considerando o desenvolvimento da avicultura e a necessidade de produzir alimentos seguros e com qualidade, a adoção de medidas para o controle sanitário das granjas e indústrias é fundamental para evitar surtos de toxinfecções alimentares transmitidas por produtos avícolas. As doenças transmitidas por alimentos (DTA) são amplamente conhecidas e mais de 250 gêneros micro-organismos envolvidos em surtos já foram identificados. A manifestação clínica mais comum das DTA é diarreia e, devido a sua elevada incidência ou por ainda ser considerada um fato comum, representa um desafio para o seu registro e controle, dificultando o conhecimento dos alimentos e micro-organismos envolvidos nesses incidentes (CVE, 2003).

Dentre os micro-organismos envolvidos em DTA relacionadas à carne de frango, podem ser citadas as espécies do gênero *Campylobacter*. *Campylobacter* spp. são bactérias gram-negativo responsáveis por causar diarreias em seres humanos, infecções oportunistas em pacientes imunossuprimidos e diarreia e distúrbios reprodutivos em animais domésticos. Há relatos da associação do *Campylobacter* spp. com doenças auto-imunes pós-infecção incluindo, artrite, síndrome de Guillain-Barré (SGB) e síndrome de Miller Fisher (Butzler, 2004; Gorman e Adley, 2004). A infecção causada por bactérias do gênero *Campylobacter* spp. foi denominada de campilobacteriose e é considerada uma zoonose, por ser uma doença transmitida aos seres humanos por animais ou produtos de origem animal (Risk..., 2009).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) *Campylobacter* spp. é o principal agente causador de doenças transmitidas por alimentos em seres humanos e é também a bactéria que mais causa enterites infecciosas no mundo. Em países desenvolvidos e em desenvolvimento os casos de campilobacteriose superam os casos de enterites causadas por

Salmonella spp, e segundo a Agência Européia de Segurança dos Alimentos (EFSA), em 2010, na União Européia essa foi a principal zoonose relatada com uma incidência que continua a aumentar (Risk..., 2009; *Salmonella...*, 2010).

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos calcula que ocorrem 13 casos de campilobacteriose para cada 100.000 habitantes. Segundo o CDC, muitos casos não são reportados e estima-se que a campilobacteriose afete mais de 2,4 milhões de pessoas a cada ano, ou 0,8% da população mundial. Embora comumente não cause morte, cerca de 124 óbitos ocorrem a cada ano por infecções causadas por *Campylobacter* spp (*Campylobacter...*, 2010).

Espécies de *Campylobacter* termofílicas, ou seja, com temperatura ideal de crescimento entre 42 e 43°C têm sido identificadas como a maior causa de gastroenterite bacteriana em seres humanos em vários países. As espécies mais frequentemente isoladas são *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari* (Altekruse *et al.*, 1999; Houg *et al.*, 2001; Foster *et al.*, 2004).

As aves, especialmente os frangos de corte, são os principais reservatórios naturais de *Campylobacter* spp. O consumo e a manipulação de aves e produtos avícolas têm sido implicados como os principais veículos de infecção e a prevalência de *Campylobacter* spp em produtos avícolas é elevada (Jones *et al.*, 1984; Uyttendale *et al.*, 1999; Jorgensen *et al.*, 2002; Mead, 2004; Hussain *et al.*, 2007).

O efeito do resfriamento e do congelamento na sobrevivência de *C. jejuni* ainda não foram bem elucidados. Alguns estudos confirmam uma redução significativa na porcentagem de carcaças positivas para *C. jejuni* após o congelamento (Stern *et al.*, 1984, Alter *et al.*, 2005). O congelamento pode dificultar a sobrevivência de *Campylobacter* spp uma vez que, diversos fatores, incluindo a formação do gelo e a desidratação, levam à injúria do micro-organismo, além do estresse oxidativo que pode induzir a morte da célula (Park, 2002).

Os métodos convencionais de isolamento de *Campylobacter* spp em alimentos utilizam meios de enriquecimento seletivo com posterior subcultivo em meios sólidos seletivos. Estes métodos são muito demorados e, após o isolamento, a confirmação requer testes bioquímicos e sorológicos adicionais. O ensaio imunoenzimático, baseado na reação antigênica, é um método analítico utilizado para análise de vários micro-organismos em alimentos, entre eles, o *Campylobacter* spp. Este ensaio confere especificidade, e agilidade; em 50 horas é possível confirmar a presença ou não da bactéria. Já a metodologia da reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido utilizada para a pesquisa do *Campylobacter* spp. em função de sua rapidez,

especificidade e sensibilidade e tem sido padronizada para detecção, identificação e quantificação de *Campylobacter* spp. em alimentos (Cheng e Griffiths, 2003; Oliveira *et al.*, 2005; bioMérieux, 2007).

Com base nestes aspectos, os objetivos deste trabalho foram avaliar a frequência e detecção de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango congeladas e resfriadas, avaliar se a temperatura de armazenamento da carne influencia na presença desse micro-organismo e comparar as metodologias imunoenzimática, PCR e PCR em tempo real para detecção desta bactéria.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Histórico

Os primeiros relatos de uma possível infecção causada por *Campylobacter* spp. ocorreram no final do século XIX na Alemanha. Em 1886, Escherich observou micro-organismos semelhantes a *Campylobacter* spp. em fezes de crianças e gatos com diarreia e denominou estas bactérias *Vibrio felinus* (Butzler, 2004).

Porém, apenas em 1909 foram realizados os primeiros isolamentos de espécies do gênero *Campylobacter* spp, McFaydean e Stockman isolaram bactérias microaerófilas com morfologia espiralada de tecidos de fetos bovinos e ovinos abortados. Em 1918, Smith também identificou micro-organismos similares ao examinar fetos bovinos abortados, denominando-os *Vibrio fetus* (Moore, 2005).

Jones e Little, em 1931, isolaram, de bezerros com diarreia, uma bactéria espiralada microaerófila que causava lesões no jejuno e a denominaram de *Vibrio jejuni*. Já Doyle, em 1944, descreveu um *vibrion* isolado do intestino de suínos com diarreia e o denominou de *Vibrio coli*. Em 1946, Levy descreveu um surto de diarreia em seres humanos e verificou a presença de bactérias com formas curvas e espiraladas em amostra de fezes e de sangue (Butzler, 2004).

Finalmente, Sébald e Veron, em 1963, sugeriram a criação do gênero *Campylobacter*, que significa bactéria encurvada. Nesse gênero foram englobadas as bactérias anteriormente denominadas de *Vibrio fetus*, *Vibrio jejuni* e *Vibrio coli*. Esses pesquisadores verificaram que

estes micro-organismos apresentavam características muito diferentes de *Vibrio* spp., tanto no metabolismo quanto na composição do material genético, o que justificava a separação dessas bactérias em um novo gênero (Moore, 2005).

Em 1966, com base em estudos filogenéticos, Veron e Chatelain propuseram a inclusão do gênero *Campylobacter* na família *Spirillaceae*. Na década de 1980, Krieg sugeriu que o gênero *Campylobacter* não fosse mais incluído na família *Spirillaceae*, por apresentar características filogenéticas incompatíveis e, apenas em 1991, os autores Vandamme e De Ley, incluíram o gênero *Campylobacter* na família *Campylobacteriaceae*, a qual também pertence o gênero *Arcobacter* (Engberg, 2006)

Atualmente o gênero *Campylobacter* compreende 32 espécies e 13 subespécies, sendo as espécies *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* e *C. upsaliensis* conhecidas como termofílicas. São reconhecidas duas subespécies de *Campylobacter jejuni* como unidades taxonômicas independentes. São elas *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* e *C. jejuni* subsp. *doylei*. *Campylobacter jejuni* subsp. *doylei* tem sido isolada do terço inferior do estômago de pacientes com úlcera gástrica e gastrite crônica ativa, além de crianças com diarreia. Já *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* apresenta a maior frequência de isolamento das espécies do gênero, e por isso, na maioria das vezes, é referida na literatura simplesmente como *Campylobacter jejuni* (Fernandez, 2008; Euzéby, 2012).

2.2. Características de *Campylobacter* spp

O gênero *Campylobacter* (do grego capilo=curvo e bacter=bastão) constitui-se de bastonetes curvos em forma de vírgula, "S", asa de gaivota ou espiral, cujas dimensões variam entre 0,2 a 0,9 µm de largura por 0,5 a 5 µm de comprimento. São bactérias Gram-negativo, microaerófilas, não hemolíticas, não esporuladas e as colônias frequentemente não são pigmentadas. Em culturas mais antigas, ou sob condições de cultivo adversas, as células de *Campylobacter* spp. podem adquirir formas cocóides, o que representa um estágio degenerativo de seu ciclo de vida, sem levar à perda de seu poder infectante (Nachamkin, 2007). A transição da morfologia celular espiralada para uma forma cocóide ocorre na fase estacionária do crescimento e, durante esse processo, essas bactérias não são detectáveis por metodologias convencionais estando na forma viável mas não cultivável (VNC) (Bovill e Mackey, 1997).

Segundo Rowe *et al.* (1998), formas VNC de *Campylobacter* spp representam uma estratégia de sobrevivência do micro-organismo, induzida pelo estresse causado por escassez de nutrientes no meio ou temperatura inadequada para crescimento, dentre outros fatores. Há carência de informações sobre a resistência das VNC a pH e sanitizantes como cloro e compostos quaternários amoniacais, que são amplamente utilizados na indústria de alimentos e nas instalações das granjas produtoras.

Os micro-organismos do gênero *Campylobacter* são móveis e possuem um flagelo polar em uma ou em ambas as extremidades, fazendo que apresentem movimento em forma de “sacarolha”. São microaerófilos, necessitam de 3 a 5% de oxigênio e de 2 a 10% de dióxido de carbono para crescimento, e a temperatura preferencial para seu desenvolvimento é de 42°C. É um micro-organismo capaz de crescer em pH de 4,9 a 9,0, sendo o pH ótimo de crescimento entre 6,5 a 7,5 (Humphrey, 2007).

As espécies do gênero *Campylobacter* obtêm energia a partir de aminoácidos ou componentes intermediários do ciclo do ácido carboxílico, não utilizam carboidratos como fonte de carbono e não fermentam nem oxidam açúcares. No gênero *Campylobacter* existem espécies que são catalase positiva e outras negativa, sendo que as principais espécies que são as responsáveis por gastroenterites em seres humanos, *C. coli*, *C. jejuni* e *C. lari*, são catalase positiva. *Campylobacter* spp. é oxidase positiva, indol negativo e reduz nitrato. Este gênero não produz hemólise, é extremamente sensível ao cloreto de sódio, sendo que essa sensibilidade varia de acordo com a temperatura (Franco e Landgraf, 1996; Jay, 2005).

Campylobacter spp. é considerado um micro-organismo fastidioso, pois sua multiplicação ocorre de forma lenta; acredita-se que esta característica se deve ao pequeno tamanho do genoma, o qual possui de 1600 Kb a 1700 Kb, correspondendo em tamanho a 30% do genoma da *Escherichia coli*. Por possuir o genoma relativamente pequeno, o gênero *Campylobacter* apresenta um número menor de genes comparados aos outros micro-organismos patogênicos, isto reflete na necessidade de um meio complexo para o desenvolvimento, o que dificulta a sobrevivência fora do ambiente intestinal dos animais de sangue quente (Vandamme, 2000; Bhunia, 2008).

Das espécies termofílicas, *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari* são considerados espécies mais importantes como patógenos para seres humanos. *C. jejuni* se destaca como a principal espécie causadora de gastroenterites. Estas espécies patogênicas são rapidamente destruídas pelo calor, não sobrevivendo aos processos térmicos utilizados no preparo de alimentos (Humphrey, 2007; *Campylobacter...*, 2005).

Campylobacter spp. está presente no trato gastrointestinal de grande parte dos animais de sangue quente, como aves, suínos e bovinos e sua principal via de transmissão é por alimentos, carne e seus derivados contaminados e mal cozidos, além da água contaminada. A contribuição relativa de cada uma das fontes acima referidas para o peso global da doença não é clara, mas acredita-se que o consumo de carne de frango é um dos principais contribuintes. A ampla ocorrência da campilobacteriose impede o desenvolvimento de estratégias de controle ao longo da cadeia alimentar. No entanto, em países onde as estratégias específicas foram colocadas em prática para reduzir a prevalência de *Campylobacter* spp. em frangos, foi observada uma redução similar nos casos de infecção humana (Risk..., 2009).

2.3. Mecanismos de virulência e patogenia

O mecanismo pelo qual *Campylobacter* spp. causa doença no homem ainda não está esclarecido, porém são reconhecidos como principais fatores de virulência a adesão e invasão de células epiteliais do hospedeiro e a produção de toxinas. O passo inicial para que ocorra a infecção é a adesão. Elementos estruturais como o flagelo, algumas proteínas de membrana externa e lipopolissacarídeos permitem a travessia do muco intestinal e adesão da bactéria à célula epitelial. O formato curvo-espiralado da célula e o movimento típico em “saca-rolha” de *Campylobacter* spp. facilitam a colonização do epitélio intestinal (Jawets *et al.*, 1998; Fernandez, 2008).

A invasão celular tem importante papel na patogenicidade. O mecanismo pelo qual o *Campylobacter* spp. invade as células epiteliais ainda não é totalmente definido. Acredita-se que microfilamentos de actina e a formação de microtúbulos seriam responsáveis pela internalização. Além disso, certas proteínas sintetizadas após contato com a célula eucariótica poderiam facilitar a internalização da bactéria promovendo a inflamação e a bacteremia (Fernandez, 2008).

A caracterização da atividade tóxica de *Campylobacter* spp. vem sendo estudada, pois somente a invasão das células hospedeiras não seria capaz de causar os efeitos citopáticos observados nas enterites. As toxinas têm sido consideradas um dos fatores mais importantes para justificar esses efeitos, sendo que essas podem ser enterotoxinas e/ou citotoxinas. A toxina de distensão citoletal (CDT), codificada pelos genes adjacentes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*, já foi caracterizada e detectada em diversas amostras de *Campylobacter* spp., seu papel como

fator de virulência ainda não está elucidado, mas acredita-se que haja o envolvimento de CDT no processo de diarreia causando alteração nas células das criptas intestinais, levando a uma erosão temporária e subsequente perda da função de absorção (Wassenaar *et al.*, 1997; Purdy *et al.*, 2000; Van Vliet e Ketley, 2001; Park, 2002).

2.4. Epidemiologia

No Brasil, a presença de *Campylobacter* spp. tem sido relatada em casos de diarreia aguda ou crônica e em indivíduos assintomáticos. Em 2003, foi notificado ao Centro de Vigilância Epidemiológica de São Paulo dois surtos de infecção causados por *Campylobacter* spp., um envolvendo três pessoas que haviam consumido ovos de Páscoa contaminados, em abril na cidade de Ribeirão Preto, e outro, na cidade de Santo André em agosto, onde foi relatada a ocorrência da doença em duas pessoas que haviam ingerido carne de frango (Surtos..., 2003).

Segundo Scarcelli *et al.* (2005), *Campylobacter* spp. foi o segundo patógeno mais isolado de crianças com idade inferior a quatro anos. Estes autores relataram que aproximadamente 25% dos quadros diarreicos diagnosticados no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Fleury em São Paulo, no período de janeiro de 1998 a abril de 2001 foram causados por essa bactéria.

Em uma análise epidemiológica dos surtos de doenças transmitidas por alimentos realizada no Brasil no período de 2000 a 2011, *Campylobacter* spp. foi considerado pouco frequente, sendo relatado em apenas 3 surtos durante o período estudado, porém estes dados podem ter sido subestimados devido a dificuldade de diagnóstico da doença, técnicas de cultivo para bactérias microaerófilas que não são feitas na rotina, e por não considerar casos isolados (Dados..., 2011).

Apesar de ser considerada uma doença comum, os surtos de campilobacteriose são raros. As características do micro-organismo, a dificuldade de acompanhamento dos casos pela saúde pública e a dificuldade de diagnóstico pelos laboratórios podem ser algumas das razões por trás da inesperada baixa incidência de surtos (Wall *et al.*, 1996; Little *et al.*, 2010).

Mazick *et al.* (2006) relataram um grande surto de campilobacteriose, ocorrido em maio de 2005 na cidade de Copenhage, Dinamarca. Dos 247 funcionários de uma empresa que

comeram na cantina 79 tiveram sintomas da doença. Os autores observaram que o surto estava relacionado ao consumo de um prato à base de carne de frango (salada de frango).

No Canadá ocorreu um surto causado por *Campylobacter jejuni*, em junho de 2007. O surto afetou mais de 200 dos 785 participantes de uma corrida em British Columbia, a provável causa do surto foi a ingestão de água e lama contaminadas com fezes de animais pelos participantes (Stuart *et al.*, 2008).

Calciati *et al.* (2012) descreveram um surto de campilobacteriose ocorrido na cidade de Barcelona, Espanha, em 2010. Na ocasião, 75 crianças desenvolveram a doença. Das amostras de fezes coletadas das crianças doentes, 64,4% foram positivas para *C. jejuni*. Amostras de água, frango assado e salada russa foram negativas para todos os micro-organismos pesquisados, porém *C. jejuni* é considerado sensível a baixas temperaturas e os alimentos suspeitos foram mantidos congelados o que pode justificar a dificuldade no isolamento. Autoridades de vigilância epidemiológica detectaram deficiências na cozinha da escola e no processo de manipulação de alimentos, como a utilização de mesma superfície para manipulação de alimentos crus e cozidos o que eleva o risco de ocorrência de contaminação cruzada.

Outro surto ocorreu na cidade de Liverpool, Reino Unido, em janeiro de 2011, e todos os envolvidos se alimentaram em um mesmo restaurante. Das 26 pessoas expostas, 11 pessoas apresentaram sintomas consistentes que presumissem infecção por *Campylobacter* spp. Das 11 pessoas com sintomas característicos de campilobacteriose, apenas quatro forneceram amostras de fezes e tiveram a confirmação laboratorial da doença. Agentes de vigilância epidemiológica detectaram o micro-organismo no *parfait* de fígado de frango (Farmer *et al.*, 2012).

2.5. Campilobacteriose em Aves

Os pombos, gaivotas, pardais, patos, perus e especialmente, o frango, são considerados reservatórios primários de *Campylobacter* spp., principalmente *C. jejuni* e *C. lari*. Sabe-se que, nas aves, a colonização é geralmente assintomática, podendo ser encontrados níveis de 10⁹ Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/g de fezes sem sintomas clínicos da doença. A alta incidência de *C. jejuni* em frangos pode ser reflexo da sua temperatura ótima de multiplicação, uma vez que o trato intestinal das aves tem uma temperatura superior à dos

mamíferos, cerca de 42°C. A alta densidade populacional na criação destes animais se tornou um fator importante para a disseminação desse agente entre aves (Park, 2002; Forsythe, 2002; Zhang, 2008).

A transmissão de *Campylobacter* spp. entre aves ocorre principalmente por via horizontal, através de cama do aviário, de moscas, da água de bebida, de pessoas e do contato com ratos, equipamentos contaminados, etc. Cerca de 90% de um lote torna-se infectado dois a quatro dias após o início da eliminação da bactéria no ambiente, devido a alta transmissão via horizontal desse agente entre aves e por estas eliminarem o micro-organismo por semanas após a contaminação (Shane e Stern, 2003).

Franchin *et al.* (2005) analisaram, no sul do país, as possíveis fontes de contaminação por *Campylobacter* termofílico em frangos antes do abate. As amostras que apresentaram maior frequência de isolamento de *Campylobacter* spp. foram amostras de penas (79,2%) seguidas das amostras de cloaca (75%).

2.6. Fontes de contaminação

Os alimentos de origem animal são considerados a principal fonte de infecção da campilobacteriose em seres humanos. Estima-se que 50-70% dos casos tenham origem alimentar e estejam relacionados ao consumo ou à manipulação de carne de frango crua contaminada, sendo que a contaminação de carcaças de frangos em abatedouros é considerado o principal fator de risco para estas infecções (Altekruse *et al.*, 1999; Shane e Stern, 2003; Rozynek *et al.*, 2005).

Falhas no processo de evisceração, más condições de higiene e manipulação são pontos críticos na contaminação de carcaças de frango. O controle adequado durante o processo de abate é importante para redução de *Campylobacter* spp. no produto final (Carvalho *et al.*, 2002).

Talvez a forma mais importante para o alimento cárneo tornar-se veículo de infecção da campilobacteriose, seja a contaminação cruzada durante a manipulação dos alimentos. Neste aspecto, a carcaça de frango congelada assume grande importância, pois a água de degelo em contato com outros alimentos, principalmente os ingeridos *in natura*, poderia explicar a origem dos frequentes casos de infecção humana (Skirrow, 1991; Scarcelli, 2005).

Paulsen *et al.* (2005) analisaram 198 amostras de carne de frango adquiridas em um supermercado na Áustria, e isolaram *Campylobacter* spp. em 39,4% das amostras analisadas. Parisi *et al.* (2007), em pesquisa realizada na Itália avaliaram 30 amostras de carne de frango do varejo e detectaram *Campylobacter* spp. em 76% amostras.

Kuana *et al.* (2008), em Porto Alegre (RS), pesquisaram a presença de *Campylobacter* spp. em 96 carcaças de frango em um abatedouro antes da imersão no chiller e encontraram uma alta incidência do micro-organismo, 97,9% das amostras foram positivas.

Oliveira e Oliveira (2013) realizaram um trabalho com o objetivo de avaliar a contaminação de carcaças de frangos de corte pelo micro-organismo *Campylobacter* spp. antes de entrar no processo de pré-resfriamento (pré-chiller) e após a saída deste (pós-chiller). Neste estudo os autores encontraram 56,0% de amostras positivas no pré-“chiller” e 44,0% no pós-“chiller”, demonstrando uma redução na contagem de *Campylobacter* spp. após o pré-resfriamento.

Menezes (2013) em Minas Gerais, pesquisou a presença de *Campylobacter* spp. em 240 carcaças de frango e encontrou uma baixa incidência desse micro-organismo, 2,08% das amostras foram positivas.

2.7. Efeito do resfriamento e congelamento na sobrevivência do *Campylobacter* spp.

A redução da temperatura prolonga a vida útil dos alimentos, devido ao aumento no tempo de geração de micro-organismos, retardando a sua multiplicação. A refrigeração evita a multiplicação dos micro-organismos termófilos e de muitos mesófilos. A diminuição da temperatura de um alimento abaixo do seu ponto de congelamento faz com que parte da água que o alimento contém mude de estado, formando cristais de gelo. A imobilização da água na forma de gelo e o aumento na concentração de solutos reduzem a atividade de água. Quando os alimentos são armazenados em baixas temperaturas uma parte da população bacteriana pode não sofrer nenhuma injúria e continuar viva, outra parte pode ter sofrido injúria subletal e estar na forma VNC e outra parte pode não sobreviver (Fellows, 1994).

Define-se como carne refrigerada, aquela armazenada em temperaturas de 0 a 4°C. O prazo de vida comercial das carnes resfriadas varia em função das condições técnicas de sua obtenção e das temperaturas em que são mantidas. Já as carnes congeladas são aquelas mantidas em temperaturas abaixo do seu ponto de congelamento (-1,5 °C). O congelamento é a forma de

conservação, a longo prazo, que menos deprecia o valor nutritivo e a qualidade sensorial da carne “in natura”. A carne magra, contendo em torno de 75% de água inicia seu congelamento a temperaturas inferiores a $-1,5^{\circ}\text{C}$. A -5°C , aproximadamente 75% da água cristaliza-se, a -10°C , cerca de 82%, a -20°C , em torno de 85%, e a -30°C , aproximadamente 87%. Cerca de 12% da água total encontra-se de tal forma ligada às proteínas que não se congela, ainda que a temperaturas muito baixas (Pardi *et al.*, 1995).

O efeito do resfriamento e do congelamento na sobrevivência de *C. jejuni* ainda não foi bem elucidado. *C. jejuni* apresenta uma temperatura ótima de multiplicação entre 37°C a 42°C e não cresce a temperaturas inferiores a 30°C , porém apresenta atividade biológica a 4°C e pode sobreviver na água por diversas semanas a esta temperatura (HUNT *et al.*, 2001; Bhaduri e Cottrell, 2004).

Diversos fatores, incluindo a formação do gelo e a desidratação, levam à injúria do micro-organismo, além do estresse oxidativo, que pode levar a morte da célula, reduzindo significativamente a sobrevivência de *Campylobacter* spp. ao congelamento (Park, 2002).

A redução da prevalência do micro-organismo em amostras congeladas foi demonstrada em um estudo realizado no Reino Unido, onde a positividade para *Campylobacter* spp. passou de 56% em amostras frescas para 31% em amostras de frango congeladas (UK-wide..., 2001).

Bhaduri e Cottrell (2004) avaliaram a sobrevivência de *C. jejuni* durante o resfriamento a 4°C e congelamento a -20°C em amostras de frango artificialmente contaminadas armazenadas por um, três e sete dias quando as amostras eram resfriadas e um, três, sete e quatorze dias quando eram congeladas. A refrigeração causou um decréscimo de 0,31 para 0,63 \log_{10} UFC/g nas contagens após 3 e 7 dias, indicando que esta bactéria pode sobreviver ao período de estocagem utilizado durante a comercialização de carnes resfriadas. As amostras congeladas apresentaram um declínio significativo de 0,56 para 1,57 \log_{10} UFC/ g na contagem de *C. jejuni*, porém, células viáveis foram detectadas após 14 dias de estocagem.

Estudo feito no País de Gales, entre março e dezembro de 2005, mostrou que o congelamento não prejudicou a recuperação de *Campylobacter* spp. nas amostras de carne de frango analisadas. Neste estudo 73,5% das 544 amostras de carne de frango fresca e 71,9% das 192 amostras congeladas analisadas estavam contaminadas com *Campylobacter* spp. Os autores concluíram que houve diferença na presença de *Campylobacter* spp. em carcaças resfriadas e congeladas (Meldrum *et al.*, 2007).

Mazieiro e Oliveira (2010) pesquisaram a prevalência de *Campylobacter* spp. termofílicos em 30 amostras de carne de frango frescas, que foram divididas em sub-amostras, e submetidas a três tratamentos. O primeiro foi o grupo controle, analisado imediatamente após a coleta, no segundo tratamento as amostras foram refrigeradas a 4°C por sete dias e no terceiro foram congeladas a -20°C por 28 dias. Os autores encontraram a bactéria em 93,3% das amostras frescas, em 53,3% das amostras refrigeradas e em 36,6% das amostras congeladas. Foi observada uma redução significativa na contagem do micro-organismo nas amostras resfriadas e congeladas quando comparadas com as amostras frescas. Esta redução foi de aproximadamente 1,88 e 2,33 log₁₀ UFC/g, respectivamente.

Bounfleur (2009), com o objetivo de avaliar o efeito do resfriamento e do congelamento na contaminação de alimentos por *C. jejuni*, analisou 36 amostras resfriadas de miúdos de frango coletados em supermercados de Santa Maria (RS), todas as amostras foram posteriormente submetidas ao congelamento por sete dias a -18°C e analisadas novamente após esse período. O autor observou a redução na taxa de positividade nas amostras que foram congeladas, o micro-organismo foi encontrado em 22 amostras resfriadas e em apenas três amostras congeladas.

2.8. Métodos para detecção e identificação de *Campylobacter* spp.

A detecção e o isolamento de micro-organismos patogênicos em alimentos pode apresentar dificuldades, principalmente relacionada ao número de micro-organismos presentes. Quando um alimento está contaminado com bactérias patogênicas, elas frequentemente estão em números baixos, com distribuição heterogênea e alta competitividade com outras espécies não patogênicas, necessitando da análise de um grande número de amostras para que haja confiabilidade nos resultados negativos (Cason *et al.*, 1997).

2.8.1. Isolamento e identificação de *Campylobacter* spp.

Os métodos de cultura utilizados para isolamento, identificação e diferenciação entre as espécies de *Campylobacter* são demorados e difíceis devido a natureza fastidiosa do micro-organismo. A detecção de *Campylobacter* spp. em alimentos deve levar em consideração que

a população presente pode ser baixa, devido ao fato de *Campylobacter* spp. ser sensível a concentração de oxigênio do ar (21%) e não crescer a temperaturas abaixo de 30°C, utilizadas normalmente na conservação dos alimentos. O sucesso da detecção, geralmente, depende da análise de um grande número de amostras, concentração de células presentes e enriquecimento seletivo em condições microaerófilas à temperatura de 42 °C. A manutenção de condições seletivas, tanto no enriquecimento quanto no plaqueamento subsequente, é garantida pela utilização de meios nutritivos suplementados com sangue de cavalo ou carneiro e diferentes antibióticos, tais como, vancomicina, polimixina, cicloheximida, trimetoprim, rifampicina, cefoperazona, anfotericina, cefalotina, colistina, cefazolina, novobiocina e bacitracina. A utilização de meios adicionados de carvão ativado em substituição ao sangue é comum, além da adição de agentes redutores, como o sulfato ferroso, metabissulfito de sódio e piruvato de sódio, na concentração de 0,025% cada (Penner, 1988; On e Holmes, 1992; Donnison., 2002).

Line (2001) avaliou diferentes formulações de antibióticos para a recuperação de *Campylobacter* spp., e os melhores resultados foram obtidos com a combinação de cefoperazona, cicloheximida, vancomicina, trimetoprim e polimixina B. Esse mesmo autor também comprovou que a adição de 200 mg/L de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) facilita a visualização e contagem das colônias.

O pré-enriquecimento com incubação a 37°C por quatro horas permite a recuperação das células de *Campylobacter* spp. injuriadas pela desidratação, aquecimento, falta de nutrientes, congelamento ou exposição a radicais de oxigênio. Portanto, a incubação a 37 °C por 4 horas é recomendada antes da incubação a 42°C por mais 20 a 44h. Ultrapassar quatro horas de pré-enriquecimento pode favorecer a multiplicação da microbiota contaminante (Donnison, 2003).

Vários métodos têm sido reportados na literatura para a análise de *Campylobacter* spp. Os meios de enriquecimento descritos com maior frequência são: caldo Preston, caldo Exeter, caldo Bolton e caldo Park e Sanders. Os meios eletivos mais comumente utilizados são: Skirrow, Campy-Cefex, Butzler, Preston e Exeter (todos com inclusão de sangue), mCCDA (Modified Charcoal Cefoperazone, Deoxycholate Agar) e Karmali (sem inclusão de sangue, mas com inclusão de carvão ativado). O caldo Preston, seletivo para isolamento de *C. jejuni* e *C. coli*, proposto por Bolton e Robertson em 1982, têm sido muito utilizado por ser mais seletivo que o meio de Skirrow no isolamento de *Campylobacter* spp. de diferentes origens (Donnison, 2003).

O caldo Bolton é recomendado pelo Food and Drug Administration (FDA) através do Bacteriological Analytical Manual (BAM) como meio de enriquecimento para recuperar *Campylobacter* spp. em diferentes tipos de alimentos, associado ao pré-enriquecimento por 4h a 37°C e ao enriquecimento seletivo a 42°C por 20 a 44 h em condições microaerófilas, seguido de estriamento em ágar seletivo (Hunt *et al.*, 2001). Pode ser usado com sucesso sem sangue, contém sulfato ferroso, metabissulfito de sódio e piruvato de sódio. Estes compostos suplementares aumentam a tolerância de *Campylobacter* spp. ao oxigênio extinguindo ânions superóxidos e peróxido de hidrogênio que ocorrem espontaneamente no meio de cultura.(Gonçalves e Franco, 2002; Paulsen *et al.*, 2005).

Paulsen *et al.* (2005) compararam o caldo Preston e o caldo Bolton e verificaram que o enriquecimento em caldo Bolton foi mais sensível e apresentou uma porcentagem de isolamento de *Campylobacter* spp. significativamente maior que a obtida após o enriquecimento em caldo Preston após 48h de incubação a uma temperatura de 41,5±0,5 °C.

Para detecção qualitativa de *Campylobacter* spp. termotolerantes por um método de cultivo tradicional, a International Organization for Standardization (ISO), pela especificação técnica 10272-1/2006, preconiza a diluição da amostras a 1:10 (peso/volume) e homogeneização do conteúdo. Posteriormente, 10 mL da amostra dessa mistura deve ser adicionado a 90 mL de caldo de Bolton com 5% de sangue de cavalo e suplemento seletivo, incubadas em condições de microaerofilia a 37°C durante 4 a 6 horas e, em seguida, a 41,5°C por 40 a 48 horas. Após a incubação, uma alçada da amostra deve ser repicada em agar mCCDA e incubado a cerca de 40°C a 41,5°C por 48 horas, sob condições de microaerofilia. Colônias com morfologia semelhante a *Campylobacter* spp. termotolerantes devem ser repicadas em TSA (agar triptona de soja) e incubadas também em condições de microaerofilia a 41,5°C por 24 a 48h. Os isolados devem ser confirmados por provas bioquímicas (Schnider *et al.*, 2010).

As colônias de *Campylobacter* spp. nos diversos meios de plaqueamento (mCCDA, Skirrow ou Butzler) são semelhantes, podendo apresentar-se lisas, convexas e brilhantes, com bordas perfeitas, ou planas, translúcidas e lustrosas, com bordas irregulares e espalhadas. Geralmente são incolores, levemente cremes ou acinzentadas, com dimensão variando de pontual a 4 a 5 mm. Nos meios com sangue não apresentam hemólise (Silva *et al.*, 2007).

Campylobacter spp. reduz o cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) formando um complexo insolúvel magenta quando cresce em meios de cultura contendo este sal. Em amostras com uma elevada carga de microbiota competitiva os agentes seletivos do meio de enriquecimento podem ser insuficientes para inibir a multiplicação e comprometer a detecção de

Campylobacter spp. As colônias de micro-organismos contaminantes geralmente são maiores e apresentam-se úmidas. O técnico precisa ser experiente para distinguir as colônias de *Campylobacter* spp. das colônias contaminantes (Dufrenne *et al.*, 2001; Line, 2001).

É muito importante lembrar que embora várias técnicas de isolamento de *Campylobacter* spp. tenham sido testadas e aprovadas, a exposição de *Campylobacter* spp. a condições adversas pode causar injúria sub-letal e isto pode inibir a multiplicação subsequente nos meios de isolamento empregados nos laboratórios. Condições desfavoráveis induzem as células a mudar sua característica de morfologia vibrióide para a forma cocóide (VNC), que não podem ser cultivadas, mesmo em meios seletivos. As células cocóides retêm algumas das suas propriedades associadas à manutenção da viabilidade e virulência, mesmo com a inibição de transcrição de DNA, e permanecem capazes de reduzir certos sais de tetrazólio. As células VNC representam um perigo potencial à saúde pública e são de interesse considerável em microbiologia de alimentos, já que um lote pode ser liberado devido à não detecção do patógeno, apesar da sua presença (Forsythe, 2002; Mead, 2004).

Várias provas bioquímicas são usadas para diferenciar as espécies de *Campylobacter*, como a produção de oxidase, catalase, sulfeto de hidrogênio, hidrólise do hipurato, redução de nitrato e sensibilidade a cefatolina e ácido nalidíxico. O uso dos antibióticos para diferenciação de espécies tem sido problemático devido à resistência de algumas amostras. A distinção entre espécies relacionadas tais como, *C. jejuni* e *C. coli*, está baseada no teste da hidrólise do hipurato de sódio (Barrett *et al.*, 1988; Endtz *et al.*, 1991).

2.8.2. Métodos Imunoenzimáticos

As técnicas microbiológicas convencionais tornam difícil e delicada a cultura de *Campylobacter* spp., devido as exigências particulares relativas a incubação dos meios de enriquecimento e de isolamento. Existem outros métodos de pesquisa da bactéria de forma mais rápida, sensível e específica, destacando-se os testes imunoenzimáticos (Jorge, 2005; BioMériux, 2007).

O ensaio imunoenzimático envolve uma reação antígeno-anticorpo específica. O antígeno a ser dosado se liga a um anticorpo específico marcado com uma enzima. A reação é medida através da intensidade de cor produzida (colorimétrica) que é proporcional a quantidade do antígeno presente na amostra. O ensaio imunoenzimático fluorescente, que associa o método

sanduíche com uma detecção final por fluorescência, é utilizado na técnica ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) do sistema automatizado imunoenzimático VIDAS[®]. A reação antígeno-anticorpo é marcada com um anticorpo associado a enzima fosfatase alcalina que reage com o substrato e produz um composto fluorescente. A emissão de fluorescência é proporcional à quantidade de antígeno ou anticorpo presente na amostra (Oyarzabal *et al.*, 2012).

Borck *et al.* (2002), com o objetivo de comparar a especificidade e a sensibilidade, de dois ensaios imunoenzimáticos (VIDAS[®] e EiaFoss) para detecção de *Campylobacter* spp., analisaram 100 amostras de fezes, 41 amostras de ossos de pescoço de perus e 61 amostras de carne de peru, coletadas em um abatedouro na Dinamarca. Os autores verificaram que a especificidade apresentada em ambos os métodos foi elevada, acima 93%. Entretanto, os autores encontraram diferenças consideráveis nas sensibilidades dos métodos, que variaram de acordo com o tipo de amostra. Os resultados das amostras de fezes, onde a carga bacteriana encontrada foi alta, apresentaram a maior sensibilidade para os dois métodos (94% para VIDAS[®] e 87% para EiaFoss). Para as amostras de ossos, o método EiaFoss apresentou uma sensibilidade significativamente menor (31%) que o VIDAS[®], que apresentou sensibilidade de 96%. Os resultados das amostras de carne apresentaram a sensibilidade de 73% e 64% para EiaFoss e VIDAS[®], respectivamente.

Liu *et al.* (2009) avaliaram o desempenho das metodologias do isolamento tradicional e imunoenzimática (VIDAS[®]) para pesquisa de *Campylobacter* spp. em carnes de frangos de corte. Neste trabalho, os autores, que coletaram 93 amostras de carne de frango no varejo do estado do Alabama (USA), encontraram 50 (54,5%) amostras positivas para *Campylobacter* spp. pela metodologia do isolamento tradicional e 54 (58,2 %) amostras positivas para este micro-organismo pela técnica do VIDAS e concluíram que as duas metodologias foram considerados semelhantes.

Gonçalves *et al.* (2012) realizaram um trabalho onde foram coletadas 24 carcaças de frango comercializadas na cidade de Campo Mourão/PR. Neste estudo os autores utilizaram o sistema imunoenzimático VIDAS[®] para a pesquisa de *Campylobacter* spp. e encontraram 79,16% de amostras positivas.

Menezes (2013) avaliou a presença de *Campylobacter* spp., utilizando o método imunoenzimático VIDAS[®], em 240 carcaças de frangos de corte coletadas de vários abatedouros do Estado de Minas Gerais e encontrou apenas cinco (2,08%) amostras positivas para este micro-organismo. O autor observou que os resultados obtidos demonstraram que a

baixa identificação do micro-organismo pelo método utilizado poderia indicar um número de células do agente em quantidade inferior ao limite de detecção do método ou que as bactérias estivessem em formas viáveis não cultiváveis.

2.8.3. Métodos moleculares

A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) tornou-se muito difundida e bastante utilizada para o diagnóstico laboratorial de *Campylobacter* spp., principalmente pelas vantagens da alta sensibilidade e especificidade, além da facilidade de sua execução (Butzler, 2004).

A metodologia de PCR é baseada na amplificação de sequências de DNA ou de RNA específicas, que a partir de uma quantidade de material amplificado fica disponível para alcançar o limiar de detecção. Os iniciadores são sequências iniciadoras do processo de síntese e correspondem a curtas cadeias de nucleotídeos complementares à região inicial (primer forward) e região final (primer reverse) da sequência que se deseja amplificar, chamada sequência alvo. A reação ocorre em três etapas, a primeira, chamada de desnaturação (melting), consiste na separação da dupla fita do DNA a ser amplificado, a segunda, chamada de anelamento (annealing) ocorre quando o iniciador se liga ao DNA a ser amplificado, e a terceira, conhecida como extensão ou hibração (extension), ocorre quando há a síntese da nova fita de DNA (Sambrook e Russel, 2001).

2.8.3.1. PCR

A PCR utiliza eletroforese em gel de agarose para detecção do produto de amplificação. Tem como variante a PCR multiplex, onde a reação desenhada permite amplificação simultânea de múltiplas sequências alvo numa mesma amostra de interesse usando mais de um par de iniciadores. Quando a reação escolhida possui duas sequências alvo, necessita de dois pares de iniciadores e é conhecida como PCR duplex (Elnifro *et al.*, 2000).

Harmon *et al.* (1997) realizaram um ensaio em que uma técnica de PCR foi desenvolvida utilizando dois conjuntos de iniciadores para a identificação e diferenciação de *C. coli* e *C. jejuni*. Após o desenvolvimento da técnica os autores avaliaram 85 amostras de

Campylobacter spp., isoladas a partir de carne de frango. Para realizar a identificação foi utilizada a técnicas de PCR em paralelo com os métodos bioquímicos convencionais. A identificação das espécies pelos dois métodos concordaram em 83 dos 85 isolados analisados. Pela PCR, 23 foram identificados como *C. coli* e 62 como *C. jejuni*.

Persson e Olsen (2005), com o objetivo de comparar uma técnica de PCR desenvolvida para a identificação *C. coli* e *C. jejuni* com métodos bioquímicos convencionais, utilizaram 135 amostras de fezes humanas artificialmente contaminadas com *Campylobacter* spp. em concentrações que variaram de 10^2 a 10^7 bactérias/mL. As metodologias identificaram 47 amostras de *C. coli* e 88 amostras de *C. jejuni* observado-se uma concordância de 99,26% da PCR com as análises bioquímicas. Os autores observaram ainda que a técnica de PCR detectou *C. coli* e *C. jejuni* a partir da concentração de 10^5 células/mL de fezes. Villardo *et al.*(2006), também realizaram um trabalho com o objetivo de comparar os testes bioquímicos convencionais e a técnica de PCR duplex para identificar espécies de *Campylobacter* spp. Estes autores utilizaram 167 amostras do micro-organismo isoladas de primatas e concluíram que as duas metodologias utilizadas para identificação das espécies de *Campylobacter* spp. concordaram em 163 das 167 amostras isoladas e que a utilização da PCR resultou na identificação de 64 amostras como *C. jejuni* e 103 como *C. coli*.

Alves *et al.* (2011) avaliaram, pela técnica do PCR, a presença de *Campylobacter* spp. em 96 amostras coletadas em um frigorífico da região sul do Brasil. Destas 96 amostras, 32 eram de suabe de cloaca coletadas das aves durante a pendura, 33 amostras eram de conteúdo cecal coletados após o abate das aves e de 31 amostras eram de carcaças inteiras coletadas após o gotejamento. Os autores encontraram o micro-organismo em 93 (95,8%) amostras analisadas, sendo 29 amostras de suabe de cloaca, e todas as amostras de conteúdo cecal e de carcaças de frango.

Perdoncini (2012) avaliou 57 carcaças de frangos de corte após o pré-resfriamento no chiller, utilizando a metodologia tradicional para detecção e isolamento de *Campylobacter* spp. e a técnica de PCR para identificação de *C. jejuni* e *C. coli*. O autor encontrou o micro-organismo em 70,2% das carcaças analisadas, sendo que nas amostras positivas foram encontrados 82% de *C. jejuni* e 8% de *C. coli*. Em 10% das amostras foram identificadas ambas as espécies.

Alves e Oliveira (2013) avaliaram a presença de *Campylobacter* spp. em 50 amostras de cortes de frango resfriados coletadas em supermercados de Londrina, PR. Os autores utilizaram a metodologia de cultivo tradicional para detecção e a PCR para a confirmação do

gênero. Foram consideradas positivas 56% das amostras analisada pelo método tradicional e todas foram confirmadas pela PCR.

2.8.3.2. PCR em tempo real

A técnica de PCR em tempo real combina a metodologia de PCR com um mecanismo de detecção e quantificação dos produtos amplificados por fluorescência. Esta metodologia permite que os processos de amplificação, detecção e quantificação do DNA sejam realizados em uma única etapa, agilizando a obtenção de resultados e diminuindo o risco de contaminação da amostra. A técnica de PCR em tempo real determina valores durante a fase exponencial da reação, monitorando a reação ciclo a ciclo e associando a amplificação do alvo com a emissão de uma determinada quantidade de fluorescência. A intensidade de sinal emitido é proporcional à quantidade de DNA alvo amplificado e aumenta exponencialmente em cada ciclo de amplificação. O ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado de Cycle Threshold (Ct) e é este ponto que indica a presença do gene alvo e pode-se, a partir desse ponto, por comparação a um padrão ou curva relativa, avaliar a quantidade de material inicialmente presente. Para essa quantificação é necessário criar uma curva padrão com quantidades pré-estabelecidas do ácido nucléico. Os valores obtidos pela PCR em tempo real das amostras desconhecidas devem ser comparados aos valores da obtidos do padrão (Marcelino, 2006; Real..., 2008).

Entre as principais tecnologias da PCR em tempo real, os dois sistemas de detecção mais usados para gerar a fluorescência são o SYBR Green e a sonda específica. SYBR Green são fluoróforos que se ligam a fita dupla de DNA e emitem fluorescência, este sistema detecta produtos inespecíficos e não permite análises multiplex. A sonda específica, são oligonucleotídeos marcados com fluoróforos altamente específicos ao produto da PCR de interesse, este sistema não detecta produtos inespecíficos e permite análises multiplex, a sonda mais utilizada é a Taqman (Real..., 2008).

Sails *et al.* (2003) desenvolveram um ensaio de PCR em tempo real para a detecção de *C. jejuni* em alimentos e compararam o ensaio desenvolvido com a metodologia convencional de isolamento. Para este trabalho foram utilizadas 97 amostras de alimentos (53 de carne crua de aves, 25 de vísceras de aves, cinco de mariscos crus e 14 de leite) que foram testadas pelas duas técnicas. Foram encontradas 63 amostras positivas para *C. jejuni* pela metodologia da

PCR em tempo real e 57 amostras positivas pelo método do isolamento. Os resultados encontrados demonstraram que 84 (86,6%) amostras apresentaram os mesmos resultados quando foram analisadas pelas duas técnicas utilizadas.

Schnider *et al.* (2010), com o objetivo de comparar dois ensaios de PCR em tempo real com a metodologia de isolamento convencional para detecção de *Campylobacter* spp., coletaram 351 amostras de pele de pescoço de frangos de corte em um abatedouro na Suíça. O primeiro ensaio de PCR em tempo real foi estabelecido com base em dois alvos diferentes descritos por Hong *et al.* (2007), (hipO e ceuE para *C. jejuni* e *C. coli*, respectivamente) e o segundo com base no gene *fusA*, (este gene permite a diferenciação entre *C. jejuni* e *C. coli*). Foram consideradas positivas para *Campylobacter* spp., 211 (60,1%) amostras pelo ensaio de hipO – ceuE, 244 (69,5%) amostras pelo ensaio de *fusA* e 254 (72,4%) amostras pelo isolamento tradicional. Aproximadamente 60% das amostras positivas continha *C. jejuni*, e menos de 10% das amostras continham *C. coli*. Os autores concluíram que a técnica de PCR em tempo real é um método adequado para a detecção, quantificação e diferenciação de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango.

Almeida *et al.* (2011), com o objetivo de comparar as metodologias imunoenzimática VIDAS e PCR em tempo real para análise de *Campylobacter* spp., coletaram 60 amostras de carcaças de frangos de corte e 60 amostras de miúdos comestíveis (moela) oriundas de quatro abatedouros diferentes localizados no Estado de Goiás (15 amostras de carcaças e 15 amostras de moela de cada indústria). Os autores encontraram 10,83% de amostras positivas pela metodologia VIDAS e 12,50% de amostras positivas pelo PCR em tempo real e concluíram que a técnica PCR em tempo real foi superior ao VIDAS para detecção de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango.

Ugarte-Rui *et al.* (2012) compararam a metodologia tradicional com a técnica PCR em tempo real para detecção de *Campylobacter* spp. Foram analisadas 114 amostras de produtos de frango de corte (38 de pele de pescoço, 38 amostras de carne de peito e 38 amostras de fezes). Pela técnica PCR em tempo real os autores encontraram positividade em 97% das amostras de fezes, 100% das amostras de pele de pescoço e 97% das amostras de carne de peito. Pela metodologia tradicional a taxa de positividade foi menor em todas as amostras analisadas, 90% das amostras de fezes, 82% das amostras de pele de pescoço e 11% das amostras de carne de peito de frango foram positivas. Os autores concluíram que a técnica PCR em tempo real foi mais sensível que a metodologia tradicional para detecção de *Campylobacter* spp.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras

As carcaças de frango analisadas neste trabalho foram obtidas diretamente de uma indústria frigorífica (abatedouro avícola) sob inspeção federal localizada no Centro Oeste de Minas Gerais no período de abril a junho de 2013. As amostras coletadas foram enviadas em caixa isotérmica com gelo reciclável ao Laboratório de Segurança Microbiológica em Alimentos (LSMA) do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), localizado na Central de Abastecimento de Minas Gerais, em Contagem/ Minas Gerais.

Foram coletadas 86 amostras de carcaças de frangos de corte, sendo 43 amostras congeladas e 43 amostras refrigeradas. A cada lote de produção eram coletadas uma amostra congelada e uma amostra resfriada, totalizando a coleta de 43 lotes distintos de produção.

As amostras congeladas foram descongeladas em refrigerador para posterior análise. O preparo das amostras e a realização das análises pela técnica imunoenzimática foram realizados no LSMA e as análises realizadas pelas técnicas moleculares foram feitas no Laboratório de Bacteriologia Aplicada (LBA) da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV/UFMG).

3.2. Pesquisa de *Campylobacter* spp.

A pesquisa de *Campylobacter* spp. foi realizada utilizando-se três metodologias distintas: a técnica imunoenzimática (realizada no sistema automatizado VIDAS[®]30 (bioMérieux, 2007); PCR (Harmon *et al.*, 1997) e PCR em tempo real (Schnider *et al.*, 2010).

3.2.1. Preparo das amostras

As amostras foram preparadas da seguinte maneira: cada amostra de uma carcaça inteira foi colocada assepticamente em um saco estéril contendo 100 mL de caldo Bolton com suplemento seletivo contendo cefoperazona, trimetoprim, vancomicina e cicloheximida

(Oxoid, SR183E). Após este procedimento a amostra foi submetida ao processo de lavagem com o caldo Bolton (enxaguadura e fricção) por aproximadamente um minuto. O caldo resultante deste processo de lavagem foi considerado a solução final (bioMérieux, 2007).

As soluções finais, contendo as amostras e os meios de cultura, foram incubadas à 37°C por 4 horas e posteriormente a $42 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 20 horas sob condições de microaerofilia (5% O₂, 10% CO₂ e 85% N₂). Para criar as condições de microaerofilia foram utilizados sacos combibag, que são sacos estéreis que possuem bolsa interna para acondicionar o gerador (GENbox microaer/bioMérieux) e gerar a atmosfera adequada para o micro-organismo.

Após a incubação, 2 mL do conteúdo incubado foram transferidos para tubos estéreis e 1,5 mL foram transferidos para tubos de micro-centrifuga. Estes procedimentos foram realizados para os ensaios imunoenzimático e PCR, respectivamente. O ensaio imunoenzimático teve sequência imediata e as amostras para PCR foram congeladas a -18°C para serem analisadas posteriormente.

3.2.2. Técnica imunoenzimática

A técnica imunoenzimática foi realizada de acordo com o protocolo do VIDAS[®] *Campylobacter* (bioMérieux,2007). Os tubos estéreis com 2 mL do conteúdo incubado foram fervidos a 100°C por 15 minutos. Após a fervura das amostras, foram transferidos 0,5 mL do material para a barreta VIDAS[®] *Campylobacter* (bioMérieux Hazelwood, Missouri/USA). Os cones e as barretas foram inseridos no equipamento VIDAS[®] 30. A barreta é composta por 10 poços cobertos por uma folha de alumínio selada e etiquetada. O primeiro poço apresenta uma parte perfurada para facilitar a introdução da amostra. O último poço é uma microcubeta que permite a leitura por fluorescência. Os poços intermediários contem os diferentes reagentes necessários à análise. O restante do caldo que não foi aquecido foi mantido na estufa a $42 \pm 0,5^\circ\text{C}$ para confirmação em caso de resultado positivo através de testes bioquímicos.

O sistema VIDAS[®] efetua duas leituras de fluorescência pelo sistema óptico para cada análise. A primeira leitura corresponde ao branco antes do contato do substrato com o cone. A segunda leitura é efetuada após a incubação do substrato com a enzima presente no cone. O cálculo do Valor de Fluorescência Relativo (RFV – relative fluorescence value) é o resultado da diferença das duas medidas. O RFV obtido de cada amostra é interpretado pelo sistema Vidas[®]30 da seguinte forma:

$$\text{Valor do Teste} = \frac{\text{RFV}_{\text{amostras}}}{\text{RFV}_{\text{calibrador}}}$$

Um resultado com um valor de teste inferior ao valor limiar (0,10) indica uma amostra que não contém antígenos ou que contém uma concentração de antígenos inferior ao limite da detecção do método e corresponderá a um resultado negativo.

Uma vez confirmadas, as amostras positivas para *Campylobacter* spp. no sistema VIDAS® foram estriadas com uma alçada do conteúdo incubado em placa de Ágar Carvão Cefoperazona Desoxicolato Modificado (m-CCDA). Posteriormente, as placas foram acondicionadas em jarra com atmosfera de microaerofilia e incubadas a 42°C por 48 horas. Após o período de incubação, foi verificado a presença de colônias típicas de *Campylobacter* spp.: colônias lisas, convexas e brilhantes, com bordas perfeitas ou planas, translúcidas, ou com bordas irregulares e espalhadas, geralmente incolores com tonalidade creme ou acinzentada. As colônias típicas foram estriadas em agar sangue através de alça calibrada estéril e incubadas a 42°C por 24 horas. Em seguida as colônias presentes no ágar foram coletadas com o auxílio de uma alça descartável de 0,1 µL e suspensas em solução fisiológica (0,85%) estéril até atingir a turbidez correspondente aos valores entre de 2,7 a 3,30 e então transferidas para cartões NH de testes bioquímicos do equipamento VITEK 2®. Para o ajuste de turbidez fez-se necessário o emprego do equipamento DensiCheck (bioMérieux, Hazelwood, Missouri, USA).

3.2.3. PCR e PCR em tempo real para a detecção de *Campylobacter* spp.

3.2.3.1. Amostras bacterianas de referência

Como controle positivo nos testes de PCR e PCR em tempo real foram utilizadas as amostras de *C. jejuni* subsp. *jejuni* NCTC 11351 e *C. coli* NCTC 11366. Estas amostras foram cultivadas em placas de ágar sangue e incubadas por 48 horas a 42°C, em condições de microaerofilia.

3.2.3.2. Extração de DNA

Os tubos de microcentrífuga contendo 1,5 mL do conteúdo incubado (amostras) foram descongelados em temperatura ambiente. A extração e purificação do DNA foram realizadas de acordo com método do tiocianato de guanidina descrito por Pitcher *et al.* (1989). O DNA precipitado das amostras coletadas e das amostras de referência foi ressuspenso em 50 µL de água ultrapura estéril e estocado a -20°C. A concentração e pureza do DNA extraído foi determinado com auxílio de um espectrofotômetro (GeneQuant 100 Classic - GE Healthcare Life Sciences).

3.2.3.3. PCR

Foram utilizados os iniciadores pg3 (5'- GAACTTGAACCGATTTG-3') e pg50 (5'- ATGGGATTTTCGTATTAAC-3') para a amplificação do gene *flaA* presente em bactérias do gênero *Campylobacter*, sendo o produto da amplificação de 460 pares de bases (pb) e os iniciadores C1 (5'-CAAATAAAGTTAGAGGTAGAATGT-3') e C4 (5'- GGATAAGCACTAGCTAGCTGAT-3') para um gene não determinado de *C. jejuni* com um produto de amplificação de 160 pb (Harmon *et al.* 1997; Villardo *et al.*, 2006). Os iniciadores foram sintetizados pela Eurofins - mwg/operon. Cada reação teve duas sequências alvo, uma para a detecção de *Campylobacter* spp. e outra para *Campylobacter jejuni*, caracterizando a técnica como PCR duplex.

As reações, que seguiram as recomendações de Harmon *et al.*, (1997) e Villardo *et al.*, (2006), foram realizadas em um volume total de 25 µL contendo 20ng do DNA extraído, 10mM de Tris-HCl, 50mM de KCl, 5,5mM de MgCl, 200µM de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 20 pmol de cada iniciador C1 e C4 e 40 pmol de cada iniciador pg3 e pg50 e 1,25 U de TaqDNA polimerase. Na sequência, essa mistura foi colocada em um termociclador (Veriti® Thermal Cycler da Applied Biosystems®) e submetidas à desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, seguidos de 25 ciclos de amplificação que consistem em desnaturação (94°C por 1 minuto), anelamento (45°C por 1 minuto) e extensão

(72°C por 1 minuto). Finalmente, as amostras foram submetidas a uma extensão final a 72°C por 7 minutos.

Para visualização dos resultados, os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE [1,0M tris, 0,01M ácido bórico, 0,01M EDTA pH 8,2 (Invitrogen)] acrescido de brometo de etídio (3mg/mL). Utilizou-se o marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen).

Para avaliação do limite de detecção da técnica foram geradas duas curvas de sensibilidade analítica, na primeira curva o DNA de *C. jejuni* e *C.coli* foi diluído em água ultrapura e na segunda o DNA de *C. jejuni* e *C. coli* foi diluído no conteúdo resultante da enxaguadura de uma carcaça de frango em caldo Bolton. Considerando que o DNA genômico de uma bactéria *Campylobacter* spp. é de aproximadamente 1700kb e o peso médio de cada base é de 650 daltons, o genoma de uma bactéria é equivalente a 2fg. Foram realizadas várias diluições em base 10 do DNA de *C. jejuni* e *C. coli* de 20ng a 2fg, correspondente a 10^7 a 10^0 genomas de *Campylobacter* spp. (Tab.1) dessa forma uma análise quantitativa da sensibilidade da técnica foi feita (Keramas *et al.*, 2003).

Tabela 1 - Diluições de DNA extraído de *C.jejuni* NCTC 11351 e *C.coli* NCTC 11366 utilizadas nas Curvas de Sensibilidade Analítica da PCR e da PCR em tempo real

Diluição	Estimativa da contagem do micro-organismo (células/mL)
20ng	10^7
2ng	10^6
200pg	10^5
20pg	10^4
2pg	10^3
200fg	10^2
20fg	10^1
2fg	10^0
0	0

3.2.3.4. PCR em tempo real para a detecção de *Campylobacter* spp.

Para a realização da metodologia de PCR em tempo real foram utilizados os iniciadores Ccj FusA-L1 (5'- GCCTTGAGGAAATTA AAACTGGTATT-3') e Ccj FusA-R1 (5'- TTAAATGCAGTTCCACAAAGCA-3') para *C. jejuni*, sendo o produto da amplificação de 83pb e os iniciadores Ccc FusA-L2 (5' - GCCTTGAAGAGATTA AACAGGGATT - 3') e Ccc FusA-L2 (5' - TTAAACGCTGTACCGCAAAGCA - 3') para *C. coli* com um produto de amplificação de 83pb. As sondas utilizadas foram: Cj_fusA-probea (FAM-AAGTCTTTCTATCGTTCC-MGBNFQ) para *C. jejuni* e Cc_fusA-probea (NED-AAGTCTTTCTATTGTTCC-MGBNFQ) para *C. coli*. Os iniciadores, que foram produzidos segundo Schneider *et al.*, (2010) foram sintetizados pela IDT & SB Portal Group e as sondas Taqman pela Life Technologies.

Cada ensaio foi realizado como PCR em tempo real duplex e as análises foram realizadas em triplicata, com um volume de 25 µL contendo 1 x de TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems®), 300 mM de cada iniciador e 200 mM de cada sonda MGB. As amostras foram analisadas em termociclador ABI 7500 Real-Time PCR System, com o software 7500 versão 2.0.5 (Applied Biosystems®). A amplificação foi realizada a 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 seg e 60°C por 1 min (Schneider *et al.*, 2010).

O resultado positivo foi definido quando pelo menos, duas das amostras em triplicata tiveram um ciclo limiar (Ct) de valor inferior a 40, ou seja, pelo menos duas das amostras em triplicata tinham que amplificar para que a amostra da carcaça de frango fosse considerada positiva. Um resultado negativo foi definido quando pelo menos duas das amostras da triplicata tinham valores de Ct superiores a 40, ou seja, quando não houve amplificação em nenhuma ou em apenas uma das triplicatas. Todas as amostras foram testadas em paralelo com controle positivo (curva de sensibilidade analítica com DNA de Cj NCTC 11351 e Cc NCTC 11366) e controle negativo (água ultra pura) (Schneider *et al.*, 2010).

Para avaliação do limite de detecção da técnica de PCR em tempo real e quantificação do DNA presente na amostra uma curva de sensibilidade analítica foi feita utilizando o DNA diluído de *C. jejuni* e *C. coli* (Tab.1).

3.3. Delineamento Experimental

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso em arranjo fatorial 2 x 3, sendo dois tipos de amostras de carcaças de frangos de corte (congeladas e resfriadas) e três tipos de metodologias de análises (VIDAS, PCR e PCR em tempo real) com 43 repetições de uma carcaça cada. Para comparação entre as metodologias (VIDAS, PCR e PCR em tempo real) foi feita análise pelo teste de McNemar ($p < 0,05$). Para comparação entre amostras resfriadas e congeladas utilizou-se o teste de Fisher ($p < 0,05$) e os resultados foram avaliados com auxílio do programa estatístico R (Siegel *et al.*, 2006).

4. RESULTADOS

4.1. Curva de sensibilidade analítica da análise de PCR

Os resultados encontrados para a curva de sensibilidade analítica da técnica de PCR estão ilustrados na Figura 1. Os resultados não foram satisfatórios para detecção de *Campylobacter* spp., de acordo com as diluições realizadas em água ultrapura. A reação feita com os iniciadores pg3 e pg50 para o gênero *Campylobacter* spp. apresentou uma sensibilidade de aproximadamente 10^4 células/mL e com os iniciadores C1 e C4 para *C. jejuni* apresentou sensibilidade de aproximadamente 10^5 células/mL. As curvas realizadas com as diluições feitas em solução de enxaguadura com caldo Bolton apresentaram sensibilidade de aproximadamente 10^5 células/mL para pg3 e pg50 e de 10^6 células/mL para C1 e C4.

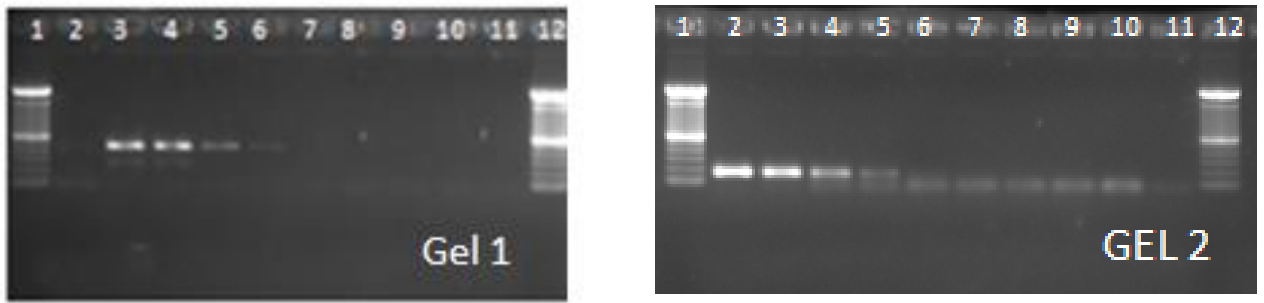


Figura 1. Curva de sensibilidade analítica da PCR

*GEL 1 - Curva de sensibilidade analítica da PCR com os iniciadores pg3 e pg50 e o DNA de *C. coli* diluído serialmente a 1:10 da canaleta 2 = 20ng à canaleta 9 = 2fg de DNA. As canaletas 10 e 11 foram os controles negativos (água ultra pura).

*GEL 2 - Curva de sensibilidade analítica da PCR com os iniciadores C1e C4 e o DNA de *C.jejuni* diluído serialmente a 1:10 da canaleta 2 = 20ng à canaleta 9 = 2fg de DNA. As canaletas 10 e 11 foram os controles negativos (água ultra pura).

4.2. Curva de sensibilidade analítica da técnica de PCR em tempo real

Os resultados encontrados na curva padrão da técnica de PCR em tempo real estão ilustrados nas figuras 2 e 3. A curva padrão feita para quantificação foi utilizada apenas para mensurar a sensibilidade analítica da técnica, pois as amostras tinham uma baixa contaminação. Apesar de ser uma técnica muito sensível, a curva não pode ser utilizada com precisão para quantificação, pois a quantificação foi confiável apenas para o intervalo de 10^2 a 10^7 bactérias, e a partir da diluição de 10^1 bactérias a amplificação teve eficiência anômala, e não foi confiável para quantificação. Por isso, como a maioria das amostras testadas estavam abaixo de 10^2 bactérias, optou-se apenas por classificá-las como positivas ou negativas, de acordo com o protocolo de SCHNIDER *et al.*, (2010). É importante ressaltar que a técnica conseguiu detectar positividade até mesmo para diluição contendo apenas 1bactéria/mL tanto para *C.jejuni* como para *C.coli*.

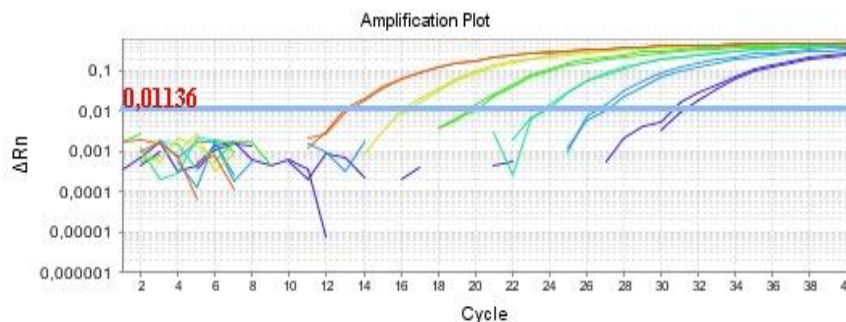


Figura 2. Curva padrão da PCR em tempo real para quantificação com DNA de *C.jejuni* diluído em base 10 de 20ng a 200fg, correspondente a 10^7 a 10^2 bactérias/mL, respectivamente. R^2 : 0,997 e Eff%: 91,661

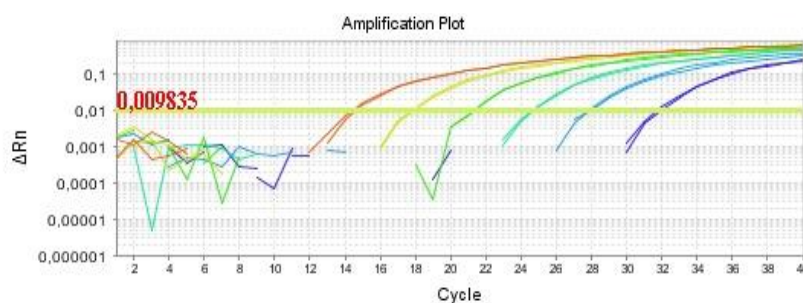


Figura 3. Curva padrão da PCR tempo real para quantificação com DNA de *C.coli* diluído em base 10 de 20ng a 200fg, correspondente a 10^7 a 10^2 bactérias/g, respectivamente. R^2 : 0,999 e Eff%: 95,214

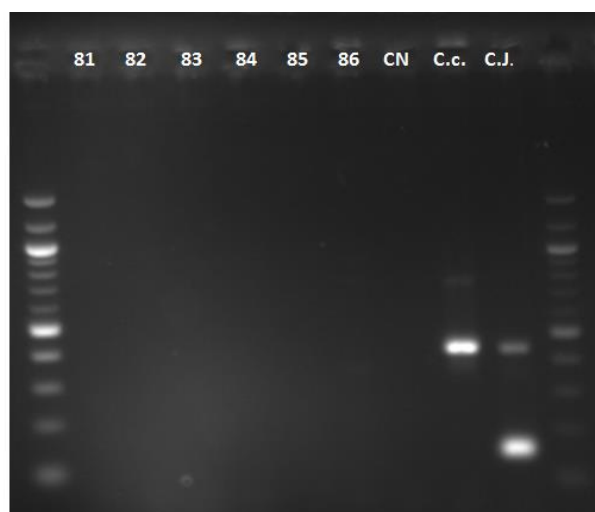
4.3. Ocorrência de *Campylobacter* spp. em carcaças de frangos de corte

Os resultados das análises da presença de *Campylobacter* spp., *C. jejuni* e *C. coli* realizados pelos métodos VIDAS[®], PCR e PCR em tempo real nas amostras de carcaças de frangos de corte congeladas e resfriadas estão apresentados na Tabela 2. Das 86 carcaças analisadas quatro (9,30%) amostras resfriadas apresentaram resultado positivo e nenhuma (0%) amostra congelada foi considerada positiva para *Campylobacter* spp. quando foram avaliadas pelo ensaio imunoenzimático VIDAS[®], as espécies das amostras positivas no VIDAS[®] não foram identificadas pelos testes bioquímicos realizados pelo sistema automatizado VITEK[®], portanto as amostras foram consideradas apenas *Campylobacter* spp. Pela técnica de PCR nenhuma amostra resfriada e nenhuma amostra congelada foi considerada positiva para este micro-organismo. Pela metodologia do PCR em tempo real, 21 (48,84%) amostras congeladas e 24 (55,81%) amostras resfriadas apresentaram resultados positivos, totalizando 45 (52,32%) amostras positivas para *Campylobacter* spp. Das amostras analisadas pela PCR em tempo real 20 (46,51%) amostras congeladas e 20 (46,51%) amostras resfriadas foram positivas para *C. jejuni* e seis (13,95%) amostras congeladas e nove (20,93%) amostras resfriadas foram positivas para *C. coli*. Cinco (11,63%) amostras congeladas e cinco (11,63%) resfriadas foram positivas tanto para *C.jejuni* quanto para *C. coli*.

Tabela 2. Resultados da pesquisa da presença de de *Campylobacter* spp., *C. jejuni* (Cj) e *C. coli* (Cc) em carcaças de frango de corte comercializadas em temperaturas de congelamento e resfriamento realizadas pelas técnicas imunoenzimática (VIDAS®), PCR e PCR em tempo real (qPCR)

Amostra	N	VIDAS	PCR	qPCR total	qPCR Cj e Cc	qPCR Cj	qPCR Cc
Congeladas	43	0(0%)	0(0%)	21(48,84%)	5 (11,63%)	20(46,51%)	6 (13,95%)
Resfriadas	43	4 (9,30%)	0(0%)	24(55,81%)	5 (11,63%)	20(46,51%)	9 (20,93%)
Total	86	4 (4,65%)	0(0%)	45(52,32%)	10 (11,63%)	40(46,51%)	15(17,44%)

Os resultados da PCR estão ilustrados na figura 4, os resultados da PCR em tempo real para *C. jejuni* na Figura 5 e os resultados da PCR em tempo real para *C. coli* na Figura 6.



CN: Controle Negativo (água ultra pura) C.c: *C. coli* NCTC 11366 e C.j: *C. jejuni* NCTC 11351; Marcador de 100bp (Invitrogen); canaletas 81 a 86: amostras de frango resfriadas e congeladas.

Figura 4. Exemplo dos resultados da PCR.

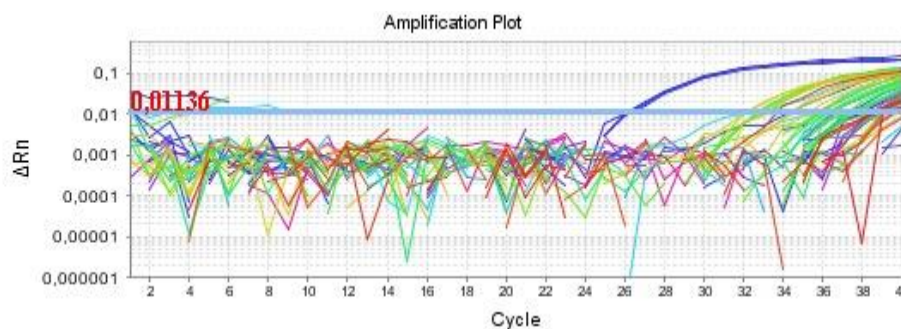


Figura 5. Exemplo dos resultados da PCR em tempo real para *Campylobacter jejuni* de amostras de frango congeladas e resfriadas.

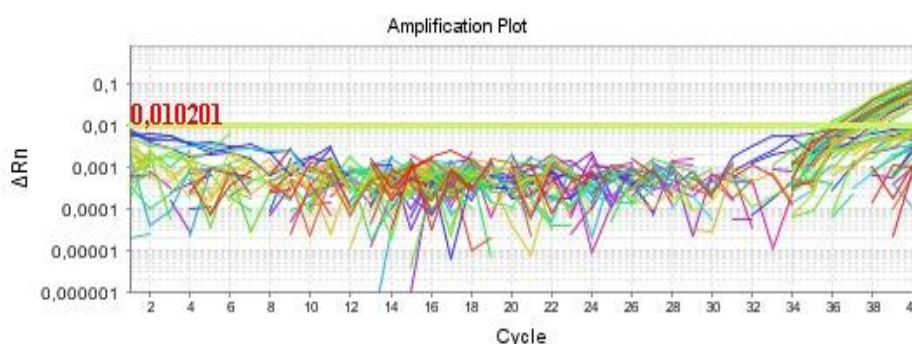


Figura 6. Exemplo dos resultados da PCR em tempo real para *Campylobacter coli* amostras de frango congeladas e resfriadas.

4.4. Comparação entre os métodos imunoenzimático e moleculares para pesquisa de *Campylobacter* spp.

Os resultados das análises de comparação das metodologias VIDAS[®], PCR e PCR em tempo real para a pesquisa de *Campylobacter* spp. em carcaças de frangos de corte congeladas e resfriadas se encontram na Tabela 3. Ao comparar as metodologias VIDAS[®] e PCR não foram observadas diferenças significativas entre elas. No ensaio VIDAS[®] foram encontradas quatro amostras positivas e na técnica de PCR nenhuma amostra positiva foi detectada. Ao comparar o ensaio imunoenzimático VIDAS[®] com a metodologia PCR em tempo real foi observada diferença significativa entre as técnicas. Foram observadas 45 amostras positivas pelo método de PCR em tempo real e quatro amostras positivas pelo VIDAS[®]. Ao comparar as duas diferentes metodologias de PCR (PCR e PCR em tempo real) também foram observadas diferenças significativas entre elas, pois foram observadas 45 amostras positivas

quando se utilizou a metodologia de PCR em tempo real e nenhuma amostra positiva ao se utilizar a técnica de PCR.

Tabela 3. Resultados da pesquisa da presença de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango de corte comercializadas em temperaturas de congelamento e resfriamento realizadas pelas técnicas imunoenzimática (VIDAS[®]), PCR e PCR em tempo real (qPCR)

Amostras	VIDAS [®]	PCR	qPCR
Positivas	4	0	45
Negativas	82	86	41
Total	86	86	86

χ^2 de McNemar = 2.25; P = 0,1336; gl = 1 para comparação dos ensaios VIDAS x PCR

χ^2 de McNemar = 39.0244; P = 4,185 x 10⁻¹⁰; gl = 1 para comparação dos ensaios VIDAS x qPCR

χ^2 de McNemar = 43.0222; P = 5.412 x 10⁻¹¹; gl = 1 para comparação dos ensaios PCR x qPCR

4.5. Comparação entre a presença de *Campylobacter* spp. em carcaças de frangos de corte resfriadas e congeladas

Os resultados das análises de comparação da presença de *Campylobacter* spp. em carcaças de frangos de corte congeladas e resfriadas pelas metodologias VIDAS[®] e PCR em tempo real se encontram na Tabela 4. Não houve diferença significativa na presença de *Campylobacter* spp. em carcaças de frangos de corte congeladas e resfriadas em nenhuma das duas metodologias utilizadas. A comparação entre carcaças congeladas e resfriadas analisadas pela PCR não foi realizada, pois todas as amostras foram negativas.

Tabela 4. Resultado da comparação da análise da presença de *Campylobacter* spp em carcaças de frangos de corte comercializada nas temperaturas de resfriamento e congelamento analisadas pelas técnicas imunoenzimática (VIDAS[®]) e PCR em tempo real total (qPCR)

Metodologias	Amostras Positivas		Valor de P*
	Congeladas	Resfriadas	
VIDAS [®]	0	4	0.1162
qPCR	21	24	0.0625

*Teste de Fisher

Os resultados das análises da presença de *C. jejuni* e *C. coli* em carcaças de frangos de corte congeladas e resfriadas realizadas pela técnica da PCR em tempo real se encontram na Tabela 5. Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) para a presença destes micro-organismos entre carcaças congeladas e resfriadas.

Tabela 5. Resultado da comparação entre carcaças de frangos de corte comercializada nas temperaturas de resfriamento e congelamento analisadas pela técnica de PCR em tempo real (qPCR) específica para *Campylobacter jejuni* (qPCR Cj) e *Campylobacter coli* (qPCR Cc)

	Amostras Positivas		Valor de P*
	Congeladas	Resfriadas	
qPCR Cj	20	20	0.3662
qPCR Cc	6	9	0.0948

*Teste de Fisher

5. DISCUSSÃO

5.1. Detecção de *Campylobacter* spp. realizada pelo método Imunoenzimático VIDAS®

No ensaio imunoenzimático VIDAS®, a baixa taxa de positividade encontrada pode estar relacionada com baixa sensibilidade da técnica, sendo necessária uma carga bacteriana maior para gerar resultados positivos. A baixa sensibilidade desse método para amostras de alimentos pode gerar um número alto de amostras falso-negativas (amostras positivas, porém não detectadas pela técnica), o que torna a liberação de lotes analisados um potencial risco para a saúde. A técnica imunoenzimática pode subestimar a real contaminação de *Campylobacter* em amostras de alimentos. Provavelmente, os resultados encontrados também podem refletir a condição do micro-organismo que pode ter sofrido injúrias devido ao processamento e armazenamento em baixas temperaturas e estar na forma VNC. Esta forma não cultivável prejudica sua detecção.

A sensibilidade apresentada pelas metodologias imunoenzimáticas para a análise de *Campylobacter* spp. varia de acordo com o tipo de amostra. Em amostras de alimentos, onde a carga microbiana é baixa, a sensibilidade apresentada também é baixa (Oyarzabal et al., 2012).

Os resultados da pesquisa de *Campylobacter* spp. realizados pela metodologia VIDAS no presente trabalho estão de acordo com os resultados apresentados por Borck *et al.* (2002) que, ao analisar amostras de alimentos e fezes pela técnica imunoenzimática VIDAS® concluíram que a sensibilidade da técnica variou de acordo com o tipo de amostra. Amostras de fezes de aves apresentaram sensibilidade de aproximadamente 94% e, em amostras de alimentos, a sensibilidade apresentada pela técnica foi de 64%. Provavelmente, os resultados encontrados por esses autores refletem a dificuldade de detecção de *Campylobacter* spp. em amostras de alimentos pois esse micro-organismo pode sofrer injúrias devido ao processamento e armazenamento em baixas temperaturas, estar na forma VNC, e, conseqüentemente, influenciar negativamente na sua detecção.

De acordo com Hochel *et al.* (2007) uma das limitações dos métodos baseados em reações antígeno-anticorpos para a detecção de bactérias patogênicas é o elevado limiar de detecção ($\sim 10^{4-6}$ UFC/mL), o que resulta em grandes quantidades de amostras falso-negativas, especialmente em alimentos. Em amostras com elevada concentração de *Campylobacter* spp. o limite de detecção não é tão problemático. Esses autores acreditam que para amostras com

baixa carga microbiana a etapa de enriquecimento seletivo adequada é indispensável para a detecção do micro-organismo, que pode estar na forma VNC.

A maior carga microbiana não é comum em amostras de alimentos, pois a competitividade com outros micro-organismos é alta e o meio presente não é favorável para o crescimento de bactérias fastidiosas como o *Campylobacter* spp. Desta maneira, as metodologias imunoenzimáticas podem não ser adequadas para análises *Campylobacter* spp. em alimentos.

Porém, os resultados obtidos em trabalhos como os de Liu *et al.* (2009) e Gonçalves *et al.* (2012) diferem do presente estudo, pois esses autores encontraram uma alta frequência de *Campylobacter* spp. em carne de frango analisadas pelo método imunoenzimático VIDAS[®].

No entanto, os resultados encontrados neste trabalho estão de acordo com os resultados encontrados por Menezes (2013) que utilizou a metodologia imunoenzimática VIDAS para detecção de *Campylobacter* spp. em carcaças de frangos de corte e observou baixa frequência desse micro-organismo nas amostras analisadas.

5.2. Detecção de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango por PCR

Os resultados encontrados pela técnica de PCR demonstraram que os iniciadores escolhidos não foram adequados para essa pesquisa. A técnica utilizada não possuiu sensibilidade analítica adequada para detecção de *Campylobacter* spp. e *Campylobacter jejuni* em amostras de alimento. Harmon *et al.* (1997) e Villardo *et al.* (2006) não avaliaram a sensibilidade analítica desses iniciadores, que foram desenhados para identificação de amostras isoladas de *Campylobacter* spp. Os resultados do presente estudo mostraram que a sensibilidade analítica desses iniciadores foi muito baixa, principalmente quando a diluição em caldo Bolton foi utilizada.

Como observado por outros autores, a técnica de PCR foi uma excelente alternativa em relação à identificação bioquímica utilizando esses e outros iniciadores (Harmon *et al.*, 1997; Persson e Olsen, 2005; Villardo *et al.* 2006; Alves e Oliveira, 2013; Perdoncini, 2012). Porém a sensibilidade da técnica para detecção do micro-organismo pode variar e não ser adequada para pesquisa de *Campylobacter* spp. em amostras com baixa carga microbiana, essa variação pode ser atribuída principalmente a escolha dos iniciadores.

Alves *et al.* (2011) utilizaram a PCR com iniciadores diferentes dos iniciadores utilizados no presente estudo para detecção de *Campylobacter* spp. em amostras de suabe cloacal, conteúdo

cecal e carcaças de frango de corte e encontraram 95,8% de amostras consideradas positivas. A alta prevalência nas amostras analisadas podem ser devida a alta sensibilidade analítica da técnica com diferentes iniciadores, mas o tipo de amostra com alta carga microbiana também pode ter influenciado na alta positividade dos resultados.

5.3. Detecção de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango por PCR em tempo real

Os resultados encontrados nas análises que utilizaram a técnica de PCR em tempo real demonstraram que houve alta frequência de contaminação por *Campylobacter* spp. nas carcaças de frango analisadas, porém não foi confiável quantificar devido a baixa carga microbiana nas amostras. Isto reforça a importância da utilização de metodologias sensíveis e com limites de detecção adequados para pesquisa dessa bactéria em alimentos, que possui uma dose infectante muito baixa (~500 bactérias) e pode ser um potencial risco à saúde humana. A técnica de PCR em tempo real utilizada se mostrou muito sensível, específica e rápida para detecção e diferenciação de amostras infectadas por *C. jejuni* e por *C. coli*.

É importante considerar que na detecção desse micro-organismo pela PCR não há necessidade de que todas as bactérias estejam vivas, pois formas VNC ou bactérias mortas também podem ser detectadas. A técnica detecta o DNA da bactéria e ele está presente em células vivas, na forma VNC e mortas. Portanto, se for considerado apenas células viáveis na quantificação dos micro-organismos presentes na amostra pode haver uma falsa interpretação, e a técnica superestimar a presença de *Campylobacter* spp.

Técnicas alternativas para detecção de células viáveis de *Campylobacter* spp. estão sendo desenvolvidas. A combinação da PCR em tempo real com monoazide propídio (PMA) foi testada por Josefsen *et al.* (2010) e mostrou ser uma metodologia rápida e confiável para detecção de células viáveis de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango.

Os resultados encontrados nas análises de PCR em tempo para detecção de *Campylobacter* spp. neste estudo estão de acordo com Sails *et al.* (2003), que avaliaram 97 amostras de alimentos pela técnica PCR em tempo real e encontraram 65% de resultados positivos. Schnider *et al.* (2010) também encontraram resultados semelhantes, estes autores detectaram 69% de positividade para *Campylobacter* spp. nas amostras analisadas pela PCR em tempo real.

A PCR em tempo real permitiu a diferenciação das espécies *C. jejuni* e *C. coli*, e a frequência encontrada foi maior para *C. jejuni* do que para *C. coli*, resultados semelhantes aos

encontrados por outros autores (Harmon *et al.*, 1997; Schnider *et al.*, 2010; Perdoncini, 2012).

5.4. Comparação entre a detecção de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango pelos métodos imunoenzimático VIDAS[®], PCR e PCR em tempo real

A diferença encontrada nos resultados de PCR em tempo real em relação a PCR e o sistema VIDAS[®] deve ser atribuída a alta sensibilidade da primeira técnica. Como foi demonstrado, a carga microbiana das amostras era baixa e provavelmente estava abaixo do limite de detecção do ensaio imunoenzimático VIDAS[®] e PCR. A baixa taxa de positividade encontrada pelo ensaio imunoenzimático pode estar relacionada também com o estado não cultivável das bactérias, devido ao processamento e armazenamento das amostras. A baixa sensibilidade da PCR pode estar relacionada a escolha dos iniciadores, que são adequados, segundo a literatura, para identificação de isolados de *C. jejuni* e *C. coli* (Harmon *et al.*, 1997; Villardo *et al.* 2006), mas que não se mostrou sensível para a detecção de *Campylobacter* spp. de carcaças de frango.

Almeida *et al.* (2011) compararam a técnica PCR em tempo real com o método imunoenzimático VIDAS[®] e encontraram maior percentual de detecção de *Campylobacter* spp. pela técnica de PCR em tempo real, resultado semelhante ao obtido no presente trabalho. Ugarte-Rui *et al.* (2012) também encontraram um alto percentual (98%) de positividade para *Campylobacter* spp. em amostras de frangos de corte analisadas pela PCR em tempo real e demonstraram que a técnica da PCR em tempo real possui sensibilidade adequada para detecção de *Campylobacter* spp. em alimentos.

A técnica de PCR em tempo real produz resultados altamente sensíveis e específicos, possui a vantagem de evitar a manipulação dos produtos da PCR depois da amplificação, reduzindo assim o risco de contaminação cruzada, o que é uma grande vantagem no laboratório clínico. A partir dos resultados encontrados nesse trabalho a técnica PCR em tempo real foi considerada uma boa alternativa para a detecção quantitativa de amostras que possuem baixa carga microbiana.

5.5. Comparação da presença de *Campylobacter* spp. em carcaças de frangos de corte resfriadas e congeladas

Não foram observadas diferenças significativas entre a presença de *Campylobacter* spp. em carcaças de frangos de corte resfriadas e congeladas em nenhum dos métodos analisados. A interferência da temperatura de resfriamento e congelamento na viabilidade desse agente também não foi elucidada.

A técnica imunoenzimática VIDAS[®] não foi adequada para triagem da presença de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango submetidas a processamentos de resfriamento e congelamento, pois esse tipo de processamento pode submeter os micro-organismos a injúria subletal, dificultar o crescimento *in vitro* e, conseqüentemente, prejudicar a detecção de *Campylobacter* spp. no material. Por isso, condições de enriquecimento seletivo ideais são necessárias para gerar um ambiente adequado e recuperação das células degeneradas.

Ao detectar o DNA das células, a técnica PCR em tempo real foi considerada adequada para detecção de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango submetidas a baixas temperaturas pois, esta metodologia apresentou alta sensibilidade e especificidade. Provavelmente a PCR em tempo real detectou micro-organismos inviáveis, viáveis e na forma VNC que também foram consideradas positivas pela PCR em tempo real. Desta maneira, ainda não foi possível avaliar se os processos de resfriamento e congelamento são adequados para a diminuição e eliminação de *Campylobacter* spp. em amostras de carcaças de frangos de corte. No entanto, Bhaduri e Cottrell (2004) concluíram em seus estudos que *Campylobacter* spp. sobrevive a armazenagem de 4°C e de -20 °C e que, individualmente ou combinadas, refrigeração e congelamento não eliminam o micro-organismo.

Vários autores encontraram resultados diferentes dos encontrados no presente trabalho. Esses autores observaram a redução desse micro-organismo em amostras armazenadas sob refrigeração ou congelamento por diferentes períodos de tempo (Alter *et al.*, 2005; Bonfler, 2009; Mazieiro e Oliveira, 2010; Oliveira e Oliveira 2013). Desta maneira, muitos trabalhos mostraram que, apesar da diminuição na contagem desse agente, ainda há micro-organismos viáveis mesmo em baixas temperaturas e períodos diferentes de tempo, demonstrando que a refrigeração e congelamento por si só não resolvem a questão da contaminação por *Campylobacter* spp., pois micro-organismos viáveis mas não cultiváveis podem estar

presentes mesmo após longos períodos de congelamento. Outras medidas preventivas devem ser tomadas tanto pela indústria produtora de alimentos quanto pelos consumidores, como o cuidado na manipulação desses produtos para evitar a contaminação cruzada.

6. CONCLUSÃO

A metodologia de PCR em tempo real é mais sensível para detecção de *Campylobacter* spp. em carcaças de frangos de corte que as técnicas do ensaio imunoenzimático VIDAS® e PCR.

A contaminação de carcaças de frango por *Campylobacter* spp. em Minas gerais é alta.

A temperatura de armazenamento (resfriada e congelada) de carcaças de frangos de corte não influencia na taxa de contaminação das carcaças por *Campylobacter* spp., porém, não é possível avaliar a viabilidade do micro-organismo a partir das metodologias utilizadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, T .L.; REZENDE, C. S. M.; NICOLAU, E. S. *et al.* Comparação entre ensaio imunoenzimático VIDAS® *Campylobacter* e reação em cadeia pela polimerase em tempo real para a detecção de *Campylobacter* spp. em carcaças e moelas provenientes de abatedouros goianos, 2011. Disponível em: <<http://www.sbpcnet.org.br/livro/63ra/conpeex/pibic/trabalhos/thatyana.pdf>>.

ALTER, T.; GAULL, F.; FROEB, A.; FEHLHABER, K. Distribution of *Campylobacter jejuni* strains at different stages of a turkey slaughter line. *Food Microbiol.*, v. 22, n.4, p. 345-351, 2005.

ALTEKRUSE, S. F.; STERN, N. J.; FIELDS, P. I.; SWERDLOW, D. L. *Campylobacter jejuni* - an emerging foodborne pathogen. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 5, n. 1, p.28-35, 1999.

ALVES, L.; VOSS-RECH, D.; POZZA, J. *et al.* Detecção por PCR de *Campylobacter* termófilos em materiais de frangos de corte obtidos em frigorífico. In: CONFERÊNCIA

FACTA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, 2011, Santos, SP. *Anais...* Santos: FACTA, 2011.

ALVES, J.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Presença de *Campylobacter* spp. em cortes refrigerados de frango. *Semina: Ciênc. Agrar.*, v.34, n.6, p.2829-2836, 2013.

BARRETT, T. J., PATTON, C. M.; MORRIS, G. K. Differentiation of campylobacter species using phenotypic characterization. *Lab. Med.*, v.19, p.96-102, 1988.

BHADURI, S.; COTTRELL, B. Survival of cold-stressed *Campylobacter jejuni* on ground chickens and chicken skin during frozen storage. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.70, n.12, p.7103-7109, 2004.

BHUNIA, A. K. Foodborne microbial pathogens: mechanisms and pathogenesis. New York: Springer, 2008. p. 217-225.

BORCK, B.; STRYHN, H.; ERSBÜLL, A. K. Thermophilic *Campylobacter* spp. in turkey samples: evaluation of two automated enzyme immunoassays and conventional microbiological techniques. *J. Appl. Microbiol.*, v. 92, p. 574-582, 2002.

BOVILL, R. A.; MACKEY, B. M. Resuscitation of 'non-culturable' cells from aged cultures of *Campylobacter jejuni* *Microbiology*, v.143, n.5, p.1575-1581, 1997.

BOUFLEUR, R. *Campylobacter jejuni* em frangos de corte, carne e vísceras de frango no rio Grande do Sul e efeito do congelamento sobre a contaminação nos cortes. 2009. 47f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

BUTZLER, J. P. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. *Clin. Microbiol. Infect.*, v.10, n.10, p.868-876, 2004.

CALCIATI, E.; LAFUENTE, S.; SIMÓ, M.D. *et al.* *Campylobacter* outbreak in a Barcelona school. *Enf. Infect. Microbiol. Clín.*, v.30, n 5, p.243-245, 2012. [online].

CAMPYLOBACTER: general information. CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 2010. Disponível em: <
<http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/campylobacter/> > Acesso em: 10 de setembro de 2013.

CARVALHO, A. C. F. B.; LIMA, V. H. C.; PEREIRA, G. T. Determinação dos principais pontos de risco de contaminação de frangos por *Campylobacter*, durante o abate industrial. *Hig. Alim.*, v.16, p.89-94, 2002.

CASON, J. A.; BAILEY, J. S.; STERN, N. J. *et al.* Relationship between aerobic bacteria, Salmonella and Campylobacter on broiler carcasses. *Poult. Sci* , v.76, p.1037–1041, 1997.

CHENG, Z.; GRIFFITHS, M. W. Rapid detection of *Campylobacter jejuni* in chicken rinse water by melting-peak analysis of amplicons in real-time polymerase chain reaction. *J. Food Prot.*, v.66, p.1343-1352, 2003.

DADOS epidemiológicos - DTA período de 2000 a 2011. [s.l.]: SVS (Secretaria de Vigilância em Saúde); UHA (Unidade Técnica de Doenças de Veiculação Hídrica); CGDT (Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis), 2011.

DONNISON, A. *Isolation of thermotolerant Campylobacter* - review and methods for New Zealand Laboratories. Wellington: Ministry of Health, 2003. p.63.

DUFRENNE, J.; RITMEESTE, W.; DELFGOU, A. E. *et al.* Quantification of the contamination of chicken and chicken products in The Netherlands with *Salmonella* and *Campylobacter*. *J. Food Prot.*, v.64, n.4, p.538-541, 2001.

ELNIFRO, E. M.; ASHSHI, A. M.; COOPER, R. J.; KLAPPER, P. E.. Multiplex-PCR: Optimization and application in diagnostic virology. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.13, n.4, p.559-570, 2000.

ENDTZ, H. P.; RUIJS, G. J.; ZWINDERMAN, A. H. *et al.* Comparison of six media, including a semisolid agar, for the isolation of various *Campylobacter* species from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.*, v.29, n.5, p.1007–1010, 1991.

ENGBERG, J. Contributions to the epidemiology of *Campylobacter* infections: a review of clinical and microbiological studies. *Dan. Med. Bul.*, v.53, n.4, p.361-389, 2006

EUZÉBY, J. P. *Dictionnaire de bactériologie vétérinaire*. 2012. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr>>. Acesso em: 13 de outubro 2013.

FARMER, S.; KEENAN, A.; VIVANCOS, R. Food-borne *Campylobacter* outbreak in Liverpool associated with cross-contamination from chicken liver parfait: implications for investigation of similar outbreaks. *Public Health*, v.126, n.8, p.657-659, 2012.

FELLOWS, P. *Tecnologia del procesado de los alimentos, principios y practicas*. Zaragoza, España: Editorial Acribia, 1994. p.549.

FERNANDEZ, H. Família *Campylobacteraceae*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Eds.). *Microbiologia*. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p.357-362.

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

FOSTER, G.; HOLMES, B.; STEINGERWALT, A. G. *et al.* *Campylobacter insulaenigrae* sp. nov., isolated from marine mammals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v.54, n.6, p.2369-2373, 2004.

FRANCHIN, P. R.; AIDOO, K. E.; BATISTA, C. R. V. Sources of poultry meat contamination with thermophilic *Campylobacter* before slaughter. *Braz. J. Microbiol.*, v.36, n.2, p.157-162, 2005.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Atheneu, p.182, 1996.

GOLÇALVES, K. O.; YAMANAKA, E. H. U.; ALMEIDA, A. P. I. *et al.* Pesquisa de *Campylobacter* Spp. em carnes e frango comercializadas na cidade de Campo Mourão-Pr. *Alim. Nutr.*, v.23, n 2, p 211-216, 2012.

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

GORMAN, R.; ADLEY, C. C.. An evaluation of five preservation techniques and conventional freezing temperatures of -20°C and -85°C for long-term preservation of *Campylobacter jejuni*. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.38, n.4, p.306-310, 2004.

HARMON, K. M.; RAMSOM, G. M.; WESLEY, I. V. Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes*, v.11, n.3, p.195-200, 1997.

HOCHÉL, I.; SLAVÍČKOVÁ, D.; VIOCHNA, D. *et al.* Detection of *Campylobacter* species in foods by indirect competitive ELISA using hen and rabbit antibodies. *Food Agric. Immunol*, v.18, n.3-4, p.151–167, 2007.

HONG, Y. H.; KU, G. J.; KIM, M. K.; SONG, K. B. Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Campylobacter jejuni* in chicken by aqueous chlorine dioxide treatment. *J. Food Sci. Nutr.*, v.12, n.4, p.279-283, 2007.

HOUNG, H. S.; SETHABUTR, O.; NIRDNOY, W. *et al.* Development of a *ceuE*-based multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay for direct detection and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Thailand. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v.40, n.1-2, p.11–19, 2001.

HUMPHREY, T.; O' BRIEN, S.; MADSEN, M. *Campylobacters* as zoonotic pathogens: a food production perspective. *Int. J. Food Microbiol.*, v.117, n.3, p.237- 257, 2007.

HUNT, J. M.; ABEYLAS, C.; TRAN, T. *Campylobacter*. In: BACTERIOLOGICAL analytical manual. Food and Drug Administration, 2001. Cap.7. Disponível em:

<<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm072616.htm>>.

Acesso em: 01 de julho de 2013.

HUSSAIN, I.; SHAHID, M. M.; AKHTAR, M.; KHAN, A. Prevalence of *Campylobacter* species in meat, milk and other food commodities in Pakistan. *Food Microbiol.*, v.24, n.3, p.219-222, 2007.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. *Modern food microbiology*. New York: Springer, 2005. 790p.

JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. *Microbiologia médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p.161-169.

JONES, D. M.; ABBOTT, J. D.; PAINTER, M. J.; SUTCLIFFE, E. M. A comparison of biotypes and serotypes of *Campylobacter* sp. isolated from patients with enteritis and from animal and environmental sources. *J. Infect.*, v.9, n.1, p.51–58, 1984.

JORGE, L. S. *Comportamento do Campylobacter jejuni em diferentes em diferentes substratos e comparação entre metodologias convencionais e métodos imunoenzimáticos para sua recuperação*. 2005. 60f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP.

JORGENSEN, F.; BAILEY, R.; WILLIAMS, S. *et al.* Prevalence and numbers of *Salmonella* and *Campylobacter* spp.. on raw, whole chickens in relation to sampling methods. *Int. J. Food Microbiol.*, v.76, n.1, p.151-164, 2002.

JOSEFSEN, M. H.; LOFSTROM, C.; HANSEN, T.B. *et al.* Rapid quantification of viable *Campylobacter* bacteria on chicken carcasses, using real-time PCR and propidium monoazide treatment, as a tool for quantitative risk assessment. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.76, n.15, p.5097–5104, 2010.

KERAMAS, G.; BANG, D. D.; LUND, M. *et al.* Development of a sensitive DNA microarray suitable for rapid detection of *Campylobacter* spp. *Mol. Cell Probes*, v.17, n.4, p.187-196, 2003.

KUANA, S. L.; SANTOS, L. R.; RODRIGUES, L. B. *et al.* Occurrence and characterization of *Campylobacter* in the Brazilian production and processing of broilers. *Avian Dis.*, v.52, n.4, p.680–684, 2008.

LINE, J. E. Development of a selective differential agar for the isolation and enumeration of *Campylobacter* spp. *J. Food Prot.*, v.64, n.11, p.1711-1715, 2001.

LITTLE, C. L.; GORMLEY, F. J.; RAWAL, N.; RICHARDSON, J. F. A recipe for disaster: outbreaks of campylobacteriosis associated with poultry liver pate in England and Wales. *Epidemiol Infect.*, v.138, n.12, p.1691-1694, 2010.

LIU, L.; HUSSAIN, S. K.; MILLER, R. S. *et al.* Efficacy of Mini VIDAS for the Detection of *Campylobacter* spp. from Retail Broiler Meat Enriched in Bolton Broth, with or without the Supplementation of Blood. *J. Food Prot.*, v.72, n.11, p.2428–2432, 2009.

MARCELINO, F. C. *Avaliação de resíduos de transgênicos em alimentos no Brasil e desenvolvimento de metodologias de análise.* 2006. 132f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, MG.

MAZICK, A.; ETHELBERG, S.; MOLLER NIELSEN, E.; LISBY, M. An outbreak of *Campylobacter jejuni* associated with consumption of chicken, Copenhagen, 2005. *Eurosurveillance* v.11, n.5, 2006. P.137-139.

MAZIERO, M. T.; OLIVEIRA, T. C R. M. Effect of refrigeration and frozen storage on the *Campylobacter jejuni* recovery from naturally contaminated broiler carcasses. *Braz. J. Microbiol.*, v.41, n.2, p.501-505, 2010.

MEAD, G. C. Microbiological quality of poultry meat – a review. *Rev. Bras. Cienc.Avic.*, v.6, n. 3, p.135-142, 2004.

MELDRUM, R. J.; WILSON, I. G. *Salmonella* and *Campylobacter* in United Kingdom retail raw chicken in 2005. *J. Food Prot.*, v.70, n.8, p.1937–1939, 2007.

MENEZES, L. D. M. Caracterização microbiológica de ovos de consumo e de carcaças de frango produzidos no Estado de Minas Gerais. 2013. 103f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

MOORE, J. E.; CORCORAN, D.; DOOLEY, J. S. G. *et al.* *Campylobacter*. *Vet. Res*, v. 36, n.3, p. 351-382, 2005.

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

OLIVEIRA, A. L.; OLIVEIRA, R. B. P. Enumeração de *Campylobacter* spp. e presença de *Campylobacter jejuni* em carcaças de frango no Estado de Minas Gerais. *Ciênc. Rural*, v.43, n.3, p.480-484, 2013.

OLIVEIRA, T. C. R. M.; BARBUT, S.; GRIFFITHS, M. W. A robotic DNA purification protocol and real-time PCR for the detection of *Campylobacter jejuni* in foods. *J. Food Prot.*,v.68, n.10, p. 2131-2135, 2005a.

ON, S. L. W.; HOLMES, B. Assessment of enzyme detection tests useful in the identification of campylobacteria. *J. Clin. Microbiol.*, v.30, n.3, p.746-749, 1992.

OYARZABAL, O. A.; BATTIE, C. Immunological methods for the detection of *Campylobacter* spp.: current applications and potential use in biosensors. In: ABUELZEIN, E. (Ed.). *Trends in immunolabelled and related techniques*. [s.l.]: InTech. 2012. p.203 -226.

PARDI, M. C.; SANTOS, I. F.; SOUZA, E. R.; PARDI, H. S. *Ciência, higiene e tecnologia da carne*. Goiânia: UFG, 1995. Vol.1. p.316-317.

PARISI, A., LANZILOTTA, S. G.; ADDANTE, N. *et al.* Prevalence, molecular characterization and antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter* isolates from

cattle, hens, broilers and broiler meat in south-eastern Italy. *Vet. Res. Commun.*, v.31, n.1, p.113-123, 2007.

PARK, S. F. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. *Int. J. Food Microbiol.*, v.74, n.3, p.177-188, 2002.

PAULSEN, P.; KANZLER, P.; HILBERT F. *et al.* Comparasion of three methods for detecting *Campylobacter*. *Int. J. Food Microbiol.*, v.103, n.2, p.229 -233, 2005.

PENNER, J. The genus *Campylobacter*: a decade of progress. *Clin Microbial. Rev.*, v.1, n.2, p.157-172, 1988.

PERDOCINI, G. Prevalência de *campylobacter jejuni* e *C. coli* em carcaças de aves após o pré-resfriamento por imersão. 2012. Disponível em: <<http://www.lume.ufgrs.br/bitstream/handle/10183/56117/000858789.pdf?sequence=1>>.

PERSSON, S.; OLSEN, K. E. Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples. *J. Med. Microbiol.*, v.54, pt.11, p.1043-1047.

PITCHER, D. G.; SAUNDERS, N. A.; OWEN, R. J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.8, p.151-156.

PURDY, D.; BUSWELL, C. M.; HODGSON, A. E. *et al.* Characterisation of cytolethal distending toxin (CDT) mutants of *Campylobacter jejuni*. *J. Med. Microbiol.*, v.49, n.5, p.473-479, 2000.

REAL- time PCR: from theory to practice. [s.l.]: INVITROGEN, 2008. 72f.

RISK assessment of *Campylobacter* spp. in broiler chickens: interpretative summary. Geneva: FAO/WHO, 2009. (Microbiological Risk Assessment Series, n.11). p.35.

ROWE, M. T.; DUNSTALL, G.; KIRK, R. *et al.* Development of an image system for the study of viable but non-culturable forms of *Campylobacter jejuni* and its use to determine their resistance to disinfectants. *Food Microbiol.*, v.15, p.491-498, 1998.

ROZYNEK, E.; DZIERZANOWSKA-FRANGAT, K.; JOZWIAK, P. *et al.* Prevalence of potential virulence markers in Polish *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates obtained from hospitalized children and from chicken carcasses. *J. Med. Microbiol.*, v.54, n.7, p.615-619, 2005.

SAILS, A. D.; FOX, A. J.; BOLTON, F. J. *et al.* A real-time PCR assay for the detection of *Campylobacter jejuni* in foods after enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.69, n.3, p.1383-1390, 2003.

SALMONELLA in humans continues to decrease, *Campylobacter* increasing. ESFA, 2010. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/120308.htm>> Acesso em: 20 de setembro 2013.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. *Molecular cloning*. 3. ed.. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCARCELLI, E.; MIYASHIRO, S.; CAMPOS, F. R. *et al.* Detecção de *Campylobacter jejuni* em carcaças e cortes de frangos pela reação da polimerase em cadeia. *Rev. Hig. Alimentar*, v.19, n.129, p.71-76, 2005.

SCHNIDER, A.; OVERESCH, G.; KORCZAK, B. M.; KUHNERT, P. Comparison of Real-Time PCR assays for detection, quantification, and differentiation of *campylobacter jejuni* and *campylobacter coli* in broiler Neck Skin Samples. *J. Food Prot.*, v. 73, n. 6, p.1057–1063, 2010.

SHANE, S. M.; STERN, N. J. *Campylobacter* infection. In.: SAIF, Y. M. *Diseases of poultry*. 11.ed. Ames: Iowa State Press, 2003. Cap.17, p.615-625.

SIEGEL, P. B.; DODGSON, J. B.; ANDERSON, L. Progress from chicken genetics to chicken genome. *Poult. Sci.*, v.85, p.2050-2060, 2006.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. *Manual de métodos de análise microbiológica*. 3.ed. São Paulo: Livraria Varela, 2007. 552p.

SKIRROW, M. B., BLASER, M. J., NACHAMKIM *et al.* *Campylobacter jejuni*: current status and future trends. Washington, DC: American Society for Microbiology. 1992.

STERN, N. J.; GREEN, S. S.; THAKER, N. *et al.* Recovery of *Campylobacter jejuni* from fresh and frozen meat and poultry collected at slaughter. *J. Food Prot.*, v.47, n.5, p.372-374, 1984.

STUART, T. L.; SANDHU, J.; STIRLING, R. An investigation points towards contaminated mud as the source of *Campylobacter jejuni* outbreak associated with a mountain bike race. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON EMERGING INFECTIOUS DISEASES, 2008 Atlanta. *Proceedings...* Atlanta: [s.n.], 2008. p.16-19.

SURTOS de doenças transmitidas por água e alimentos notificados à Divisão do DDTHA – CVE por Semana Epidemiológica, DIR e Município–Estado de São Paulo, 2003. São Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica, {2003?} Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/dados/dta03_surto.xls> Acesso em: 22 de outubro de 2013.

UGARTE-RUIZ, M.; MEZ-BARRERO, G. O.; PORRERO, S. *et al.* Evaluation of four protocols for the detection and isolation of thermophilic *Campylobacter* from different matrices. *J. Appl. Microbiol.*, v.113, n.1, p.200-208, 2012.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA - UBABEF. Relatório Anual. 2013. Disponível em: <<http://www.ubabef.com.br/files/publicacoes/732e67e684103de4a2117dda9ddd280a.pdf>>. Acesso em: 1º de novembro de 2013

UK-WIDE survey of *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of fresh and frozen chicken on retail sale. United Kingdom: FSA, 2001.

UYTTENDAELE, M.; TROY, P.; DEBEVERE, J. Incidence of *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Listeria monocytogenes* in poultry carcasses and different

types of poultry products for sale on the Belgian retail market. *J. Food Prot.*, v.62, n.7, p.735–740, 1999.

VANDAMME, P. Taxonomic of the family Campilobacteriaceae. In: NACHAMKIN, I.; BLASER, M.J., eds. *Campylobacter*. Washington: ASM Press, 2000. p.3-27.

VAN VLIET, A. H. M.; KETLEY, J. M. Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. *Soc. Appl. Microbiol. Symp. Ser.*, v.90, n.30, p.45S-56S, 2001.

VIDAS® *Campylobacter*. [s.l.]: BIOMÉRIEUX, [200-]. 6p. REF 30111-07999 H - pt - 2007/09.

VILARDO, M. C. B.; THOMÉ, J. D .S; ESTEVES, W. T. C. *et al.* Application of biochemical and polymerase chain reaction assays for identification of *Campylobacter* isolates from non-human primates. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.101, n.5, p.400-501, 2006.

WALL, P. G.; DE LUOVOIS, J.; GILBERT, R. J.; ROWE, B. Food poisoning: notifications, laboratory reports, and outbreaks—where do the statistics come from and what do they mean? *Commun Dis Rep CDR Rev.*, v.6, n.7, p.93-100, 1996.

WASSENAAR, T. M.; ENGELSKIRCHEN, M.; PARK, S.; LASTOVICA, A. Differential uptake killing potential of *Campylobacter jejuni* by human peripheral monocytes/macrophages. *Med. Microbiol. Immunol.*, v.186, n.2/3, p.139-144, 1997.

ZHANG, Q. Campylobacteriosis. In: SAIF, Y. M. (Ed.). *Diseases of poultry*. 12.ed. Iowa: Brackwell Publishing, 2008. p.675-690.