

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE *CAMPYLOBACTER* SPP. EM
CARCAÇAS DE FRANGO RESFRIADAS E CONGELADAS POR PCR EM TEMPO
REAL ASSOCIADA A PROPÍDIO MONOAZIDA (PMA)**

Andréa Guicheney Salgado e Almeida Castro

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2015

Andréa Guicheney Salgado e Almeida Castro

**DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE *CAMPYLOBACTER* SPP. EM
CARCAÇAS DE FRANGO RESFRIADAS E CONGELADAS POR PCR EM TEMPO
REAL ASSOCIADA A PROPÍDIO MONOAZIDA (PMA)**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG,
como requisito parcial para obtenção do grau de
mestre em Ciência Animal.

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

Orientadora: Silvana de Vasconcelos Cançado.

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2015**

C355d Castro, Andréa Guicheney e Almeida Castro, 1986-
Detecção de quantificação de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango resfriadas e congeladas por PCR em tempo real associada a propídio monoazida (PMA) / Andréa Guicheney Salgado e Almeida Castro. – 2015.
53 p. : il.

Orientador: Silvana Vasconcelos Cançado
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Frango de corte – Carcaças – Teses. 2. *Campylobacter* – Teses. 3. Reação em cadeia de polimerase – Teses. I. Cançado, Silvana Vasconcelos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

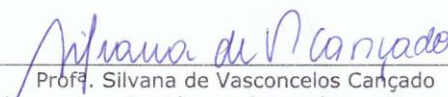
CDD – 636.508

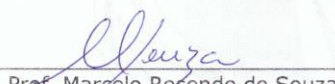
FOLHA DE APROVAÇÃO

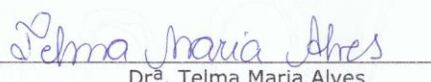
ANDRÉA GUICHENEY SALGADO E ALMEIDA CASTRO

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau e MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração TECNOLOGIA E INSPEÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL.

Aprovada em 28 de Agosto de 2015, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Silvana de Vasconcelos Cançado
Presidente - Orientador


Prof. Marcelo Resende de Souza
Escola de Veterinária - UFMG


Dr. Telma Maria Alves
Inova Biotecnologia Saúde Animal Ltda

Agradecimentos

Agradeço a Deus por estar comigo, por ser minha esperança e minha luz. Por sempre reservar coisas maravilhosas pra mim.

Ao papai e à mamãe pelo apoio e o carinho tão característicos. Obrigada por me deixarem ser quem eu quero ser.

Aos irmãos Hellen, Silvia e Relton pelos conselhos, amizade e união.

Ao Carlão, meu amor, que me aturou nos momentos de crise, que entendeu minha ausência e que mesmo assim me encheu de carinho e esperança para que eu continuasse até o fim dessa caminhada.

À Professora Silvana pela oportunidade, pela paciência, pelos risos e pela sensibilidade nos momentos de choro.

Ao Professor Andrey pelos ensinamentos, por toda ajuda e por abrir as portas do seu laboratório para mim.

Ao Professor Marcelo pelas sugestões e pela presença sempre tão agradável.

A Telma, pela ajuda, pela amizade, pelo carinho e por cada ensinamento tão valioso que me passou. Sua contribuição para esse trabalho e para a minha vida foram imensuráveis.

Ao Professor Tadeu e a Lili pelo apoio e pela amizade

À Professora Débora pela ajuda e pela disponibilidade.

Aos Professores e funcionários dos Departamentos de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal e Medicina Veterinária Preventiva. Em especial à Graciela Kunrath, Professora Ângela e Danilo Bastos.

Aos amigos da inspeção (e da vida) Gui e Renatinha pelas conversas, pelo apoio, pelos auxílios e por serem sempre tão legais comigo!

Aos amigos do LBA, Carol, Dionei, Ermilton, Fernanda, Gabi, Jamilinha, Jonata, Luciana, Mayrinha e, em especial a Elaine e a Ethiene por existirem na minha vida. A ajuda, amizade, companheirismo, paciência e apoio que me deram durante todo o experimento foram de extrema importância para mim. Sou eternamente agradecida a vocês.

À Avivar Alimentos pelo fornecimento das carcaças de frango.

Ao Colegiado de pós-graduação em Ciência Animal da EV/UFGM.

À Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia (FEPMVZ).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)

A todos que contribuíram para a realização desse trabalho, muito obrigada!

“A persistência é o caminho do êxito”

Charlie Chaplin

Sumário

1. Introdução	15
2. Objetivo.....	16
3. Revisão de literatura.....	16
3.1 Carne de frango	16
3.2 Micro-organismos do gênero <i>Campylobacter</i>	17
3.3 Mecanismos de virulência, patogenia e epidemiologia	18
3.4 Campilobacteriose.....	19
3.4.1 Campilobacteriose em aves	19
3.4.2 Campilobacteriose humana	20
3.5 Contaminação da carne de frango por <i>Campylobacter</i> spp.....	21
3.6 Legislações nacionais e internacionais relacionadas ao controle de <i>Campylobacter</i> spp.	23
3.7 Efeitos do resfriamento e congelamento na viabilidade do micro-organismo	24
3.8 Métodos de detecção de <i>Campylobacter</i> spp. em alimentos.....	25
3.8.1 Isolamento	25
3.8.2 Métodos enzimáticos.....	27
3.8.3 Metodologia Molecular	28
3.8.4 PCR em tempo real	28
3.8.5 Intercalantes de DNA (EMA e PMA)	29
4. Material e métodos	31
4.1 Amostragem	31
4.2 Preparo das amostras.....	31
4.3 Tratamento com PMA.....	32
4.4 Extração de DNA	33
4.5 PCR em tempo real para a detecção de <i>Campylobacter</i> spp.	33
4.6 Condições de cultivo da amostra controle.....	34
4.7 Curva de sensibilidade analítica	34
4.8 Delineamento Experimental	34
5. Resultados e Discussão	35
5.1 Curva de sensibilidade analítica	35

5.2 Detecção de <i>Campylobacter</i> spp. em carcaças de frango utilizando a técnica da PCR em Tempo Real com e sem o tratamento com PMA.....	36
5.3 Comparação entre PCR em tempo real com PMA e sem PMA	37
5.4 Comparação da presença de <i>Campylobacter</i> spp. em carcaças resfriadas e congeladas.....	38
5.5 Quantificação de <i>Campylobacter</i> spp. em carcaças de frango	39
6. Conclusões	41
7. Referências bibliográficas	42
8. Anexo	53

Lista de abreviaturas

ABPA: Associação Brasileira de Proteína Animal

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CDC: Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos (Centers for Disease Control and Prevention)

CDT: Toxina de distensão citotetal

CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento

COP: Código de Prática

Ct: Cycle Threshold

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido Desoxirribonucléico (Deoxyribonucleic Acid)

DTA: Doenças Transmitidas por Alimentos

ECDC: Centro Europeu de Controle e Prevenção de Doenças (European Centre for Disease Prevention and Control)

EFSA: Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (European Food Safety Authority)

ELFA: Enzyme Linked Fluorescent Assay

EMA: Etídio Monoazida

FAO: Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (Food and Agriculture Organization of the United Nations)

fg: Fentograma

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz

FSIS: Serviço de Inspeção e Segurança Alimentar (Food Safety and Inspection Service)

g: Gramas

°C: Graus Celsius

ISO: Organização Internacional para Padronização (International Organization for Standardization)

Kb: Kilobases

Kg: Kilograma

LBA: Laboratório de Bacteriologia Aplicada

Log: Logarítimo

MAPA: Ministério da Agropecuária Pecuária e Abastecimento

mCCDA: Ágar Carvão Cefoperazona Desoxicolato Modificado (Modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar)

mg: Miligrama

MgCl: Cloreto de Magnésio

mL: mililitros

mM: Milimolar

ng: nanograma

OMS: Organização Mundial da Saúde

PBS: Tampão Fosfato Salino (Phosphate Buffered Salin)

PCR: Reação em Cadeia de Polimerase (Polymerase Chain Reaction)

PMA: Propídio Monoazida

RIISPOA: Regulamento Industrial de Inspeção Sanitária de Produtos de Origem Animal

rpm: Rotações por minuto

UBA: União Brasileira de Avicultura

UFC: Unidades Formadoras de Colônias

µL: Microlitro

µm: Micrômetro

µM: Micromolar

USDA: United States Departament of Agriculture

VNC: Viável mas não cultivável

Lista de tabelas

Tabela 1. Diluições de DNA extraído de *Campylobacter jejuni* NCTC11351 utilizadas na curva de sensibilidade analítica.....34

Tabela 2. Resultados da pesquisa da presença de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango em temperaturas de congelamento e resfriamento, realizada pela técnica de PCR em tempo real e PCR em tempo real associada ao tratamento com PMA.....37

Tabela 3. Comparação da presença de *Campylobacter* spp. em carcaças de frangos resfriadas e congeladas analisadas pela técnica de PCR em tempo real e PCR em tempo real com PMA.....38

Tabela 4. Variação de *Cycle threshold* (Ct) de amostras quantificadas para *Campylobacter* spp. em carcaças de frangos resfriadas e congeladas e analisadas pela técnica de PCR em tempo real e PCR em tempo real com tratamento com PMA.....39

Lista de figuras

Figura 1. Curva de sensibilidade analítica de PCR em tempo real com DNA de *Campylobacter jejuni* diluído em base 10 de 20ng a 2fg, correspondente a 10^7 a 10^1 bactérias/g, respectivamente.35

Figura 2. Curva padrão de PCR em tempo real com DNA de *Campylobacter jejuni* diluído em base 10 de 20ng a 2fg, correspondente a 10^7 a 10^1 bactérias/g, respectivamente. Eficiência da amplificação (Eff%): 91,976.36

Figura 3. Curva de amplificação de DNA de amostra resfriada analisada pela metodologia da PCR em tempo real sem tratamento com PMA41

Figura 4. Curva de amplificação de DNA de amostra resfriada analisada pela metodologia da PCR em tempo real submetida ao tratamento prévio com PMA41

Resumo

A contaminação de carcaças de frangos de corte por micro-organismos do gênero *Campylobacter* é frequente. No entanto, sua detecção é dificultada devido a sua característica fastidiosa. Metodologias como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real foram desenvolvidas para verificar a presença do micro-organismo. Porém, também é necessário determinar sua viabilidade visto que apenas bactérias vivas são capazes de causar infecções alimentares no homem. O propídio monoazida (PMA) é um intercalante de DNA capaz de penetrar apenas em células não viáveis, impedindo que seu DNA seja amplificado pela técnica da PCR em tempo real. Com o objetivo de detectar e quantificar *Campylobacter* spp. viável em carcaças de frango de corte congeladas e resfriadas, foram analisadas 60 amostras de carcaças de frangos (30 resfriadas e 30 congeladas) pela metodologia da PCR em tempo real com e sem o tratamento pelo PMA. Foi observado que quando as amostras foram tratadas com PMA, tanto as carcaças congeladas quanto as resfriadas, tiveram menor taxa de positividade em relação às amostras não tratadas com este intercalante de DNA ($p < 0,001$). Das 60 amostras analisadas pela metodologia da PCR em tempo real, 53 (88,33%) apresentaram resultado positivo para *Campylobacter* spp., enquanto 11 (18,33%) tiveram resultado positivo utilizando-se o método PCR em tempo real com tratamento pelo PMA. Pela técnica da PCR em tempo real sem o tratamento com PMA, 26 (86,67%) amostras resfriadas e 27 (90%) amostras congeladas apresentaram resultados positivos para *Campylobacter* spp.. Quanto utilizado o PMA, foi observado que um menor número de carcaças congeladas continha o micro-organismo viável, duas (6,67%), quando comparado às nove (30%) carcaças resfriadas positivas ($P < 0,05$). Conclui-se que o armazenamento de carcaças de frango de corte em temperaturas de refrigeração e congelamento é eficaz na redução da positividade para *Campylobacter* spp. quando utilizada a técnica de PCR em tempo real com tratamento por PMA em relação à PCR em tempo real sem o tratamento com o intercalante de DNA. Além disso, o micro-organismo se mantém viável com maior frequência em carcaças resfriadas, quando comparado a carcaças congeladas.

Palavras-chave: carcaças de frangos de corte, PCR em tempo real, PMA, temperatura de armazenamento

Abstract

The contamination of broiler carcasses by *Campylobacter* spp. is common and its assessment is difficult because of its tedious feature. Methods such as Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) were developed to verify the presence of the microorganism, but it is also necessary to determine their viability as only live bacteria are capable of causing foodborne disease. The Propidium monoazide (PMA) is a DNA intercalator that can penetrate only in non-viable cells, preventing their DNA to be amplified by real time PCR. In order to detect and verify the viability of *Campylobacter* spp., frozen and refrigerated broiler carcasses were analysed. Sixty samples of broiler carcasses were collected in a poultry slaughterhouse under federal inspection (30 refrigerated and 30 frozen) and analysed by Real-Time PCR and Real-Time PCR after PMA treatment. It was observed that when samples were treated with PMA, both frozen and refrigerated carcasses, had the lowest positivity rate compared to untreated samples with DNA intercalator ($p < 0.001$). Fifty three out of 60 samples analysed by Real-Time PCR (88.33%) were positive for *Campylobacter* spp., while 11 (18.33%) tested positive by Real-Time PCR with treatment by PMA. For the Real-Time PCR, 26 (86.67%) refrigerated samples and 27 (90%) frozen samples were positive for *Campylobacter* spp. When PMA was used, nine (30%) refrigerated samples and two (6.67%) frozen samples tested positive for the bacteria. It was also observed that a smaller number of frozen carcasses contained viable microorganism compared to the refrigerated carcasses ($p < 0.05$). It is concluded that the use of low temperatures in storage of carcasses was effective in controlling contamination of carcasses by *Campylobacter* spp. using Real-Time PCR with PMA comparing with Real-Time PCR without PMA treatment. Furthermore, the microorganism keeps viable more frequently in refrigerated carcass, comparing with frozen carcass.

Keywords: broiler carcasses, real-time PCR, PMA, storage temperature

1. Introdução

O Brasil é hoje o maior exportador de carne de frango do mundo e o terceiro maior produtor, ficando atrás apenas dos Estados Unidos e da China. A produção brasileira de carne de frango em 2013 chegou a mais de 12 milhões de toneladas e, desse montante, 68,4% foram destinados ao mercado interno, o que resultou em um consumo de 41,8 Kg per capita, colocando a carne de frango como a principal carne consumida pelos brasileiros (ABPA, 2014).

A carne de frango é um alimento de alto valor nutricional, fonte de proteínas, lipídeos e sais minerais. Porém, por ser rica em nutrientes e possuir alta atividade de água, pode se tornar substrato para a proliferação microbiana. A contaminação deste produto pode ocorrer por via endógena ou, principalmente, durante o processo de abate do frango. Uma vez contaminada, a carne de frango pode ser fonte de infecção por micro-organismos patogênicos (FAO/WHO, 2009). As doenças transmitidas por alimentos (DTA) são causadas pelo consumo de água ou alimentos contaminados por agentes biológicos, físicos ou químicos. Diferentes doenças podem ser transmitidas por alimentos, as quais causam todos os anos prejuízos aos cofres públicos por meio de gastos com medicamentos, hospitalizações e perda de produtividade no trabalho.

Entre os agentes biológicos que causam DTA em seres humanos e que estão associadas à contaminação da carne de frango, destacam-se os micro-organismos do gênero *Campylobacter*. Estas bactérias são responsáveis por distúrbios reprodutivos em animais domésticos, diarreia em seres humanos e animais, além de infecções oportunistas em pessoas com imunossupressão. Adicionalmente, infecções humanas por *Campylobacter* têm também sido relacionadas com a ocorrência da síndrome de Guillain-Barré, doença que afeta o sistema nervoso periférico, causando desmielinização de neurônios, paralisia e morte (Butzler, 2004).

A infecção causada por *Campylobacter* spp. é denominada campilobacteriose e é considerada uma zoonose por ser uma doença que tem como reservatório os animais selvagens e domésticos. As aves, especialmente os frangos de corte, são os principais reservatórios naturais do micro-organismo e o consumo e a manipulação de produtos avícolas têm sido implicados como os principais veículos de infecção.

Órgãos internacionais de saúde, como a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), têm relatado a campilobacteriose como a doença transmitida por alimentos mais reportada no mundo, juntamente com a salmonelose. Existem diferentes veículos transmissores dessa doença. No entanto, a carne de frango é mais frequentemente relacionada aos surtos (ICMSF, 2006; FAO/WHO, 2009).

O micro-organismo *Campylobacter* spp. normalmente cresce a temperaturas de 37°C a 42°C. Entretanto, segundo Bhaduri e Cottrell (2004), a bactéria *Campylobacter jejuni* possui atividade fisiológica em temperaturas de refrigeração e isto pode representar um perigo à saúde do consumidor. Por outro lado, Georgsson et al. (2006) observaram redução na contaminação pelo micro-organismo em carcaças congeladas, o que pode ser um benefício para a segurança alimentar associada ao consumo desta carne. A redução da contagem de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango pode ser atribuída à diminuição da viabilidade das suas células.

Em função das dificuldades relacionadas às técnicas clássicas de isolamento e identificação de *Campylobacter* spp., ensaios de biologia molecular são desenvolvidos com o objetivo de melhorar a detecção destes micro-organismos em alimentos, além de reduzir o tempo com que a análise é realizada. No entanto, a reação em cadeia da polimerase (PCR) possui como limitação a incapacidade de distinguir micro-organismos mortos, viáveis e micro-organismos viável, mas não cultivável (VNC). A diferenciação entre bactérias viáveis e VNC é de grande importância, já que apenas micro-organismos vivos ou VNC representariam perigo real à saúde humana.

O Propídio Monoazida (PMA) é um derivado do iodeto de propídio que tem demonstrado capacidade de se ligar covalentemente à dupla fita de DNA a partir da exposição à luz com determinado comprimento de onda. Este reagente penetra apenas a membrana celular de células mortas ou injuriadas e, ao se ligar de forma covalente ao DNA impede sua amplificação na PCR, possibilitando a diferenciação entre micro-organismos viáveis e VNC dos micro-organismos não viáveis. Dessa forma, somente o DNA de bactérias potencialmente prejudiciais ao consumidor é detectado (Waring, 1965, Nocker et al., 2006).

Em vista dos prejuízos que *Campylobacter* spp. pode causar à saúde do ser humano e da dificuldade de detecção das formas viáveis do micro-organismo por metodologias tradicionais, torna-se imprescindível que novas técnicas diagnósticas sejam desenvolvidas.

2. Objetivo

Os objetivos desta pesquisa foram verificar a influência da temperatura de armazenamento na presença e viabilidade de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango de corte pela utilização da metodologia da PCR em tempo real associada ou não ao uso do Propídio monoazida (PMA).

3. Revisão de literatura

3.1 Carne de frango

Atualmente, a carne de frango é mais consumida no Brasil, em comparação às carnes bovina e suína. Em 1988, o consumo dessas carnes no Brasil era de 11,8 Kg per capita, 27,6 Kg per capita e 7,0 Kg per capita, para as carnes de frango, bovino e suíno, respectivamente (UBA, 2008). Em 2015, segundo a Companhia Nacional de Abastecimento, a projeção para o consumo de carne de frango será de 44,2 Kg per capita, enquanto que para a carne bovina será de 35,2 Kg, e para suínos, apenas 14,6 Kg. Esse consumo da carne de frango é resultado da alta inserção de tecnologia no setor, o que possibilitou a queda no preço do frango para o produtor e, conseqüentemente, queda do preço da carne para o consumidor final (CONAB, 2015).

Desenvolvida inicialmente para subsistência, a avicultura brasileira passou a ter sua produção tecnificada e aumentada, a partir dos anos 1960 e 1970. Inicialmente, a implantação de um sistema de integração, no qual o integrador fornece os pintos de um dia e a ração ao integrado para que este cuide das aves até o fim da criação, contribuiu para a verticalização da atividade. Juntamente com esse processo de modificação do modo de produção avícola, a seleção genética das aves e adequações na nutrição propiciaram um

enorme avanço na produção do frango. Melhorias em parâmetros, como conversão alimentar, fizeram com que o frango engordasse mais rapidamente, consumindo menos ração, o que permitiu que o tempo até o abate, que em 1930 ocorria aos 105 dias de idade, fosse reduzida para 41 dias de idade, em 2009 (Rizzi, 1993; Cunha, 2014).

Com o aumento na oferta de carne de frango, e, conseqüentemente a queda do seu preço, o consumidor brasileiro passou a incluí-la no seu cardápio. Além disso, a facilidade de preparo e a ampla oferta de pratos prontos e semiprontos à base de frango também contribuiu para que este tipo de produto se tornasse uma alternativa de consumo ao atender a tendência por refeições rápidas e tipo *fast-food*. O padrão alimentar da população vem também se modificando no sentido da conscientização de que uma dieta equilibrada reflete em uma vida saudável e com maior bem-estar (Carvalho, 2007; Santos Filho et al., 2011).

Nesse sentido, tem-se demonstrado que o aumento do consumo de gordura associa-se à elevação da concentração plasmática de colesterol e a maior incidência de aterosclerose coronária e aórtica, sendo a terapia nutricional boa medida de prevenção e tratamento das dislipidemias (Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2007). De acordo com a Tabela Brasileira de Composição Alimentar, em cada 100g de peito de frango cru sem pele são contidos apenas 3,0 g de lipídeos, enquanto a mesma quantidade de coxão mole bovino sem gordura possui quase o triplo (8,7 g) (Núcleo de estudos e pesquisa em alimentação, 2011). Com baixos teores de gordura e colesterol, o consumo da carne de frango, associado a hábitos de vida saudáveis, tem sido aliados no combate a essas afecções, além de auxiliar no controle de doenças como diabetes e obesidade.

3.2 Micro-organismos do gênero *Campylobacter*

A família *Campylobacteriaceae* abrange os gêneros *Arcobacter*, *Sulfospirillum* e *Campylobacter* e as espécies genericamente denominadas *Bacteroides ureolyticus*. Os micro-organismos do gênero *Campylobacter* são 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. É um micro-organismo considerado fastidioso, por causa das suas exigências nutricionais e ambientais, fazendo com que se multiplique de forma lenta. Por possuir o genoma pequeno (1600 Kb a 1700 Kb), o gênero *Campylobacter* apresenta um número menor de genes comparados aos outros micro-organismos patogênicos. Isso reflete na necessidade de um meio complexo para o desenvolvimento, o que dificulta a sobrevivência fora do ambiente intestinal dos animais de sangue quente. Em culturas antigas, ou sob condições de cultivo adversas, suas células podem adquirir formas cocóides, o que representa um estágio degenerativo de seu ciclo de vida, sem levar à perda de seu poder infectante. 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 VNC. As formas VNC são induzidas por fatores como, por exemplo, o estresse causado por escassez de nutrientes no meio ou por temperatura inadequada para crescimento. Segundo diversos autores, essa transição morfológica representa uma estratégia de sobrevivência do micro-organismo (Vandamme e De Ley, 1991; Bovill e Mackey, 1997; Vandamme, 2000; Nachamkin, 2007; Bhunia, 2008).

Os micro-organismos do gênero *Campylobacter* são móveis e possuem um flagelo polar em uma ou ambas as extremidades, fazendo que apresentem movimento em forma de "saca-rolha". Sua necessidade

de oxigênio gira em torno de 3 a 5% e de dióxido de carbono de 2 a 10%. A temperatura preferencial para seu desenvolvimento é de 42°C e seu crescimento ocorre em pH de 4,9 a 9,0, sendo o pH ótimo de 6,5 a 7,5 (Humphrey et al., 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. Existem espécies que são catalase positiva e outras negativa, sendo que as principais espécies, responsáveis por gastroenterites em seres humanos, *C. coli*, *C. jejuni* e *C. lari*, são catalase positivo. *Campylobacter* spp. é oxidase positivo, indol negativo e reduz nitrato. Esse gênero não produz hemólise, é extremamente sensível ao cloreto de sódio, sendo que essa sensibilidade varia de acordo com a temperatura de desenvolvimento (Franco e Landgraf, 1996; Jay, 2005).

As espécies termofílicas, *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari*, são consideradas as espécies mais importantes como patógenos para seres humanos. *C. jejuni* se destaca com a principal espécie causadora de gastroenterites. Estas espécies patogênicas são rapidamente inativadas pelo calor, não sobrevivendo aos processos térmicos utilizados no preparo de alimentos (Humphrey et al., 2007).

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 mal cozidos e água contaminada. A carne de frango é relatada como uma das principais formas de transmissão do micro-organismo sendo a contaminação cruzada, durante o preparo dos alimentos, um fator importante na epidemiologia dessa doença. 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 semelhante nos casos de infecção humana (FAO/WHO, 2009).

3.3 Mecanismos de virulência, patogenia e epidemiologia

O mecanismo pelo qual *Campylobacter* spp. causa doença no homem ainda não está esclarecido. No entanto, adesão e invasão de células epiteliais do hospedeiro e a produção de toxinas são reconhecidos como principais fatores de virulência envolvidos nesse processo. O passo inicial para que ocorra a infecção é a adesão. Elementos estruturais como 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 (Jawetz, 1998; Fernandez, 2008). A invasão celular tem importante papel na patogenicidade. O mecanismo pelo qual *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).

As toxinas, como as enteroxinas e as citotoxinas, têm sido consideradas um dos fatores mais importantes para justificar os efeitos citopáticos ocorridos nas enterites. A toxina de distensão citoletal (CDT), codificada pelos genes adjacentes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*, foi caracterizada e detectada em diversas amostras de *Campylobacter* spp. e seu papel como fator de virulência ainda não está bem elucidado, mas acredita-se que haja o envolvimento de CDT no processo de diarreia causando alteração nas 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).

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 três surtos durante o período estudado. Esses dados, porém, podem estar subestimados devido a dificuldade de diagnóstico da doença. As características do micro-organismo, a dificuldade de acompanhamento dos casos pelos órgãos de saúde pública e a dificuldade de diagnóstico pelos laboratórios podem ser algumas das razões que justificam a inesperada baixa incidência de surtos (Wall et al., 1996; Little et al., 2010; Brasil, 2011).

Mazick et al. (2006) relataram um grande surto de campilobacteriose, ocorrido em maio de 2005 na cidade de Copenhagem, na 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 no estado de *British Columbia*. A provável causa do surto foi a ingestão de água e lama contaminadas com fezes de animais (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 dos doentes, 64,4% foram positivas para *C. jejuni*. Amostras de água, frango assado e salada russa foram negativas para todos os micro-organismos pesquisados. Esse resultado pode ser atribuído ao fato de os alimentos suspeitos terem sido mantidos congelados, o que dificulta o isolamento de *Campylobacter* spp.. 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, Inglaterra, em janeiro de 2011, onde todos os envolvidos se alimentaram em um mesmo restaurante. Das 26 pessoas expostas, 11 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).

3.4 Campilobacteriose

3.4.1 Campilobacteriose em aves

Pombos, gaivotas, pardais, patos, perus e, especialmente, o frango de corte, são considerados reservatórios primários de *Campylobacter* spp.. Sabe-se que nas aves, a colonização é geralmente assintomática, podendo ser encontrados níveis de 10^9 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 do agente entre as aves (Park, 2002; Forsythe, 2002; Zhang, 2008).

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

3.4.2 Campilobacteriose humana

Campylobacter é uma das maiores causas de DTA no mundo e a principal bactéria envolvida em casos de enteropatias em seres humanos (WHO, 2011). A doença provocada por esses micro-organismos é denominada campilobacteriose e tem um período de incubação de dois a cinco dias. Os principais sintomas observados são febre, diarreia e dor abdominal. A diarreia pode durar de dois a três dias, mas as dores podem persistir após este período. As fezes podem conter sangue, muco ou pus (Karmali e Fleming, 1979). Com uma baixa dose infectante, menor que 500 células bacterianas, a campilobacteriose ainda pode causar cefaleia, dor nas costas e náuseas (Robinson, 1981; ACMSF, 2005).

As espécies que mais acometem o homem são *C. jejuni* subs. *jejuni*, *C. coli* e *C. lari*. *C. jejuni* se destaca como a principal espécie causadora de gastroenterites em humanos (EFSA, 2005). A doença pode ser grave para crianças, idosos e pessoas com imunossupressão, devendo ser considerada um importante problema de saúde pública. *C. jejuni* coloniza o jejuno, íleo e cólon causando, em nível tecidual, uma degeneração do epitélio e ulceração da mucosa. Os pacientes podem excretar o micro-organismo por duas a três semanas (FIOCRUZ, 2005).

Dentre as complicações que podem ocorrer após a campilobacteriose, citam-se artrite reativa, meningite, síndrome de Miller Fischer e osteomielite. No entanto, a mais séria sequela tem sido associada com o desenvolvimento de doenças neurológicas, como a síndrome de Guillain-Barré. Esta síndrome, que afeta o sistema nervoso periférico, é caracterizada pela desmielinização de neurônios, pode resultar em paralisia ascendente, comprometimento respiratório, muscular e morte (Allos, 1998; Nachamkin, 1998). Estima-se que no mínimo 30 a 40% dos pacientes com a síndrome foram infectados anteriormente com o micro-organismo. A associação entre as doenças parece estar restrita à infecção pela espécie *C. jejuni*. Contudo, estudos têm sido realizados no sentido de verificar se outras espécies do gênero poderiam estar relacionadas à síndrome (Allos, 1997; Bersudsky et al., 2000; Belkum et al., 2009).

A importância da campilobacteriose no mundo vem sendo pesquisada e relatada por diversos órgãos internacionais de saúde. No relatório anual de surtos de doenças alimentícias do Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos (CDC), o número de surtos causados por *Campylobacter* aumentou de 25, em 2010, para 30, em 2011, e 37 em 2012 (CDC, 2014). Em monitoramento realizado pela Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA) e pelo Centro Europeu de Controle e Prevenção de Doenças (ECDC), verificou-se que a campilobacteriose foi a zoonose mais reportada nos países europeus no ano de 2013 (EFSA e ECDC, 2015), superando os casos de salmonelose.

3.5 Contaminação da carne de frango por *Campylobacter* spp.

Os alimentos de origem animal contaminados são considerados o principal veículo de transmissão de *Campylobacter* spp. para 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. A contaminação de carcaças de frangos em abatedouros é considerada o principal fator de risco para estas infecções. Nesse sentido, as falhas no processo de evisceração e das condições de higiene e a manipulação inadequada das carcaças são os principais responsáveis pela transferência do micro-organismo para a carne. Com isso, o controle adequado durante o processo de abate é importante para redução de *Campylobacter* spp. no produto final (Altekruse et al., 1999; Carvalho et al., 2002; Shane e Stern, 2003; Rozynek et al., 2005).

Herman et al. (2003) pesquisaram as rotas de contaminação da carne de frango por *Campylobacter* spp. e encontraram que a quantidade de lotes de aves positivas para o micro-organismo aumenta com o tempo de criação. Isso ocorre, provavelmente, devido à água de bebida, por ser esta uma importante fonte de transmissão de doenças dentro dos aviários. Em um documento da FAO e OMS (2009) sobre *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. em carne de frango, foi reportado que a prevenção da entrada de *Campylobacter* spp. nas granjas avícolas é a medida mais importante no controle dessa enfermidade.

Além de medidas de prevenção na criação, a adoção de práticas que impeçam a contaminação da carne de frango durante o abate é imprescindível. O processo de obtenção da carne de aves se divide em duas fases: pré-abate e abate. O manejo pré-abate se inicia ainda na granja quando é retirado das aves o acesso à alimentação, mas mantido o acesso à água. Essa prática tem por objetivo reduzir o conteúdo gastrointestinal e, conseqüentemente, minimizar a ocorrência de ruptura de alças intestinais, diminuindo a contaminação de carcaças, superfícies de manipulação e demais utensílios por fezes (Petracci et al., 2010).

Tendo por base o fluxograma de abate de aves, as etapas em que mais se encontra contaminação da carcaça de frango por micro-organismos do gênero *Campylobacter* são a escalda, a depenagem, a evisceração e o resfriamento (Guerin et al., 2010). A escalda ocorre após a sangria e tem por objetivo o amolecimento de folículos pilosos, o que facilita a retirada das penas. A água dos escaldadores, apesar de estar a elevadas temperaturas e de a legislação exigir sua renovação a cada turno de trabalho de oito horas (Brasil, 1998a), age como um disseminador de micro-organismos. A depenagem, por sua vez, propicia a contaminação cruzada entre carcaças por meio dos “dedos” depenadores. Em um estudo relacionando lotes de frangos positivos para *Campylobacter* spp. e a contaminação das respectivas carcaças, encontrou-se que a água da escalda permite a sobrevivência dessa bactéria, e a conseqüente contaminação das penas, e que isso estaria relacionado à contaminação das carcaças após a depenagem (Seliwiorstow et al., 2015).

Após a depenagem e a lavagem das carcaças, ocorre o processo de evisceração. Durante essa etapa, que nas empresas de grande porte ocorre de forma mecânica, o maquinário utilizado pode funcionar como via de transmissão de micro-organismos. Aves com variados tamanhos e pesos podem interferir na eficiência dos equipamentos de evisceração, levando à ruptura intestinal e à contaminação da carne. De acordo com o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitário de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), as carcaças ou partes de carcaça que se contaminarem por fezes durante a evisceração ou em qualquer outra fase dos trabalhos devem ser condenadas. No entanto, é importante ressaltar que os equipamentos de abate contaminados pela ocasião da ruptura, são veículos para a contaminação de outras carcaças e até mesmo de lotes abatidos subsequentemente.

Na etapa final do processo de abate ocorre a lavagem interna e externa das carcaças com água e, posteriormente, o resfriamento, que poderá ocorrer por aspersão de água gelada ou por imersão, que é o método mais utilizado no Brasil. A água de imersão do tanque de resfriamento, ou *chiller*, deve ser potável, renovada constantemente, deve passar pelas carcaças em sentido contracorrente com temperatura não superior a 4°C e pode ser hiperclorada, com máximo de 5 ppm de cloro livre (Brasil, 1998). Apesar de esses fatores terem como objetivo a redução da carga microbiana das carcaças, a água do *chiller* pode permitir a contaminação cruzada entre carcaças de frango. Ao avaliarem a ocorrência de *Campylobacter* spp. termotolerante nos dois principais frigoríficos de aves do Chile, Figueroa et al. (2009), concluíram que o resfriamento possuía um efeito limitado sobre a redução da contaminação de carcaças de frango. Os autores atribuíram esse resultado devido à provável contaminação inicial das carcaças, o que prejudicaria todo o processo até o seu fim.

Talvez, a forma mais importante para o alimento cárneo tornar-se veículo de *Campylobacter* spp. 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 e Piatti, 2002).

Paulsen et al. (2005) analisaram 198 amostras de carne de frango adquiridas em 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* em 76% amostras.

Kuana al. (2008), em Porto Alegre (RS), avaliaram 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 que há uma redução na contagem de *Campylobacter* spp. após o pré-resfriamento, mas que a contaminação pelo micro-organismos ainda é alta depois desse processo.

Ivanova et al. (2014), analisaram 73 carcaças de frango obtidas de diferentes etapas de abate durante dois dias e encontraram uma alta taxa de isolamento de *C. jejuni* (60%). Este resultado foi atribuído à possível ruptura de alças intestinais e contaminação de superfícies de trabalho, mãos de manipuladores e água de processamento.

Reis (2015) pesquisou a presença de *Campylobacter jejuni* e *C. coli* em carcaças de frango resfriadas e congeladas, coletadas de um abatedouro sob inspeção federal em Minas Gerais. Pelo método de PCR em tempo real. Foi encontrada uma frequência total de 52,32% do micro-organismo, sendo considerada alta e de importância para a saúde pública.

3.6 Legislações nacionais e internacionais relacionadas ao controle de *Campylobacter* spp.

Com o objetivo de reduzir a incidência de campilobacteriose no mundo, órgãos como o *Codex Alimentarius* desenvolveram diretrizes que visam o controle de *Campylobacter* spp. em carne de frango (CAC/GL 78-2011). O principal foco desse documento é oferecer informações de controle do micro-organismo aos governos e indústria de forma a reduzir as DTA e garantir as práticas equitativas no comércio internacional de alimentos. As diretrizes não possuem como objetivo estabelecer limites quantitativos para o micro-organismo, mas sim fornecer medidas de controle que vão desde os incubatórios até o momento de consumo da carne.

Nesse sentido, o governo neozelandês criou o programa para gestão do risco de *Campylobacter* spp. com foco na carne de frango. A meta do Ministério das Indústrias Primárias (MPI) daquele país é alcançar, em um período de cinco anos, 50% de redução na incidência de campilobacteriose humana. Para isso, as estratégias utilizadas incluem: desenvolvimento do Código de Prática (COP) para os processadores de aves; revisão de metas de desempenho para *Campylobacter* spp. em frangos de corte; realização de auditorias de processadores primários e secundários de carne de aves e monitorização de produtos alimentares em vários pontos da cadeia alimentar (MPI, 2013). A monitoração desses produtos é realizada pelo Ministério da Saúde e em seu guia de referência microbiológica para alimentos, a pesquisa de *Campylobacter* spp. é preconizada em produtos à base de frango como alimentos processados, carne crua, cozida, curada e/ou defumada (Ministry of Health, 1995). Para realizar a monitoração microbiológica é utilizado um plano de amostragem de duas ou três classes dependendo do alimento analisado. Para fins de aplicação do plano de amostragem entende-se que m é o limite que separa o lote aceitável do produto ou lote com qualidade intermediária aceitável e M separa o lote com qualidade intermediária aceitável do lote inaceitável. Valores acima de M são inaceitáveis e c é o número máximo aceitável de unidades de amostras com contagens entre os limites de m e M . O plano de duas classes é realizado quando a unidade amostral a ser analisada pode ser classificada como aceitável ou inaceitável e o plano de três classes é utilizado quando a unidade amostral a ser analisada pode ser classificada como aceitável, qualidade intermediária aceitável ou inaceitável (Anexo 1).

Seguindo a mesma tendência, o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) publicou a 3ª edição do guia para controle de *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. em carne de frangos. Esse documento contém recomendações que visam à prevenção da contaminação das carcaças nos diferentes pontos do processo de abate (USDA, 2010). Além disso, o USDA, por meio do Serviço de Inspeção e Segurança Alimentar (FSIS), está propondo novos métodos e parâmetros para a análise de *Campylobacter* spp. em carnes de frango e de peru. A meta esperada é reduzir de 19% a 37% a incidência de campilobacteriose no país por meio da redução do patógeno nos produtos à base de carne de frango (FSIS, 2015).

A Comissão Europeia, na tentativa de aumentar o nível de segurança dos alimentos produzidos nos países membros, tem estabelecido medidas de controle de risco em nível produtivo e comercial. Com o objetivo de embasar o desenvolvimento de critérios de contenção de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango, a EFSA divulgou um informe científico que contempla ações de controle em toda a cadeia alimentar. De acordo com o órgão, a contaminação das carcaças poderia ser diminuída por meio da implantação de medidas de biossegurança nas granjas de produção e programas de autocontrole durante o abate. O órgão acredita que a adoção de critérios microbiológicos de 1000 ou 500 UFC/g pode reduzir o risco de

campilobacteriose na população em mais de 50% ou 90%, de acordo com o produto analisado (EFSA, 2011).

Em contrapartida ao que ocorre internacionalmente, quase não há no Brasil legislações ou material técnico que informe sobre a importância de *Campylobacter* spp. na avicultura e nos produtos à base de carne de frango. No que diz respeito à produção de aves, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) preconiza apenas o controle de doenças como salmoneloses, micoplasmoses, influenza e doença de Newcastle. Os padrões microbiológicos estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para carne de aves visam somente à pesquisa de coliformes a 45°C em 10 g de amostra (ANVISA, 2001).

3.7 Efeitos do resfriamento e congelamento na viabilidade do micro-organismo

De acordo com a legislação brasileira, a temperatura das carcaças de frango ao final do processo de abate deve ser igual ou inferior a 7°C. Toleram-se a temperatura de 10°C, para as carcaças destinadas ao congelamento imediato (Brasil, 1998). O resfriamento e o congelamento da carne de aves são essenciais para prevenir o crescimento de patógenos e retardar o desenvolvimento de micro-organismos deteriorantes (Mead, 2004). Além disso, o uso de temperaturas baixas na conservação da carne reduz a atividade enzimática e as reações químicas do próprio alimento, aumentando sua vida de prateleira (Frazier e Westhoff, 1993).

O resfriamento evita o crescimento de micro-organismos termófilos e de muitos micro-organismos mesófilos devido ao aumento no tempo de geração, reduzindo ou evitando sua multiplicação. A eficácia desse método de conservação depende de fatores como tipo de alimento armazenado, tipo de embalagem utilizada e grau de contaminação microbiana. O congelamento é a operação na qual a temperatura do alimento é reduzida abaixo do seu ponto de congelamento. A longo prazo, esse é o método de conservação de alimentos que menos deprecia o valor nutritivo e a qualidade sensorial da carne “in natura”. A diminuição da população microbiana que ocorre em alimentos submetidos ao congelamento se deve a efeitos subletais e efeitos letais, como a precipitação e a desnaturação de proteínas e enzimas ou por lesões físicas causadas pelos cristais de gelo (Frazier e Westhoff, 1993, Pardi et al., 1995; Fellows, 2000).

As espécies de *Campylobacter* spp. patogênicas para os humanos possuem como característica o crescimento em temperaturas entre 41°C e 43°C. Em temperaturas abaixo de 30°C esses micro-organismos não se multiplicam (Lee et al., 1998). Em estudo realizado por Hazeleger et al. (1998), *C. jejuni* apresentou crescimento em temperaturas mínimas de 31°C e 32°C. Esses autores, entretanto, relataram a presença de atividades fisiológicas importantes para a sobrevivência do micro-organismo em temperaturas de 4°C. A ausência de proteínas de choque térmico, segundo eles, poderia explicar o fato de *C. jejuni* não crescer em temperaturas abaixo de 30°C.

Estudos têm sido realizados com o objetivo de avaliar a redução do número de carcaças positivas para *Campylobacter* spp. após o congelamento. Gill e Harris (1982) avaliaram o crescimento e a sobrevivência de *C. jejuni* em carne e alimentos cozidos. Para isso, foi realizada a inoculação do micro-organismo em fatias de carne, as quais foram armazenadas a 25°C por duas semanas e a -1°C ou -18°C por seis semanas. Os autores verificaram que após duas semanas a -18°C houve uma rápida redução da contagem bacteriana. Resultado semelhante foi obtido por Moorhead e Dykes (2002). Porém, a contagem do patógeno diminuiu já na primeira semana de experimento.

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

Acreditando na eficácia do congelamento como método de redução da contagem do micro-organismo, as autoridades de saúde pública da Islândia, em 2000, adotaram a congelação dos produtos à base de carne de frango como medida de mitigação de risco da exposição humana a *Campylobacter* spp.. Em 2001, o governo da Noruega implantou a mesma estratégia (Georgsson *et al*, 2006).

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. (Meldrum e Wilson, 2007).

Maziero e Oliveira (2010) pesquisaram a prevalência de *Campylobacter* spp. termofílico 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.

3.8 Métodos de detecção de *Campylobacter* spp. em alimentos

A detecção e o isolamento de patógenos em alimentos podem apresentar dificuldades, principalmente relacionada ao número de micro-organismos presentes na amostra. Quando um alimento está contaminado com bactérias patogênicas, elas frequentemente estão em números baixos, com distribuição heterogênea e sofrendo alta competitividade com outras espécies não patogênicas. Isso implica na necessidade da análise de um grande número de amostras para que haja confiabilidade nos resultados negativos.

3.8.1 Isolamento

Os micro-organismos do gênero *Campylobacter* possuem natureza fastidiosa, crescendo mais lentamente que outros enteropatógenos. Os métodos utilizados para seu isolamento podem variar, mas normalmente requerem condições especiais de cultivo (Oyofe *et. al.*, 1992). A dificuldade em isolar micro-organismos termotolerantes do gênero *Campylobacter* pode advir de vários fatores como alta exigência nutritiva, temperatura de crescimento elevada (41°C a 43°C), em oposição às baixas temperaturas utilizadas na conservação de alimentos, sensibilidade ao oxigênio, baixa competitividade em relação a outros micro-organismos e quantidade baixa de células ou predomínio de células injuriadas na amostra analisada. Fatores estressantes podem fazer com que *Campylobacter* spp. assumam a forma VNC. Essa forma não viável é, no entanto, infectante para o homem o que constitui perigo para a saúde pública (Nachamkin, 2007).

O isolamento de *Campylobacter* spp. é realizado normalmente por métodos que utilizam meios de enriquecimento seletivo e plaqueamento em ágar seletivos. Porém, outros métodos como filtração e enriquecimento em meio semi-sólido estão descritos na literatura (Jeffrey et al, 2000; Knill et al, 1982). Dentre os antimicrobianos mais utilizados na preparação dos meios de cultura para *Campylobacter* spp. os mais frequentes são Trimetopim, Polimixina, Colistina, Vancomicina, Rifampicina, Cicloheximida, Anfotericina, Cefalotina, Cefoperazona, Cefazolina, Novobiocina e Bacitracina. A escolha dos antimicrobianos é realizada com base na resistência das cepas bacterianas do gênero a esses compostos e na inibição do crescimento de organismos competidores (Corry et al, 1995). Da mesma forma, a utilização de temperaturas de 42°C a 43°C aumenta a seletividade microbiana, inibindo o crescimento de outros micro-organismos intestinais e favorecendo o crescimento de *Campylobacter* spp. termotolerante (Garrity et al., 2005, Vandamme et al., 2005). O isolamento pode ainda ser favorecido pela adição de agentes que reduzem o efeito tóxico de compostos derivados do oxigênio, como suplemento sulfato férrico, meta bisulfito de sódio e piruvato de sódio (suplemento FBP), sangue, haemina e carvão (Corry et al. 1995, Hunt e Abeyta, 1995).

O isolamento de *Campylobacter* spp. a partir de amostras de alimento normalmente requer uma etapa de enriquecimento e o meio utilizado para esse fim pode afetar significativamente a recuperação do micro-organismo na amostra (Baylis et al., 2000). Diferentes meios de enriquecimento têm sido desenvolvidos como caldo *Preston*, caldo *Exeter*, caldo *Bolton* e caldo *Park e Sanders* (Corry et al., 1995).

Bolton e Robertson (1982) compararam a adição de etapa de enriquecimento com o plaqueamento direto no isolamento de *C. jejuni* e *C. coli* de fezes humanas e suabes retais/cloacais de animais de produção. Eles encontraram maior taxa de isolamento dessa bactéria a partir das amostras submetidas previamente ao enriquecimento em caldo *Preston* em relação ao plaqueamento direto em ágar *Skirrow* ou ágar *Preston*. Em estudo avaliando diferentes métodos de isolamento de *Campylobacter* spp., Paulsen et al. (2005) obtiveram melhores resultados com o uso de caldo *Bolton* na etapa de pré-enriquecimento ao invés do caldo *Preston*. A análise de 461 amostras de carne bovina, suína e de frango resultou em 88,2% de positividade para *Campylobacter* spp. utilizando o primeiro caldo, enquanto que para o segundo a taxa de isolamento foi de 64%.

Os meios sólidos mais comumente utilizados para cultivo do micro-organismo são *Skirrow*, *Campy-Cefex*, *Butzler*, *Preston* e *Exeter*, *modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar* (mCCDA) e *Karmali*. A maioria deles contém sangue desfibrinado de cavalo ou carneiro na proporção de 5% a 15% (Corry et al., 1995). O sangue, no entanto, é um suplemento considerado como não seletivo (Bolton et al, 1984).

Devido à variabilidade da qualidade e da possibilidade de contaminação do sangue, foi desenvolvido o meio mCCDA. Este meio contém, ao invés de sangue, uma mistura de carvão ativado, sulfato ferroso e sódio piruvato que elevam a aerotolerância das espécies de *Campylobacter* spp. O antimicrobiano escolhido inicialmente para esse meio, Cefazolina, foi substituído mais tarde pelo Cefoperazona por aumentar a seletividade. A Anfotericina B é outro componente do suplemento do mCCDA e tem o objetivo de prevenir o crescimento de leveduras (Bolton e Coates, 1983; Bolton et al., 1984; Hutchinson e Bolton, 1984; Corry et al. 1995).

Apesar da diversidade de meios para isolamento de *Campylobacter* spp., há uma grande dificuldade na execução dessas técnicas em alimentos. A presença de baixa quantidade de bactérias do gênero, associada à alta carga de competidores e ao elevado estresse a que esses micro-organismos são submetidos, pode fazer com que o isolamento pelas metodologias convencionais seja muito reduzido (Borck et al, 2002).

Com objetivo de padronizar a técnica de detecção e contagem de *Campylobacter* spp., a “International Organization for Standardization” (ISO) divulgou as especificações técnicas para detecção e enumeração do micro-organismo (10272 partes 1 e 2). Na parte 1 da norma é preconizado o enriquecimento seletivo da amostra diluída em caldo Bolton. Essa etapa ocorre a 37°C por 4h a 6h, para que haja a recuperação das células injuriadas e, posteriormente, a 41,5°C durante 40h a 48h. Uma alíquota do caldo incubado é estriado sobre mCCDA e em outro meio sólido seletivo (Ágar Skirrow, Karmali, Preston) e ambos são incubados em microaerofilia. As colônias consideradas típicas são repicadas em ágar Columbia com sangue desfibrinado de ovino para posterior confirmação por microscopia, testes bioquímicos e de crescimento. As colônias de *Campylobacter* spp. consideradas típicas normalmente são pequenas, redondas, brilhantes e com tendência a se espalharem (ISO, 2006).

3.8.2 Métodos enzimáticos

Além das técnicas microbiológicas, que são difíceis de serem realizadas, foram desenvolvidos métodos imunoenzimáticos, que envolvem, na detecção do micro-organismo, a reação entre antígeno e anticorpo. Nesses ensaios, anticorpos específicos são marcados com uma enzima e, ao entrar em contato com antígenos microbianos, mudam de cor, sendo que essa mudança de cor é proporcional à quantidade de antígeno presente na amostra. Essas técnicas são consideradas vantajosas pela facilidade de execução da análise e rapidez com que o resultado é obtido (Richardson et al, 2009).

O ensaio imunoenzimático fluorescente, que associa o método sanduíche com uma detecção final por fluorescência, é utilizado na técnica do ensaio enzimático fluorescente (ELFA) do sistema automatizado imunoenzimático VIDAS®. Neste ensaio, a reação antígeno-anticorpo é marcada com um anticorpo associado à 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 e Battie, 2012).

Diversos métodos enzimáticos para detecção de *Campylobacter* spp. foram descritos na literatura, dentre eles a aglutinação em látex. Utilizando um kit comercial (Meritec Campy-Meridian Diagnostics), Nachamkin e Barbagalo (1990) encontraram 100% de sensibilidade na detecção de cepas puras de *C. jejuni* e *C. coli*. No entanto, amostras sabidamente *C. lari* não foram detectadas no mesmo teste.

Com o objetivo de comparar o isolamento com a técnica imunoenzimática TECRA CAMVIA (3M) na detecção de *Campylobacter* spp., Bailey et al. (2008) coletaram 398 carcaças de frango de 19 estabelecimentos de abate dos Estados Unidos. O método testado foi considerado mais rápido e sensível em relação ao isolamento tradicional preconizado pelo USDA. No entanto, foram detectadas amostras falso negativo provenientes, na maioria, de uma só planta de abate. Percebeu-se que essas amostras foram coletadas no fim do processo de produção, o que sugere que células gravemente injuriadas não obtêm bons resultados pelo método imunoenzimático.

Reis (2015), trabalhando com carcaças de frango em Minas Gerais, encontrou pela técnica imunoenzimática VIDAS® apenas 9,3% de positividade para *Campylobacter* spp. em carcaças resfriadas, enquanto por meio de PCR em tempo real foram detectadas 55,81%. Segundo o autor, esse baixo índice de positividade pelo método imunoenzimático pode ser atribuído à baixa sensibilidade da técnica utilizada.

3.8.3 Metodologia Molecular

A metodologia da PCR é uma técnica altamente sensível e rápida em que sequências predeterminadas de DNA podem ser amplificadas em milhões de cópias pelo uso de dois fragmentos específicos, e complementares, de DNA denominados iniciadores ou *primers* (Koneman et al., 2001).

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 *primers* são sequências iniciadoras do processo de síntese gênica 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. No fim dos ciclos, são obtidos milhares de cópias de DNA alvo, que poderão ser detectados posteriormente por meio de eletroforese em gel de agarose (Sambrook e Russel, 2001; Kubista et al., 2006). Essa técnica tornou-se muito difundida e bastante utilizada para o diagnóstico laboratorial de *Campylobacter* spp., principalmente pelas vantagens de altas sensibilidade e especificidade, além da facilidade de sua execução (Butzler, 2004).

3.8.4 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 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). Esse ponto indica a presença do gene alvo e a partir desse ponto, por comparação a um padrão ou curva relativa, permite avaliar a quantidade de material inicialmente presente na amostra (Marcelino, 2006; Invitrogen, 2008).

Os dois sistemas de detecção mais usados para gerar a fluorescência na PCR em tempo real são o SYBR Green e a sonda específica. SYBR Green são fluorocromos que se ligam a fita dupla de DNA e emitem fluorescência, detectando produtos inespecíficos. A sonda específica é composta de oligonucleotídeos marcados com fluoróforos altamente específicos ao produto da PCR de interesse. Essas sondas possuem na extremidade 5' uma molécula fluorescente chamada de “*reporter*” e na extremidade oposta, 3', uma molécula denominada “*quencher*”, a qual inibe a fluorescência do *reporter*. Durante a extensão, a DNA polimerase separa o *quencher* do *reporter*, levando ao aumento da intensidade da fluorescência. Para que isso ocorra, é necessário um termociclador acoplado a um sistema óptico para a excitação e captura da fluorescência emitida na reação (Castelani e Duarte, 2011), além de um *software* que interpreta o espectro gerado, realizando assim a quantificação do DNA (Bustin, 2000; Bustin, 2002; Casaril 2010).

Sails et al. (2003) desenvolveram um ensaio para quantificar *C. jejuni* em alimentos após 48 h de enriquecimento em caldo Bolton. Eles compararam a metodologia convencional de isolamento e a PCR em tempo real na análise de amostras de carne de frango crua, miúdos de frango, mariscos crus e leite. Das 97 amostras analisadas, 63 foram positivas para *C. jejuni* na PCR e 57 no isolamento, com 86,6% de concordância entre os resultados. O tempo de análise das amostras enriquecidas avaliadas pela PCR em tempo real foi de aproximadamente 3 h, enquanto que para o isolamento foi de 48 h. Os autores concluíram que a PCR em tempo real pode reduzir significativamente o tempo gasto na detecção de *C. jejuni* em amostras de alimentos, ajudando na determinação dos pontos de contaminação pelo micro-organismo e na redução e eliminação de risco ao consumidor.

Debretsion et al. (2007) encontraram menor concordância de resultados entre isolamento e PCR em tempo real. Ao analisarem 84 lavados de frangos coletados de diferentes estágios do processo de abate, obtiveram 32% de positividade pelo método convencional e 77% pela PCR. Esse estudo, no entanto, não utilizou o enriquecimento prévio das amostras.

Com o objetivo de comparar o isolamento tradicional de *C. jejuni* à PCR em tempo real ambos com e sem enriquecimento seletivo, Rantsiou et al. (2010) avaliaram 48 amostras de frango provenientes de supermercados da região noroeste da Itália. A detecção de *C. jejuni* foi superior pela metodologia da PCR em relação ao método tradicional, independentemente do enriquecimento. Sem a etapa do enriquecimento, a PCR gerou 87% de positividade, enquanto que após o enriquecimento das amostras foi verificado apenas 27% de amostras positivas. Segundos os autores, a redução do número de amostras positivas após a incubação poderia ser atribuída à presença, nas amostras não enriquecidas, de células mortas ou injuriadas, incapazes de crescer no meio seletivo utilizado no experimento.

Reis (2015) avaliou três métodos de detecção de *Campylobacter* spp. (VIDAS 30, PCR E PCR em tempo real) na pesquisa da incidência do micro-organismo em carcaças de frango resfriadas e congeladas de um abatedouro em Minas Gerais. Das 86 amostras analisadas pelo método da PCR em tempo real, 24 (55,81%) amostras resfriadas e 21(48,84%) amostras congeladas apresentaram resultados positivos para *Campylobacter* spp. A autora destacou que esses resultados podem estar superestimados se forem consideradas apenas células viáveis na quantificação do micro-organismo na amostra. Isso porque a utilização da PCR em tempo real permite a detecção de DNA de células viáveis ou VNC, que causariam danos ao consumidor, e também de células mortas, que não representariam qualquer perigo à saúde pública.

3.8.5 Intercalantes de DNA (EMA e PMA)

A aplicação da PCR em tempo real na detecção de *Campylobacter* spp. em alimentos tem gerado resultados melhores quando comparada a outras metodologias. Essa técnica, no entanto, possui a limitação de não diferenciar células viáveis, mortas e VNC (Rudi, et al. 2005). Por esse motivo, o desenvolvimento de técnicas que façam a distinção de células viáveis tem sido descrito na literatura e inclui submissão da amostra a diferentes gradientes de concentração, para separação de células viáveis e VNC das células mortas, e posterior análise por PCR em tempo real (Wolffs et al., 2005); detecção do RNA mensageiro do micro-organismo (Sails et al., 2003; Sung et al., 2004) e tratamento de amostras com intercalantes de DNA, como o etídio monoazida (EMA) ou propídio monoazida (PMA) antes da realização da PCR em tempo real (Nogva et al., 2003; Rudi et al., 2005; Nocker et al. 2006; Josefsen et al. 2010; Luo et al., 2010).

O EMA é um derivado do brometo de etídio, uma droga utilizada no tratamento da tripanossomíase. O PMA é um composto idêntico ao brometo de propídio exceto pela presença de um grupo azida. A utilização dessas tecnologias se baseia na afinidade de ambos pela dupla fita de DNA e na incapacidade de penetrarem a membrana de células intactas. O tratamento das amostras com os intercalantes, seguido de exposição à luz com determinado comprimento de onda faz com que eles se liguem covalentemente ao DNA de células mortas (Figura 1), impedindo que esse material seja amplificado na PCR. Ao final do procedimento, o que se espera é que apenas o DNA de células viáveis e VNC tenha sido amplificado e seja detectado (Waring, 1965, Nocker et al., 2006).

Com o objetivo de inibir a amplificação do DNA de cepas inativadas de *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp., Nogva et al. (2003) utilizaram EMA como tratamento anterior à 5'-nuclease PCR. Os autores puderam observar que a técnica foi capaz de diferenciar células viáveis e não viáveis, ao contrário do método utilizado como comparação (LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit).

Rudi et al. (2005) avaliaram a utilização do EMA e a técnica da PCR em tempo real na diferenciação de células vivas e mortas de *C. jejuni*. Para isso, foi inoculada a superfície de peitos e coxas de frango com bactérias vivas e mortas (inativadas pelo calor). Após a inoculação, com a ajuda de suabes, foram coletadas amostras de superfície do frango e foram realizadas suspensões desse material em caldo *Mueller Hinton*. Essas suspensões foram então tratadas com EMA, o DNA extraído e realizado a PCR em tempo real. Os autores concluíram que o EMA-PCR em tempo real foi eficiente para a distinção quantitativa entre as células viáveis e mortas de *C. jejuni* e a metodologia pode ser aplicada na quantificação de células viáveis e não viáveis presentes em produtos avícolas.

Flekna et al. (2007) investigaram o efeito do tratamento prévio com EMA na detecção da viabilidade de *C. jejuni*. Ao analisarem amostras contendo *C. jejuni* viáveis e inativados pelo calor, os autores verificaram que o EMA-PCR em tempo real levou à redução do sinal da PCR. A técnica, no entanto, subestimou o número de células viáveis presentes na amostra, demonstrando não ser suficientemente eficaz na indicação da viabilidade de micro-organismos.

Nocker e Camper (2006) observaram que EMA poderia penetrar a membrana de células viáveis, o que levou Nocker et al. (2006) a testarem o PMA como alternativa na detecção da viabilidade de nove tipos de cepas bacterianas. Para todas as bactérias testadas, o PMA não afetou o rendimento de DNA das células vivas, enquanto que o DNA proveniente de micro-organismos mortos foi eficientemente removido do meio durante a extração. O EMA foi igualmente eficiente em remover o DNA de células mortas, mas por outro lado levou à redução do DNA de bactérias vivas. O uso do PMA, comparado ao EMA, demonstrou menor efeito tóxico às células vivas e maior afinidade ao DNA.

Josefsen et al. (2010) analisaram 50 carcaças de frango de um lote positivo para *Campylobacter* spp. pelos métodos de isolamento e PMA-PCR em tempo real com o objetivo de avaliar a eficiência do PMA em detectar as células viáveis e VNC do micro-organismo. Comparada à cultura, o PMA-PCR em tempo real foi considerado vantajoso na detecção da viabilidade de *Campylobacter* spp.. Além disso, foi realizada a inoculação de carcaças de frango, conhecidamente negativas para essa bactéria, com cepas ativas e inativas de *C. jejuni*. Encontrou-se resultado negativo, tanto no isolamento quanto para o PMA-PCR em tempo real, nas carcaças com cepas inativadas, o que demonstra a eficácia do método em reduzir o sinal da PCR para bactérias mortas.

Kruger et al. (2014) coletaram amostras de coxa e asa de frango e carcaças de frango congeladas e resfriadas com o fim de comparar o efeito do tratamento com EMA e PMA na detecção de *Campylobacter* spp. viável. A influência de diferentes condições de pré-incubação das amostras foram testadas. Temperaturas de 25 °C - 37 °C, 10 °C - 20 °C e 0 °C e tempos de cinco e 15 minutos foram usados com esse objetivo. A penetração de PMA nas células mortas, segundo os autores, foi dependente do tempo e da temperatura de incubação das amostras antes da exposição à luz. As condições de 15 minutos a 30°C de incubação foram consideradas as melhores dentre as testadas na redução do sinal de células inviáveis na PCR em tempo real utilizada. Na comparação entre os intercalantes de DNA, foi observado que EMA não foi eficientemente excluído das células de *Campylobacter* spp. em diferentes estágios fisiológicos infectantes, ao contrário do PMA.

Duarte et al (2015) submeteram cepas de *C. jejuni* e *C. coli* a condições de estresse normalmente encontradas ao longo da cadeia de processamento da carne de frango e utilizaram o tratamento com PMA para avaliar a redução da viabilidade do micro-organismo. Ao comparar o efeito do aquecimento, da refrigeração, do congelamento, da oxidação e da elevação da acidez do meio, eles observaram que o congelamento das amostras levou à redução do número do micro-organismo com maior evidência, em relação aos outros tipos de estresse.

4. Material e métodos

4.1 Amostragem

As carcaças de frango testadas foram obtidas de um abatedouro de aves sob inspeção federal localizado no Centro Oeste de Minas Gerais. As coletas foram realizadas nos períodos de 28 de abril a 16 de maio de 2015. As amostras coletadas foram enviadas em caixas ao Laboratório de Aves e Ovos do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal (DTIPOA) da Escola de Veterinária da UFMG (EV/UFMG).

Foram coletadas 60 amostras de carcaças de frangos de corte, inteiras e sem miúdos, sendo 30 amostras congeladas e 30 amostras refrigeradas, pareadas. A cada lote de produção foram coletadas e identificadas duas carcaças de frango após o *chiller*, sendo uma direcionada para as câmaras de resfriamento (amostra resfriada) enquanto a outra carcaça do mesmo lote foi encaminhada para os túneis de congelamento (amostra congelada). A coleta das amostras foi realizada considerando o prazo de validade das carcaças resfriadas (sete dias) e a data de início das análises.

Os frangos congelados foram descongelados em refrigerador para posterior análise (7°C por 20 h). O preparo das carcaças e a realização das análises pela técnica molecular foram realizados no Laboratório de Bacteriologia Aplicada (LBA) do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP) da EV/UFMG. Todas as amostras foram mantidas em temperatura de refrigeração por um período de 20h a 24h até o momento das análises.

4.2 Preparo das amostras

Todas as amostras foram preparadas em ambiente devidamente higienizado e desinfetado com álcool 70% (v/v). Após toda a higienização o trabalho foi realizado sob chama de bico de *Bunsen*. As embalagens das

amostras, antes de serem abertas, foram higienizadas com papel toalha embebido em álcool 70% (v/v). Com auxílio de pinça e tesoura estéreis, foram coletados, de cada carcaça, fragmentos, de pesos equivalentes, de carne e pele das seguintes regiões: coxa, asa, peito, região cloacal, costado e pescoço. Esses fragmentos foram cortados em pedaços menores, para facilitar a homogeneização, e pesados em balança analítica (Shimadzu AY220, São Paulo, Brasil) até completarem o peso de 10 g. Esse procedimento foi realizado com cada uma das 60 carcaças, resultando, assim, em 60 amostras contendo 10 g. Após a pesagem as amostras foram colocadas em saco de *stomacher* estéril e em seguida foram adicionados 90 mL de solução salina fosfatada (PBS) (0,01M pH 7,2) estéril. Os sacos com as amostras de carne e pele de frango e o PBS foram homogeneizados durante cinco minutos em homogeneizador automático (ITR MK 1204, Esteio, Brasil) e encaminhados para a capela de fluxo laminar previamente preparada.

Com auxílio de pipetador e ponteira estéril, foram coletadas duas vezes a quantidade de 1,5 mL do conteúdo do saco *stomacher*. Esses conteúdos foram dispensados em dois microtubos diferentes. Os microtubos contendo os homogeneizados foram centrifugados a 14000 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e o sedimento obtido foi pesado em balança analítica (Shimadzu AY220, São Paulo, Brasil). O peso do sedimento obtido após a centrifugação da amostra foi padronizado para a faixa de 0,025 a 0,040 g. Caso os sedimentos não atendessem a faixa de peso estabelecida, o procedimento de coleta do homogeneizado, centrifugação e descarte do sobrenadante era repetido até que se chegasse à faixa determinada. Em um dos micriotubos foi realizado o tratamento com PMA, enquanto que no outro não se fez tratamento prévio. Ambos os micriotubos foram encaminhados para a extração de DNA. Dessa forma, cada homogeneizado se transformou em duas amostras, uma tratada com PMA e a outra não tratada com PMA.

4.3 Tratamento com PMA

O tratamento com PMA™ dye 1 mg (Biotium, Hayward, EUA) foi realizado como descrito por Kruger et al. (2014) e de acordo com as recomendações do fabricante. Assim, 1 mg do PMA foi diluído em 98 µL de água miliQ estéril para a obtenção de uma solução estoque a 20 mM. Posteriormente, a solução estoque foi diluída em uma solução de 20% de Dimetilsulfóxido (DMSO) que foi armazenada como solução de uso na concentração de 10 mM. O protocolo de tratamento das amostras com PMA foi realizado no mesmo dia do processamento das amostras.

Todos os sedimentos padronizados para 0,025 a 0,040 g obtidos a partir do processamento das amostras de frango foram suspensos em 1 mL de PBS. Em seguida, as amostras destinadas ao tratamento com PMA foram pré-incubadas a 30 °C por 10 minutos. Após esse período, 5 µL da solução de PMA a 10 mM foram adicionados ao microtubo para obter uma concentração final de 50 µM por amostra. Os tubos foram então incubados a 30°C por 15 minutos no escuro e então expostos ao sistema de fotoativação, em comprimento de onda 465 - 475nm, utilizando o equipamento PMA™ LED Photolysis Device (Biotium, Hayward, EUA) também pelo tempo de 15 minutos a 30 °C. Terminado o procedimento, as amostras tratadas e não tratadas foram centrifugadas por dez minutos a 14000 rpm à temperatura ambiente, o sobrenadante descartado seguindo-se da extração de DNA.

4.4 Extração de DNA

A extração de DNA das amostras tratadas com PMA e das não tratadas com PMA foi realizada imediatamente após o processamento utilizando o método do isotiocianato de guanidina descrito por Pitcher et al. (1989), com uma modificação. Após a etapa de adição do isopropanol, os tubos foram colocados no freezer em temperatura de -20 °C *overnight*. A adaptação do método foi realizada com o objetivo de aumentar a precipitação do DNA. Depois do processo de purificação, o DNA foi suspenso em 50 µL de água ultrapura estéril e armazenado entre 2 °C e 4 °C até o momento da análise pela metodologia de PCR em tempo real e, após a análise, armazenado a -20°C. A concentração e pureza do DNA extraído foram determinadas com auxílio de espectrofotômetro na faixa de absorbância 260 nm/280 nm (GeneQuant 100 Classic - GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, Nova Jersey).

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

A sequência alvo do 16S rRNA foi amplificada utilizando-se os iniciadores descritos por Josefsen et al. (2010) e Lubeck et al. (2003). Para a realização da metodologia de PCR em tempo real foram utilizados os iniciadores *forward* (5'-CTGCTTAACACAAGTTGAGTAGG-3') e *reverse* (5'-TTCCTTAGGTACCGTCAGAA-3') e o produto amplificado de 287pb. A sonda utilizada foi descrita por Kruger et al. (2014) (5'/56FAM/TGTCATCCTCCACGCGGCGTTGCTGC/3BHQ). Tanto as sondas quanto os iniciadores foram sintetizados pela Integrated DNA Technologies (IDT, EUA).

Cada reação de PCR em tempo real foi realizada com um volume de 25µL contendo 1 x de TaqMan Universal PCR Master (Promega®, M750, Madison, EUA), 4,5 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂), 0,5 µM de cada iniciador, 0,1 µM da sonda e do ROX reference dye (Invitrogen, 12223-012, Nova York, EUA) e uma média de 197,25 ng/µL de DNA extraído de cada amostra. Os ciclos de amplificação foram realizados com um aquecimento inicial a 95°C por 3 minutos, seguido de 45 ciclos de 95°C por 15 segundos; 60°C por 1 minuto; 72°C por 30 segundos. A coleta dos dados foi realizada na fase exponencial da reação. Como controle positivo utilizou-se DNA extraído de *C. jejuni* NCTC 11351 e como controle negativo água miliQ.

Para cada amostra tratada ou não tratada com PMA, foram realizadas análises em triplicata. O resultado positivo foi definido quando pelo menos, duas das amostras em triplicata tiveram um *Cycle threshold* (Ct) de até 40,8. O Ct é proporcional ao número de cópias do DNA alvo presente na amostra e, segundo Jung et al. (2005), é o ponto que detecta o ciclo em que a reação atinge o limiar da fase exponencial, isto é, o ponto que indica a presença do gene alvo. Para ser classificada como negativa, duas ou três das triplicatas deveriam obter valor de Ct superior a 40,8, o que se traduz como nenhuma amplificação das repetições ou amplificação de apenas uma delas.

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* NCTC 11351. Considerando a curva de sensibilidade analítica, pôde-se quantificar o DNA de amostras cujas médias de Ct não ultrapassassem 37,51, que foi o limite de detecção encontrado para a técnica. Curvas com médias acima desse valor, mas que tivessem amplificação satisfatória, foram apenas classificadas em positivas.

4.6 Condições de cultivo da amostra controle

Como controle positivo das reações de PCR em tempo real, foi utilizada uma amostra de referência de *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* NCTC 11351. Esta cepa, armazenada a -80°C, foi descongelada e cultivada em placas de ágar Columbia suplementadas com 5% de sague desfibrinado de ovino sendo incubadas por até 48 horas, a 42°C, em condições de microaerofilia. Após esse primeiro cultivo, as colônias foram passadas para novas placas de ágar Columbia e incubadas nas mesmas condições. Como controle de qualidade, foi observado o aspecto da colônia formada na placa, assim como foi realizada coloração de Gram para confirmação da morfologia bacteriana. Com auxílio de suabe estéril, o material bacteriano foi coletado e depositado em microtubo com 1,0 mL de PBS estéril para extração e diluição do DNA.

4.7 Curva de sensibilidade analítica

Para avaliação do limite de detecção da técnica de PCR em tempo real, foi realizada uma curva de sensibilidade analítica (Keramas et al, 2003). Para isso, o DNA extraído e dosado de uma amostra de referência de *C. jejuni* NCTC 11351 foi diluído na base 10 em água ultrapura, iniciando-se da concentração 20 ng/μL até 2 fg/μL, correspondente a 10^7 a 10^0 genomas de *Campylobacter* spp.. Todas as diluições do DNA da amostra de referência foram submetidas à PCR sob as mesmas condições de reação utilizadas para a análise das amostras experimentais. 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 micro-organismo do gênero é equivalente a 2fg (Tabela 1).

Tabela 1. Diluições de DNA extraído de *Campylobacter jejuni* NCTC11351 utilizadas na curva de sensibilidade analítica

Diluição	Estimativa de 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

4.8 Delineamento Experimental

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente ao acaso em arranjo fatorial 2x2, sendo dois tipos de carcaça de frango de corte (resfriada e congelada) e dois pré-tratamentos das amostras (com PMA e sem PMA) com 30 repetições para cada. Para comparação entre os tratamentos foi realizado teste Qui-quadrado e para análise de Ct das amostras quantificáveis para *Campylobacter* spp. foi realizada Análise de Variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey (Sampaio, 2010).

5. Resultados e Discussão

5.1 Curva de sensibilidade analítica

Os resultados da curva de sensibilidade analítica para a quantificação de *Campylobacter* spp. pela técnica de PCR em tempo real são demonstrados nas Figuras 1 e 2. Houve amplificação satisfatória do DNA das diluições bacterianas de 20 ng/μL até 20 fg/μL, o que equivale a 10^7 a 10^1 bactérias/g, respectivamente. Com base na curva realizada, foi possível detectar amostras de carne de frango que continham contaminação de até 10 bactérias, o que demonstrou que a técnica é altamente sensível. A diluição 2 fg/μL, equivalente a 10^0 bactérias, teve amplificação anômala e por isso não foi utilizada para compor a curva. O Ct obtido nessa curva variou de 16,32 a 37,51, valores que foram utilizados como base para a quantificação de *Campylobacter* spp. nas amostras analisadas.

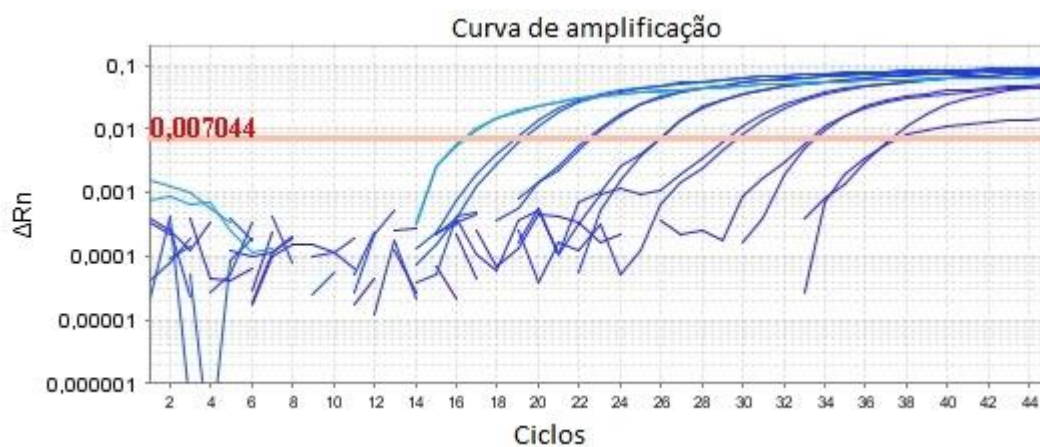


Figura 1. Curva de sensibilidade analítica de PCR em tempo real com DNA de *Campylobacter jejuni* diluído em base 10 de 20ng a 2fg, correspondente a 10^7 a 10^1 bactérias/g, respectivamente.

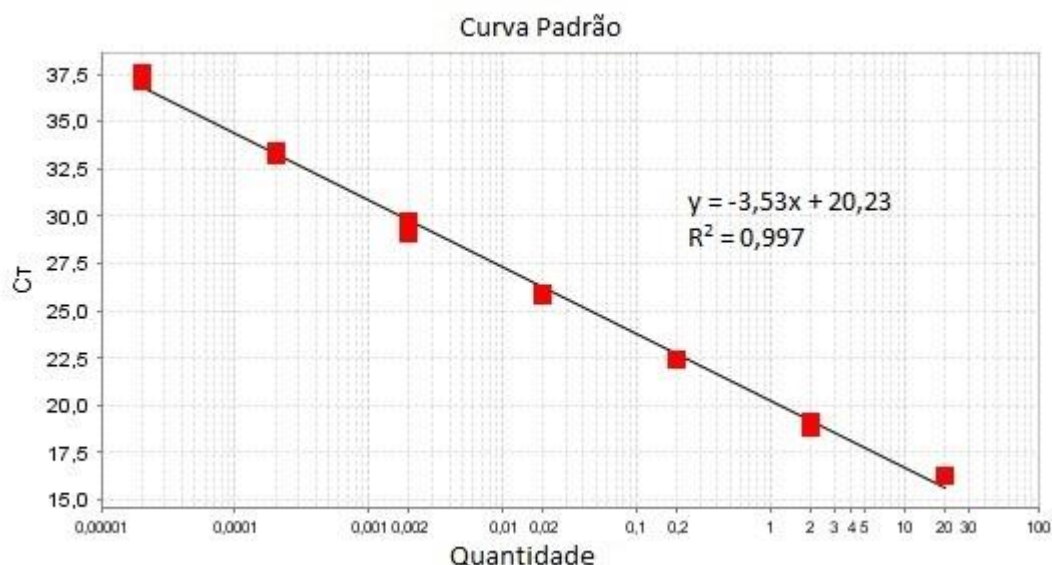


Figura 2. Curva padrão de PCR em tempo real com DNA de *Campylobacter jejuni* diluído em base 10 de 20ng a 2fg, correspondente a 10^7 a 10^1 bactérias/g, respectivamente. Eficiência da amplificação (Eff%): 91,976.

5.2 Detecção de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango utilizando a técnica da PCR em Tempo Real com e sem o tratamento com PMA

Os resultados das análises de PCR em tempo real com e sem PMA das amostras de carne de frango congeladas e resfriadas estão apresentados na tabela 2. Das 60 amostras analisadas utilizando a técnica da PCR em tempo real sem tratamento com PMA, 53 (88,3%) apresentaram resultados positivos para *Campylobacter* spp. Destas 53 amostras positivas, 27 (90,0%) eram congeladas e 26 (86,7%) resfriadas. Esses resultados demonstraram que houve alta frequência de contaminação por *Campylobacter* spp. nas carcaças de frango analisadas. 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 (Robinson, 1981). A técnica de PCR em tempo real utilizada se mostrou muito sensível, específica e rápida para detecção e diferenciação de amostras infectadas pelo micro-organismo. Porém, é importante considerar que na detecção desse micro-organismo pela PCR não há necessidade de que todas as bactérias estejam vivas, pois a técnica detecta o DNA da bactéria esteja ela viva, na forma VNC ou morta. Portanto, se forem consideradas apenas células viáveis na quantificação dos micro-organismos presentes na amostra pode haver uma falsa interpretação, e a técnica pode superestimar a presença de *Campylobacter* spp. ou até levar a um resultado falso positivo. Reis (2015), pesquisando a contaminação de carcaças de frango resfriadas e congeladas pela metodologia da PCR em tempo real, encontrou uma taxa de positividade de 52,32%, para o micro-organismo. Esse resultado está de acordo com o encontrado no presente trabalho, indicando que a PCR em tempo real é uma técnica de importância na detecção de *Campylobacter* spp.

Tabela 2. Resultados da pesquisa da presença de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango em temperaturas de congelamento e resfriamento, realizada pela técnica de PCR em tempo real e PCR em tempo real associada ao tratamento com PMA

Amostra	N*	Sem PMA**		Com PMA**	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Congelada	30	27 (90,0%)	3 (10,0%)	2 (6,7%)	28 (93,3%)
Resfriada	30	26 (86,7%)	4 (13,3%)	9 (30,0%)	21 (70,0%)
Total	60	53 (88,3%)	7 (11,7%)	11 (18,3%)	49 (81,7%)

*N: número amostral

*PMA: Propídio Monoazida (Intercalante de DNA)

Quando foi utilizado o PMA, das 60 amostras de carne de frango analisadas 11 (18,3%), foram consideradas positivas, sendo duas (6,7%) congeladas e nove (30,0%) resfriadas. A utilização do intercalante de DNA é baseada na afinidade deste pela dupla fita de DNA e na incapacidade de penetrar a membrana de células intactas. Dessa maneira, como uso do PMA, as células bacterianas inviables não são detectadas pela PCR e o resultado demonstra apenas os micro-organismos viáveis. Ao utilizar o PMA há uma frequência muito menor de carcaças positivas para o micro-organismo quando comparado à PCR em tempo real sem tratamento com o intercalante. Isso indica que, ao serem coletadas, a maior parte das carcaças de frango estão contaminadas por *Campylobacter* spp., mas, por algum fator, seja ele intrínseco ou extrínseco, ocorre a morte desses micro-organismos até o momento de análise das amostras.

5.3 Comparação entre PCR em tempo real com PMA e sem PMA

Os resultados das análises de comparação da presença de *Campylobacter* spp. em carcaças de frangos de corte congeladas e resfriadas avaliadas pelas metodologias da PCR em tempo real e PCR em tempo real com tratamento pelo PMA estão apresentados na tabela 3. Para esta avaliação foi observada diferença entre os tratamentos utilizados ($P < 0,001$). Esses resultados demonstram que, com a utilização da metodologia da PCR em tempo real com tratamento pelo PMA, menos amostras foram positivas para o micro-organismo, quando comparado com a PCR em tempo real sem tratamento com PMA. Isso indica que aquelas bactérias que sofreram injúrias letais durante o armazenamento do frango não tiveram seu DNA amplificado durante a PCR em tempo real, quando utilizado o PMA como tratamento prévio. Esse resultado, no que diz respeito à segurança dos alimentos, seria de maior confiabilidade em relação ao resultado da PCR em tempo real sem tratamento com PMA, uma vez que apenas *Campylobacter* spp. em sua forma viva ou VNC seria capaz de provocar doença no consumidor.

Josefsen et al. (2010) realizaram a comparação entre esses mesmos tipos de PCR e encontraram menor discrepância de resultados. Na análise de PCR em tempo real foram observadas 96% de amostras positivas, enquanto que para PCR em tempo real tratada com PMA, 90% das amostras foram positivas. Os autores sugeriram que tal resultado poderia ser devido à baixa quantidade de bactéria no estado VNC presente nas carcaças no pós-abate, momento em que as amostras foram coletadas. No presente trabalho, as carcaças foram submetidas a baixas temperaturas para armazenamento (resfriamento e congelamento) e o abaixamento da temperatura pode ter sido eficiente no controle do micro-organismo no alimento.

Tabela 3. Comparação da presença de *Campylobacter* spp. em carcaças de frangos resfriadas e congeladas analisadas pela técnica de PCR em tempo real e PCR em tempo real com PMA

Amostra	Sem PMA*	Com PMA*
Congelada	27 a	2 bB
Resfriada	26 a	9 bA
Total de amostras	30	30

*PMA: Propídio Monoazida (Intercalante de DNA)

Médias seguidas de letras distintas minúsculas na linha diferem entre si pelo teste do Qui-quadrado ($p < 0,001$).

Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na coluna diferem entre si pelo teste do Qui-quadrado ($p < 0,05$).

5.4 Comparação da presença de *Campylobacter* spp. em carcaças resfriadas e congeladas

Não foi observada diferença ($P > 0,05$) na detecção de *Campylobacter* spp. entre as carcaças resfriadas e congeladas quando as mesmas foram analisadas pela metodologia da PCR em tempo real. Esse resultado concorda com os resultados encontrados por Reis (2015) que também encontrou uma alta taxa de positividade do micro-organismo *Campylobacter* spp. em carcaças de frangos e não encontrou diferença ($P > 0,05$) na detecção entre as carcaças submetidas a diferentes temperaturas de armazenamento. O resultado de PCR em tempo real para amostras não tratadas com PMA representa a quantidade total de DNA de *Campylobacter* spp. presente na amostra, ou seja, o DNA de micro-organismos viáveis e VNC somados ao valor do DNA de micro-organismos não viáveis. Sendo as carcaças, resfriadas e congeladas, utilizadas nesse experimento pareadas, isto é, provenientes dos mesmos lotes e submetidas às mesmas condições de abate o esperado é que a quantidade de DNA, proveniente de bactéria viável ou não viável, seja semelhante.

Ao utilizar o PMA como tratamento prévio das amostras, observou-se que as carcaças resfriadas apresentaram um maior índice de contaminação ($P < 0,05$) quando comparadas às carcaças congeladas. De acordo com esse resultado, um maior número de carcaças resfriadas possui *Campylobacter* spp. viável em relação às carcaças congeladas. Esses resultados sugerem que ao ser congelado, o micro-organismo sofre injúrias que o tornam inviável, reduzindo o risco de campilobacteriose no ser humano. Isso pode ser explicado pelo efeito que o congelamento exerce sobre a bactéria, levando à precipitação e desnaturação de proteínas e enzimas, formação de cristais de gelo, morte e redução da carga microbiana viável presente no alimento (Frazier e Westhoff, 1993).

Duarte et al (2015), ao inocularem carcaças com *Campylobacter jejuni* e *C. coli* submetidos a condições de estresse comumente encontradas ao longo do processamento da carne de frango, observaram que o congelamento das amostras levou à redução do número de micro-organismo. Estes autores avaliaram a contaminação de carcaças de frangos submetidas aos efeitos do aquecimento, da refrigeração, do congelamento, da oxidação e da acidez do meio e concluíram que o congelamento foi mais eficiente na redução da carga microbiana viável do micro-organismo no alimento.

Ao comparar amostras congeladas, foi observada diferença entre as submetidas ao tratamento com PMA e as não tratadas com o intercalante de DNA ($p < 0,001$). Observou-se que das 30 amostras congeladas analisadas, 27 (90%) foram positivas na PCR em tempo real, enquanto apenas 2 (6,67%) apresentaram resultado positivo para a PCR em tempo real com tratamento com PMA. Da mesma forma, a comparação entre as amostras resfriadas tratadas ou não com PMA mostrou diferença ($p < 0,001$). A análise destes

resultados indica que as carcaças de frango possuem altas taxas do micro-organismo *Campylobacter* spp. No entanto, o congelamento e o resfriamento se mostraram eficientes em reduzir a amplificação indiferenciada de DNA do micro-organismo presente na amostra, o que reflete na viabilidade de *Campylobacter* spp. e, logo, no real risco que essa bactéria representa à saúde da população.

5.5 Quantificação de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango

Os resultados para a quantificação de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango congeladas e resfriadas analisadas pela PCR em tempo real e pela PCR em tempo real com tratamento prévio pelo PMA estão descritos na tabela 4. Das 27 carcaças de frango congeladas consideradas positivas pela análise da PCR em tempo real sem tratamento com PMA, 21 puderam ser quantificadas e, das 26 amostras resfriadas, 21 foram quantificadas para *Campylobacter* spp. A variação de Ct encontrada para essas amostras foi de 32,8 a 36,38 e, de acordo com a curva de sensibilidade analítica realizada para esse experimento, pode ser considerada uma contaminação alta, girando em torno de 10^1 a 10^2 bactérias/g. Quando foi utilizada a metodologia da PCR em tempo real com tratamento prévio com PMA as duas carcaças de frango congeladas consideradas positivas puderam ser quantificadas e, das nove amostras resfriadas, oito foram quantificadas para *Campylobacter* spp. A variação de Ct encontrada para essas amostras foi de 24,72 a 37,06, o que traduz uma contaminação 10^1 a 10^5 bactérias/g.

Tabela 4. Variação de *Cycle threshold* (Ct) de amostras quantificadas para *Campylobacter* spp. em carcaças de frangos resfriadas e congeladas e analisadas pela técnica de PCR em tempo real e PCR em tempo real com tratamento com PMA

Amostras	Sem PMA*	Com PMA*
Congelada	34,62 +- 1,76	30,58+- 5,86 B
Resfriada	34,73 +- 1,93	34,89 +- 2.17A

* PMA: Propídio Monoazida (Intercalante de DNA)

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na coluna diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Ao analisar a quantidade de bactérias do gênero *Campylobacter* em carcaças congeladas, não foi observada diferença ($p > 0,05$) quando a comparação foi realizada entre os tratamentos PCR em tempo real com PMA e PCR em tempo real sem o PMA. Carcaças congeladas não tratadas com PMA tiveram Ct variando de 36,38 a 32,86, o que equivale a uma contaminação por *Campylobacter* spp. de 10^1 a 10^2 bactérias/g. As carcaças congeladas tratadas com PMA tiveram variação de Ct de 36,44 a 24,72 equivalendo a uma contaminação de 10^1 a 10^4 bactérias. Resultado semelhante foi obtido em amostras resfriadas, quando da comparação entre amostras tratadas com PMA e não tratadas com PMA, previamente à PCR em tempo real. Em relação às carcaças resfriadas, os Ct encontrados foram de 36,66 a 32,8 para amostras não tratadas e 37,06 a 32,72 para as tratadas com PMA. Em ambos os tipos de amostras, a faixa de contaminação das carcaças pelo micro-organismo correspondeu a 10^1 a 10^2 bactérias. Nesses casos em que os tratamentos térmicos foram aplicados, mas que não levaram à morte de *Campylobacter* spp., infere-se que o número de micro-organismos do gênero foi mantido estável no produto, mesmo tendo sido submetidos ao congelamento e resfriamento.

A análise da quantidade de *Campylobacter* spp. das amostras não tratadas com PMA também não resultou em diferença ($p > 0,05$) quando a comparação foi realizada entre amostras congeladas e resfriadas. O resultado quantitativo, assim com o qualitativo, indica que as carcaças sendo pareadas são similares do ponto de vista microbiológico. Isto porque elas foram coletadas em um mesmo momento do processo de

abate e com isso, muito provavelmente, passaram pelas mesmas fontes de contaminação. Como a análise sem PMA detecta e quantifica todas as formas de *Campylobacter* spp. (vivos, VNC e mortos), era de se esperar que a contaminação fosse semelhante, mesmo que as carcaças tenham passado por tratamentos térmicos diferentes. Para esses grupos, a contaminação microbiana ficou entre 10^1 e 10^2 bactérias/g. Esse número reflete a quantidade total de DNA presente na amostra, sendo o somatório de DNA proveniente de células vivas, VNC e mortas.

Porém, foi observada diferença ($P < 0,05$) nas contagens de micro-organismos viáveis quando a comparação foi realizada entre as carcaças congeladas e resfriadas tratadas com PMA, previamente à PCR em tempo real. Para as amostras resfriadas, a quantidade de bactéria variou de 10^1 a 10^2 bactérias. Já os valores de Ct das amostras congeladas indicam maior variação na contaminação por *Campylobacter* spp., além de uma alta concentração do micro-organismo viável, equivalente a 10^4 bactérias. Considerando que 500 células de *Campylobacter* spp. seriam suficientes para causar doença em humanos, essas contaminações indicam que as amostras analisadas possuíam alto potencial infeccioso. Por outro lado, Luo et al. (2010) sugeriram que a presença de alta concentração de células com membrana comprometida poderia exceder a capacidade de ligação do PMA, possibilitando a amplificação de DNA de células mortas ou não viáveis, o que poderia representar um viés da técnica utilizada. A alta quantificação do micro-organismo se deu justamente nas amostras congeladas, as quais se esperam menor contaminação por *Campylobacter* spp. pelo fato de essa bactéria ser sensível a temperaturas de congelamento. Comparando a quantidade máxima de bactérias nas amostras congeladas e resfriadas e considerando que a refrigeração gera menos danos à célula de *Campylobacter* spp., quando comparada ao congelamento, esse resultado quantitativo poderia estar realmente superestimado.

As figuras 3 e 4 exemplificam as curvas de amplificações de DNA encontradas no presente trabalho. Na figura 3, a amostra resfriada não tratada previamente com PMA possuiu média de Ct de 30,48, o que equivale a contagens de *Campylobacter* spp. de 10^3 bactérias/g. Ao observar a curva de amplificação da mesma amostra submetida, porém, ao tratamento prévio por PMA (figura 4), encontrou-se média de Ct de 36,47, o que corresponde a uma contaminação por 10^1 bactérias/g, valor inferior ao encontrado para a amostra não tratada com PMA. A análise das figuras em conjunto permite inferir que das 10^3 bactérias/g detectadas, na amostra não tratada com PMA, em torno de 10^2 bactérias/g estariam mortas, havendo apenas 10^1 bactéria/g em estado VNC ou viva. Observando esse exemplo, o resultado das amostras tratadas com PMA se tornaria mais interessante, uma vez que, com o tratamento com o intercalante de DNA, a pesquisa de *Campylobacter* spp. não estaria superestimada, demonstrando o risco real que o alimento representa para a saúde.



Figura 3. Curva de amplificação de DNA de amostra resfriada analisada pela metodologia da PCR em tempo real sem tratamento com PMA

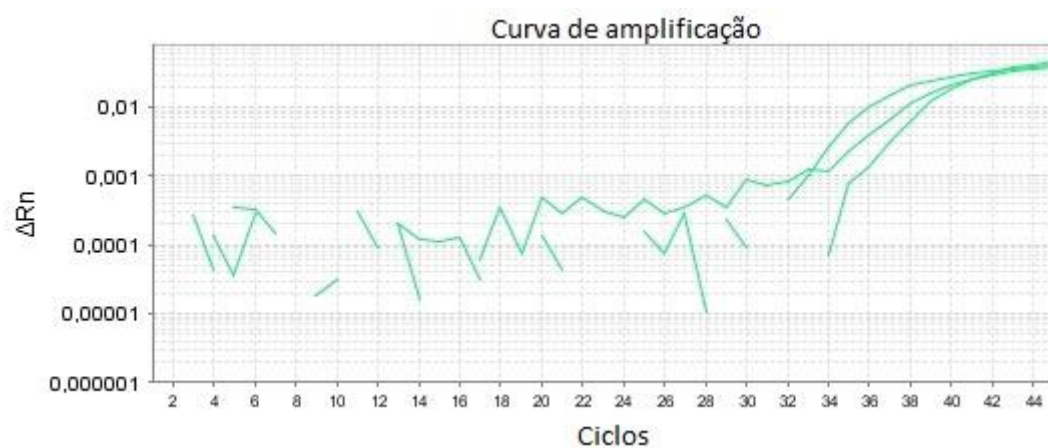


Figura 4. Curva de amplificação de DNA de amostra resfriada analisada pela metodologia da PCR em tempo real submetida ao tratamento prévio com PMA

6. Conclusões

O armazenamento de carcaças de frango de corte em temperaturas de refrigeração e congelamento é eficaz na redução da positividade para *Campylobacter* spp. quando utilizada a técnica de PCR em tempo real com tratamento por PMA em relação à PCR em tempo real sem o tratamento com o intercalante de DNA.

O micro-organismo se mantém viável com maior frequência em carcaças resfriadas, quando comparado a carcaças congeladas.

7. Referências bibliográficas

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL (ABPA) – Relatório Anual 2014. Disponibilidade <
<http://www.ubabef.com.br/files/publicacoes/8ca705e70f0cb110ae3aed67d29c8842.pdf>> Data de acesso:
15 de julho de 2015.
- ADVISORY COMMITTEE ON THE MICROBIOLOGICAL SAFETY OF FOOD (ACMSF). *Second Report on Campylobacter*: Advises the food standards agency on the microbiological safety of food. Food Standards Agency, 2005.
- ALLOS, B. M.. Association between *Campylobacter* infection and Guillain-Barré syndrome. *The journal of infection disease*. v. 176, p. S125-S128, 1997.
- ALLOS, B. M.. *Campylobacter jejuni* infection as a cause of the Guillain-Barré syndrome. *Emerging infectious disease*. v. 12, n. 1, p. 173-184, 1998.
- 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.
- ARQUIVO BRASILEIRO DE CARDIOLOGIA. Sociedade brasileira de cardiologia, abril de 2007. IV Diretriz Brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose. v. 88, p2-19. Disponibilidade em:<<http://publicacoes.cardiol.br/consenso/2007/diretriz-DA.pdf>>. Acesso: 23 de janeiro de 2015.
- BAILEY, J. S.; FEDORKA-CRAY, P.; RICHARDSON, L. J.; COX, N. A.; COX, J. M.. Detection of *Campylobacter* from broiler carcass rinse sample utilizing the TECRA visual Immunoassay (VIA). *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*. v. 16, p. 374-380, 2008.
- BAYLIS, C. L.; MACPHEE, S.; MARTIN, K. W.; HUMPHREY, T. J.; BETTS, R, P.. Comparison of three enrichment media for the isolation of *Campylobacter* spp. from foods. *Journal of Applied Microbiology*, v. 89, p. 884-891, 2000.
- BELKUM, A. V.; JACOBS, B.; BEEK, E. V.; LOUWEN, R.; RIJS, W. V.; DEBRUYNE, L.; GILBERT, M.; LI, J.; JANSZ, A.; MÉGRAUD, F.; ENDTZ, H.. Can *Campylobacter coli* induce Guillain-Barré syndrome? *European journal of clinical microbiology infection disease*, v. 28, p. 557-560, 2009.
- BERSUDSKY, M.; ROSENBERG, P.; RUDENSKY, B.; WIRGUIN, I.. Lipopolysaccharides of a *Campylobacter coli* isolate from a patient with Guillain-Barré syndrome display ganglioside mimicry. *Neuromuscular Disorders*, v. 10, p. 182-186, 2000.
- 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.

- BOLTON, F. J.; COATES, D.. Development of a blood-free *Campylobacter* medium: screening tests on basal medium and supplements, and the ability of selected supplements to facilitate aerotolerance. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 54, p. 115-125, 1983.
- BOLTON, F. J.; HUTCHINSON, D. N.; COATES, D.. Blood-Free selective medium for isolation of *Campylobacter jejuni* from feces. *Journal of clinical microbiology*, v. 19, n. 2, p. 169-171, 1984.
- BOLTON, F. J.; ROBERTSON, L.. A selective medium for isolating *Campylobacter jejuni/coli*. *Journal of clinical pathology*, v. 35, p. 462-467, 1982.
- 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.
- BOTTELDOORN, N; VAN COILLIE, E.; PIESSENS, V.; RASSCHAERT, G.; DEBRUYNE, L.; HEYNDRIKX, M.; HERMAN, L.; MESSENS W.. Quantification of *Campylobacter* spp. in chicken carcass rinse by real-time PCR. *J. Appl. Microbiol.*, v. 105, n. 6, p. 1909–1918, 2008.
- BOVILL, R. A., MACKEY, B. M., Resuscitation of ‘non-culturable’ cells from aged cultures of *Campylobacter jejuni*. *Microbiology*, v. 143, p. 1575-1581, 1997.
- BRASIL. Decreto 30.691 de 29 de março de 1952. Regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal (RIISPOA).
- BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria 210 de 10 de novembro de 1998. Regulamento técnico da inspeção tecnológica e higiênico-sanitária de carne de aves. 1998(a)
- BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução da diretoria colegiada nº12 de 2 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Fundação Orwaldo Cruz (FIOCRUZ). Procedimentos para manipulação de micro-organismos patogênicos e/ou recombinantes na FIOCRUZ. Rio de Janeiro, 220p, 2005.
- BRASIL, Ministério da Saúde. SVS (Secretaria de Vigilância em Saúde); UHA (Unidade Técnica de Doenças de Veiculação Hídrica); CGDT (Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis). Dados epidemiológicos - DTA período de 2000 a 2011. [s.l.], 2011.
- BUSTIN, S. A.. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology*, v. 25, p. 169-193, 2000.
- BUSTIN, S. A.. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of molecular endocrinology*, v. 29, p. 23-39, 2002.
- BUTZLER, J. P.. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. *Clin Microbiol Infect*, v. 10, p. 868–876, 2004.

CALCIATI, E.; LAFUENTE, S.; SIMÓ, M.; BALFAGON, P.; BARTOLOMÉ, R.; CAYLÀ, J.. A *Campylobacter* outbreak in a Barcelona school. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, v. 30, n. 5, p. 243-245, 2012.

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.

CARVALHO, T. B.. *Estudo da elasticidade-renda da demanda de carne bovina, suína e de frango no Brasil*. 2007. 88f. Dissertação (Mestrado em Economia Aplicada). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba-SP.

CASARIL, K. B. P. B.. *Padronização de PCR tradicional e em tempo real para detecção de Campylobacter jejuni e Campylobacter coli em alimentos*. 2010. Tese (Doutorado em ciência de alimentos) Universidade Estadual de Londrina. Londrina-PR.

CASTELANI, L.; DUARTE, K. M. R.. Métodos moleculares em microbiologia de alimentos. *Pubvet*, v. 5, n. 2, 2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). *Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks*, United States, 2012, Annual Report. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, 2014.

CODEX ALIMENTARIUS. *Directrices para el control de Campylobacter y Salmonella En la carne de pollo*. CAC/RCP 78-2011. Disponível em http://www.codexalimentarius.org/input/.../CXG_078e.pdf

CONAB Indicadores da agropecuária Companhia Nacional de Abastecimento Ano XXIV, n6 junho de 2015. ISSN: 2317-7535 Indic. Agropec., Brasília, Ano XXIV, n. 6, jun. 2015, p. 01-96 Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_06_30_17_30_12_revista_junho__final__inter.net.pdf

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

CUNHA, C. C.. *Avaliação de desempenho da produção de frangos de corte no Brasil utilizando a análise envoltória de dados e o índice de Malmquist*. 2014. 79f. Dissertação (Mestrado em Agronegócios) - Universidade de Brasília. Faculdade de agronomia e medicina veterinária. Brasília-DF.

DEBRETSION, A.; HABTEMARIAM, T.; WILSON, S.; NGANWA, D.; YEHUALAESHET, T.. Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Campylobacter jejuni* on chicken rinses from poultry processing plant. *Molecular and cellular probes*, v. 21, p. 177-181, 2007.

DUARTE, A.; BOTTELDOORN, N.; COUCKE, W.; DENAYER, S.; DIERICK, K.; UYTENDAELE, M.. Effect of exposure to stress conditions on propidium monoazide (PMA)-qPCR based *Campylobacter* enumeration in broiler carcass Rinses. *Food Microbiology*, v. 48, p. 182-190, 2015

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). *Scientific Report of the Scientific Panel on Biological Hazards on the request from the Commission related to Campylobacter in animals and foodstuffs*. The EFSA Journal v. 173, p. 1-105, 2005.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). *Campylobacter in animal and foodstuffs: Opinion of the scientific panel on biological hazards on the request from the commission related to Campylobacter in animal and foodstuffs*. The EFSA journal. Question EFSA-Q-2003-081. 2005.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). *Scientific opinion on Campylobacter in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain*. EFSA Journal, v. 9, n. 4, 2011.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY AND EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (EFSA/ECDC). *The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013*. EFSA Journal, v. 13, n. 1, p. 162, 2015. Disponível em: www.efsa.europa.eu/efsajournal.

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. 2000. *Tecnologia del procesamiento de los alimentos, principios y practicas*. Zaragoza, España. Editorial Acribia S.A., 549p.

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

FIGUEROA, G.; TRONCOSO, M.; LÓPEZ, C.; RIVAS, P.; TORO, M.. Occurrence and enumeration of *Campylobacter* spp. during the processing of Chilean broilers. *BMC microbiology*, v. 9, n. 94, 2009.

FLEKNA, G.; STEFANIC, P.; WAGNER, M.; SMULDERS, F. J. M.; MOZINA, S. S.; HEIN, I.. Insufficient differentiation of live and dead *Campylobacter jejuni* and *Listeria monocytogenes* cells by ethidium monoazide (EMA) compromises EMA/real-time PCR. *Research in Microbiology*, v. 158, p. 405-412, 2007

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/WORD HEALTH ORGANIZATION. *Samonella and Campylobacter in chicken meat: Meeting. Microbiological risk assessment series n. 19*. Rome, Italy, 2009.

FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE (FSIS). *Changes to the Salmonella and Campylobacter Verification Testing Program: Proposed Performance Standards for Salmonella and Campylobacter in Not-Ready-to-Eat Comminuted Chicken and Turkey Products and Raw Chicken Parts and Related Agency Verification Procedures and Other Changes to Agency Sampling* Federal register, v10, n16, p3940-3950, 2015. Disponível em: <http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/55a6586e-d2d6-406a-b2b9-e5d83c110511/2014-0023.pdf?MOD=AJPERES>

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

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

FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. C.. *Microbiologia de los alimentos*. 4. ed. Zaragoza: Acribia. 681p., 1993.

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

GARRITY, G.M.; BELL, J.A.; LILBURN, T... *Order I. Campylobacteriales ord. nov.*. In: G.M. Garrity (Ed.) 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume Two: the Proteobacteria*. 2 ed. New York: Springer, 2005.

GEORGSSON, F.; PORKESSON, A. E.; GEIRSDÓTTIR, M.; REIERSEN, J.; STERN, N.. The influence of freezing and duration of storage on *Campylobacter* and indicator bacteria in broiler carcasses. *Food microbiology*, v. 23, p. 677-683, 2006.

GILL, C.O.; HARRIS, L.M.. Survival and growth of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* on meat and in cooked foods. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 44, n. 2, p. 259-263, 1982.

GUERIN, M. T.; SIR, C.; SARGEANT, J. M.; WADDELL, L.; O'CONNOR, A. M.; WILLS R. W.; BAILEY, R. H.; BYRD, J. A.. The change in prevalence of *Campylobacter* on chicken carcasses during processing: A systematic review. *Poultry Science*. v. 89, p. 1070-1084, 2010.

HAZELEGER, W. C.; WOUTERS, J. A.; ROMBOUTS, F. M.; ABEE, T.. Physiological activity of *Campylobacter jejuni* far below the minimal growth temperature. *Applied and environment microbiology*, v. 64, n. 10, p. 3917-3922, 1998.

HERMAN, L.; HEYNDRICKX, M.; GRIJSPEERDT, K.; VANDEKERCHOVE, D.; ROLLIER, I.; ZUTTER, L.. Routes for *Campylobacter* contamination of poultry meat: epidemiological study from hatchery to slaughterhouse. *Epidemiology and Infection*, v. 131, n. 3, p. 1169–1180, 2003.

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

HUNT, J.M.; ABEYTA, C. *Isolation of Campylobacter species from food and water*. In FDA Bacteriological Analytical Manual. 8. ed. p. 7.01–7.27. Gaithersburg, MD : Association of Official Analytical Chemists, 1995.

HUTCHINSON, D. N.; BOLTON, F. J.. Improved blood free selective medium for isolation of *Campylobacter jejuni* from faecal specimens. *Journal of clinical pathology*, v. 37, p. 956-957, 1984,

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). *Guia Simplificado para Compreensão e Uso de Objetivos de Inocuidade Alimentar e Objetivos de Desempenho*. 2006. Disponível em:
<http://www.icmsf.org/pdf/FSO%20Objectives/GuiaSimplificadoPO.pdf>.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION (ISO). 10272-1:2006. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of Campylobacter spp. Part 1: Detection method*.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION (ISO). 10272-2:2006. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of Campylobacter spp. Part 2. Colony count technique*.

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

IVANOVA, M.; SINGH, R.; DHARMASENA, M.; GONG, C.; KRASTANOV, A.; JIANG, X.. Rapid identification of *Campylobacter jejuni* from poultry carcasses and slaughtering environment samples by real-time PCR. *Poultry science*, v. 93, n. 6, p. 1587-1597, 2014.

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

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

JEFFREY, J. S.; HUNTER, A.; ATWILL, E. R.. A fied-suitable, semisolid aerobic enrichment medium for isolation of *Campylobacter jejuni* in small numbers. *Journal of Clinical Microbiol*, v 38, n.4, p.1668-1669, 2000.

JOSEFSEN, M. H.; LOFSTROM, C.; HANSEN, T. B.; CHRISTENSEN, L. S.; OLSEN, J. E.; HOORFAR, J.. Rapid Quantification of Viable *Campylobacter* Bacteria on Chicken Carcasses, Using Real-Time PCR and Propidium Monoazide Treatment, as a Tool for Quantitative Risk Assessment . *Applied and environmental microbiology*, v. 76, n15, p. 5097–5104, 2010.

JUNG, R.; SOONDRUM, K.; NEUMAIER, M.. *Quantitative PCR*. Clin Chem Lab Med, v.38, n. 9, 833–836, 2000.

KARMALI, M. A.; FLEMING, P. C.. *Campylobacter enteritis*. *Canadian Medical Association Journal*, v. 120, p. 1525-1532, 1979.

KERAMAS, G.; BANG, D. D.; LUND, M.; MADSEN, M.; RASMUSSEN, S. E.; BUNKENBONG, H.; TELLEMAN, P.; CHRISTENSEN, CBV.. Development of a sensitive DNA microarray suitable for rapid detection of *Campylobacter* spp. *Mol. Cell Probes*, v. 17, n. 4, p. 187-196, 2003.

KNILL, M. J.; SUCKLING, W. G.; PEARSON, A. D.. *Campylobacter* from water. In *Campylobacter: Epidemiology, Pathogenesis and Biochemistry*. Lancaster, M.T.P. press, p. 281-284, 1982.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M; SCHREKENBERGER, P.C. *Diagnóstico microbiológico*. Texto e atlas colorido. 5. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2001.

KRUGER, N-J.; BUHLER, C.; IWOBI, A. N.; HUBER, I.; ELLERBROEK, L.; APPEL, B.; STINGL, K.. “Limits of control”- Crucial parameters for a reliable quantification of viable *Campylobacter* by real-time PCR. PLoS ONE, v. 9, n. 2, e88108, 2014.

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.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J. M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONÁK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJOBACK, R.; SJOGREEN, B.; STROMBOM, L.; STAHLBERG, A.; ZORIC, N.. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 27, p. 95–125, 2006.

- LEE, A.; SMITH S. C.; COLOE, P. J.. Survival and growth of *Campylobacter jejuni* after artificial inoculation onto chicken skin as a function of temperature and packaging conditions. *Journal of food protection*, n. 12, p. 1609-1614, 1998.
- 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.
- LUBECK, P. S.; WOLFFS P.; ON P. A.; RADSTROM P.; HOOFFAR, J.. Toward an international standard for PCR-based detection of food-borne thermotolerant *Campylobacters*: assay development and analytical validation. *Appl Environ Microbiol*, v. 69, p.5664–5669, 2003.
- LUO, J-F.; LIN, W. T.; GUO Y.. Method to detect only viable cells in microbial ecology. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 86, p. 377-384, 2010.
- 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.
- 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, p. .137-139, 2006.
- MEAD, G. C.. Microbiological quality of poultry meat: a review. *Brazilian journal of poultry science*, 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.
- MINISTRY OF HEALTH. Microbiological Reference Criteria for Food. Version 2.0, 1995
- MINISTRY FOR PRIMARY INDUSTRIES (MPI). *Campylobacter* risk management strategy 2013-2014. 2013. Disponível em: <<http://www.mpi.govt.nz/news-resources/publications.aspx>>
- MOORHEAD, S. M.; DYKES, G.A.. Survival of *Campylobacter jejuni* on beef trimmings during freezing and frozen storage. *Letters in Applied Microbiology*, v. 34, p. 72-76, 2002.
- NACHAMKIN, I.; ALLOS, B. M.; HO, T.. *Campylobacter* Species and Guillain-Barre Syndrome. *Clinical microbiology reviews*, v. 11, n. 3, p. 555-567, 1998.
- NACHAMKIN, I.; BARBAGALLO, S.. Culture Confirmation of *Campylobacter* spp. by Latex Agglutination *Journal of clinical microbiology*, v. 28, n. 4, p. 817-818, 2000.
- NACHAMKIN, I. *Campylobacter jejuni*. In: *Food Microbiology : fundamental and frontiers*. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R. 3.ed. Washinton: ASM Press. p.237-248, 2007.

- NOCKER, A.; CAMPER, A.K.. Selective Removal of DNA from Dead Cells of Mixed Bacterial Communities by Use of Ethidium Monoazide. *Applied and environmental microbiology*, v. 72, n. 3, p. 1997–2004, 2006.
- NOCKER, A.; CHEUNG, C.Y.; CAMPER, A.K.. Comparison of propidium monoazide and ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *J. Microbiol. Methods*, n. 67, p. 310–320, 2006.
- NOGVA, H.K.; DROMTORP, S.M.; NISSEN, H.; RUDI, K.. Ethidium monoazide for DNA based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. *Biotechniques*, v. 810, p. 812–813, 2003.
- NOTERMANS, S.; HOOGENBOOM-VEDERGAAL, A.. Existing and emerging foodborne diseases. *Internatinal journal of food microbiology*. v. 15, p. 197-205, 1992.
- NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISA EM ALIMENTAÇÃO - Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. - Campinas-SP: UNICAMP - 2011. Disponibilidade<
http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf?arquivo=taco_4_versao_ampliada_e_revisada.pdf> Data de acesso: 27 de março de 2015
- 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.
- 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.
- OYOFO, B. A.; ORNTON, S. A.; BURR, D. H.; TRUST, T. J.; PAVLOVSKIS, O. R.; GUERRY, P.. Specific Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by Using Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 30, n. 10, p. 2613-2619, 1992.
- PARDI, M.C.; SANTOS, I.F.; SOUZA, E.R.; PARDI, H. S. *Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne*. 1995. Volume 1. Editora UFG, pg 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.; MAYRHOFER, S.; BAUMGARTNER, S.; SMULDERS, F.J.M.. Comparison of three methods for detecting *Campylobacter* in chilled or frozen meat. *International Journal of Food Microbiology*, v. 103, n. 2, p. 229 -233, 2005.
- PETRACCI, M.; BIANCHI, M.; CAVANI, C.. Pre-slaughter handling and slaughtering factors influencing poultry product quality. *Word's poultry science journal*, v. 66, p. 17-26, 2010.

- PITCHER, D.G.; SAUNDERS, N.A.; OWEN, R.J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidine thiocyanate. *Lett Appl Microbiol*, v. 8, p.151-156, 1989.
- 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.
- RANTSIU, K.; LAMBERTI, C.; COCOLIN, L.. Survey of *Campylobacter jejuni* in chicken meat products by application of a quantitative PCR protocol. *International journal of food microbiology*, v. 141, p. S75-S79, 2010.
- REIS, L. P.. Utilização das metodologias imunoenzimática e reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção e caracterização de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango. 2015. 62f. Dissertação (mestrado em ciência animal)-Universidade Federal de Minas Gerais-Escola de Veterinária. Belo Horizonte-MG.
- RICHARDSON, L. J.; COX, N. A.; BAILEY, J. S.; BERRANG, M. E.; COX, J. M.; BUHR, R. J.; FEDORKA-CRAY, P. J.; HARRISON, M. A.. Evaluation of TECRA broth, Bolton broth, and direct plating for recovery of *Campylobacter* spp. from broiler carcass rinsates from commercial processing plants. *J. Food Prot*, v. 72, p. 972-977, 2009.
- RIZZI, A. T. *Mudanças tecnológicas e reestruturação da indústria agroalimentar: o caso da indústria de frangos no Brasil*. 1993. 194 f. Tese (Doutorado em Economia) - Instituto de Economia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- ROBINSON, D. A.. Infective dose of *Campylobacter jejuni* in milk. *Br. Med. J.* v. 282, p. 1584, 1981.
- 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.
- RUDI, K.; MOEN, B.; DROMTORP, S. M.; HOLCK, A. L.. Use of Ethidium Monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. *Applied and environmental microbiology*, v. 71, n. 2, p. 1018-1024, 2005.
- SANTOS FILHO, J. I.; MIELE, M.; MARTINS, F. M.; TALAMINI, D. J. D. Os 35 anos que mudaram a avicultura brasileira. In: SOUZA, J. C. P. V. B.; TALAMINI, D. J. D.; Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/907864/1/Os35anosquemudaramaaviculturabras.pdf>
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. 2001. *Molecular Cloning*. 3. Ed. v. 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova Iorque.
- SAMPAIO, I. B. M. S.. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2000. 221p.
- SAILS, A. D.; FOX, A. J.; BOLTON, F. J.; WAREING, D. R. A.; GREENWAY, D. L. A.. A Real-Time PCR Assay for the Detection of *Campylobacter jejuni* in Foods after Enrichment Culture. *Applied and environmental microbiology*, v. 69, n. 3. P. 1383-1390, 2003.
- SCARCELLI, E.; PIATTI, R.M. Patógenos emergentes relacionados à contaminação de alimentos de origem animal. *O Biológico*, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 123-127, 2002.

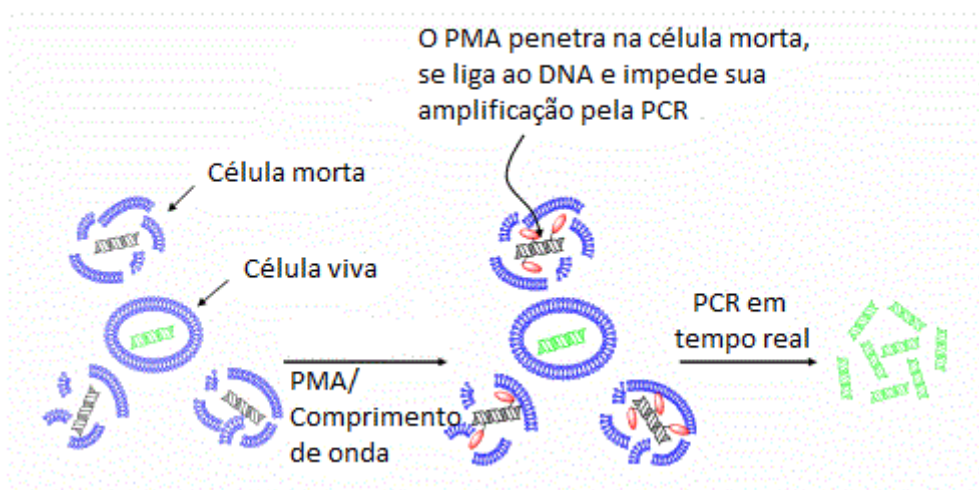
- SELIWIORSTOW, T.; BARÉ, J.; VAN DAME, I.; UYTENDAELE, M.; DE ZUTTER, L..
Campylobacter carcass contamination throughout the slaughter process of *Campylobacter*-positive broiler batches. *International journal of food microbiology*, v. 194, p. 25-31, 2015.
- SKIRROW, M. B.. Epidemiology of *Campylobacter* enteritis. *International journal of food microbiology*, v. 12, p. 9-16, 1991.
- 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.
- 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.
- SUNG, K. D.; STERN, N. J.; HIETT, K. L.. Relationship of Messenger RNA Reverse Transcriptase–Polymerase Chain Reaction Signal to *Campylobacter* spp. viability. *Avian diseases*, v. 48, p. 254–262, 2004.
- UBA - União Brasileira de Avicultura. Relatório Anual 2008. Disponibilidade<
<http://www.ubabef.com.br/files/publicacoes/1dae07eab061c11e7985bf2c61870866.pdf>> Data de acesso: 15 de julho de 2015.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). Compliance guideline for controlling *Salmonella* and *Campylobacter* in poultry, 3. ed, 2010. Disponível em:
<[www.fsis.usda.gov/PDF/Compliance Guideline Controlling Salmonella Poultry.pdf](http://www.fsis.usda.gov/PDF/Compliance_Guideline_Controling_Salmonella_Poultry.pdf)>
- VANDAMME, P.; DE LEY, J.. Proposal for a new Family, Campylobacteriaceae. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 41, n. 3, p. 451-455, 1991.
- VANDAMME, P. Taxonomic of the family Campylobacteriaceae. In: NACHAMKIN, I.; BLASER, M.J., eds. *Campylobacter*. Washington: ASM Press, 2000. p.3-27.
- VANDAMME, P.; DEWHIRST, F. E.; PASTER, B. J.; ON, S. L. W.. Family Campylobacteriaceae. Bergey's manual of systematic bacteriology, v. 2, p. 145-1146, 2005.
- 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.
- 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.
- WARING, M. J.. Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *J. Mol. Biol.* v. 13, p.269-282, 1965.
- 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.

WOLFFS, P.; NORLING, B.; HOORFAR, J.; GRIFFITHS, M.; RÅDSTRO, M.. Quantification of *Campylobacter* spp. in Chicken Rinse Samples by Using Flotation prior to Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 5759–5764, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Campylobacter*. 2011. Fact sheet N°255, Geneva. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/es/>

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

8. Anexo



Anexo 1: Princípio da modificação do DNA causada pelo propídio monoazida na detecção da viabilidade bacteriana por PCR em tempo real. (Fonte: Product information, Biotium)

Anexo 2. Tolerância para a presença de *Campylobacter* spp. em amostras representativas de frango cru, alimentos processados à base de frango, carne cozida de frango e carne defumada de frango.

Produto (10g)	n	c	m	M
Frango cru *	5	2	0	-
Alimentos que requerem processamento >70°C	5	1	0	-
Carne cozida	5	0	0	-
Curada e/ou defumada	5	0	0	-

n: número de amostras de um lote que devem ser coletadas de forma aleatória; **m:** limite que, em um plano de amostragem de três classes, separa o lote aceitável do inaceitável; **M:** é o limite que, em um plano de duas classes, separa o produto aceitável do inaceitável; **c:** número máximo aceitável de contagens entre m e M, para um plano de três classes (Ministry of Health, 1995).