

Ethiene Luiza de Souza Santos

Detecção e identificação de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango de corte produzidas no estado de Minas Gerais

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.
Co-orientador: Andrey Pereira Lage

Belo Horizonte

Escola de Veterinária da UFMG

2016

S237d Santos, Ethiene Luiza de Souza, 1987-
Detecção e identificação de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango de corte produzidas no estado de Minas Gerais / Ethiene Luiza de Souza Santos. – 2016. 58 p. : il.

Orientadora: Silvana de Vasconcelos Cançado
Co-orientador: Andrey Pereira Lage
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

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

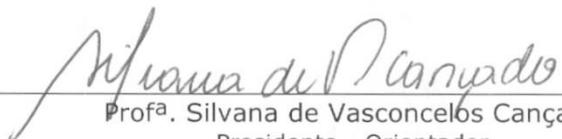
CDD – 664.07

FOLHA DE APROVAÇÃO

ETHIENE LUIZA DE SOUZA SANTOS

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

Aprovada em 21 de Janeiro de 2016, pela banca constituída pelos membros:



Prof.ª. Silvana de Vasconcelos Cançado
Presidente - Orientador



Dr.ª. Elaine Maria Seles Dorneles
Universidade Federal de Lavras - UFLA



Prof. Marcelo Resende de Souza
Escola de Veterinária - UFMG

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, por me dar força e saúde para trilhar meus caminhos e por não me desamparar.

À minha família pela presença em minha vida, especialmente meus pais, Aluizio e Neuza, por me estimular a buscar sempre mais e por me apoiar em minhas decisões.

Ao meu irmão, Siron, por ser companheiro, amigo, paciente e exemplo de bondade.

Ao meu noivo, Heitor, pela amizade acima de tudo, pelo companheirismo, pela atenção, pelo tempo a mim dedicado independente do horário, pelo amor incondicional e por toda sua contribuição para essa pesquisa.

À minha orientadora, professora Silvana, pelas oportunidades de crescimento, pela confiança em mim depositada e pelo aprendizado.

Ao meu co-orientador, professor Andrey, pelo acolhimento e aprendizado, pela dedicação e por toda paciência.

À Liliane Menezes, à Telma Maria Alves e aos professores Marcelo e Elaine pela disponibilidade, pelos ensinamentos e por toda a atenção, desde a graduação até o mestrado.

Aos amigos do LBA, especialmente Mayra e Jamili, por todo apoio e carinho, pela atenção e a contribuição na pesquisa.

Ao Gui, à Déia e à Isabela pela disponibilidade em me ajudar, pessoalmente e profissionalmente, desde o início desse trabalho.

Ao amigo Felipe, pela amizade, atenção e por todos os conselhos.

Aos professores e funcionários do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal. Em especial ao Cosme pela atenção e dedicação.

Aos professores e funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva. Em especial à Rita, pela amizade, pelo carinho e pelo exemplo de amor à profissão.

À Nazareth (MAPA) e a todos os responsáveis pelos abatedouros pelo fornecimento das amostras e por toda colaboração.

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

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao CNPq e à FAPEMIG pelos recursos financeiros para execução do experimento.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desse trabalho, muitíssimo obrigada, de coração!

SUMÁRIO

1.	Introdução	13
2.	Objetivos.....	14
3.	Revisão de literatura	15
3.1	O micro-organismo <i>Campylobacter</i>	15
3.2	Mecanismos de virulência	16
3.3	Campilobacteriose	17
3.4	Prevalência de <i>Campylobacter</i> spp. em carcaças de frango de corte	18
3.5	Efeitos do resfriamento e congelamento na viabilidade do micro-organismo <i>Campylobacter</i> spp. em carcaças de frangos	21
3.6	Epidemiologia	23
3.6	Métodos para detecção e identificação de <i>Campylobacter</i> spp.	24
3.6.1	Cultivo	25
3.6.2	Metodologia Molecular	27
3.6.2.1	PCR em Tempo Real	28
3.6.2.1.1	Uso de intercalantes de DNA	30
4.	Material e métodos	33
4.1	Amostragem	33
4.2	Preparo das amostras	33
4.2.1	Preparo das amostras para isolamento de <i>Campylobacter</i> spp.	34
4.2.2	Preparo das amostras para extração de DNA	34
4.3	Isolamento e identificação de <i>Campylobacter</i> spp.	34
4.4	Confirmação do gênero e da espécie dos isolados.....	36
4.5	Tratamento com PMA.....	37
4.6	Extração de DNA	37
4.7	PCR em Tempo Real para a detecção de <i>Campylobacter</i> spp.....	38
4.8	Curva de sensibilidade analítica	38
4.9	Condições de cultivo das amostras controle.....	39
4.10	Delineamento experimental.....	39
5.	Resultados.....	40
5.1	Detecção de <i>Campylobacter</i> spp. em carcaças de frangos utilizando a técnica de cultura e isolamento	40

5.2	Detecção de <i>Campylobacter</i> spp. em carcaças de frangos de corte utilizando a técnica de PCR em Tempo Real	41
5.2.1	Curva de sensibilidade analítica da técnica de PCR em Tempo Real.....	41
5.2.2	Detecção de <i>Campylobacter</i> spp. em carcaças de frangos utilizando a técnica da PCR em Tempo Real	42
5.3	Detecção de <i>Campylobacter</i> spp. em carcaças de frango utilizando a técnica da PCR em Tempo Real com tratamento pelo PMA	42
5.4	Comparação entre isolamento, PCR em Tempo Real e PCR em Tempo Real associada ao uso de PMA	42
6.	Discussão	43
6.1	Detecção de <i>Campylobacter</i> spp. em carcaças de frangos de corte utilizando a técnica de cultura e isolamento	43
6.2	Detecção de <i>Campylobacter</i> spp. em carcaças de frangos de corte utilizando a técnica da PCR em Tempo Real	44
6.3	Detecção de <i>Campylobacter</i> spp. em carcaças de frangos utilizando a técnica da PCR em Tempo Real	45
6.4	Comparação entre isolamento, PCR em tempo real e PCR em tempo real associada ao uso de PMA	46
6.5	Avaliação das carcaças resfriadas e congeladas	46
6.6	Ocorrência de <i>Campylobacter</i> spp. em carcaças de frango abatidas no estado de Minas Gerais ..	48
7.	Conclusões	48
8.	Referências bibliográficas.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Diluições de DNA extraído de <i>Campylobacter jejuni</i> NCTC11351 utilizadas na curva de sensibilidade analítica.....	39
Tabela 2: Resultados da pesquisa da presença de <i>Campylobacter</i> spp. em carcaças de frango do estado de Minas Gerias, comercializadas em temperaturas de congelamento e resfriamento, realizada pela metodologia de cultivo.	40
Tabela 3: Resultados da identificação das espécies de <i>Campylobacter</i> spp. isoladas de carcaças de frango, comercializadas em temperaturas de congelamento e resfriamento no estado de Minas Gerais.	40
Tabela 4: Resultados da pesquisa da presença de <i>Campylobacter</i> spp. em carcaças de frangos de corte, comercializadas em temperaturas de congelamento e resfriamento, realizadas pela técnica da PCR em Tempo Real.	42
Tabela 5: Resultados da pesquisa da presença de <i>Campylobacter</i> spp. em carcaças de frango, comercializadas em temperaturas de congelamento e resfriamento, realizadas pelas técnicas de isolamento, PCR em Tempo Real e PCR em Tempo Real associada ao tratamento com PMA.	42
Tabela 6: Resultado da comparação da análise da presença de <i>Campylobacter</i> spp. em carcaças de frangos de corte comercializada nas temperaturas de resfriamento e congelamento analisadas pelas técnicas PCR em Tempo Real e PCR em Tempo Real com propídio monoazida.	43
Tabela 7: Comparativo entre os resultados de isolamento e PCR em Tempo Real associada ao uso de propídio monoazida (PMA).....	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Princípio da modificação causada pelo PMA na detecção de células bacterianas viáveis por PCR em Tempo Real. (Fonte: Product information, Biotium).....	31
Figura 2: Curva de sensibilidade analítica de PCR em Tempo Real com DNA de <i>Campylobacter jejuni</i> diluído em base 10 de 20ng a 2fg, correspondente a 10^7 a 10^1 bactérias, respectivamente.....	41
Figura 3: Curva padrão de PCR em Tempo Real com DNA de <i>Campylobacter jejuni</i> diluído em base 10 de 20ng a 2fg, correspondente a 10^7 a 10^1 bactérias, respectivamente. Eficiência da amplificação (Eff%): 91,976; Coeficiente de correlação (R^2): 0,997.....	41

RESUMO

As Doenças Transmitidas por Alimentos são consideradas um grande problema de saúde pública mundial e dentre os micro-organismos que podem ser veiculados destacam-se as bactérias do gênero *Campylobacter* spp. que ocorrem com frequência em carcaças de frangos de corte. Com o objetivo detectar, caracterizar e avaliar a incidência de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango de corte congeladas e resfriadas produzidas no estado de Minas Gerais foram analisadas, por três metodologias distintas; cultura e isolamento, PCR em Tempo Real e PCR em Tempo Real associada ao uso de propídio monoazida (PMA), 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; 100 amostras de carcaças de frangos de corte (40 resfriadas e 60 congeladas) coletadas de 16 abatedouros avícolas do estado. Das 100 amostras analisadas pela metodologia de cultura e isolamento, 28 (28%) apresentaram resultado positivo para *Campylobacter* spp., e, dessas positivas, 14 eram congeladas e 14 resfriadas. Pela metodologia da PCR em tempo real 84 amostras (84%) foram positivas para o micro-organismo, destas 47 eram congeladas e 37 resfriadas. Das amostras analisadas pelo PCR em tempo real com tratamento pelo PMA oito congeladas (31%) e 18 resfriadas (69%) foram consideradas positivas. Das amostras analisadas pela metodologia da cultura e isolamento, 11 (39%) foram positivas para *Campylobacter jejuni*, 4 (15%) para *Campylobacter coli* e 2 (7%) para *Campylobacter lari*. Foi observado também que um menor número de carcaças congeladas continha o micro-organismo viável quando comparado às carcaças resfriadas. Concluiu-se que a ocorrência e a viabilidade do micro-organismo *Campylobacter* spp. em carcaças de frangos de corte produzidas no estado de Minas Gerais é alta, e que as metodologias de cultura e isolamento e de PCR em Tempo Real associada ao uso de PMA são eficazes em detectar a viabilidade desse patógeno.

Palavras-chave: Carcaças de frangos de corte, cultivo, isolamento, PCR em tempo real, PMA, viabilidade.

ABSTRACT

The food-transmitted illness are considered an immense issue to the world general health and between the microorganisms who can be conveyed that way, the bacterium *Campylobacter* spp. standouts, it frequently occurs on poultry carcasses. Striving to detect, depict and evaluate the occurrence of campylobacter spp. in poultry carcasses, frozen and chilled carcasses, collected from the state of Minas Gerais, were analyzed using three distinct methodologies (culture, real time PCR and real time PCR associated with the use of propidium monoazide). A hundred samples of poultry carcasses (40 chilled and 60 frozen) were collected from sixteen poultry's slaughterhouse along the state and each one were submitted to tests using the three methodologies. The culture method showed positive results to the presence of *Campylobacter* spp. in 28 (28%) carcasses, and from these 14 carcasses were frozen and 14 chilled. The PCR methodology, 84 (84%) samples were positive to the microorganism, and from these 47 were frozen and 37 chilled. From the samples analyzed using the real time PCR with the use of PMA, (DNA intercalate capable of penetrate in non-viable cells, preventing that its DNA be amplified by the real time PCR) eight frozen (31%) and 18 chilled (69%) returned positive results to the presence of the bacterium. The culture method also returned positive results to the presence of *Campylobacter jejuni* from 11 (39%) samples, *Campylobacter coli* from 4 (15%) samples and *Campylobacter lari* from 2 (7%) samples. The results also showed that less frozen carcasses, in comparison to those who were chilled, presented the microorganism. We can conclude that the occurrence and viability of the microorganism *Campylobacter* spp. in poultry carcasses from the state of Minas Gerais is high and that the culture and real time PCR with the use of PMA are efficient in detecting the presence of this pathogen.

Keywords: poultry carcasses, culture, isolation, real-time PCR, PMA, viability.

1. Introdução

A produção de carne de frango no Brasil em 2014 superou a marca de 12,5 milhões de toneladas. Deste montante, 67,7% foram destinados ao mercado interno, com um consumo de 42,8 Kg per capita, sendo que a carne de frango é a principal carne consumida pelos brasileiros. O Brasil é hoje o maior exportador de carne de frango do mundo e o terceiro maior produtor, ficando atrás apenas dos EUA e da China. Nestes cenários, o estado de Minas Gerais ocupou a quinta colocação entre os estados brasileiros, tanto em produção quanto em exportação de carne de frango, sendo responsável por 7,12% da produção nacional e por uma parcela de 4,74% da exportação (ABPA, 2015).

A carne de frango apresenta elevado teor de nutrientes, alta atividade de água e pH próximo à neutralidade. Tais fatores fazem com que este alimento se torne um bom substrato para proliferação microbiana, o que potencializa a susceptibilidade à deterioração e à possibilidade de causar doenças aos seres humanos. Alimentos contaminados por agentes biológicos são relatados como a maior causa de doenças transmitidas por alimentos (DTA), que possuem mais de 250 micro-organismos identificados como responsáveis por sua ocorrência. Muitos casos de DTA não são notificados, pois seus sintomas se assemelham a gripes ou discretas diarreias e vômitos. A subnotificação de episódios de DTA dificulta o conhecimento dos alimentos e dos agentes biológicos envolvidos em tais incidentes (Notermans e Verdegaal, 1992; Forsythe, 2000; Moura Filho et al., 2010).

Dentre os micro-organismos envolvidos em surtos de toxi-infecções relacionados à carne de frango, podem ser citadas espécies do gênero *Campylobacter*, uma bactéria Gram negativo, microaerofílica, responsável por causar distúrbios reprodutivos em animais domésticos, diarreias em seres humanos e animais e infecções oportunistas em pessoas imuno-comprometidos. Há relatos da associação de *Campylobacter* spp. com doenças auto-imunes pós-infecção, incluindo, artrite, síndrome de Guillain-Barré (SGB) e síndrome de Miller Fisher (Butzler, 2004; Gorman e Adley, 2004; FAO/WHO, 2009).

A infecção causada por *Campylobacter* spp., denominada campilobacteriose, é considerada uma zoonose por ser uma doença que tem como reservatórios animais selvagens e domésticos. As espécies do gênero *Campylobacter* spp. são comensais da microbiota intestinal de animais domésticos e silvestres e disseminam-se pelo meio ambiente, contaminando a água, as pastagens e as culturas vegetais. As aves, especialmente os frangos de corte, são os principais reservatórios naturais de *Campylobacter* spp. e sua colonização ocorre por várias fontes, como água, ração, contato com outras espécies de animais e fezes de outras aves ou animais presentes no galpão (Altekruse et al., 1999; Freitas e Noronha, 2007).

Espécies de *Campylobacter* termofílicas, com temperatura ideal de crescimento entre 42 e 43°C, têm sido identificadas como a principal causa de gastroenterite bacteriana em seres humanos em vários países. As principais espécies associadas às toxinfecções alimentares em humanos são *Campylobacter jejuni* subs. *jejuni*, *C. coli*, *C. lari* e *C. upsaliensis* (Altekruse et al., 1999; Houg et al., 2001; Foster et al., 2004).

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. Apesar de existirem diferentes veículos transmissores dessa doença, a carne de frango é o mais frequentemente relacionado aos surtos (ACMSF, 2005; FAO/WHO, 2009).

Os métodos convencionais de isolamento de *Campylobacter* spp. a partir de amostras de alimentos utilizam meios de enriquecimento seletivo com posterior cultivo em meios sólidos seletivos. Estes métodos são demorados e, após o isolamento, a confirmação requer testes bioquímicos ou moleculares adicionais para identificação do micro-organismo. Além disso, bactérias do gênero *Campylobacter* spp. são fastidiosas, difíceis de serem cultivadas e, quando submetidas a situações de estresse, como a refrigeração e congelamento dos alimentos, podem assumir uma forma viável mas não cultivável (VNC), conduzindo a uma possível redução da sensibilidade da técnica (Reis, 2015). As células VNC representam um perigo potencial à saúde pública, pois um lote de determinado alimento pode ser liberado devido à não detecção do patógeno, apesar da sua presença, viabilidade e virulência (Forsythe, 2000).

Em função das dificuldades relacionadas às técnicas clássicas de isolamento e identificação de *Campylobacter* spp., ensaios de biologia molecular são utilizados com o objetivo de melhorar a detecção destes micro-organismos em alimentos, além de reduzir o tempo com que a análise é realizada (Botteldoorn et al., 2008). No entanto, a impossibilidade de distinção entre células viáveis e VNC de bactérias mortas é um limitante da reação em cadeia da polimerase (PCR).

O uso de propídio monoazida (PMA) é uma alternativa para contornar esse limitante da PCR. O PMA é um tipo de corante derivado do iodeto de propídio com capacidade de se ligar covalentemente à dupla fita de DNA após a exposição à luz com determinado comprimento de onda. Este reagente se liga apenas ao DNA de células mortas ou que apresentem lesões em sua membrana e, ao se ligar de forma covalente, impede que o DNA seja amplificado na PCR, o que possibilita a diferenciação entre micro-organismos viáveis e VNC dos não viáveis. Dessa forma, somente o DNA de bactérias potencialmente prejudiciais ao consumidor é detectado (Waring, 1965; Nocker et al., 2006).

A legislação brasileira não preconiza o controle de *Campylobacter* spp. nas granjas ou nos produtos de origem avícola, o que, aliado à subnotificação de casos de campilobacteriose, pode representar um fator de risco para a população de consumidores. Futuramente, as exigências quanto à segurança dos produtos avícolas devem aumentar e o mercado nacional precisa se antecipar a esta possibilidade buscando aprimoramento das técnicas de detecção, identificação e controle deste micro-organismo.

2. Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram:

- **Objetivo geral:** estimar a ocorrência de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango de corte congeladas e resfriadas processadas em abatedouros avícolas do estado de Minas Gerais, utilizando as metodologias de isolamento, PCR em Tempo Real e PCR em Tempo Real associada ao uso de propídio monoazida (PMA).

- **Objetivos específicos:**

- Avaliar a ocorrência do micro-organismo *Campylobacter* spp. em carcaças de frangos de corte produzidas no estado de Minas Gerais sob SIF.
- Comparar as metodologias de isolamento, PCR em Tempo Real e PCR em Tempo Real associada ao uso de PMA na detecção de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango e;
- Comparar a ocorrência e a viabilidade de *Campylobacter* spp. nas diferentes temperaturas de armazenamento (resfriamento e congelamento);

3. Revisão de literatura

3.1 O micro-organismo *Campylobacter*

A família *Campylobacteriaceae* abrange os gêneros *Arcobacter*, *Campylobacter* e *Sulfospirillum*. O gênero *Campylobacter* possui 32 espécies e 13 subespécies identificadas, sendo as principais espécies patogênicas para o homem *C. jejuni* subsp. *jejuni*, *C. jejuni* subsp. *doylei*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* e *C. helveticus* (Vandame e De Ley, 1991; Foster et al., 2004).

Os micro-organismos pertencentes ao gênero *Campylobacter* são bastonetes Gram negativo em forma de espiral, vírgula, “S” ou asa de gaivota e são móveis por flagelação monopolar ou bipolar por um único flagelo (monotríquia). A presença desse único flagelo confere movimentação à bactéria em forma de “saca rolha” ou “vai e vem”. Esses micro-organismos se caracterizam como oxidase positivo, não hemolíticos, não esporulados e não crescem em meios com concentração de 3,5% de NaCl ou a 25°C, além disso são microaerófilos, o que faz com que necessitem de pequenas quantidades de oxigênio (3-6%) e concentração de 2 a 10% de dióxido de carbono para seu desenvolvimento. Os micro-organismos do gênero *Campylobacter* possuem dimensões que variam entre 0,2 a 0,8 µm de largura por 0,5 a 5 µm de comprimento. A maior parte das espécies de *Campylobacter* cresce a 37 °C, no entanto, as espécies patogênicas para os seres humanos possuem melhor crescimento a 42° C e são denominadas termofílicas ou termotolerantes (Vandame e De Ley, 1991; Humphrey et al., 2007; Quetz, 2009).

Em condições adversas de cultivo ou em culturas mais antigas, as células de *Campylobacter* spp. podem assumir formas esféricas ou cocóides, sendo consideradas como formas degenerativas que, no entanto, podem não perder seu poder infectante. A transição morfológica da forma espiralada para a forma cocóide ocorre na fase estacionária do crescimento e, durante esse processo, a detecção de *Campylobacter* spp. por metodologias de cultivo e isolamento se torna muito dificultada, caracterizando-o como forma VNC (Bovill e Mackey, 1997; Nachamkin, 2007).

O micro-organismo *Campylobacter* está presente no trato gastrointestinal de grande parte dos dos animais de sangue quente, como aves, suínos e bovinos. A via alimentar é a principal forma de

transmissão para o homem, com o consumo de carne e seus derivados malcozidos e água contaminada. A frequência de casos de campilobacteriose relacionada à carne de frango está ligada ao fato de a temperatura corporal das aves ser mais elevada, em torno de 42°C, o que favorece o desenvolvimento das espécies patogênicas para os seres humanos (Jay et al., 2005).

Campylobacter é considerado uma bactéria fastidiosa, pois sua multiplicação ocorre de forma lenta e tal característica é associada a um pequeno tamanho de genoma (1600 Kb a 1700 Kb). O fato de possuir o genoma pequeno faz com que bactérias do gênero *Campylobacter* apresentem um número menor de genes comparados aos outros micro-organismos patogênicos. Isto reflete na necessidade de um meio complexo para o seu desenvolvimento, o que adicionalmente dificulta a sobrevivência fora do ambiente intestinal dos animais de sangue quente (Vandamme, 2000; Bhunia, 2008).

3.2 Mecanismos de virulência

Existem diversos mecanismos pelos quais *Campylobacter* spp. causa doença em seres humanos e são reconhecidos como principais fatores de virulência a adesão e invasão de células epiteliais do hospedeiro e a produção de toxinas. A motilidade é um fator determinante para a colonização, adesão e invasão das células intestinais, para tanto, a motilidade bacteriana requer a presença de flagelo (Ferrero e Lee, 1988).

A adesão às células epiteliais é a etapa inicial para que ocorra a infecção. Elementos estruturais como o flagelo, algumas proteínas de membrana externa e lipopolissacarídeos permitem a travessia do muco intestinal e adesão da bactéria à célula epitelial por meio de adesinas presentes nesses elementos. A combinação entre o flagelo, a forma em espiral da célula e o movimento em saca-rolhas são responsáveis pela mobilidade do micro-organismo em ambientes viscosos (Ferrero & Lee, 1988; Jawets et al., 1998; Fernandez, 2008).

A invasão celular tem importante papel na patogenicidade. Os mecanismos pelos quais o *Campylobacter* spp. invade as células epiteliais ainda não são totalmente definidos. 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. Um exemplo dessas proteínas é a CiaB (*Campylobacter invasion antigens B*), que é necessária para a invasão celular por *Campylobacter jejuni* e é reconhecida pelos receptores celulares do hospedeiro. A invasão ocorre por endocitose e se inicia com a sinalização na superfície da célula hospedeira. Este sinal é reconhecido pelos receptores, presentes na membrana celular associados às proteínas citoplasmáticas. Estas proteínas formam depressão na membrana externa, quando os receptores estão ligados aos micro-organismos, essa depressão aumenta e transforma em vacúolos citoplasmáticos. As células epiteliais infectadas apresentam inchaço, perda de microvilosidades e apoptose prematura devido ao efeito citotóxico do micro-organismo. Posteriormente, o vacúolo formado, migra até a lâmina própria e então a bactéria é liberada juntamente com o conteúdo da célula epitelial, o que faz com que o processo inflamatório seja desencadeado (Konkel et al, 2001; Guerry, 2007; Levin, 2007; Fernandez, 2008).

As toxinas têm sido consideradas um dos fatores mais importantes para justificar os efeitos citopáticos ocorridos nas enterites, sendo que estas podem ser enterotoxinas e/ou citotoxinas. A toxina de distensão citoletal (CDT), codificada pelos genes adjacentes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*, foi caracterizada e detectada em diversas amostras de *Campylobacter* spp. Esta proteína possui uma atividade semelhante à DNase e, dentro da célula, potencializa o bloqueio do ciclo celular, resultando na degradação do DNA. Como resposta à degradação, as células do hospedeiro bloqueiam certas fases na divisão celular, o que leva à distensão citoplasmática e morte celular. O mecanismo patogênico relacionado à CDT está ligado à inibição da imunidade humoral e celular, resultante da apoptose de células de resposta imune, que pode ocasionar necrose do epitélio celular e fibroblastos, envolvidos na reparação das lesões ocasionadas por patógenos, o que resulta em lenta cicatrização e manifestação dos sintomas da doença. As enterotoxinas têm a capacidade de se ligar a um receptor celular, entrar na célula e elevar o AMP cíclico. Os tipos de enterotoxinas são: toxina *cólera-like* (CTL) e a toxina *Escherichia coli* termo-lábil (LT). As enterotoxinas se ligam ao receptor celular e, após a ativação proteolítica, são transportadas para o interior da célula do hospedeiro onde, então, desregulam a adenil ciclase e, como consequência, os níveis de AMPc e a secreção celular aumentam, o que resulta em diarreia aquosa (Wassenaar et al., 1997; Purdy et al., 2000; Van Vliet e Ketley, 2001; Park, 2002; Abuoun et al., 2005 Smith e Bayles, 2006).

3.3 Campilobacteriose

Dentre os principais reservatórios primários de *Campylobacter* spp. podem ser citados pombos, gaiotas, pardais, patos, perus e, especialmente, o frango de corte. Sabe-se que nas aves, a colonização é geralmente assintomática, podendo ser encontrados níveis de 10^8 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/g de fezes sem sintomas clínicos da doença. O trato intestinal das aves possui uma temperatura superior à dos mamíferos, cerca de 42°C , que coincide com a temperatura ótima de multiplicação de *C. jejuni*, o que pode explicar a alta incidência deste micro-organismo em frangos. A alta densidade populacional utilizada na criação destes animais se tornou um fator importante para a disseminação desse agente entre as aves (Park, 2002; Forsythe, 2002; Keener et al., 2004; Zhang, 2008).

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

As espécies de *Campylobacter*, principalmente as termofílicas, são responsáveis pela ocorrência de enteropatias em seres humanos e também são uma das principais causas de DTA no mundo. A infecção por este micro-organismo está associada à ingestão de alimentos contaminados, principalmente carne de frango crua, malcozida ou recontaminada após a cocção (CDC, 2015; WHO, 2015).

A doença provocada por esses micro-organismos é denominada campilobacteriose e tem um período de incubação de dois a cinco dias, com ocorrência de sintomatologia de dois a três dias,

podendo perdurar por até dez dias. Os principais sintomas observados são febre, diarreia, dores de cabeça e abdominal, podendo ocorrer também náuseas, vômitos e indisposição. A diarreia pode variar de aquosa, moderada e auto limitante a disenteria sanguinolenta, mucoide ou purulenta. Estes sintomas se assemelham aos sintomas de doenças causadas por diversos outros micro-organismos patogênicos entéricos. Todavia, o que chama a atenção e é um fator agravante em toxi-infecções causadas por *Campylobacter* spp. é a baixa dose infectante: cerca de 400 a 500 células. (Karmali e Fleming, 1979; Robinson, 1981; Butzler, 2004; ACMSF, 2005; WHO, 2015). A campilobacteriose pode ser grave para crianças, idosos e pessoas com imunossupressão, devendo ser considerada um importante problema de saúde pública.

As espécies que mais acometem os seres humanos são *C. jejuni* subs. *jejuni*, *C. coli* e *C. lari*. Estima-se que 95% dos casos de campilobacteriose estejam relacionados à infecção por *C. jejuni*. *C. coli* é responsável por 4% e *C. lari* por cerca de 1% dos casos de campilobacteriose. *C. upsaliensis* foi relatado causando infecções em humanos, principalmente crianças de países em desenvolvimento (EFSA, 2005; Nachamkin, 2008). *C. jejuni* coloniza o jejuno, o íleo e o 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).

Após a infecção por *Campylobacter* spp., a recuperação costuma ser rápida. O tratamento, na maioria das vezes, é sintomático e, em poucos, casos há a necessidade do uso de antimicrobianos. Entretanto, em alguns casos, podem ocorrer complicações e sequelas a longo prazo. Dentre as complicações, citam-se artrite reativa, meningite, osteomielite e alterações neurológicas. Cabe salientar que as sequelas mais sérias estão associadas às doenças neurológicas, como as síndromes de Guillain-Barré e de Miller-Fisher. A síndrome de Guillain-Barré afeta o sistema nervoso periférico e é caracterizada pela desmielinização de neurônios, podendo resultar em paralisia ascendente, comprometimento respiratório, muscular e morte. A síndrome de Miller-Fisher é uma variante da síndrome de Guillain-Barré e é caracterizada por ataxia, arreflexia e oftalmoplegia (Allos, 1998; Nachamkin 2008, Brasil, 2009).

3.4 Prevalência de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango de corte

A principal fonte de infecção da campilobacteriose em seres humanos são os alimentos. As estimativas são de que 50-70% dos casos tenham origem alimentar e estejam relacionados ao consumo ou à manipulação de carne de frango crua contaminada, sendo que a contaminação de carcaças de frangos em abatedouros é considerada o principal fator de risco para estas infecções. Falhas no processo de evisceração, inadequadas condições de higiene e manipulação são pontos críticos a serem considerados na contaminação de carcaças de frango. 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 & Stern, 2003; Rozynek et al., 2005; CDC, 2015).

Herman et al.(2003) pesquisaram as rotas de contaminação da carne de frango por *Campylobacter* spp.. Os autores encontraram influência direta entre o avanço do tempo de criação e a quantidade de lotes de aves positivas, tendo como provável causa a água de bebida, pois esta é uma importante fonte de transmissão de doenças nos 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 das 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 o acesso à alimentação é retirado das aves, mas o acesso à água é mantido. Essa prática tem por objetivo reduzir o conteúdo gastrointestinal para o momento do abate e, conseqüentemente, minimizar a ocorrência de extravasamento de conteúdo intestinal em casos de ruptura de alças intestinais, diminuindo a contaminação de carcaças, superfícies de manipulação e demais utensílios por fezes (Petracci et al., 2010).

As etapas do abate em que há maior contaminação da carcaça de frango por micro-organismos são a escalda, a depenagem, a evisceração e o resfriamento. A escalda ocorre após a sangria e tem por objetivo o amolecimento de folículos para facilitar a retirada das penas. A temperatura da água dos escaldadores é bastante elevada e a legislação exige sua renovação a cada turno de trabalho de oito horas. Apesar disso este é um ponto importante na disseminação 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, com a conseqüente contaminação das penas e isso estaria relacionado à contaminação das carcaças após a depenagem (Brasil, 1998; Guerin et al., 2010; Seliwiorstow et al., 2015).

Na etapa final do processo de abate ocorrem as lavagens interna e externa das carcaças com água e, posteriormente, o pré-resfriamento, que poderá ocorrer por aspersão de água gelada ou por imersão, sendo este último 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.

Talvez, a forma mais importante para o alimento cárneo se tornar veículo de infecção da campilobacteriose, seja a contaminação cruzada durante a manipulação dos alimentos. Neste aspecto, a carcaça de frango congelada assume grande importância, pois a água de degelo em contato com outros alimentos, principalmente os ingeridos *in natura*, poderia explicar a origem dos frequentes casos de infecção humana (Skirrow, 1991; Scarcelli & Piatti, 2002).

Dias et al. (1990) realizaram um estudo em Belo Horizonte (MG) em que foram analisadas 100 carcaças de frango prontas para a comercialização quanto à presença de *C. jejuni*. Destas carcaças, 50 eram provenientes de abatedouros sob inspeção federal e 50 de abatedouros sem inspeção federal. Após isolamento, identificação por testes bioquímicos e eletroforese em gel de poliácridamida, foram encontrados 38% de amostras positivas nos estabelecimentos sem inspeção federal e 2% de amostras positivas nos estabelecimentos sob inspeção federal.

Além dos pontos mencionados, requisitos básicos de Boas Práticas de Manipulação devem ser obedecidos no que diz respeito às instalações e saneamento do estabelecimento, higiene dos funcionários, higiene na elaboração dos alimentos e cuidados no armazenamento e transporte de matérias primas e produtos acabados (BRASIL, 1997). Outros programas de autocontrole como Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) devem também ser implantados na indústria visando garantir a produção de uma carne de alto padrão de qualidade e sanidade.

Aquino et al. (2002) analisaram 68 amostras de carcaças de frango de corte pós abate entre os anos de 1998 e 2000 no estado do Rio de Janeiro para a presença de *C. jejuni* e *C. coli*, utilizando a metodologia dependente de cultivo e posterior caracterização por testes bioquímicos. Foram encontradas 60% de amostras positivas para *C. coli* e *C. jejuni*, aproximadamente 30% de cada espécie.

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.

Franchin et al. (2007) analisaram a frequência de *Campylobacter* spp. em carcaças de frangos de corte durante o processamento em um matadouro no Sul do Brasil, utilizando a metodologia dependente de cultivo. As amostras foram coletadas após a depena, a evisceração, após o *chiller* e após o congelamento. Em cada um desses pontos foram coletadas 72 amostras. Além disso, amostras foram obtidas a partir da água do tanque resfriador (n=23) e a partir da superfície de equipamentos em contato direto com o frango (n=24). Ao todo, foram analisadas 335 amostras e 71% foram positivas para *Campylobacter* spp.. A Frequência do micro-organismo foi de 68% nas amostras após a depena, 69,4% após a evisceração, 84,7% após a refrigeração e 63,9% após o congelamento. Nas amostras de água do tanque refrigerador foram encontradas 91,3% de amostras positivas para *Campylobacter* spp. e 50% de amostras positivas para a superfície dos equipamentos.

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

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.

Azeredo et al. (2010) avaliaram a ocorrência de *Campylobacter* spp. em 70 carcaças de frangos de corte provenientes de um frigorífico com Serviço de Inspeção Estadual de Minas Gerais (Instituto Mineiro de Agropecuária – IMA). Os autores, que realizaram suabe da pele de carcaças de frango coletadas após o resfriamento durante a etapa de gotejamento, relataram uma ocorrência de 27% de *Campylobacter* spp. Das dezenove amostras positivas para *Campylobacter* spp., 14 foram identificadas como *C. jejuni* (74%).

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

Silva (2013), utilizando a metodologia dependente de cultivo, pesquisou a presença de *C. jejuni* e *C. coli* em 105 carcaças resfriadas de frango, comercializadas no Distrito Federal. Do total de carcaças de frango, 11 (11,55%) amostras foram positivas para a pesquisa de *Campylobacter* spp., sendo sete (63,64%) amostras positivas para *C. jejuni* e quatro (36,36%) amostras positivas para *C. coli*.

Menezes (2013) pesquisou a presença de *Campylobacter* spp., pela metodologia imunoenzimática, em 240 carcaças de frangos de corte abatidos no estado de Minas Gerais e encontrou uma baixa incidência desse micro-organismo, 2,08% das amostras eram positivas.

Reis (2015) pesquisou a presença de *C. jejuni* e *C. coli* em carcaças de frango resfriadas e congeladas, coletadas de um abatedouro 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.

3.5 Efeitos do resfriamento e congelamento na viabilidade do micro-organismo *Campylobacter* spp. em carcaças de frangos

Carne refrigerada é definida como àquela armazenada em temperaturas entre 0 e 4°C. O prazo de validade comercial das carnes resfriadas varia em função das condições técnicas de sua obtenção e das temperaturas em que são mantidas. Já as carnes congeladas são aquelas mantidas em temperaturas abaixo do seu ponto de congelamento (-1,5°C). O congelamento é a forma de conservação, a longo prazo, que menos deprecia o valor nutritivo e a qualidade sensorial da carne “in natura”. A carne magra, contendo em torno de 75% de água, inicia seu congelamento a temperaturas inferiores a -1,5°C. A -5°C, aproximadamente 75% da água é cristalizada, a -10°C, cerca de 82%, a -20°C, em torno de 85%, e a -30°C, aproximadamente 87%. Cerca de 12% da água total encontra-se ligada às proteínas, o que impede o seu congelamento, ainda que a temperaturas muito baixas (Pardi et al., 1995).

Micro-organismos termófilos e alguns mesófilos têm seu crescimento diminuído a partir da redução da temperatura do ambiente. O resfriamento de um alimento abaixo do seu ponto de congelamento faz com que parte da água que o alimento contém mude de estado, formando cristais de gelo. A imobilização da água na forma de gelo e o aumento na concentração de solutos reduzem a atividade de água diminuindo a possibilidade de crescimento microbiano. Com isso, a refrigeração e o congelamento são intervenções amplamente utilizadas como forma de controle do crescimento de microrganismos em alimentos (Fellows, 2000; Bhaduri e Cottrell, 2004).

O efeito do resfriamento e do congelamento na sobrevivência de *C. jejuni* ainda não foi bem elucidado. Alguns estudos confirmam uma redução significativa na porcentagem de carcaças positivas para *C. jejuni* após o congelamento. Diversos fatores, incluindo a formação do gelo e a

desidratação, levam à injúria do micro-organismo, além do estresse oxidativo, que pode levar à morte da célula, reduzindo significativamente sua sobrevivência no alimento (Stern et al., 1984; Park, 2002; Alter et al., 2005).

A redução da prevalência de *Campylobacter* spp. em amostras congeladas foi demonstrada em um estudo realizado no Reino Unido, onde 56% das amostras frescas apresentaram resultado positivo para este micro-organismo em comparação a 31% de positividade em amostras de frango congeladas (FSA, 2001).

Bhaduri e Cottrell (2004) avaliaram os efeitos da refrigeração a 4°C, do congelamento a -20°C e uma combinação dos dois métodos de conservação na sobrevivência de *Campylobacter jejuni* em carcaças e em pele de frango. As amostras refrigeradas foram armazenadas durante um período total de sete dias, com avaliações feitas nos dias 1, 3 e 7. As amostras congeladas foram armazenadas durante um período total de 14 dias, com avaliações feitas nos dias 1, 3, 7 e 14. Para as amostras em que houve a combinação dos dois métodos de conservação, foi realizado um pré-resfriamento durante um período de sete dias com posterior congelamento em um período de mais 14 dias. Em amostras de carcaças de frango somente resfriadas, houve redução na contagem de células de 0,34 a 0,81 log₁₀ UFC/g e em amostras de pele de frango a redução na contagem de células de *C. jejuni* foi de 0,31 a 0,63 log₁₀ UFC/g. Quando foi utilizado o método de congelamento isoladamente e associado à pré-refrigeração promoveu uma redução na contagem de células de 0,56 a 1,57 log₁₀ UFC/g em carcaças de frango e de 1,38 a 3,39 log₁₀ UFC/g em amostras de pele de frango, durante um período de duas semanas. Este estudo demonstrou que, individualmente ou em combinação, refrigeração e congelamento não são um substituto para o manuseio seguro e cozimento adequado de carcaças de frango e que não há diferença significativa entre amostras frescas e congeladas.

Nierop et al. (2005) investigaram a presença de *Campylobacter* spp. em 99 carcaças de frango frescos e congelados, provenientes de diferentes tipos de comércio em Gauteng na África do Sul. Utilizando métodos dependentes de cultivo, 32,3% das amostras estavam contaminadas com *Campylobacter* spp. Não houve diferença significativa ($p>0,1$) na contaminação entre amostras refrigeradas ou congeladas, ou entre amostras coletadas em açougues ou supermercados ou adquiridas de vendedores ambulantes. No entanto, significativamente ($p<0,1$), mais carcaças refrigeradas provenientes de supermercados estavam contaminadas com *Campylobacter* spp.

Georgsson et al. (2006) avaliaram a influência do congelamento e do tempo de estocagem na incidência de *Campylobacter* em carne de frango. Esses autores analisaram 90 carcaças provenientes de lotes positivos para *Campylobacter*. Do total de amostras, dez foram compostas por carcaças frescas que foram armazenadas à temperatura de 2-4°C e analisadas em até 24 horas pós abate e as 80 amostras restantes foram congeladas e mantidas à temperatura de -20°C durante o período experimental. As amostras congeladas foram distribuídas em quatro grupos experimentais, de acordo com o período de armazenamento, contendo 20 carcaças cada. Após os períodos de armazenamento de 31, 73, 122 e 220 dias, cada grupo foi dividido em dois grupos de dez carcaças cada. Amostras de um grupo foram descongeladas à temperatura de 7°C durante 20 horas e do outro grupo a 22°C durante 16 horas antes das análises. O congelamento seguido de armazenagem a -20°C por 3, 73, 122 e 220 dias causou reduções significativas ($P\leq 0,05$) na contagem de *Campylobacter* em comparação às contagens observadas no produto fresco, a única exceção foi observada em frangos descongelados a 7°C após 31 dias de estocagem. Com uma armazenagem prolongada, a redução na contagem de *Campylobacter* foi semelhante em ambas

as temperaturas de descongelamento, exceto aos 73 dias em que as contagens para carcaças descongeladas a 7°C foram menores que aquelas descongeladas a 22°C ($P \leq 0,05$). Após 73 dias de armazenamento, as contagens de *Campylobacter* se estabilizaram e não houve redução significativa até 220 dias de armazenamento. Os autores concluíram que para o controle de *Campylobacter* são necessárias medidas preventivas desde a granja até a mesa do consumidor e o congelamento, por ter beneficiado a redução da carga deste microrganismo, pode ser uma destas medidas.

3.6 Epidemiologia

Uma análise epidemiológica dos surtos de doenças transmitidas por alimentos foi realizada no Brasil no período de 2000 a 2011. Nesta análise *Campylobacter* spp. foi considerado pouco frequente, pois seu relato ocorreu em apenas três surtos durante o período estudado (Dados..., 2011). Todavia estes dados podem ter sido subestimados devido à dificuldade de diagnóstico da doença, técnicas dependentes de cultivo para isolamento bactérias microaerófilas que não são utilizadas rotineiramente e por desconsiderar casos isolados. As características do microrganismo, a dificuldade de acompanhamento dos casos pela saúde pública e a dificuldade de diagnóstico pelos laboratórios também podem ser algumas das razões por trás da inesperada baixa incidência de surtos (Wall et al., 1996; Little et al., 2010)

Mazick et al. (2006) relataram um grande surto de campilobacteriose, ocorrido em maio de 2005 na cidade de Copenhagem. Neste surto, 247 funcionários de uma empresa comeram na cantina e 79 destes apresentaram sintomas da doença. Os autores observaram que o surto estava relacionado ao consumo de uma salada à base de carne de frango.

Em junho de 2007 ocorreu um surto associado a *Campylobacter jejuni* no Canadá. 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 pelos participantes (Stuart et al., 2008).

Em janeiro de 2011 foi relatado um surto na cidade de Liverpool, Inglaterra e todos os envolvidos se alimentaram em um mesmo restaurante. Havia 26 pessoas expostas e, destas, 11 apresentaram sintomas consistentes de 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 microrganismo no *parfait* de fígado de frango (Farmer et al., 2012).

Calciati et al. (2012) descreveram um surto de campilobacteriose ocorrido na cidade de Barcelona, Espanha, em 2010. Na ocasião, 75 crianças desenvolveram a doença. Foram coletadas amostras de fezes destas crianças e 64,4% eram positivas para *C. jejuni*. Amostras de água, frango assado e salada russa testaram negativas para os micro-organismos pesquisados. Porém, os alimentos suspeitos foram mantidos congelados, o que pode explicar a dificuldade no isolamento, pois *C. jejuni* é considerado sensível a baixas temperaturas. 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.

Em outubro de 2012, o Departamento de Saúde de Vermont (VDH), nos Estados Unidos, identificou três casos de infecção por *C. jejuni* confirmados laboratorialmente. Em outra notificação a rede nacional de subtipagem molecular de vigilância de doenças transmitidas por alimentos identificou três casos semelhantes em New Hampshire, Nova York e que tinham sido relatados nos últimos seis meses. Após investigações, o VDH descobriu que todos os seis pacientes consumiram fígados de galinha crus ou levemente cozidos, que foram produzidos no mesmo estabelecimento avícola em Vermont. Em resposta, o estabelecimento voluntariamente cessou a venda de fígados de frango e uma avaliação de segurança alimentar, realizada pelo Departamento de Agricultura da Segurança Alimentar e Serviço de Inspeção (USDA-FSIS) dos Estados Unidos, não encontrou violações importantes no estabelecimento. Este foi o primeiro surto de campilobacteriose relatado em múltiplos estados associado a fígado de galinha nos Estados Unidos (Tompkins et al., 2013).

Em janeiro de 2014, o Departamento de Saúde de Ohio, Estados Unidos notificou a Divisão de Saúde Pública de Oregon (OPHD) pela ocorrência de campilobacteriose em dois residentes de Ohio que haviam voltado de viagem do Oregon. Os viajantes relataram o consumo de patê de fígado de frango em um restaurante deste estado. Ainda no mês de janeiro, a OPHD recebeu relatórios adicionais de campilobacteriose em duas pessoas que tinham consumido patê de fígado de galinha em outro restaurante do Oregon. *Campylobacter jejuni* foi isolado em culturas de amostras de fezes de três pacientes. Ambos os restaurantes relataram o uso de fígados de frango malcozidos para preparação do patê e uma investigação revelou que os fígados foram comprados a partir do mesmo estabelecimento no estado de Washington EUA (Scott et al., 2015).

Estima-se que, a cada ano, 48 milhões de pessoas ficam doentes por causas alimentares. Aproximadamente 128 mil são internadas com suspeitas de toxi-infecção e três mil morrem em decorrência do consumo de alimentos contaminados no mundo. 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.

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

A importância de *Campylobacter* spp. como causador de doenças transmitidas por alimentos é crescente e simultaneamente crescem os esforços laboratoriais para detecção deste patógeno. Diversos métodos de coleta e isolamento foram desenvolvidos com o objetivo de obter melhores resultados em sua detecção bacteriológica. O número de micro-organismos presentes em alimentos é um dos fatores que exercem grande influência na detecção e no isolamento de patógenos. Quando um alimento está contaminado com bactérias patogênicas, elas frequentemente estão em números baixos, com distribuição heterogênea e a competitividade com outras espécies não patogênicas é alta. Isso implica na necessidade da análise de um grande

número de amostras para que haja confiabilidade nos resultados negativos (Cason et al., 1997; Voss-Rech e Vaz, 2012).

3.6.1 Cultivo

Os micro-organismos do gênero *Campylobacter* são de natureza fastidiosa o que faz com que cresçam 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 de nutrientes, 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, quantidade baixa de células ou predomínio de células injuriadas na amostra analisada. Fatores estressantes podem fazer com que *Campylobacter* spp. assumam a forma VNC, que não é cultivável, mas ainda assim infectante para os seres humanos e perigo para a saúde pública (Nachamkin, 2007).

Usualmente o isolamento de *Campylobacter* spp. é realizado utilizando-se meios de enriquecimento seletivo e plaqueamento em ágar seletivos. Porém, outros métodos como filtração e enriquecimento em meio semi-sólido estão descritos na literatura (Knill et al, 1982; Jeffrey et al, 2000). Os antimicrobianos utilizados com maior frequência na preparação dos meios de cultura para *Campylobacter* spp. 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 amostras bacterianas do gênero a esses compostos e na inibição do crescimento de organismos competidores (Corry et al, 1995).

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

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

A utilização de temperaturas de 42°C a 43°C aumenta a seletividade microbiana, pois inibe o crescimento de outros micro-organismos intestinais e favorece o crescimento de *Campylobacter* spp. termotolerante (Garrity et al., 2005, Vandamme et al., 2005). O isolamento pode ainda ser aprimorado com a inclusão 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, haemin e carvão ativado (Corry et al. 1995, Hunt e Abeyta, 1995).

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

Bolton e Robertson (1982) realizaram um estudo comparativo entre a adição de etapa de enriquecimento e o plaqueamento direto no isolamento de *C. jejuni* e *C. coli* de fezes humanas e suabes retais/cloacais de animais de produção. Neste estudo, foi encontrada maior taxa de isolamento dessas bactérias 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 (88,62%) em comparação ao caldo *Preston* (64%) na análise de 461 amostras de carnes bovina, suína e de frango.

Os meios sólidos mais comumente utilizados para cultivo do micro-organismo são *Skirrow*, *Campy-Cefex*, *Butzler*, *Preston* e *Exeter*. Estes contêm sangue desfibrinado de cavalo ou carneiro na proporção de 5% a 15%, porém o sangue é um suplemento considerado como não seletivo. Ainda são utilizados também os meios *modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar* (mCCDA) e *Karmali* que não contêm sangue, mas sim carvão ativado (Bolton et al, 1984, Corry et al., 1995).

O meio mCCDA foi desenvolvido como alternativa aos meios em que se adiciona sangue para contornar a variabilidade da qualidade do sangue, a possibilidade de contaminação e o alto custo do sangue. Este meio contém, como suplemento, uma mistura de carvão ativado, sulfato ferroso e sódio piruvato que têm a finalidade de aumentar a aerotolerância das espécies de *Campylobacter* spp. Inicialmente, o antimicrobiano de escolha como suplemento para este meio foi a Cefazolina, no entanto o mesmo foi substituído, mais tarde, pela Cefoperazona por aumentar a seletividade. Outro componente de suplementação do mCCDA é a Anfotericina B, que tem por objetivo prevenir o crescimento de leveduras (Bolton & 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).

Para padronizar a técnica de detecção e contagem de *Campylobacter* spp. a “*International Organization for Standardization*” (ISO) divulgou as especificações técnicas 10272-1/2006 para detecção e 10272-2/2006 para enumeração de colônias de *Campylobacter* spp.. Estas especificações preconizam o enriquecimento seletivo da amostra diluída em caldo *Bolton* suplementado com sangue equino. 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 (ISO 10272, 2006). Segundo Gonçalves e Franco (2002) e Paulsen et al. (2005), o caldo *Bolton* pode ser usado

com sucesso sem sangue e contém em sua composição sulfato ferroso, metabissulfito de sódio e piruvato de sódio. Estes compostos suplementares aumentam a tolerância de *Campylobacter* spp. ao oxigênio extinguindo ânions superóxidos e peróxido de hidrogênio que ocorrem espontaneamente no meio de cultura.

Segundo a metodologia ISO, após a fase inicial de enriquecimento em caldo Bolton, uma alçada do caldo incubado é estriado em mCCDA e em outro meio sólido seletivo (Ágar Skirrow, Karmali, Preston) e ambos são incubados. 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).

Com o objetivo de facilitar a pesquisa de *Campylobacter* spp. em alimentos, um novo meio de cultura foi desenvolvido. O *CampyFood Agar*® (CFA) tem a vantagem de melhorar a visualização do micro-organismo por conter agentes cromogênicos que permitem o crescimento de colônias vermelho-alaranjado. Essa facilidade na detecção de colônias típicas de *Campylobacter* spp. por meio do CFA, ao invés de mCCDA, foi reportada por Pacholewicz et al. (2013) na avaliação da contaminação de carcaças de frango. Também Habib et al. (2011), em um estudo em que foram comparados diferentes tipos de ágar no isolamento de *Campylobacter* spp., obtiveram maior contagem de micro-organismos no plaqueamento direto a partir do CFA, em comparação aos ágar mCCDA e *Brilliance Campy Count Agar*®.

3.6.2 Metodologia Molecular

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

A metodologia de PCR se baseia na amplificação de sequências de DNA ou de RNA específicas que, a partir de uma quantidade de material amplificado, fica disponível para alcançar o limiar de detecção. Os iniciadores são sequências do processo de síntese e correspondem a curtas cadeias de nucleotídeos complementares à região inicial (*primer forward*) e região final (*primer reverse*) da sequência que se deseja amplificar, chamada sequência alvo. A reação ocorre em três etapas, a primeira, chamada de desnaturação (*melting*), consiste na separação da dupla fita do DNA a ser amplificado, a segunda, chamada de anelamento (*annealing*), que ocorre quando o iniciador se liga ao DNA a ser amplificado, e a terceira, conhecida como extensão (*extension*), ocorre quando há a síntese da nova fita de DNA. Ao final dos ciclos, são obtidas milhões de cópias de DNA alvo, que poderão ser detectadas posteriormente por meio de eletroforese em gel de agarose (Sambrook e Russel, 2001; Kubista et al., 2006).

Harmon et al. (1997) desenvolveram uma técnica de PCR utilizando dois conjuntos de iniciadores para a identificação e diferenciação de *C. coli* e *C. jejuni*. Esta técnica foi utilizada pelos autores para avaliar 85 amostras de *Campylobacter* spp., isoladas a partir de carne de frango. Em paralelo

à técnica de PCR, foram realizados testes bioquímicos convencionais. Como resultado, foi obtida concordância entre as técnicas em 83 dos 85 micro-organismos analisados. Pela PCR, 23 foram identificados como *C. coli* e 62 como *C. jejuni*.

Persson e Olsen (2005) analisaram 135 amostras de fezes humanas artificialmente contaminadas com *Campylobacter* spp. em concentrações que variaram de 10^2 a 10^7 bactérias/mL com o objetivo de comparar uma técnica de PCR desenvolvida para a identificação *C. coli* e *C. jejuni* com métodos bioquímicos convencionais. Foi possível identificar 47 amostras de *C. coli* e 88 amostras de *C. jejuni*, com uma concordância de 99,26% entre as duas metodologias. Os autores observaram ainda que a técnica de PCR detectou *C. coli* e *C. jejuni* a partir da concentração de 10^5 células/mL de fezes.

Villardo et al. (2006) também realizaram um trabalho com o objetivo de comparar os testes bioquímicos convencionais e a técnica de PCR duplex para identificar espécies de *Campylobacter* spp. Para tal estudo, foram utilizadas 167 amostras isoladas de primatas e em 163 delas houve concordância dos resultados nas duas metodologias. Com o uso da PCR, foi possível a identificação de 64 amostras de *C. jejuni* e 103 de *C. coli*.

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

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

Alves e Oliveira (2013) coletaram 50 amostras de cortes de frango resfriados em supermercados de Londrina, no Paraná e avaliaram a presença de *Campylobacter* spp.. Foi utilizada a metodologia de cultivo tradicional para detecção e a PCR para a confirmação do gênero. Foram consideradas positivas 56% das amostras analisada pelo método tradicional e todas foram confirmadas pela PCR.

3.6.2.1 PCR em Tempo Real

A reação de PCR em Tempo Real possui capacidade para medir os produtos de amplificação de PCR em estágios iniciais da reação à medida que são acumulados em um modo de "Tempo Real de detecção", medindo assim a quantidade de produto de PCR enquanto a reação ainda está na fase exponencial (qPCR) (Pestana et al. 2010).

A técnica de PCR em Tempo Real combina a metodologia de PCR a um mecanismo de detecção e quantificação dos produtos amplificados por fluorescência. Esta metodologia permite a utilização de uma etapa única para a realização dos processos de amplificação, detecção e quantificação do DNA, o que confere agilidade para a obtenção de resultados e diminui o risco de contaminação da amostra. Na PCR em Tempo Real, os valores são determinados durante a fase exponencial da reação, com monitoramento a cada ciclo da reação e quando uma determinada quantidade de fluorescência é emitida e associada à amplificação do alvo. A intensidade de sinal emitido é proporcional à quantidade de DNA alvo amplificado e aumenta exponencialmente a cada ciclo de amplificação. O ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado de Cycle Threshold (Ct) e é este ponto que indica a presença do gene alvo e pode-se, a partir desse ponto, por comparação a um padrão ou curva relativa, avaliar a quantidade de material inicialmente presente no alvo de estudo. Para essa quantificação é necessário criar uma curva padrão com quantidades pré-estabelecidas do ácido nucléico. Os valores obtidos pela PCR em Tempo Real das amostras desconhecidas devem ser comparados aos valores obtidos no padrão (Marcelino, 2006; Invitrogen, 2008).

Existem dois sistemas de detecção mais utilizados para gerar a fluorescência na PCR em Tempo Real: o SYBR Green e a sonda específica. SYBR Green são fluorocromos que se ligam a fita dupla de DNA e emitem fluorescência, este sistema detecta produtos inespecíficos. A sonda específica é composta por oligonucleotídeos marcados com fluoróforos altamente específicos ao produto da PCR de interesse. Este sistema não detecta produtos inespecíficos (Invitrogen, 2008). 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 ótico 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 48h de enriquecimento em caldo Bolton. Para tal, foram comparadas as metodologias convencional de isolamento e a PCR em Tempo Real. Foram analisadas 97 amostras de carne de frango crua, miúdos de frango, mariscos crus e leite. Do total de amostras analisadas, 63 foram positivas para *C. jejuni* na PCR e 57 no isolamento, o que reflete uma concordância de 86,6% entre os resultados. O tempo de análise das amostras enriquecidas avaliadas pela PCR em Tempo Real foi de aproximadamente 3h, enquanto que para o isolamento foi de 48h. 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.

Debretson 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 independente 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. O autor 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 ou até mesmo a PCR 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.

3.6.2.1.1 Uso de intercalantes de DNA

Diante de todas as dificuldades para detecção de *Campylobacter* spp. em alimentos, a utilização de PCR em Tempo Real tem gerado melhores resultados em comparação a outras metodologias. No entanto, como limitante, essa técnica é incapaz de diferenciar células viáveis de células mortas e VNC (Rudi, et al. 2005). Por esse motivo, o desenvolvimento de técnicas que façam a distinção de células viáveis foram descritos na literatura e incluem 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, enquanto o PMA é um composto idêntico ao iodeto de propídio exceto pela presença de um grupo azida. A utilização dessas tecnologias tem sido baseada 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 aconteça uma ligação covalente entre estes compostos e o DNA de células mortas (Figura 1), com isso, esse material não é amplificado na PCR. Ao final do processo, espera-se que apenas células viáveis sejam amplificadas e detectadas (Waring, 1965, Nocker et al., 2006).

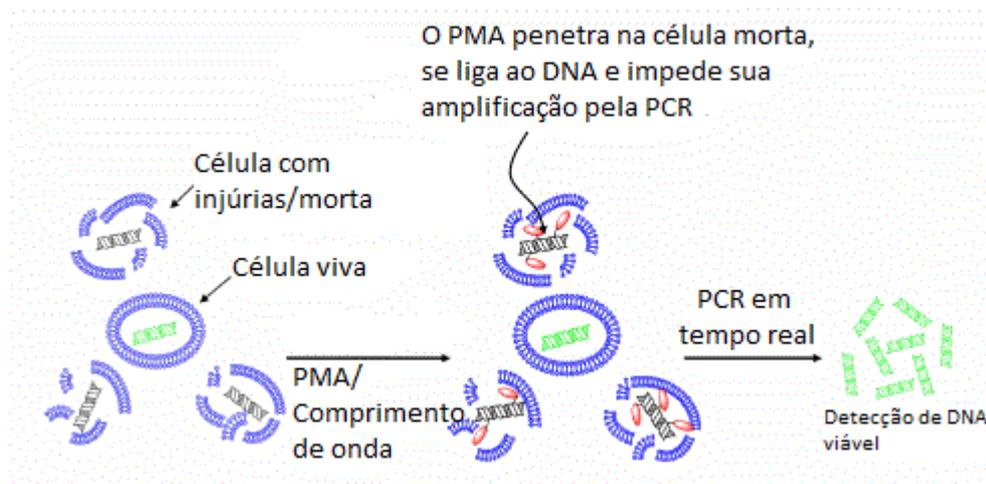


Figura 1: Princípio da modificação causada pelo PMA na detecção de células bacterianas viáveis por PCR em Tempo Real. (Fonte: Product information, Biotium)

Com o objetivo de inibir a amplificação do DNA de amostras 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) inocularam bactérias vivas e inativadas pelo calor na superfície da coxa e peito de frangos para avaliar a utilização do EMA e a técnica da PCR em Tempo Real na diferenciação de células vivas e mortas de *C. jejuni*. Após a inoculação, foram coletadas amostras de suabe da superfície do frango e a partir desse material foram feitas suspensões em caldo Mueller Hinton, tratadas com EMA. Posteriormente, o DNA dessas amostras foi extraído e a PCR em Tempo Real realizada. Os autores concluíram que o EMA-PCR em Tempo Real foi eficiente para a distinção quantitativa entre células viáveis e células mortas de *C. jejuni*, com isso a metodologia pode ser aplicada amplamente na quantificação de células viáveis e não viáveis presentes em produtos avícolas.

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 amostras 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.

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.

Josefsen et al. (2010) analisaram 50 carcaças de frango de um lote positivo para *Campylobacter* spp. pelos métodos de cultivo, PCR em Tempo Real e PMA-PCR em Tempo Real com o objetivo de avaliar a eficiência do PMA em detectar 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 amostras bacterianas ativas e inativas de *C. jejuni*. Encontrou-se resultado negativo, tanto no isolamento quanto para o PMA-PCR em Tempo Real, nas carcaças com amostras bacterianas inativadas, o que demonstra a eficácia do método em reduzir o sinal da PCR para bactérias mortas.

Seinige et al. (2014) realizaram um estudo de comparação de eficácia do uso de EMA e PMA para detecção de *Campylobacter jejuni* e *C. coli* utilizando a técnica de PCR em Tempo Real quantitativa. Para o experimento, foram realizadas diluições seriadas a partir da concentração de 10^7 de amostras de referência e amostras de campo de *C. jejuni* e *C. coli* de três formas diferentes: completamente vivas, completamente mortas pela inativação com o calor e uma mistura entre vivas e mortas. A fim de avaliar a qualidade da PCR em Tempo Real, foi utilizado um método tradicional de cultura em paralelo. Foi encontrada uma correlação de 99,7% entre EMA-PCR e o cultivo bacteriano e de 98,9% na PMA-PCR. No entanto, para as diluições com maiores concentrações de células não viáveis houve uma redução incompleta na amplificação do DNA, o que demonstra a necessidade de adequação da dose de EMA/PMA em amostras com alto índice de células mortas.

Kruger et al. (2014) coletaram amostras de coxa e asa de frango e carcaças de frango congeladas e resfriadas com o objetivo 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 foi testada. Temperaturas de 25 a 37°C, 10 a 20°C e 0°C e tempos de cinco e 15 minutos foram usados com esse intuito. 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.

Castro (Comunicação pessoal, dados ainda não publicados) analisou 60 carcaças de frango pelos métodos de PCR em Tempo Real e PCR em Tempo Real associada ao uso de PMA com o objetivo de verificar a viabilidade de *Campylobacter* spp. em carcaças de frangos de corte congeladas e resfriadas. Foram encontrados 88,3% de amostras positivas pela metodologia de PCR em Tempo Real e 18,3% de amostras positivas pela metodologia de PCR em Tempo Real associada ao uso de PMA. Neste estudo, concluiu-se que a técnica de PCR em Tempo Real associada ao PMA foi eficaz em detectar *Campylobacter* spp. viável em carcaças de frango resfriadas e congeladas quando comparada à PCR em Tempo Real.

4. Material e métodos

4.1 Amostragem

As amostras de carcaças de frangos de corte (resfriadas e congeladas, prontas para comercialização) foram coletadas, pelas coordenadorias regionais, diretamente de todos os 16 abatedouros avícolas registradas no Serviço de Inspeção Federal (SIF) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), localizadas no Estado de Minas Gerais. As coletas foram realizadas de 11 de novembro a 15 de dezembro de 2015. As amostras coletadas foram enviadas em caixas isotérmicas ao Serviço de Inspeção de Produtos de Origem Animal (SIPOA) do MAPA na cidade de Belo Horizonte e posteriormente encaminhadas ao Laboratório de Bacteriologia Aplicada (LBA) da Escola de Veterinária da UFMG (EV/UFMG), onde foram realizadas as análises.

De cada um dos 16 abatedouros amostrados foram coletadas quatro amostras congeladas e quatro amostras resfriadas de carcaças de frangos de corte, inteiras e sem miúdos, de lotes distintos de produção, de acordo com a característica de produção de cada estabelecimento. Com isso foram obtidas apenas carcaças congeladas dos abatedouros que produziam apenas esse tipo de carcaça, assim como para as carcaças resfriadas. Amostras de carcaças congeladas e resfriadas foram obtidas de abatedouros produtores dos dois tipos de carcaças.

Desta forma, foram obtidas oito carcaças (quatro congeladas e quatro resfriadas) de estabelecimentos produtores de carcaças congeladas e resfriadas, assim como foram obtidas quatro carcaças (quatro congeladas ou quatro resfriadas) de estabelecimentos que produzem apenas carcaças congeladas ou resfriadas. No total, foram obtidas 100 amostras de carcaças de frango (60 congeladas e 40 resfriadas). As coletas de todas as amostras foram realizadas respeitando o prazo de validade das carcaças resfriadas.

Previamente ao início das análises, as amostras resfriadas e congeladas foram mantidas sob temperatura de refrigeração. O período de manutenção das amostras congeladas em refrigerador com o objetivo de seu completo descongelamento foi de 24 horas.

4.2 Preparo das amostras

Todas as amostras foram preparadas em ambiente devidamente higienizado e desinfetado com álcool 70%. As carcaças embaladas foram depositadas sobre bandejas de alumínio, que foram previamente revestidas com papel alumínio estéril. Todo o preparo das amostras foi realizado próximo à 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, tesoura e bisturi estéreis, foram coletados fragmentos de carne e pele da coxa, asa, peito, região cloacal, costado e pescoço de cada carcaça. Esses fragmentos foram cortados em pedaços menores, para facilitar a homogeneização, e pesados em balança analítica (Shimatzu AY220) até completarem 50g. Após a pesagem, as amostras foram divididas em duas porções de composição idêntica, uma destinada aos testes microbiológicos e a outra destinada aos testes moleculares.

4.2.1 Preparo das amostras para isolamento de *Campylobacter* spp.

A porção de 25g amostrada de cada carcaça, destinada às provas microbiológicas, foi pesada em saco de *stomacher* estéril e, em seguida, foram adicionados 225mL do meio de enriquecimento seletivo, caldo Bolton (Himedia, M1592), contendo 5% (v/v) de sangue lisado e desfibrinado de equino e suplemento seletivo composto de Cefoperazona, Trimetoprim, Vancomicina e Anfotericina B (Himedia, FD231), de acordo com a ISO 10272-1 (2006). As amostras foram então homogeneizadas durante cinco minutos em homogeneizador automático (ITR MK 1204) e encaminhadas para a capela de fluxo laminar previamente preparada para as análises microbiológicas.

4.2.2 Preparo das amostras para extração de DNA

A porção de 25g de amostra, destinada à metodologia de PCR em Tempo Real, foi pesada em saco de *stomacher* estéril e, em seguida, foram adicionados 225mL de solução salina fosfatada (PBS) (0,01M pH 7,2) estéril. Os sacos com as amostras de frango e o PBS foram homogeneizados durante cinco minutos em homogeneizador automático (ITR MK 1204) e foram encaminhados para a capela de fluxo laminar previamente higienizada.

Com auxílio de pipetador e ponteira estéril, foram coletadas duas alíquotas de 1,5mL do conteúdo do saco *stomacher* homogeneizado, que foram dispensados em dois microtubos de 1,5mL DNase, RANase free estéreis diferentes. Um deles foi encaminhado para extração de DNA sem prévio tratamento com PMA, enquanto o outro foi destinado ao tratamento prévio com PMA e subsequente extração do DNA. Dessa forma, cada homogeneizado se transformou em duas amostras, uma tratada com PMA e a outra não tratada com PMA.

Os microtubos contendo os homogeneizados foram centrifugados a $9700 \times g$ (Eppendorf MiniSpin plus®) por cinco minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento obtido foi pesado em balança analítica (Gehaka, BG400). A massa do sedimento, obtido após a centrifugação da amostra, foi padronizada para a faixa de 0,030 g a 0,050 g. Caso os sedimentos não atendessem a faixa de massa estabelecida, o procedimento de coleta do homogeneizado, centrifugação e descarte do sobrenadante era repetido até que se chegasse à faixa determinada.

4.3 Isolamento e identificação de *Campylobacter* spp.

O isolamento de *Campylobacter* spp. foi realizado de acordo com a ISO 10272-1 (2006) com modificações. As amostras destinadas às provas microbiológicas passaram por etapas de pré-incubação e incubação em temperaturas e em meios de cultura específicos. Os sacos para *stomacher*, contendo as amostras preparadas e o meio de enriquecimento seletivo, foram incubados em condições de microaerofilia (10% de CO₂, 10% de H₂ e 80% de N₂) a 37°C por 5h ± 1h e depois a 41,5°C por 44h ± 4h. Para assegurar as condições de microaerofilia dentro dos sacos, estes foram incubados com uma ligeira abertura contendo uma gaze estéril.

Após o período de incubação, com o auxílio de uma alça bacteriológica estéril, cada amostra foi homogeneizada e repicada para isolamento em uma placa de mCCDA (Himedia, M887) contendo suplemento seletivo composto de Cefoperazona e Anfotericina B (Himedia, FD135). O mesmo procedimento foi realizado em uma placa de *Campyfood*® (Biomerieux, 43471) e uma placa de ágar BHI (caldo BHI – MERCK, 1104930500 e 1,5%p/v de ágar ágar -Vetec, 006) suplementadas com 5% (v/v) de sangue equino e suplemento Karmali, composto de Piruvato de sódio, Cefoperazona, Vancomicina e Ciclohexamida (Oxoid, SR0167E), por amostra. As placas foram incubadas a 41,5°C por 44h ± 4h em condições de microaerofilia.

Após esse período de incubação, as placas foram analisadas visualmente e todas as colônias típicas ou suspeitas de serem *Campylobacter* spp. foram selecionadas para visualização ao microscópio óptico. Para a visualização ao microscópio, essas colônias foram levemente tocadas com uma alça bacteriológica estéril e foi feito esfregaço em lâmina de vidro contendo uma pequena gota de PBS. Após a secagem ao ar, os esfregaços foram fixados utilizando a chama do bico de *Bunsen* e coradas com fucsina fenicada Ziehl Neelsen (fucsina básica, etanol 95% v/v, fenol e água destilada) durante cinco minutos. Decorrido este tempo, os esfregaços foram lavados com água destilada e secos ao ar. Terminado todo esse processo, os esfregaços foram visualizados ao microscópio óptico em objetiva de imersão.

As colônias que apresentaram morfologia condizente com as características de *Campylobacter* spp. (bastonetes pequenos, curvos ou espiralados), em sua forma cocóide ou convencional, foram repicadas para isolamento em ágar BHI suplementado com 5% (v/v) de sangue ovino e suplemento seletivo Skirrow (Merck, 1022490001), composto de Vancomicina, Polimixina e Trimetoprim.

As placas de ágar BHI, suplementadas com sangue e suplemento Skirrow, foram então incubadas a 41,5°C por 44h ± 4h em condições de microaerofilia. As colônias foram analisadas visualmente e coradas com fucsina fenicada. Após a confirmação da morfologia e da pureza das colônias, ao microscópio óptico em objetiva de imersão, estas foram repicadas em placas de ágar Columbia (Himedia, M144), suplementado com 5% (v/v) de sangue ovino, que foram incubadas por 44h ± 4h a 41,5°C, em condições de microaerofilia, para obtenção de massa bacteriana. A massa bacteriana obtida a partir das placas, nas quais foram confirmadas a morfologia e pureza das colônias, foi congelada a -80°C em criotubos estéreis contendo 1mL de caldo Tioglicolato (Merck, 108191) com 20% de glicerol (v/v) para posterior confirmação de gênero e espécie de *Campylobacter* por PCR convencional.

Com o objetivo de estimar a contaminação inicial de *Campylobacter* spp. das amostras antes do enriquecimento em caldo Bolton, foi realizada a contagem prévia das colônias. Para isso, a metodologia foi baseada na ISO 10272-2 (2006). Antes da incubação das amostras contidas nos sacos *stomacher* em meio de enriquecimento seletivo Bolton, foram retiradas duas alíquotas de 50µL, que foram transferidas e espalhadas na superfície de placas de ágar mCCDA com seu suplemento. Após a secagem desse material na superfície do ágar, as placas foram incubadas em condições de microaerofilia, inicialmente a 37°C por 5h ± 1h e depois a 41,5°C por 44h ± 4h. Após esse período, foram selecionadas placas contendo menos que 150 colônias e realizada a contagem. De cada placa, foram selecionadas até cinco colônias típicas para subcultivo para isolamento em ágar Columbia suplementado com 5% (v/v) de sangue ovino. As placas de ágar Columbia foram incubadas a 41,5°C por 44h ± 4h, em condições de microaerofilia e as colônias

tiveram sua morfologia confirmada ao microscópio óptico. Em seguida, foi realizado um novo repique em placas de ágar BHI suplementadas com sangue ovino e suplemento Skirrow.

As placas de ágar BHI, suplementadas com sangue e suplemento Skirrow, foram então incubadas a 41,5°C por 44h ± 4h em condições de microaerofilia. As colônias foram analisadas novamente e coradas com fucsina fenicada. Após a confirmação da morfologia e da pureza das colônias, estas foram repicadas em placas de ágar Columbia (Himedia, M144) suplementado com 5% (v/v) de sangue ovino, que foram incubadas por 44h ± 4h a 41,5°C, em condições de microaerofilia, para obtenção de massa bacteriana. A massa bacteriana obtida a partir das placas, nas quais foram confirmadas a morfologia e pureza das colônias, foi congelada a -80°C em criotubos estéreis contendo 1,0mL de caldo Tioglicolato (Merck, 108191) com 20% de glicerol (v/v) para posterior confirmação de gênero e espécie de *Campylobacter* por PCR convencional.

4.4 Confirmação do gênero e da espécie dos isolados.

Para confirmação do gênero e da espécie dos isolados foram utilizados os iniciadores pg3 (5'-GAACTTGAACCGATTTG-3') e pg50 (5'ATGGGATTTTCGTATTAAC-3') para a amplificação do gene *flaA* presente em bactérias do gênero *Campylobacter*, sendo o produto da amplificação de 460 pares de bases (pb), os iniciadores C1 (5'-CAAATAAAGTTAGAGGTAGAATGT-3') e C4 (5'-GGATAAGCACTAGCTAGCTGAT-3') para um gene não determinado de *C. jejuni* com um produto de amplificação de 160 pb (Harmon et al. 1997; Villardo et al., 2006). Também foram utilizados os iniciadores ICC-UP (5'-GAAGTATCAATCTTAAAAAGATAA-3') e ICC-DN (5'-AAATATATACTTGCTTTAGATT-3') para *C. coli* com produto de amplificação 72 pb e ICL-UP (5'-CTTACTTTAGGTTTTAAGACC-3') e ICL-DN (5'-CAATAAACCTTACTATCTC-3') para *C. lari* com produto de amplificação de 279 pb. Estes iniciadores são para amplificação da região espaçadora 16-23S rDNA das espécies de *Campylobacter* e foram descritos por Khan e Edge (2007). Todos os iniciadores foram sintetizados pela Eurofins - mwg/operon.

As reações, que seguiram as recomendações de Harmon et al., (1997) e Villardo et al., (2006), foram realizadas em um volume total de 25 µL contendo 20ng do DNA extraído, 10mM de Tris-HCl, 50mM de KCl, 5,5mM de MgCl, 200µM de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 20 pmol de cada iniciador C1 e C4 e 40 pmol de cada iniciador pg3 e pg50 e 1,25 U de TaqDNA polimerase. Na sequência, essa mistura foi colocada em um termociclador (Veriti® Thermal Cycler da Applied Biosystems®) e submetidas à desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, seguidos de 25 ciclos de amplificação que consistem em desnaturação (94°C por 1 minuto), anelamento (45°C por 1 minuto) e extensão (72°C por 1 minuto). Finalmente, as amostras foram submetidas a uma extensão final a 72°C por 7 minutos.

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

4.5 Tratamento com PMA

O tratamento com PMA™ dye 20 mM em H₂O (Biotium, 40019) foi realizado como descrito por Kruger et al. (2014) e segundo as recomendações do fabricante. O protocolo de tratamento das amostras com PMA foi realizado no mesmo dia do processamento das amostras.

Os sedimentos padronizados para 0,030g a 0,050g obtidos a partir do processamento das amostras de frango foram ressuspensos em 1,0mL de PBS. Em seguida, as amostras foram pré-incubadas a 30°C por 10 minutos e 2,5µL de PMA foram adicionados para obter uma concentração final de 50 µM por amostra. Após a adição do PMA, os tubos foram incubados a 30°C por 15 minutos, ao abrigo da luz e então expostos ao sistema de fotoativação, em comprimento de onda 465-475 nm utilizando o equipamento PMA™ LED Photolysis Device (Biotium, E90002) por 15 minutos a 30°C. Terminado o tratamento, as amostras foram centrifugadas por dez minutos a 13000xg e então submetidas à extração de DNA.

4.6 Extração de DNA

A extração de DNA das amostras tratadas com PMA e das não tratadas com PMA foi realizada imediatamente após o processamento das amostras, utilizando o método do tiocianato de guanidina descrito por Pitcher et al. (1989) com modificações.

Os sedimentos padronizados para 0,030 g a 0,050 g obtidos a partir do processamento das amostras de frango foram ressuspensos em 100 µL de TE buffer (10mmol Tris-HCl; 1 mmol/L EDTA, pH 8). Após essa etapa, adicionou-se 500 µL de reagente de GES (5 mol/L tiocianato de guanidina, 100mmol/L EDTA e 0.5% v/v sarkosyl) e, após breve agitação, deixou agir por dez minutos. Feito isso, adicionou-se 250 µL de acetato e amônio (7,5 M) gelado, o tempo de ação foi de dez minutos em gelo. Em seguida, foram adicionados 500 µL de uma mistura de clorofórmio e 2-pentanol (24:1), os tubos foram agitados exaustivamente e centrifugados a 13100 x g durante dez minutos. Após essa centrifugação, 750µL do sobrenadante foram transferidos para outro tubo e foram adicionados 405µL de 2-propanol gelado. Os tubos foram invertidos durante um minuto para misturar as soluções e colocados no freezer a -20°C durante 24 horas. Esta adaptação do método foi realizada para aumentar a precipitação do DNA. Após esse período o DNA precipitado foi depositado por centrifugação a 13100 x g durante dez minutos. Os pellets de DNA foram lavados duas vezes com 500 µL de etanol a 70% v/v e após cada lavagem os tubos foram centrifugados a 11300 x g durante cinco minutos. Para secagem, os tubos foram abertos e invertidos sobre papel toalha. Depois do processo de purificação, o DNA foi ressuspendido em 50µL de água ultrapura estéril e armazenado entre 2°C a 4°C até o momento da análise pela metodologia de PCR em Tempo Real.

A concentração e pureza do DNA extraído foram determinadas com auxílio de espectrofotômetro nas faixas de absorvância 260nm/280nm (GeneQuant 100 Classic - GE Healthcare Life Sciences). Após as análises de PCR em Tempo Real o DNA extraído foi armazenado a -20°C.

4.7 PCR em Tempo Real para a detecção de *Campylobacter* spp.

A sequência alvo do gene 16S rRNA foi amplificada utilizando-se os iniciadores descritos por Josefsen et al. (2010) e Lubeck et al. (2003). Foram utilizados os iniciadores *forward* (5'-CTGCTTAACACAAGTTGAGTAGG-3') e o iniciador *reverse* (5'-TTCCTTAGGTACCGTCAGAA-3') e o produto amplificado de 287 pb. A sonda utilizada foi descrita por Kruger et al. (2014) (5'/56FAM/TGTCATCCTCCACGCGGGCGTTGCTGC/3BHQ). Tanto as sondas quanto os iniciadores foram sintetizados pela IDT Integrated DNA Technologies.

Cada reação de PCR em Tempo Real foi realizada com um volume de 25µL contendo 1x de TaqMan Universal PCR Master (Promega®, M750), 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) e uma média de 104,69 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 ultrapura.

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.

4.8 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 10⁷ a 10⁰ 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
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

4.9 Condições de cultivo das amostras controle

Como controle positivo das reações de PCR em Tempo Real, foi utilizada uma amostra de referência de *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* NCTC 11351.

Como controle positivo das reações de PCR, foram utilizadas as amostras de referência de *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* NCTC 11351, *Campylobacter coli* NCTC 11366 e *Campylobacter lari* NCTC 11352.

Estas cepas, armazenadas a -80°C, foram cultivadas em placas de ágar Columbia suplementadas com 5% (v/v) de sague desfibrinado de ovino, após descongelamento, e incubadas por até 48 horas, a 41,5°C, em condições de microaerofilia. As culturas bacterianas obtidas foram coletadas com ajuda de suabe estéril e colocadas em microtubos contendo 1,0mL de PBS estéril para a extração de DNA.

4.10 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso em arranjo fatorial 2 x 3, sendo dois tipos de amostras de carcaças de frangos de corte (congeladas e resfriadas) e três tipos de metodologias de análises (Isolamento, PCR em Tempo Real e PCR em Tempo Real associada ao uso com PMA) com 100 repetições de uma carcaça cada. Para comparação entre as metodologias (Isolamento, PCR em Tempo Real e PCR em Tempo Real associada ao uso com PMA) foi feita análise pelo teste de McNemar e para avaliar a concordância entre as metodologias foi utilizado o teste Kappa. Para comparação entre amostras resfriadas e congeladas utilizou-se o teste de Pearson e para comparação entre as amostras provenientes do isolamento utilizou-se teste de Fisher. Os resultados foram avaliados com auxílio do programa estatístico R (Siegel et al., 2006).

5. Resultados

5.1 Detecção de *Campylobacter* spp. em carcaças de frangos utilizando a técnica de cultura e isolamento

O resultado das análises do método de isolamento para detecção do micro-organismo *Campylobacter* spp. nas amostras de carcaças de frangos de corte congeladas e resfriadas produzidas no estado de Minas Gerais estão apresentados na Tabela 2. Das 100 amostras analisadas utilizando essa metodologia, 28 (28%) apresentaram resultados positivos para *Campylobacter* spp. e destas 28 amostras positivas, 14 carcaças eram congeladas e 14 eram resfriadas.

Tabela 2: Resultados da pesquisa da presença de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango do estado de Minas Gerais, comercializadas em temperaturas de congelamento e resfriamento, realizada pela metodologia de cultivo.

Tratamento	Quantidade	<i>Campylobacter</i> spp.	
		Positivo	Negativo
Congelada	60	14 (23%) ^a	46 (77%)
Resfriada	40	14 (35%) ^a	26 (65%)
Total	100	28 (28%)	72 (72%)

Médias seguidas de letras iguais são semelhantes pelo método do χ^2 de Pearson P= 0.2957

Os resultados da identificação de *Campylobacter* spp. isolados de carcaças de frangos estão apresentados na Tabela 3. Em 11 carcaças foram isoladas somente *C. jejuni* e, destas 11, cinco eram resfriadas e seis congeladas. Em quatro carcaças foram encontradas somente *C. coli*, uma era proveniente de carcaça resfriada e quatro de carcaças congeladas. Em 11 carcaças positivas foram encontradas colônias de *C. jejuni* e *C. coli*, deste total seis eram carcaças resfriadas e cinco carcaças congeladas. Em duas amostras foram encontradas *C. jejuni* e *C. lari*, essas duas carcaças eram resfriadas.

Tabela 3: Resultados da identificação das espécies de *Campylobacter* spp. isoladas de carcaças de frango, comercializadas em temperaturas de congelamento e resfriamento no estado de Minas Gerais.

Tratamento	Quantidade	<i>Campylobacter</i> spp.			
		<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>	<i>C. jejuni</i> e <i>C. lari</i>
Congelada	14	6 (43%)	3 (21%)	5 (36%)	0 (0%)
Resfriada	14	5 (36%)	1 (7%)	6 (43%)	2 (14%)
Total	28	11 (39%)	4 (15%)	11 (39%)	2 (7%)

Teste de Fisher – valor de p = 0.3012

5.2 Detecção de *Campylobacter* spp. em carcaças de frangos de corte utilizando a técnica de PCR em Tempo Real

5.2.1 Curva de sensibilidade analítica da técnica de PCR em Tempo Real

Os resultados da curva de sensibilidade analítica para a quantificação de *Campylobacter* spp. pela técnica de PCR em Tempo Real são demonstrados nas Figuras 2 e 3. Houve amplificação satisfatória do DNA das diluições bacterianas de 20 ng/ μ L até 20 fg/ μ L, o que equivale a 10^7 a 10^1 bactérias. Com base na curva realizada, foi possível detectar amostras de frango que continham contaminação de até 10 bactérias, o que demonstrou que a técnica é altamente sensível. A diluição 2 fg/ μ L, 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.

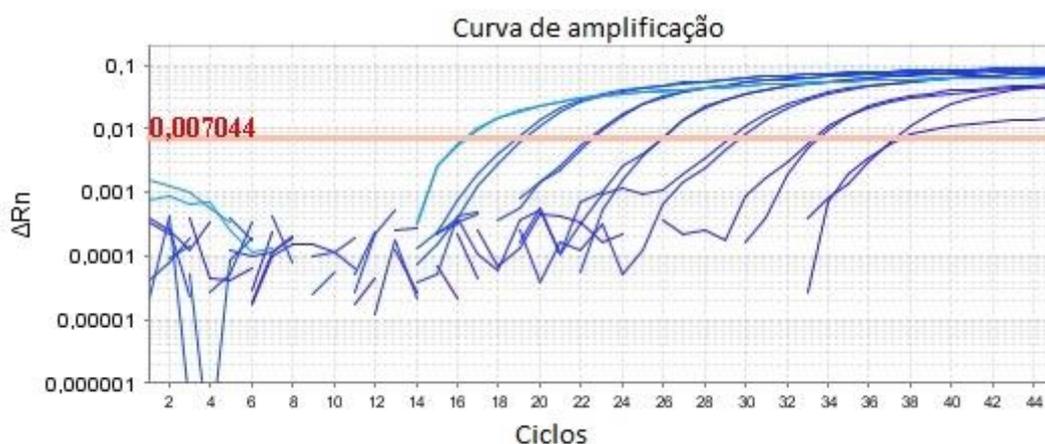


Figura 2: Curva de sensibilidade analítica de PCR em Tempo Real com DNA de *Campylobacter jejuni* diluído em base 10 de 20ng a 2fg, correspondente a 10^7 a 10^1 bactérias, respectivamente.

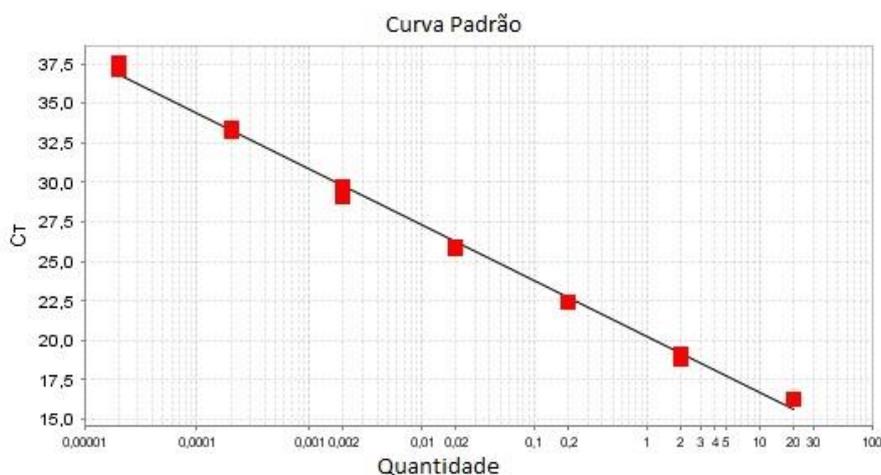


Figura 3: Curva padrão de PCR em Tempo Real com DNA de *Campylobacter jejuni* diluído em base 10 de 20ng a 2fg, correspondente a 10^7 a 10^1 bactérias, respectivamente. Eficiência da amplificação (Eff%): 91,976; Coeficiente de correlação (R^2): 0,997.

5.2.2 Detecção de *Campylobacter* spp. em carcaças de frangos utilizando a técnica da PCR em Tempo Real

Os resultados das análises de PCR em Tempo Real das amostras de carcaças de frangos congeladas e resfriadas estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Resultados da pesquisa da presença de *Campylobacter* spp. em carcaças de frangos de corte, comercializadas em temperaturas de congelamento e resfriamento, realizadas pela técnica da PCR em Tempo Real.

Tratamento	N*	PCR em Tempo Real	
		Positivo	Negativo
Congelada	60	47 (78%)	13 (22%)
Resfriada	40	37 (93%)	3 (7%)
Total	100	84 (84%)	16 (16%)

*N: número amostral χ^2 de Pearson = 2.6073, graus de liberdade = 1, p-value = 0.1064

5.3 Detecção de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango utilizando a técnica da PCR em Tempo Real com tratamento pelo PMA

Os resultados das análises de PCR em Tempo Real das amostras de frango congeladas e resfriadas tratadas por PMA estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Resultados da pesquisa da presença de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango, comercializadas em temperaturas de congelamento e resfriamento, realizadas pelas técnicas de isolamento, PCR em Tempo Real e PCR em Tempo Real associada ao tratamento com PMA.

Tratamento	N*	PCR em Tempo Real com utilização de PMA**	
		Positivo	Negativo
Congelada	60	8 (13%) A	52 (87%)
Resfriada	40	18 (45%) B	22 (55%)
Total	100	26 (26%)	74 (74%)

*N: número amostral χ^2 de Pearson = 10.917, graus de liberdade = 1, p = 0.0009529

*PMA: Propídio Monoazida (Intercalante de DNA)

5.4 Comparação entre isolamento, PCR em Tempo Real e PCR em Tempo Real associada ao uso de PMA

Os resultados das análises de comparação da presença de *Campylobacter* spp. em carcaças de frangos de corte congeladas e resfriadas avaliadas pelas metodologias do isolamento, da PCR em Tempo Real e PCR em Tempo Real com tratamento pelo PMA estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Resultado da comparação da análise da presença de *Campylobacter* spp. em carcaças de frangos de corte comercializada nas temperaturas de resfriamento e congelamento analisadas pelas técnicas PCR em Tempo Real e PCR em Tempo Real com propídio monoazida.

Amostra	Isolamento	Sem PMA	Com PMA
Positivas	28	84	26

*PMA: Propídio Monoazida (Intercalante de DNA)

No entanto, como demonstrado na Tabela 7, apenas nove amostras foram positivas tanto no isolamento quanto na PCR em Tempo Real associada ao uso de PMA. Enquanto 17 amostras foram positivas na PCR e negativas ao isolamento. Todavia, 19 amostras foram positivas no isolamento e não houve sua detecção na PCR em Tempo Real associada ao uso de PMA.

Tabela 7: Comparativo entre os resultados de isolamento e PCR em Tempo Real associada ao uso de propídio monoazida (PMA).

PCR+PMA	Isolamento		Total
	Amostras negativas	Amostras positivas	
Amostras negativas	55A	19C	74
Amostras positivas	17B	9D	26
Total	72	28	100

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes se diferem pelo método do χ^2 de McNemar $P=0,867632$

6. Discussão

6.1 Detecção de *Campylobacter* spp. em carcaças de frangos de corte utilizando a técnica de cultura e isolamento

Os métodos de cultura utilizados para isolamento, identificação e diferenciação entre as espécies de *Campylobacter* são demorados e difíceis devido à natureza fastidiosa do micro-organismo. A detecção de *Campylobacter* spp. em alimentos deve levar em consideração que a população presente pode ser baixa, devido ao fato de *Campylobacter* spp. ser sensível a concentração de oxigênio do ar (21%) e não crescer a temperaturas abaixo de 30°C, utilizadas normalmente na conservação dos alimentos. O sucesso da detecção, geralmente, depende da forma de conservação das amostras, da análise de um grande número de amostras, concentração de células presentes, pré-enriquecimento com incubação a 37°C por quatro horas e enriquecimento seletivo em condições microaerófilas à temperatura de 42°C. No entanto, no presente estudo os métodos de conservação (congelados x resfriados) não interferiram na ocorrência de *Campylobacter* spp. nas carcaças ($p=0,2975$) (Vandamme, 2000; Bhunia, 2008).

C. jejuni foi a espécie mais encontrada nas amostras analisadas. Segundo Food... (2012) a principal espécie envolvida nos casos de campilobacteriose em seres humanos é a *C. jejuni*, que pode ser encontrada nos alimentos geralmente em baixa concentração, o que, aliado à sensibilidade ao oxigênio, dessecação, calor, desinfetantes e pH ácido, dificulta o seu isolamento.

Dias et al. (1990), pesquisando *C. jejuni* em carcaças de frango prontas para comercialização, em Belo Horizonte, encontraram 2% de positividade em carcaças de estabelecimentos com SIF e 38% de positividade em estabelecimentos sem SIF. No entanto, para essa pesquisa, foi utilizado somente um abatedouro com SIF, o que explica a baixa taxa de positivos encontrada em comparação ao presente estudo. Adicionado a isso, os nove estabelecimentos que não possuem SIF não utilizavam água clorada no tanque de resfriamento, além de, segundo os autores, condições de higiene mais precárias comparadas aos estabelecimentos sem SIF, o que pode explicar a alta taxa de resultados positivos.

Silva (2013), utilizando a metodologia de isolamento, pesquisou em 105 carcaças resfriadas de frango, comercializadas no Distrito Federal, a presença de *C. jejuni* e *C. coli*. Do total de carcaças de frango, 11 (11,55%) amostras foram positivas para a pesquisa de *Campylobacter* spp., sendo sete (63,64%) amostras positivas para *C. jejuni* e quatro (36,36%) amostras positivas para *C. coli*. As taxas de isolamento relatadas por este autor foram diferentes das taxas encontradas no presente estudo, no entanto, é importante ressaltar que o autor não utilizou a etapa de pré-incubação a 37°C, o que pode ter contribuído para a menor taxa de isolamento. Segundo Donnison (2003) a utilização de uma fase de pré-enriquecimento com incubação a 37°C por quatro horas permite a recuperação das células de *Campylobacter* spp. injuriadas pela desidratação, aquecimento, falta de nutrientes, congelamento ou exposição a radicais de oxigênio, o que pode explicar a taxa de amostras isoladas encontradas neste estudo.

No presente trabalho, *C. lari* foi identificado em apenas duas amostras de carcaças resfriadas. Segundo Moore e Matsuda (2002) *C. lari* é considerada uma espécie de ocorrência mais rara quando comparada a contaminação pelas outras espécies. Rosa (2015), pesquisando *Campylobacter* spp. em linguças de frango congeladas e resfriadas, também encontrou menor taxa de isolamento de *C. lari*. O autor relatou a identificação da presença de *Campylobacter* spp. somente nas linguças resfriadas, com uma taxa de positividade de 11,75%, sendo que 75% destas amostras positivas foram identificadas como *C. coli* e 25% como *C. lari*. O autor relatou que o isolamento de *C. lari* no Brasil ocorre esporadicamente.

6.2 Detecção de *Campylobacter* spp. em carcaças de frangos de corte utilizando a técnica da PCR em Tempo Real

Utilizando a técnica de PCR em Tempo Real para a detecção de *Campylobacter* spp. das 60 amostras congeladas 47 (78%) apresentaram resultados positivos e das 40 amostras resfriadas 37 (93%) foram positivas para o micro-organismo. É importante ressaltar que a metodologia da PCR identifica todas as bactérias presentes na amostra, pois, a técnica detecta o DNA da bactéria e ele está presente em células vivas, na forma VNC e em células mortas. Portanto, se for considerado que apenas células viáveis e VNC são capazes de causar infecção, pode haver uma falsa interpretação, e a técnica pode superestimar a presença de *Campylobacter* spp. com real capacidade patogênica em carcaças de frango.

No entanto, os resultados explicitam que a maior parte das carcaças continham o micro-organismo. Levando em consideração que dentre os principais fatores que influenciam na contaminação das carcaças por *Campylobacter* spp. estão os cuidados prévios ao abate, desde o início da criação das aves, como água de bebida, passando pela fase de pré-abate, em que são

adotadas medidas com o objetivo de minimizar a ocorrência de extravasamento de conteúdo intestinal em casos de ruptura de alças intestinais, diminuindo a contaminação de carcaças, terminando no abate propriamente dito, em que as etapas em que ocorre maior contaminação das carcaças de frango por micro-organismos são a escalda, a depenagem, a evisceração e o resfriamento, os resultados demonstram que se faz necessária a adoção maiores cuidados ao longo da cadeia produtiva da carne de frango (Herman et al., 2003; Petracci et al., 2010, Seliwiorstow et al., 2015). Ainda que a campilobacteriose seja uma doença pouco estudada em nosso país, não se pode ignorar o risco que representa para a população, sendo um problema de Saúde Pública, com relação direta às precárias condições sanitárias de boa parte da população.

6.3 Detecção de *Campylobacter* spp. em carcaças de frangos utilizando a técnica da PCR em Tempo Real

Quando foi utilizado o tratamento prévio com intercalante de DNA (PMA), das 100 amostras analisadas, 26 (26%) foram consideradas positivas, sendo oito (30,8%) congeladas e 18 (69,2%) resfriadas.

Tais resultados foram inferiores aos encontrados por Josefsen et al. (2010), que encontraram 90% de carcaças de frango positivas para *Campylobacter* spp. pelo método de PCR em tempo real associado ao tratamento com PMA. No entanto, para a recuperação de células do micro-organismo das carcaças de frango, os autores utilizaram dupla enxaguadura e concluíram que desta forma é possível aumentar de uma taxa de 27% a 47% de recuperação de células com uma única enxaguadura para uma taxa que varia de 55% a 94% de recuperação com dupla enxaguadura. No presente trabalho, foi utilizada uma amostragem de uma parcela representativa das carcaças (25 gramas), o que pode ter influenciado na detecção do micro-organismo.

Porém, Castro (Comunicação pessoal, dados ainda não publicados) ao pesquisar a presença de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango congeladas e resfriadas utilizando a técnica da PCR em tempo real com a utilização de PMA, encontrou 18,3% de amostras positivas para *Campylobacter* spp.. Apesar do autor ter utilizado a mesma metodologia do presente trabalho para a recuperação de células do micro-organismo, as parcelas das carcaças amostradas foram diferentes, dez gramas em comparação a 25 gramas. O que pode explicar as diferenças na detecção do micro-organismo nos dois trabalhos.

A utilização do PMA é baseada na afinidade deste pela dupla fita de DNA e na incapacidade de penetrar a membrana de células intactas. Dessa maneira, ao utilizar o PMA as células bacterianas inviáveis não são detectadas pela PCR e o resultado demonstra apenas os micro-organismos viáveis. No entanto, fica claro que a metodologia utilizada para a recuperação de células de *Campylobacter* spp. das carcaças de frango pode influenciar diretamente no resultado final das análises.

Os testes moleculares, por serem de rápida e fácil execução em comparação às técnicas de cultivo microbiológico, podem contribuir para a identificação de *Campylobacter* spp. em um grande número de amostras e são uma opção para uso na rotina. Apesar disso, não substituem completamente as técnicas de cultivo, pois para a determinar os perfis de resistência es estudos

epidemiológicos e para a sorotipagem dos micro-organismos, os métodos microbiológicos ainda são necessários.

6.4 Comparação entre isolamento, PCR em tempo real e PCR em tempo real associada ao uso de PMA

Foi observada uma alta frequência de contaminação das carcaças que foram analisadas pela PCR em Tempo Real (84 amostras) e uma baixa taxa nas que foram analisadas pela PCR em Tempo Real com tratamento pelo PMA (26 amostras) e no isolamento (28 amostras). Castro (Comunicação pessoal, dados ainda não publicados) ao comparar as técnicas de PCR em tempo real e PCR em tempo real associada ao uso de PMA encontrou uma alta frequência de contaminação das carcaças que foram analisadas pela PCR em tempo real (88,3%) e uma baixa taxa nas que foram analisadas pela PCR em tempo real com tratamento pelo PMA (18,3%). Neste estudo foi observada diferença significativa entre as metodologias trabalhadas, demonstrando que as diferentes metodologias têm eficiência diferenciada na detecção do micro-organismo. Estes dados corroboram com os resultados encontrados no presente estudo.

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 entanto, como demonstrado na tabela 7, apenas nove amostras foram positivas tanto no isolamento quanto na PCR em tempo real associada ao uso de PMA. Enquanto 17 amostras foram positivas na PCR e negativas ao isolamento. Levando em consideração que o objetivo do uso de PMA é detectar as células viáveis (possíveis de serem detectadas ao isolamento) e as células VNC (não detectáveis ao isolamento), estes resultados demonstram que é possível utilizar esta técnica com essa finalidade obtendo sucesso. Todavia, 19 amostras foram positivas no isolamento e não houve sua detecção na PCR em tempo real associada ao uso de PMA. Este resultado pode ser explicado pela metodologia utilizada para a recuperação de células das carcaças de frango, pois, como demonstrado anteriormente, este pode ser um fator que influencie na detecção de *Campylobacter* spp.. Em comparação ao isolamento, a PCR em tempo real associada ao uso de PMA demonstrou 32% de sensibilidade e 76% de especificidade.

6.5 Avaliação das carcaças resfriadas e congeladas

Não foi observada diferença significativa entre as carcaças resfriadas e congeladas quando as mesmas foram avaliadas pela metodologia de cultivo e isolamento. Os resultados positivos, para o micro-organismo, encontrados pela técnica de isolamento foram inferiores aos resultados encontrados na PCR em tempo real. Os métodos de cultura utilizados para isolamento, identificação e diferenciação entre as espécies de *Campylobacter* são demorados e difíceis devido à natureza fastidiosa do micro-organismo, porém os resultados encontrados nesta metodologia

permitem avaliar a real contaminação por micro-organismos viáveis e VNC. Desta maneira, apesar da diminuição na contagem desse agente, é possível verificar a presença de micro-organismos viáveis mesmo em baixas temperaturas, demonstrando que a refrigeração e o congelamento por si só não inativam *Campylobacter* spp. em carcaças. Para evitar surtos de doenças causadas pela contaminação dos alimentos, medidas preventivas adicionais devem ser tomadas tanto pela indústria produtora de alimentos quanto pelos consumidores, como o cuidado na manipulação desses produtos para evitar a contaminação cruzada.

A carcaças, congeladas e resfriadas, utilizadas nesse experimento foram independentes, provenientes de estabelecimentos e lotes distintos de produção, com isso, somente é possível avaliar a contaminação das carcaças (congelada ou resfriada) sem a possibilidade de avaliar o efeito do resfriamento ou o congelamento.

Não foram observadas diferenças na contaminação das carcaças resfriadas e congeladas quando as mesmas foram avaliadas pela metodologia da PCR em tempo real. Ao detectar o DNA das células, a técnica PCR em tempo real foi considerada adequada para detecção de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango submetidas a baixas temperaturas, pois esta metodologia apresentou alta sensibilidade e especificidade. Porém, a metodologia detectou micro-organismos viáveis, na forma VNC e inviáveis que também foram considerados positivos pela PCR em tempo real. Estes resultados concordam com os resultados apresentados por Reis (2015) e por Castro (Comunicação pessoal, dados ainda não publicados) que também encontraram uma alta taxa de positividade para o micro-organismo em carcaças de frangos de corte e não observaram diferenças entre as carcaças resfriadas e congeladas. Estes dois autores, avaliaram carcaças pareadas, ou seja, as carcaças resfriadas e congeladas pertenciam ao mesmo lote de produção e foram submetidas às mesmas condições de abate, então o esperado é que a quantidade de DNA, proveniente da contaminação da bactéria seja semelhante.

Quando foi utilizada a metodologia de PCR em tempo real com tratamento prévio com o PMA foi observado que as carcaças resfriadas apresentaram um maior índice de contaminação quando comparadas às carcaças congeladas. Ao submeter uma carcaça de frango ao congelamento diversos fatores, incluindo a formação do gelo e a desidratação, levam à injúria do micro-organismo, além do estresse oxidativo, que pode levar à morte celular e significativa redução na sobrevivência de *Campylobacter* spp. (Park, 2002).

Como as amostras utilizadas para as determinações por PCR em tempo real tratadas previamente ou não com PMA foram preparadas a partir de uma mesma porção de amostra, e considerando que o PMA não permite a amplificação de DNA de células mortas, foi possível observar que o tratamento pelo congelamento reduz a sobrevivência do micro-organismo *Campylobacter* spp. nas carcaças.

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. reduziu de 56% em amostras frescas para 31% em amostras de frango congeladas (EFSA, 2001).

6.6 Ocorrência de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango abatidas no estado de Minas Gerais

A ocorrência de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango de corte coletadas nos estabelecimentos no estado de Minas Gerais encontrada pelo método de PCR em tempo real foi considerada muito elevada (84%), demonstrando a alta contaminação das aves pelo micro-organismo. Também foi encontrada uma alta frequência de amostras positivas quando as mesmas foram avaliadas pelas metodologias do isolamento e da PCR em tempo real associada ao uso de PMA (28% e 26% respectivamente). Por se tratar de um micro-organismo de importância para a saúde pública e considerando que essas duas metodologias detectam apenas células capazes de causar a infecção esses resultados podem ser considerados elevados, além disso nota-se uma evidente subnotificação no país e pouca informação à população em geral.

Gomes et al. (2006) ao pesquisarem *Campylobacter* termofílico em 24 lotes de frangos destinados ao abate e oriundos de pequenas propriedades em Pelotas, sul do Brasil, relataram a detecção da bactéria em 22 lotes, o que corresponde a uma infecção de 91,7% dos lotes analisados.

Perdoncini (2012), avaliou a frequência de contaminação de carcaças de frangos de corte por *Campylobacter* spp. em frigoríficos sob inspeção federal no estado do Rio Grande do Sul. Foram avaliadas 57 carcaças de frangos que foram coletadas após a etapa de pré-resfriamento e a taxa de positividade encontrada foi de 70,2%.

Brizio et al. (2014) em trabalho realizado em abatedouros, sob inspeção federal, localizados no estado do Rio Grande do Sul, encontraram, por método convencional de cultivo, 36,6% de carcaças de frango positivas para *Campylobacter* spp..

Os riscos à saúde dos consumidores fazem com que o contínuo monitoramento, assim como a adoção de boas práticas de fabricação se tornem medidas essenciais para garantir a qualidade das carcaças de frango de corte e consequente segurança dos consumidores.

7. Conclusões

A análise de carcaças de frango de corte provenientes de abatedouros avícolas do estado de Minas Gerais permitiu concluir que a ocorrência de *Campylobacter* spp. no estado é alta e que a viabilidade desse micro-organismo também é alta.

A comparação entre as metodologias demonstrou que o uso da PCR em Tempo Real pode superestimar a presença de *Campylobacter* spp., em contrapartida, o uso de PMA associada à PCR em Tempo Real se mostrou eficaz em detectar a viabilidade desse patógeno.

Não foi possível avaliar se a temperatura de armazenamento da carne influencia na presença desse micro-organismo em decorrência da utilização de amostras não pareadas. No entanto é possível afirmar que houve maior detecção de *Campylobacter* spp. em amostras resfriadas em comparação às amostras congeladas e houve maior viabilidade do micro-organismo em carcaças resfriadas.

8. Referências bibliográficas

ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual 2015. Disponibilidade < <http://abpa-br.com.br/files/publicacoes/c59411a243d6dab1da8e605be58348ac.pdf> > Data de acesso: 15 de julho de 2015.

ABUOUN, M.; MANNING, G.; CAWTHRAW, S. A.; RIDLEY, A.; AHMED, I. H.; ASSENAAR, T. M.; NEWELL, D. G. Cytolethal distending toxin (CDT)- negative *Campylobacter jejuni* strains and anti-CDT neutralizing antibodies are induced during human infection but not during colonization in chickens. *Infection and Immunity*, United Kingdom, [online], v. 73, p. 3053-3062, 2005. Disponível em: <http://iai.asm.org/cgi/content/short/73/5/3053>. Acesso em: 10 jan 2016.

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.. *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. *Emerging Infectious Disease*. Atlanta, v.5, p.28-35, 1999.

ALTER, T.; GAULL, F.; FROEB, A.; FEHLHABER, K. *Distribution of Campylobacter jejuni strains at different stages of a turkey slaughter line*. *Food Microbiology*. Vol. 22 pg. 345-351, 2005.

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

ALVES, L.; VOSS-RECH, D.; POZZA, J. et al. Detecção por PCR de *Campylobacter* termófilos em materiais de frangos de corte obtidos em frigorífico. In: CONFERÊNCIA FACTA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, 2011, Santos, SP. Anais... Santos: FACTA, 2011.

AQUINO, M. H. C., A. P. G. PACHECO, M. C. S. FERREIRA, A. TIBANA. Frequency of Isolation and Identification of Thermophilic *Campylobacters* from Animals in Brazil. *The Veterinary Journal* 2002, 164, 159-161.

AZEREDO, L. I.; LUCHESE, R. H.; LAURIA-FILGUEIRA, A. L.. *Campylobacter* spp em carne de ave crua: avaliação da etapa de resfriamento. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2010; 69(4):518-24.

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.

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

BHUNIA, A. K. Foodborne microbial pathogens: mechanisms and pathogenesis. *Purdue University*, p. 217-225, 2008.

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.; ROBERTSON, L.. A selective medium for isolating *Campylobacter jejuni/coli*. *Journal of clinical pathology*, v. 35, p. 462-467, 1982.

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.

BORCK, B.; STRYHN, H.; ERSBÙLL, 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 COILLIEI, E.; PIESSENS, V.; RASSCHAERT, G.; DEBRUYNE, L.; HEYNDRIKX, M.; HERMAM, L.; MESSENS, W. Quantification of *Campylobacter* spp. in chicken carcass rinse by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*, n. 105, p. 1909-1918, 2008.

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

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria 368 de 04 de setembro de 1997. Regulamento técnico sobre condições higiênicas-sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para estabelecimentos elaboradores/industrializadores de alimentos.

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)

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*. *Clinical Microbiology and Infection*, v.10, n.10, p.868-876, 2004.

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.

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.

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

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

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Foodborne Germs and Illnesses, 2015. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/foodsafety/foodborne-germs.html>>. Acesso em 12 jan 2016.

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.

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

DEBRETSON, 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.

DIAS, T. C.; QUEIROZ, D. M. M.; MENDES, E. N.; PERES, J. N.. Chicken carcass as a source of *Campylobacter jejuni* in Belo Horizonte, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* vol.32 no.6, p. 414-418. São Paulo Nov./Dec. 1990.

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

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

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 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.

FAO/WHO [Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization]. 2009. *Risk assessment of Campylobacter spp. in broiler chickens: Interpretative Summary*. Microbiological Risk Assessment Series No 11. Geneva. 35pp.

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

FELLOWS, P. 2000. *Tecnología del procesado de los alimentos, principios y practicas*. Zaragoza, España. Editorial Acribia S.A., 549p. 1994

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

FERRERO, R. L.; A. LEE. Motility of *Campylobacter jejuni* in a viscous environment: comparison with conventional rod-shaped bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 1988, ed., 134, pág 53-59.

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.

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz. Procedimentos para manipulação de micro-organismos patogênicos e/ou recombinantes na FIOCRUZ. Rio de Janeiro, 220p, 2005.

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

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

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

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

FREITAS, J.A.; NORONHA, G.N. Ocorrência de *Campylobacter* spp. em carne e miúdos de frango expostos ao consumo em Belém, Pará. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 59, n. 3, p. 813-815, 2007.

FSA - Food Standards Agency. *UK-wide Survey of Salmonella and Campylobacter Contamination of Fresh and Frozen Chicken on Retail Sale*. United Kingdom: FSA, 2001.

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.

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.

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

GORMAN, R.; ADLEY, C.C. An evaluation of five preservation techniques and conventional freezing temperatures of -20°C and -85°C for long-term preservation of *Campylobacter jejuni*. 2004.

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.

HABIB, I.; UYTTENDAELE, M.; ZUTTER, L.. Evaluation os ISO 10272:2006 standard versus alternative enrichment and plating combinations for enumeration and detection of *Campylobacter* in chicken meat. *Food microbiology*, v. 28, p. 1117-1123, 2011.

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

HERMAN, L.; HEYNDRIKX, 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.

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

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

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,

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.

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*.

INVITROGEN. Real- Time PCR: From theory to practice - Handbook. 72f. 2008.

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

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. *Modern food microbiology*. 7. ed. New York: Springer, 790 p, 2005.

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.

KEENER, K.M. AND BASHOR, M.P. AND CURTIS, P.A. AND SHELDON, B.W. AND KATHARIOU, S.. Comprehensive Review of *Campylobacter* and Poultry Processing, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v3(2), p.105-116, 2004.

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.

KHAN, I.U.H.; EDGE, T.A.. Development of a novel triplex PCR assay for the detection and differentiation of thermophilic species of *Campylobacter* using 16S-23S rDNA internal transcribed spacer (ITS) region. *Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology* 103 (2007) 2561–2569

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.

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

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

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.

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

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

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

MOURA FILHO L. G. M.; BEZERRA S.S.; BARROS G. C.; MELO H. M. G.; MENDES E. S. *Perfil microbiológico da carne de frangos abatidos artesanalmente e na indústria, comercializados na grande Recife-PE*. *Medicina Veterinária*, Recife, v.4, n.1, p.12-17, jan/mar, 2010.

- NACHAMKIN, I. *Campylobacter jejuni*. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R. Food Microbiology: fundamental and frontiers. 3.ed. Washinton: ASM Press. p.237-248. 2007.
- NACHAMKIN I, SZYMANSKI C. M, BLASER M. J., *Campylobacter*, 3 ed. ASM, Washington, D.C, 2008.
- NIEROP, W.V.; DUSÉ, A.G.; MARAIS, E.; AITHMA, N.; THOTHOBOLO, N.; KASSEL, M.; STEWART, R.; POTGIETER, A.; FERNANDES, B.; GALPIN, J.S.; BLOOMFIELD, S.F. *Contamination of chicken carcasses in Gauteng, South Africa, by Salmonella, Listeria monocytogenes, and Campylobacter*. International Journal of Food Microbiology. Vol. 99 pg 1-6. 2005.
- 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.
- 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.
- 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.
- PACHOLEWICZ E, SWART A, LIPMAN LJ, WAGENAAR JA, HAVELAAR AH. et al. (2013) Propidium monoazide does not fully inhibit the detection of dead *Campylobacter* on broiler chicken carcasses by qPCR. *J Microbiol Methods* 95: 32–38.2013.
- 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.

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

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

PESTANA, E. A.; BELAK, S.; DIALLO, A.; CROWTHER, J. R.; VILJOEN, G. J. Early, Rapid and Sensitive Veterinary Molecular Diagnostics - Real Time PCR Applications. Springer. 2010

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 guanidium thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.8, p.151-156.

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

QUETZ, J.D. Estudo sobre *Campylobacter coli* em crianças da area urbana de Fortaleza, CE/Brasil: identificação genética, inflamação intestinal e impacto no estado nutricional 141 f.: il. ; Dissertação (Mestrado em farmacologia) Universidade Federal do Ceara. Fortaleza, 2009.

RANTSIOU, 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.

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.

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

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. 2001. *Molecular Cloning*. 3. Ed. v. 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova Iorque.

SCARCELLI, E. , PIATTI, R.M.. Patógenos emergentes relacionados à contaminação de alimentos de origem animal. *Biológico*, São Paulo, v.64, n.2, p.123-127, jul./dez., 2002.

SCOTT, M. K.; GEISSLER A., POISSANT T., DEBESS E., MELIUS B., ECKMANN K., SALEHI E., CIESLAK, P. R.. *Campylobacteriosis* Outbreak Associated with Consuming Undercooked Chicken Liver Pâté — Ohio and Oregon, December 2013–January 2014. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. Weekly / Vol. 64 / No. 14. 2015

- SEINIGE, D.; KRISCHEK, C.; KLEIN, G.; KEHRENBURG, C.. Comparative Analysis and Limitations of Ethidium Monoazide and Propidium Monoazide Treatment for the Differentiation of Viable and Nonviable *Campylobacter* Cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 2014
- SELIWIORSTOW, T., BARÉ, J., VAN DAMME, I., UYTTENDAELE, M., DE ZUTTER L.. *Campylobacter* carcass contamination throughout the slaughter process of *Campylobacter*-positive broiler batches. *Int J Food Microbiol.* 2015 Feb 2;194:25-31.
- SHANE, S. M.; STERN, N. J. *Campylobacter* infection. In.: SAIF, Y. M. Diseases of poultry. 11.ed. Ames: Iowa State Press, 2003. Cap.17, p.615-625.
- SIEGEL, S.; CASTELLAN JR, N. J.. Estatística Não-Paramétrica para Ciências do Comportamento. Ed Penso, 2ed. 2006.
- SILVA, P. R. Isolamento e resistência antimicrobiana em cepas de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* isoladas de carcaças resfriadas de frango na região do Distrito Federal e entorno. Dissertação de mestrado em saúde animal. Brasília/DF. Universidade de Brasília. 2013.
- SKIRROW MB. Epidemiology of *Campylobacter* enteritis. *Int J Food Microbiol.* 1991 Jan;12(1):9-16.
- SKIRROW, M. B., BLASER, M. J., NACHAMKIM et al. *Campylobacter jejuni*: current status and future trends. Washington, DC: American Society for Microbiology. 1992
- SMITH, J. L.; BAYLES, D. O. The contribution of cytolethal distending toxin to bacterial pathogenesis. *Critical Reviews in Microbiology*, Pennsylvania, [online] v.32, n.4, p.227- 248, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17123907>. Acesso em: 10 jan 2016.
- STERN, N.J.; GREEN, S.S.; THAKER, N.; KROUT, D.J.; CHIU, J. *Recovery of Campylobacter jejuni from fresh and frozen meat and poultry collected at slaughter*. *Journal of Food Protection*. Vol. 47, n° 5, pg 372-374. 1984.
- STUART, T .L.; SANDHU, J.; STIRLING, R. An investigation points towards contaminated mud as the source of *Campylobacter jejuni* outbreak associated with a mountain bike race. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON EMERGING INFECTIOUS DISEASES, 2008 Atlanta. Proceedings... Atlanta: [s.n.], 2008. p.16-19.
- 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.
- TOMPKINS, B. J.; DEVLIN, V., KAMHI, L.; TEMPLE, B.; WEENING, K.; WIRSING, E.; GOODE, B.; et al., Multistate Outbreak of *Campylobacter jejuni* Infections Associated with Undercooked Chicken Livers — Northeastern United States, 2012. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. Weekly / Vol. 62 / No. 44. 2013.
- VANDAMME, P.; DE LEY, J. Proposal of a new family, *Campylobacteraceae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 41, p. 451-55, 1991.
- VANDAMME, P. Taxonomy of the family *Campylobacteraceae*. *Campylobacter*, Washington, 2 ed, p 3-44, 2000.

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.

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

VOSS-RECH, D.; VAZ, E. S. L.. Técnicas laboratoriais para isolamento de *Campylobacter* em material avícola. *Anais do Workshop de Diagnóstico Microbiológico de Campylobacter Aplicado à Avicultura*. Embrapa. P 21-28. 2012.

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.

WHO – World Health Organization. Water-related diseases, 2015. Disponível em: <http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/campylobacteriosis/en/>. Acesso em: 29 dez 2015.

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.

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