

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**ESCOLA DE VETERINÁRIA**  
**Colegiado dos Cursos de Pós-Graduação**

Isolamento de *Campylobacter jejuni* em  
carcaças de frango coletadas em Indústrias  
Frigoríficas de Minas Gerais

**Eronilda Castro Pena**

**Belo Horizonte**  
**Escola de Veterinária - UFMG**  
**2012**

Eronilda Castro Pena

Isolamento de *Campylobacter jejuni* em carcaças de frango coletadas em Indústrias  
Frigoríficas 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: Prof<sup>a</sup>. Silvana de Vasconcelos Cañado

Belo Horizonte  
Escola de Veterinária da UFMG  
2012

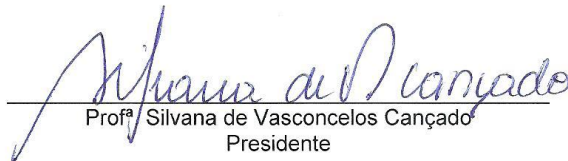
P397i Pena, Eronilda Castro, 1973-  
Isolamento de *Campylobacter jejuni* em carcaças de frango coletadas em indústrias  
frigoríficas de Minas Gerais / Eronilda Castro Pena. – 2012.  
37 p. : il.

Orientadora: Silvana de Vasconcelos Caçado  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.  
Inclui bibliografia

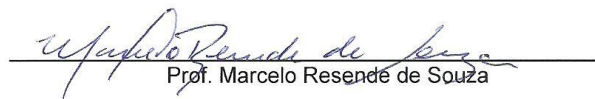
1. Frango de corte – Carcaças – Teses. 2. *Campylobacter* – Teses. 3. Infecções por  
*Campylobacter* – Teses. I. Caçado, Silvana de Vasconcelos. II. Universidade Federal de  
Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.089 692

Dissertação defendida e aprovada em 11 de maio de 2012, pela Comissão Examinadora constituída por:

  
Prof<sup>a</sup> Silvana de Vasconcelos Cançado  
Presidente

  
Prof<sup>a</sup>. Daniela Duarte de Oliveira

  
Prof. Marcelo Resende de Souza

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado equilíbrio, serenidade, saúde e força para superar todos os obstáculos que apareceram nesta caminhada; por me fazer acreditar em mim, no meu potencial. Enfim, meu eterno agradecimento a Deus, sempre presente em minha vida.

A meus pais, que sempre me apoiaram em todas as situações, incentivando sempre meus estudos. É por vocês que busco sempre dar exemplo, como vocês, que nunca mediram esforços para que eu fosse adiante, sempre apostando em mim, pois sem vocês nada, mas nada mesmo, seria possível.

A meu filho Leonardo, pela formação que me permitiu ter, com os sacrifícios que só ele sabe quais foram, por ser a coisa mais preciosa da minha vida e por conseguir com apenas um sorriso transformar um dia difícil em magnífico a quem dedico minha incessante busca... Te Amo.

À Leandro, pela compreensão, e muita paciência, principalmente nesse período.

À minha família, a qual amo muito, pelo carinho, paciência e incentivo, obrigado pela força e incentivo. Por estarem sempre ao meu lado, apoiando em todos os momentos.

Em especial a Liliane, por termos nos tornado verdadeiras amigas. E que tornou possível a execução deste projeto, agradeço muito ao tempo dedicado e ouvir minhas queixas, minhas lágrimas de desânimo e por sempre procurar me reerguer. Que foi uma das maiores incentivadoras para que eu fizesse esse mestrado, por ter me ajudado a crescer como pesquisadora, por sempre me incentivar na busca do crescimento, sendo exemplo de competência, garra, determinação e disciplina.

Ao Diretor Geral do IMA Dr Altino, a Ilka e Paula, por ter concedido minha liberação do trabalho para a realização do mestrado. Venho por meio desta apresentar meus agradecimentos pelo apoio e oportunidade que me foram concedidos.

À minha orientadora, professorinha Silvana de Vasconcelos Caçado, pela dedicação, paciência empregada, atenção e pelo conhecimento transmitido pela oportunidade de crescimento, aprendizado, realização profissional e pessoal e pela confiança em mim depositada. Pelas sugestões que fizeram com que concluíssemos este trabalho.

Aos meus colegas de trabalho do laboratório que participaram diretamente deste trabalho e me ajudaram em todos os momentos. Obrigado a todos.

Gostaria também de agradecer a banca examinadora desta pesquisa, pelas brilhantes considerações que guiaram a confecção final deste trabalho, Prof. Marcelo e Daniela proporcionando discussões e sugestões que servirão para crescimento, aprendizado e incentivo à pesquisa.

E a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução dessa dissertação de Mestrado, o meu mais profundo agradecimento.

---

## SUMÁRIO

---

<b>RESUMO</b> .....	10
<b>ABSTRACT</b> .....	11
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	13
2.1. Histórico .....	13
2.2. Características do micro-organismo .....	14
2.3. Principais reservatórios de <i>Campylobacter</i> .....	15
2.4. Campilobacteriose .....	15
2.4.1. Sintomas da campilobacteriose .....	15
2.5. Mecanismo de virulência e patogênese .....	16
2.6. Fontes de contaminação .....	17
2.7. Contaminação de frango por <i>Campylobacter</i> .....	17
2.7.1. Contaminação de frango por <i>Campylobacter</i> , no abatedouro .....	17
2.7.2. Contaminação de frango por <i>Campylobacter</i> , em amostras obtidas no varejo .....	18
2.8. Surtos causados por <i>Campylobacter</i> .....	19
2.9. Efeito do resfriamento e congelamento na sobrevivência de <i>Campylobacter</i> spp .....	20
2.10. Métodos para identificação de <i>Campylobacter</i> .....	22
2.10.1. Métodos imunológicos .....	22
2.10.2. Métodos bioquímicos .....	23
2.10.3. Métodos moleculares .....	24
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	25
3.1. Amostras .....	25
3.2. Pesquisa de <i>Campylobacter</i> .....	26
3.3. Preparação das amostras .....	26
3.4. Confirmação e testes bioquímicos .....	28
3.5. Delineamento Experimental .....	29
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	29
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	31
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	31

---

### LISTA DE ABREVIATURAS

---

<i>C. fetus</i>	<i>Campylobacter fetus</i>
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
CDC	Centers for Disease Control and Prevention / Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CDT	Toxina de Distensão Citoletal
CRLT	Toxina Citoletal de Arredondamento
CVE-SP	Centro de Vigilância Epidemiológica de São Paulo
DTA	Doenças Transmitidas Por Alimento
ELFA	Enzyme Linked Fluorescent Assay / Ensaio Imunoenzimático Fluorescente
EUA	Estados Unidos da América
GBS	Síndrome de Guillain-Barré
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IMA	Instituto Mineiro de Agropecuária
LSMA	Laboratório de Segurança Microbiológica em Alimentos
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
m-CCDA	Ágar Charcoal Cefoperazona Desoxicolato Modificado
OPAS	Organização Pan Americana da Saúde
PCR	Reação da Cadeia da Polimerase
S.I.F.	Serviço de Inspeção Federal
UFC/g	Unidade Formadora de Colônia por grama
VE-DTA	Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos
VNC	Viável mas não cultivável
WHO	World Health Organization / Organização Mundial da Saúde

---

---

**LISTA DE TABELAS**

---

Tabela 1	Características das espécies de <i>Campylobacter</i> nos testes de identificação bioquímica	14
Tabela 2	Municípios dos estabelecimentos sorteados por meso-região e por sistema de fiscalização	26
Tabela 3	Análises de <i>Campylobacter jejuni</i> em 240 amostras de frangos coletadas em abatedouros do estado de Minas Gerais	30

---



---

**LISTA DE FIGURAS**

---

Figura 1	Morfologia de <i>Campylobacter</i> por microscopia eletrônica e por coloração de Gram (aumento 1000 x)	11
Figura 2	Ligação antígeno anticorpo e fluorescência emitida no teste VIDAS® <i>Campylobacter</i>	27
Figura 3	Meso-regiões de acordo com IBGE	31
Figura 4	Pesagem da amostra, homogeneização e amostra dentro do saco Combibag com gerador de microaerofilia e barra de vedação	32
Figura 5	Aquecimento dos tubos e distribuição da amostra nas barretes	33
Figura 6	Equipamento VIDAS, com cones e barretes	33
Figura 7	Crescimento característico de <i>Campylobacter</i> em ágar mCCDA	34
Figura 8	Etapas do procedimento para identificação das provas bioquímicas no VITEK® 2	35

---

---

## RESUMO

---

Com o objetivo de avaliar a qualidade microbiológica das carcaças de frangos de corte produzidas em Minas Gerais, pela avaliação da contaminação pelo micro-organismo *Campylobacter* spp., foram coletadas, pelos serviços de inspeção estadual e federal, 246 amostras de carcaças de frangos de corte, congeladas e resfriadas, provenientes de cinco regiões do estado. A metodologia utilizada para a detecção do micro-organismo foi a técnica imunoenzimática ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) no equipamento VIDAS 30 e a confirmação foi realizada através de testes bioquímicos, no equipamento VITEK 2. Foram detectadas apenas cinco amostras positivas (2,1%) para *Campylobacter* spp. O baixo índice de positividade, provavelmente, ocorreu devido às condições de resfriamento e congelamento a que foram submetidas as amostras, pois o micro-organismo *Campylobacter*, quando em condições de injúria, sofre alterações morfológicas, passando da forma original de espiroqueta móvel para cocóide. Essas formas não são cultiváveis em meios de cultura, porém, são infectivas. Além disso, o método ELFA utilizado para detecção desse patógeno em alimentos apresenta limites de detecção mais altos, o que exige um estágio de enriquecimento para permitir a multiplicação do organismo alvo.

Palavras-chave: carcaça de frango; *Campylobacter*; infecção alimentar

---

## ABSTRACT

---

In order to evaluate the microbiological quality of broiler carcasses produced in Minas Gerais State, by the evaluation of contamination by microorganism *Campylobacter* spp., were collected, by official inspection services, 246 samples of broiler carcasses, frozen and chilled, from the five regions of the Minas Gerais State. The methodology used to detection of microorganism was the ELFA technique (Enzyme Linked Fluorescent Assay) using the equipment VIDAS 30 and the confirmation was performed by biochemical tests, using the equipment VITEK 2. Only five samples (2.1%) were positive to *Campylobacter* spp. The low rate of positivity was probably due to the cooling and freezing conditions at which the samples were submitted, because when the microorganism *Campylobacter* enters injury conditions its cell morphology changes from helical to coccoidal. The coccoid form is considered viable but not culturable but can be infective. Furthermore, the ELFA method used to detect this pathogen in food has higher detection limits, which requires an enrichment stage to allow for the multiplication of the target organism.

Keywords: chicken carcasses, *Campylobacter*, food borne infection

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente o Brasil é o terceiro maior produtor de carne de frango do mundo, ficando atrás apenas dos EUA e da China. Em 2010, a produção brasileira foi de 12,23 milhões de toneladas, 11,38% a mais que no ano de 2009. Esse crescimento foi impulsionado pelo aumento do consumo de carne de frango e pela expansão nas exportações. O Brasil exportou 3,81 milhões de toneladas de carne de frango, ocupando o primeiro lugar mundial nesse quesito, o que representa 31% do volume total produzidos. Os 69% restantes foram destinados ao mercado interno onde o consumo per capita foi de 44 quilogramas (UBA, 2011).

A carne de frango é uma excelente fonte de proteínas, vitaminas do complexo B e de minerais. Porém, devido suas características intrínsecas, como composição química, elevada atividade de água e pH próximo da neutralidade, é um ótimo meio para desenvolvimento de micro-organismos. Portanto, cuidados durante seu processamento são necessários para que não haja riscos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) (Delazari, 1998; Cardoso e Araujo; 2001).

As DTA são conhecidas desde épocas muito remotas e cerca de 250 agentes biológicos envolvidos em surtos já foram identificados. Esses agentes podem causar diversas doenças, que se manifestam de forma isolada ou associada, tais como as doenças diarreicas, neurológicas, renais, hemolíticas, ictéricas, alérgicas, respiratórias e sistêmicas. A forma diarreia é a manifestação clínica mais comum das DTA e, devido sua elevada incidência ou por ser considerada ainda um fato “normal”, tanto por parte da população como dos profissionais de saúde, representa um desafio para o seu registro e controle. Assim, a subnotificação das DTA tem sido o fator principal para impedir o

conhecimento do seu verdadeiro impacto na população, dificultando, conseqüentemente, o conhecimento dos alimentos e micro-organismos envolvidos (CVE/SES-SP, 2002).

Dentre os micro-organismos envolvidos em surtos de toxi-infecções relacionados à carne de frango, podem ser citadas espécies do gênero *Campylobacter* e, mais precisamente, as espécies termofílicas como *C. jejuni* e *C. coli*. que estão relacionadas como agentes causadores de problemas gastroentéricos em humanos. A carne de frango e seus derivados são considerados o principal veículo transmissor de *Campylobacter* para o homem (Butzler, 2004).

A campilobacteriose é uma doença com manifestações gastrintestinais que, em cerca de sete dias, tende a manifestar uma melhora espontânea do quadro clínico do paciente (Cocker et al., 2002). Todavia, em alguns casos, podem ocorrer graves sequelas da infecção, como a Síndrome de Guillain-Barré, doença que afeta o sistema nervoso periférico, causando desmielinização de neurônios.

Um número muito pequeno de *Campylobacter* (menos de 500 células) pode causar doenças em seres humanos. Mesmo que uma gota de caldo de carne crua de frango pode infectar uma pessoa. Uma maneira de se infectar é cortar carne de aves em uma tábua de corte, e depois usar a mesma tábua sem lavar para preparar legumes ou outros alimentos crus ou levemente cozidos (Butzler, 2004).

A incidência desse micro-organismo na carne pode variar de acordo com as condições de manejo durante a criação dos animais, com os cuidados higiênicos nas operações de abate e com a posterior manipulação das carnes (Bourgeois, et al., 1994). No Brasil, são poucos os relatos sobre a veiculação das espécies de

*Campylobacter* através de produtos de origem animal e sobre o envolvimento delas nas enfermidades transmitidas por alimentos. A escassez deste diagnóstico possivelmente pode ser devida às condições de isolamento do agente, que por se tratar de bactéria microaerófila, necessita de metodologia especial.

O efeito do resfriamento e do congelamento na sobrevivência de *C. jejuni* ainda não foram bem elucidados. Alguns estudos confirmam uma redução significativa na porcentagem de carcaças positivas para *C. jejuni* após o congelamento (Stern et al., 1984, Alter et al., 2005). O congelamento pode reduzir significativamente a sobrevivência de *Campylobacter*, uma vez que, diversos fatores, incluindo a formação do gelo e a desidratação, levam à injúria do micro-organismo, além do estresse oxidativo que pode induzir a morte da célula (Park, 2002). No entanto, um número significativo de *C. jejuni* pode sobreviver ao resfriamento e congelamento, desta maneira deve ser alertado que estes tratamentos sozinhos não garantem a segurança do alimento, com respeito a este micro-organismo (Bhaduri e Cottrell, 2004; Georgsson et al., 2006; Rosenquist et al., 2006).

Com base nestes aspectos, este trabalho teve como objetivo avaliar o Isolamento de *Campylobacter jejuni* em carcaças de frango coletadas em Indústrias frigoríficas de Minas Gerais

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Histórico

Os primeiros registros de uma possível infecção por *Campylobacter* ocorreram na Alemanha, em 1886, e foram relatados por Theodor Escherich. Nestes relatos, foi descrito que em 35 de 72 crianças com diarreia foram encontradas bactérias em

forma de espiral que, a princípio, foram denominadas de *Vibrio felinus* (Butzler, 2004).

Porém, apenas em 1909 é que ocorreu a primeira identificação da bactéria, feita por McFadyen e Stockman, que observaram que o micro-organismo causador de diarreias em humanos era semelhante a um *Vibrio* reconhecido em episódios de aborto em ovelhas. Em 1918, micro-organismos similares foram identificados por Smith ao examinar fetos bovinos abortados e, em razão de sua morfologia, foram classificados como pertencentes ao gênero *Vibrio*, recebendo como primeira denominação, *Vibrio fetus* (Moore, 2005). Em 1931, Jones et al., descreveram a espécie *Vibrio jejuni* como causa da disenteria em bezerros. As lesões intestinais causadas por esta bactéria foram observadas principalmente na região do jejuno. Em 1946, Levy descreveu um surto de diarreia em humanos e verificou a presença de formas curvas e espiraladas de vibriões em amostra de fezes e de sangue (Butzler, 2004).

Finalmente, no ano de 1963, o gênero *Campylobacter*, que significa bactéria encurvada, foi proposto por Sebald e Véron. Estes pesquisadores englobaram nesse gênero as bactérias antes denominadas de *Vibrio fetus*, *Vibrio jejuni* e *Vibrio coli*, e verificaram que estes micro-organismos apresentavam características muito diferentes do *Vibrio* spp., tanto no metabolismo quanto na composição dos pares de bases do material genético (Moore, 2005).

Em 1966, com base em estudos filogenéticos, Veron e Chatelaine, propuseram a inclusão do gênero *Campylobacter* na família Spirillaceae. Em 1973, estes mesmos autores consideraram as bactérias *V. jejuni* e *V. coli* como duas espécies diferentes denominando-as

*Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*, respectivamente (Engberg, 2006).

Na década de 1980, Krieg (1984) sugeriu que o gênero *Campylobacter* não fosse mais incluído na família *Spirillaceae*, por apresentar características filogenéticas incompatíveis. Concordantes com estas hipóteses, Vandamme e Del Ley (1991) propuseram a criação da família *Campylobacteriaceae*, à qual pertencem os gêneros *Arcobacter* e *Campylobacter* (Engberg, 2006).

Na atualidade, o gênero *Campylobacter* engloba 17 espécies, cinco subespécies e três biótipos. As espécies mais frequentemente isoladas de animais e de humanos são *C. jejuni* subsp. *Jejuni*, *C. jejuni* subsp. *doylei*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* e *C. helveticus* (Foster et al., 2004).

## 2.2. Características do micro-organismo

O gênero *Campylobacter* (do grego *Kampulos*=curvo e *bacter*=bastão) é constituído de bastonetes curvos em forma de vírgula, "S", asa de gaivota ou espiral, suas dimensões variam entre 0,2 a 0,9 µm de largura por 0,5 a 5 µm de comprimento.

São bactérias Gram-negativo, microaerófilas, não hemolíticas, não esporuladas e as colônias frequentemente não são pigmentadas (Fig. 1). Em culturas mais antigas, ou sob condições de cultivo adversas, as células de *Campylobacter* spp. podem adquirir formas esféricas ou cocóides, o que representa um estágio degenerativo de seu ciclo de vida, sem levar à perda de seu poder infectante (Nachamkin, 2007). A transição da morfologia celular vibrióide para uma forma cocóide ocorre na fase estacionária do crescimento e, durante esse processo, não são detectáveis por metodologias convencionais estando na forma viável, mas não cultivável (VNC) (Bovill e Mackey, 1997).

As espécies do gênero *Campylobacter* são móveis por possuírem um flagelo polar em uma ou em ambas as extremidades, apresentando movimento em forma de "saca-rolha", ou "vai e vem". São organismos sensíveis ao oxigênio, microaerófilos, requerendo de 3 a 5% de oxigênio e de 2 a 10% de dióxido de carbono e temperatura preferencial de 42°C durante um período de 48 horas para o seu desenvolvimento. Estes micro-organismos não se desenvolvem em meios com pH abaixo de 4,9 (Humphrey, 2007).

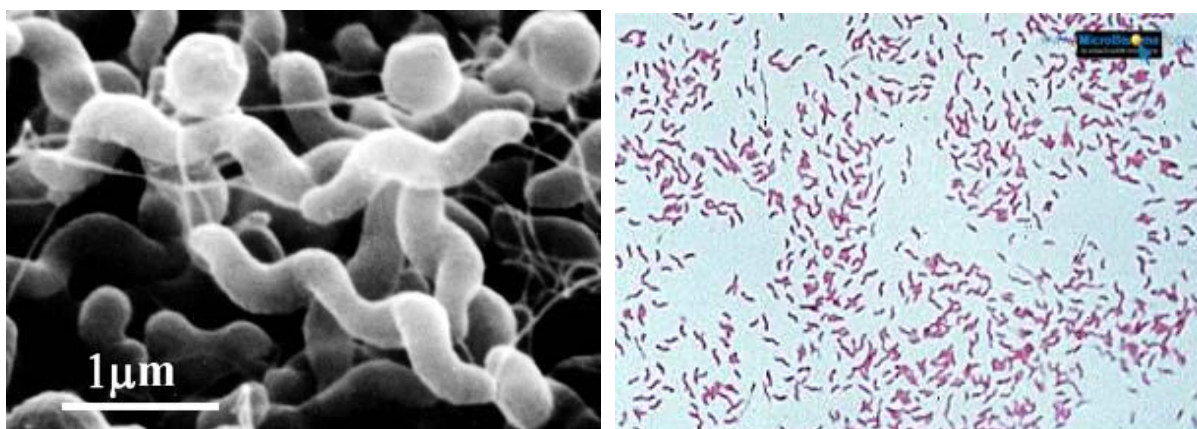


Figura 1. Morfologia de *Campylobacter* por microscopia eletrônica e por coloração Gram (aumento 1000x). (Fonte: <http://www.pref.aichi.jp/eiseiken/67f/microbiol.html>)

Estas espécies não utilizam carboidratos como fonte de carbono e não fermentam nem oxidam açúcares, devido a isso, obtêm energia a partir de aminoácidos ou componentes intermediários do ciclo do ácido carboxílico. Dentre o gênero *Campylobacter* existem espécies que são catalase positivo e outras negativo (Tab. 1), sendo que as principais espécies, *C. coli* e *C. jejuni* são catalase positivo (Jay, 2005).

Micro-organismos *Campylobacter* spp. são oxidase positivo, indol negativo e redutores do nitrato, exceto o *Campylobacter jejuni* ssp. *doylei*. Este gênero não produz hemólise e é extremamente sensível ao cloreto de sódio (essa sensibilidade varia de acordo com a temperatura) (Franco e Landgraf, 1996).

Tabela 1. Características das espécies de *Campylobacter* nos testes de identificação bioquímica

Ensaio	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	<i>C. hyointestinalis</i>	<i>C.</i> <i>upsaliensis</i>
Crescimento a 25°C	-	±	-	-	+	D	-
Crescimento a 35-37°C	+	+	+	+	+	+	+
Crescimento a 42°C	+	±	+	+	D	+	+
TSI, H <sub>2</sub> S	-	-	D	-	-	+(a)	-
Catalase	+	+	+	+	+	+	-
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+
Utilização de glicose	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólise do hipurato	+	+	-	-	-	-	-
Resistência ao ácido nalidíxico	S <sup>(b)</sup>	S	S	R	R	R	S
Resistência a cefalotina	R	R	R	R	S <sup>(c)</sup>	S	S

+: 90% ou mais linhagens são positivas. -: 90% ou mais linhagens são negativas. D: 11-89% de linhagens são positivas. R: resistente. S: susceptível. (a): pequenas quantidades de H<sub>2</sub>S são encontradas em culturas frescas de *C. hyointestinalis* (com menos de três dias). (b): resistência ao ácido nalidíxico já foi observada em *C. jejuni*. (c): resistência a cefalotina já foi observada em *C. fetus* subsp. *Fetus* (Hunt et al., 2001).

*Campylobacter* spp. são considerados micro-organismos fastidiosos, pois sua multiplicação ocorre de forma lenta. Acredita-se que esta característica se deve ao pequeno tamanho do seu genoma (1600 Kb a 1700 Kb, compreendendo em tamanho a 30% do genoma de *Escherichia coli*). Esta característica também pode estar relacionada ao fato de não fermentarem carboidratos (Vandamme, 2000). Por possuir o genoma relativamente pequeno, o gênero *Campylobacter* apresenta um número menor de genes comparados aos outros micro-organismos patogênicos e isto reflete na necessidade de um meio complexo para seu desenvolvimento, o que

dificulta a sobrevivência fora do ambiente intestinal dos animais de sangue quente (Bhunja, 2008).

As espécies patogênicas para o ser humano são classificadas como termofílicas, por apresentarem temperatura ótima de multiplicação de 42°C, sendo que as temperaturas máximas e mínimas giram em torno de aproximadamente 30°C e 46°C, respectivamente. São micro-organismos rapidamente destruídos pelo calor, não sobrevivendo aos processos térmicos utilizados no preparo de alimentos (Humphrey, 2007).

Dentre as espécies termofílicas, *C. jejuni* ssp. *jejuni*, *C. coli* e *C. lari* são consideradas as espécies mais importantes como patógenos para o homem. *Campylobacter jejuni* se destaca como a principal espécie causadora de gastroenterites em humanos (CDC, 2012).

### 2.3. Principais reservatórios de *Campylobacter*

Os micro-organismos da espécie *Campylobacter* são encontrados no trato gastrointestinal de uma grande variedade de animais domésticos e silvestres (bovinos, suínos, gatos, cães, roedores e, principalmente, aves). Os pombos, gaiivotas, pardais, patos, perus e, especialmente, o frango, são considerados reservatórios primários de *C. jejuni*. Sabe-se que nas aves, a colonização é geralmente assintomática, podendo, a bactéria, ser encontrada em níveis de  $10^9$  Unidades Formadoras de Colônias por grama (UFC/g) de fezes (Keener, 2004). A alta incidência de *C. jejuni* em frangos (frequência de 30 a 100%) pode ser reflexo da sua temperatura ótima de multiplicação, uma vez que o trato intestinal das aves tem uma temperatura superior à dos mamíferos, ou seja, cerca de 42 °C (Blaser e Reller, 1981; Schoeni e Doyle, 1992; Dickins et al., 2002; Forsythe, 2002; Park, 2002).

### 2.4. Campilobacteriose

A campilobacteriose é a causa mais comum de doença diarreica nos Estados Unidos da América (EUA). Segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), são notificados aproximadamente quinze casos de campilobacterioses por ano, para cada 100.000 habitantes. Muitos casos não são diagnosticados ou relatados, podendo-se estimar que esta doença afete mais de 2,4 mil pessoas por ano. Acredita-se que o número de casos esteja subestimado, porque muitos hospitais não fazem cultura de rotina para o diagnóstico deste agente (CDC, 2010).

A campilobacteriose também é a doença de origem alimentar mais comum na Dinamarca, onde foram registrados, em

2003, 3.542 casos, com 90% das infecções sendo causadas por *C. jejuni*. Em Singapura, as principais bactérias isoladas em 7.344 pacientes com diarreia foram: *Salmonella* spp. (10,1%); *Campylobacter* spp. (1,2%); *Shigella* SP. (1,1%); *Vibrio parahaemolyticus* (0,8%) e *Vibrio cholerae* (0,2%) (Ranthum, 2008).

*C. jejuni* e *C. coli* são responsáveis por 95% dos casos de campilobacteriose em humanos. A maioria dos casos de campilobacteriose são esporádicos, e os surtos são incomuns. Porém, a infecção pode ocorrer pela ingestão de menos de 500 UFC (Black et al., 1998; Keener, 2004 e Park, 2002; Butzler, 2004).

#### 2.4.1. Sintomas da campilobacteriose

A sintomatologia da campilobacteriose é clinicamente semelhante à causada por diversos outros patógenos entéricos. Esta se caracteriza por diarreia líquida acompanhada de febre baixa e dores abdominais. Em alguns casos, a febre pode ser alta e as fezes podem conter sangue e muco. Outros sintomas são náuseas, dor de cabeça, indisposição, vertigens e dor muscular, sendo que raramente ocorrem vômitos. Mas o agravante é a baixa dose infectiva, estimando-se que a ingestão de 400 a 500 células possa provocar a doença. A fase aguda da diarreia dura dois ou três dias, mas as dores abdominais podem persistir por até três semanas (Nachamkin, 2007). Segundo Skirrow e Blaser (2000), os pacientes se recuperam em uma semana e apenas 20% dos casos necessita de terapia com antibióticos.

Apesar da sintomatologia predominante da campilobacteriose ser a diarreia, esta infecção pode também causar problemas muito graves como a Síndrome de Guillain-Barré (GBS), a artrite reativa e a septicemia em indivíduos imunossuprimidos (Mead, 2004).

A GBS é caracterizada como uma doença autoimune e pós-infecciosa que causa destruição da bainha de mielina dos nervos periféricos, levando a paralisia neuromuscular aguda, podendo



comprometer os músculos da respiração e causar a morte (Takahashi et al., 2005). O desenvolvimento da GBS ocorre através de um mecanismo de mimetismo antigênico entre os lipo-oligosacarídeos da bactéria e os gangliosídeos da membrana dos nervos periféricos (Guerry, 2008). Quando *C. jejuni* infecta o corpo humano, uma das respostas imunes é a produção de anticorpos específicos para a estrutura desses lipo-oligosacarídeos. No entanto, o próprio corpo humano contém compostos com exatamente a mesma estrutura molecular e são encontrados na membrana celular das células nervosas humanas. Assim, a estrutura do lipo-oligosacarídeo do *C. jejuni* imita a estrutura molecular do gangliosídeo, e os anticorpos produzidos em reação à membrana da bactéria também reagem contra a membrana das células nervosas. O resultado é o dano do nervo que evolui em paralisia característica da GBS (Rees, 1995).

A GBS pode afetar duas em cada 100.000 pessoas e é, atualmente, a causa mais comum de paralisia neuromuscular aguda no mundo. Em um estudo realizado no Japão, 22 dos 159 pacientes (14%) com GBS haviam tido infecção por *C. jejuni* (Hughes, 2004). Em outro estudo feito na França, 58 dos 264 pacientes (22%) com GBS tiveram a doença após infecção por *C. jejuni* (Sivadon et al., 2005).

Em outros casos, a infecção por *C. jejuni* pode desencadear a Síndrome de Miller Fisher, que se caracteriza por perda dos reflexos oculomotores e relativa perda da força nas extremidades e tronco. O processo é mediado por anticorpos-autoimunes contra a mielina do sistema nervoso (Overell e Willison, 2005).

Complicações decorrentes de enterite não são comuns, embora tenham sido relatados casos de bacteremias, septicemias, artrite reativa, endocardites, infecção do trato urinário, peritonites, meningites e abortos após a infecção intestinal (Butzler, 2004). A taxa de letalidade é de 0,1 óbitos por mil casos. Fatalidades são raras em indivíduos saudáveis, mas costumam ocorrer em

pacientes com câncer ou outras doenças debilitantes (WHO, 2009).

Para estabelecer uma infecção suficiente para causar a doença, o micro-organismo precisa sobreviver ao estresse fisiológico associado a ambientes externos e internos, tais como flutuações de temperatura, variações de pH, diferentes tipos de hospedeiro, imunidade do hospedeiro, estresse oxidativo e fornecimento de nutrientes limitado. (Guerry, 2007).

Praticamente todas as pessoas infectadas com *Campylobacter* irão se recuperar sem a necessidade de nenhum tratamento específico. Em algumas circunstâncias, os antibióticos devem ser usados. Estas incluem febre alta, fezes sanguinolentas, doenças prolongadas (sintomatologia com duração mais longa que duas semanas) gestação, infecção por HIV e outros estados imunocomprometidos (Allos, 2001). Os pacientes devem beber líquidos em abundância enquanto a diarreia persistir. Em casos mais graves, antimicrobianos como eritromicina, ciprofloxacina podem ser usados (Snelling et al., 2005).

## **2.5. Mecanismo de virulência e patogênese**

O mecanismo pelo qual *Campylobacter* causa doença em humanos ainda não está esclarecido. Porém, são reconhecidos dois fatores principais de virulência: a adesão e a invasão de células epiteliais do hospedeiro com produção de toxinas.

O passo inicial para que ocorra a infecção por *Campylobacter* é a adesão. Elementos estruturais como o flagelo, algumas proteínas de membrana externa e o lipopolissacarídeo permitem a travessia do muco intestinal e adesão da bactéria à célula epitelial. O formato curvo-espiralado da célula e o movimento típico em “sacacrolha” do *Campylobacter* facilitam o contato com o epitélio do intestino (Fernandez, 2008).

A invasão celular tem importante papel na patogenicidade de *Campylobacter*. A habilidade e a intensidade da invasão

parecem ser linhagem dependente, como mostram os estudos *in vitro* realizados com diferentes linhagens celulares como a Hep-2 (células de carcinoma de laringe humana), a HeLa (célula de carcinoma de útero humano) e também células do tecido epitelial intestinal humano INT-407. Acredita-se que microfilamentos de actina e a formação de microtúbulos seriam responsáveis pela internalização. Além disso, certas proteínas sintetizadas por *Campylobacter*, após contato com a célula eucariótica, poderiam facilitar a internalização da bactéria promovendo a inflamação e a bacteremia (Ketley, 1997; Van Vliet e Ketley, 2001; Fernandez, 2008).

A atividade tóxica deste micro-organismo vem sendo estudada, pois se acredita que somente a invasão das células hospedeiras não seria capaz de causar os efeitos citopáticos observados nas enterites (Van Vliet e Ketley, 2001).

A toxina de distensão citoletal (CDT) já foi caracterizada e detectada em diversas amostras de *Campylobacter* (Wassenaar et al., 1997; Purdy et al., 2000). Seu papel como fator de virulência ainda não está elucidado, mas acredita-se que haja o envolvimento da CDT no processo de diarreia causando alteração nas células da cripta epitelial, levando a uma erosão temporária e subsequente perda da função de absorção (Van Vliet e Ketley, 2001).

Outra citotoxina bastante estudada é a toxina citoletal de arredondamento (CRLT), que recebe esse nome em função do aspecto arredondado que confere às células hospedeiras (Wassenaar et al., 1997).

Outro fator de virulência que parece ter relação com *C. jejuni* é a produção de hemolisinas. A síntese de hemolisinas, entretanto, parece ser dependente da presença de quelantes de ferro como o cálcio, que auxilia a ligação da toxina na membrana dos eritrócitos (Barateia et al., 2001).

## 2.6. Fontes de contaminação

Todos os alimentos oriundos de animais contaminados por *Campylobacter* são considerados veículos potenciais de transmissão do micro-organismo. Partindo dessa premissa, os cuidados higiênicos e tecnológicos durante a evisceração de animais de abate são muito importantes. É provável que o controle da campilobacteriose humana melhore com o domínio da infecção dos animais e com a prevenção da contaminação de produtos alimentícios de origem animal (Pardi et al., 1995). Além disso, o cozimento adequado dos alimentos potencialmente contaminados (por exemplo, a carne de frango) e a pasteurização do leite e de produtos lácteos são essenciais para a prevenção da campilobacteriose (Strohl et al., 2004).

O maior número de casos esporádicos ocorre, por contaminação cruzada durante a manipulação de carne de frango crua ou pelo consumo da carne mal cozida (Keener, 2004).

## 2.7. Contaminação de frango por *Campylobacter*

### 2.7.1. Contaminação de frango por *Campylobacter*, no abatedouro

Carvalho et al. (2002) pesquisaram a bactéria *Campylobacter jejuni* nas diferentes etapas da linha de abate de um abatedouro avícola localizado na região nordeste do estado de São Paulo. A água de lavagem das carcaças após a evisceração mostrou uma elevada taxa de contaminação por *Campylobacter*, sendo 61,3% das amostras positivas para este micro-organismo.

Nas carcaças examinadas em abatedouro, a frequência de isolamento de *Campylobacter* variou entre 15% a 78,5% (Lindblad et al., 2006; Arsenault et al., 2007; Atanassova et al., 2007; Ghafir et al., 2007; Son et al., 2007;). Esta contaminação foi mais elevada na etapa do pré-chiller, conforme verificado por Son et al. (2007), que encontraram o micro-organismo em 100% das carcaças analisadas. Aves, na etapa de pré-escaldagem, também apresentaram elevada

frequência da bactéria, sendo esta detectada em 92% das carcaças de frango.

Franchin et al. (2007) pesquisaram a frequência de *Campylobacter* termofílico em carcaças de frango durante o processo de abate em um abatedouro do sul do Brasil. Dentre as 335 amostras analisadas, 84,7% foram positivas para *Campylobacter* nas carcaças após o “chiller”.

Kuana et al. (2008), em Porto Alegre, pesquisaram *Campylobacter* spp. em carcaças de frango de corte antes da imersão no “chiller” e encontraram valores superiores a 97,9% de amostras positivas. Os mesmos autores avaliaram também a presença deste micro-organismo na produção de 22 lotes comerciais de frangos de corte e detectaram a bactéria em 81,8% das amostras de conteúdo cecal, 80,9% das amostras de fezes e 80,4% das amostras de “swab” cloacal.

A elevada contaminação das carcaças de aves nas etapas de pré-escaldagem e pré-chiller, pode ser explicada pela probabilidade de ruptura do intestino em fases anteriores resultando em contaminação destas (Son et al., 2007). Dentre as espécies, *C. jejuni* e *C. coli* foram as mais encontradas em amostras de carcaças de frango de abatedouro.

Atanassova et al. (2007), na Alemanha, examinaram 144 amostras de peru na planta processadora após a desossa e encontraram uma prevalência de *Campylobacter* spp. de 29,2%. Após o isolamento da bactéria, a diferenciação bioquímica mostrou que *C. jejuni* foi encontrado em 61,9% das amostras, seguido de *C. fetus* (23,8%) e *C. coli* (14,3%).

### **2.7.2. Contaminação de frango por *Campylobacter*, em amostras obtidas no varejo**

A carne de frango e seus derivados são considerados os principais veículos transmissores de *Campylobacter* para humanos. A elevada incidência deste micro-organismo nas aves vivas têm merecido atenção especial por parte de alguns pesquisadores (Butzler, 2004). As

porcentagens de lotes de frango colonizados com *Campylobacter* variam muito entre os países e esta variação pode ser devido às diferentes técnicas de amostragem e isolamento (Jorgensen et al., 2000; Mead, 2004; Newell, 2004).

A ocorrência de espécies termotolerantes de *Campylobacter* em 200 amostras de frango foi de 44,5% em um estudo realizado no Peru, sendo *C. jejuni* a espécie mais isolada, correspondendo a 21,5% das amostras, seguida de *C. coli* (14%) e *C. lari* (9%) (Tresierra-Ayala et al., 1995).

Em um trabalho realizado no sul do Chile 25,7% das 300 amostras analisadas estavam contaminadas com *Campylobacter*, sendo que 76,6% eram *C. jejuni* e 23,4% *C. coli* (Fernandez e Torres, 2000).

Um estudo feito no Brasil avaliou a presença de *C. jejuni* em 48 amostras de diversos produtos derivados de carne bovina, suína, frango, pato, ovos e leite obtidos em estabelecimentos comerciais da região de São Gonçalo, Rio de Janeiro. Foi isolado *C. jejuni* em 64,8% do total das amostras analisadas, sendo que 100% das amostras de coxa e fígado resfriadas de frango estavam contaminadas. Não houve isolamento nas amostras de carne suína congelada, fígado bovino resfriado, leite de cabra e queijo frescal (Gonçalves e Franco, 2002).

Tanto Dominguez et al. (2002) como Jorgensen et al. (2002) estudaram a ocorrência de *Campylobacter* spp. e de *Salmonella* spp. em carne de frango na Inglaterra e Espanha e observaram que a frequência de contaminação foi maior para *Campylobacter*, mostrando a importância das aves como reservatórios do micro-organismo.

Segundo Dominguez et al. (2002), na Espanha, das 198 amostras de carne de frango obtidas no varejo encontrou-se *Salmonella* spp. em 71 (35,83%) e *Campylobacter* spp em 98 (49,5%) .

Porém, Jorgensen et al. (2002) isolaram, na Inglaterra, 25% *Salmonella* spp. e 83% de

*Campylobacter* das 241 amostras de carnes de frango do varejo.

Entre as pesquisas realizadas com cortes de frango do varejo, na Itália e Japão, Pezzotti et al. (2003) e Sallam (2007) encontraram as maiores taxas de contaminação por *Campylobacter* termofílico. Na Itália, Pezzotti et al. (2003) encontraram o micro-organismo em 81,3% das 155 amostras de carne de frango do varejo e Sallam (2007), no Japão, observou que 110 (64,7%) de 170 amostras de frango estavam contaminadas por *Campylobacter*.

Nos Estados Unidos, estudos têm mostrado que 60 a 80% das carcaças de frango estão contaminadas com *Campylobacter*, com contagens variando de 10.000 a 100.000 micro-organismos por carcaça (Kenner, 2004).

Paulsen et al. (2005) analisaram 461 amostras de carne de aves, suína e bovina e seus derivados adquiridas em supermercados e lojas de conveniências na Áustria. *Campylobacter* spp. foi isolado em 24,84% das amostras de aves, 4,76% de suínos e em bovinos *Campylobacter* não foi isolado.

Scherer et al. (2006), na Alemanha, também encontraram elevada percentagem (65,7%) de *Campylobacter* spp. em 140 amostras de coxa de frango.

Parisi et al. (2007), no sul da Itália, avaliaram 30 amostras de carne de frango do varejo e detectaram *Campylobacter* em 22 (76%) amostras. Em outro trabalho realizado na Itália por Pepe et al. (2009) foi demonstrada a presença de *Campylobacter* em 37,1% das amostras de carcaças de frango.

Segundo Bardon et al. (2009), na República Tcheca, a ocorrência de *Campylobacter* em amostras de frango aumentou nos últimos anos, em 2006 a frequência de *Campylobacter* era de 43%, aumentando para 46% em 2007 e 50% em 2008.

Dominguez et al. (2002), estudaram na Espanha, 198 amostras de carne de frango obtidas no varejo encontrou-se *Salmonella*

spp. em 71 (35,83%) e *Campylobacter* spp. em 98 (49,5%) amostras. A frequência de contaminação foi maior para *Campylobacter*. O mesmo trabalho foi realizado por Jorgensen et al. (2002) na Inglaterra, e das 241 amostras de carnes de frango do varejo *Salmonella* spp. foi isolada de 25% das amostras e *Campylobacter* spp. foi isolado de 83% das amostras, mostrando a importância das aves como reservatórios do micro-organismo.

Muitos esforços têm sido feitos no sentido de diminuir a presença de *Campylobacter* na carne de frango, porém, o resultado obtido tem sido limitado, pois são poucas as informações conclusivas de como esse micro-organismo contamina os lotes comerciais de frango. Além disso, ainda não existem métodos efetivos de controle de *Campylobacter* nas granjas (Kenner, 2004).

## **2.8. Surtos causados por *Campylobacter***

Em agosto de 2003, foi registrado o último surto relatado de doença de origem alimentar causado por *Campylobacter* em São Paulo, de acordo com dados do CVE-SP (CVE, 2003). Esse surto ocorreu na cidade de Santo André e envolveu duas pessoas que haviam ingerido carne de frango.

Em Madri, na Espanha, em maio de 2003, foi identificado um surto de gastroenterite causada por *Campylobacter* em uma escola. Oitenta e um casos foram identificados em um total de 253 pessoas avaliadas. O estudo revelou que um veículo incomum, uma sobremesa a base de creme feita com leite UAT, foi associado com a doença. O creme foi contaminado com *Campylobacter jejuni* proveniente de frango cru preparado no dia anterior na mesma cozinha (Jiménez et al., 2005).

As estimativas mostraram que no ano 2000, na Inglaterra e no País de Gales, ocorreram aproximadamente 360.000 casos de infecção por *Campylobacter*, totalizando 27% das doenças de origem alimentar (Adak et al., 2005). Na Holanda, foram estimados 80.000 casos de

campilobacteriose por ano e os custos com a doença chegaram a 21 milhões de euros (De Wit et al., 2001; Havelaar et al., 2005).

Em maio de 2005, na cidade de Copenhage, Dinamarca, ocorreu um surto causado por *Campylobacter jejuni* e relacionado ao consumo de prato à base de frango por empregados de uma empresa. Este foi o primeiro grande surto de campilobacteriose identificado e associado a um alimento contendo carne de frango na Dinamarca (Mazick et al., 2006).

No ano de 2008, 18.499 casos de infecção por patógenos intestinais foram confirmados em laboratório nas áreas pesquisadas pelo FoodNet, sendo que o número de infecções causadas pelo gênero *Campylobacter*, para cada 100.000 habitantes, foi de aproximadamente 5.825, ficando atrás somente da *Salmonella* que afetou 7.444/ 100.000 habitantes (MMWR, 2008).

Um grande surto causado por *Campylobacter jejuni* ocorreu no Canadá, em junho de 2007. Água e lama contaminadas com fezes de animais foram ingeridas pelos participantes de uma corrida de bicicleta e foi a provável causa. O surto afetou mais de 200 dos 785 participantes da corrida de 67 km em British Columbia (Stuart et al., 2008).

Um grande surto de campilobacteriose causado por alimentos e envolvendo um grande número de pessoas, foi relatado ao CDC em outubro de 2007 e foi relacionado ao consumo de queijo fresco (MMWR, 2007). Nesse episódio, 101 pessoas consumiram queijo produzido a partir de leite não pasteurizado em uma comunidade rural no Kansas. Dentre as 101 pessoas que consumiram o queijo, 67 (66%) adoeceram. *Campylobacter jejuni* foi isolado de duas pessoas doentes que apresentaram padrões genéticos indistinguíveis através de eletroforese de campo pulsado. Uma cepa de *Campylobacter jejuni* isolada de uma terceira pessoa doente apresentou-se muito semelhante às outras duas. Embora todas as amostras de queijo tenham se mostrado negativas para *Campylobacter*, os

resultados de investigação epidemiológica mostraram associação entre a doença e o consumo do mesmo.

## **2.9. Efeito do resfriamento e congelamento na sobrevivência de *Campylobacter* spp**

A redução da temperatura prolonga a vida útil dos alimentos, devido ao aumento no tempo de refrigeração, retardando a multiplicação microbiana. A refrigeração evita a multiplicação dos micro-organismos termófilos, e de muitos mesófilos. A diminuição da temperatura de um alimento abaixo do seu ponto de congelamento faz com que parte da água que o alimento contém mude de estado, formando cristais de gelo. A imobilização da água na forma de gelo e o aumento na concentração de solutos reduzem a atividade de água impedindo a multiplicação dos micro-organismos (Fellows, 1994).

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

O efeito do resfriamento e do congelamento na sobrevivência do *Campylobacter* spp. ainda não está bem elucidado. O *C. jejuni* apresenta uma temperatura ótima de multiplicação entre 37 a 42°C e não cresce

em temperaturas inferiores a 30°C, porém apresenta atividade biológica a 4 °C, e pode sobreviver na água por diversas semanas a esta temperatura (BAM, 2001; Bhaduri e Cottrell, 2004). Alguns estudos confirmaram uma redução significativa na porcentagem de carcaças positivas para *C. jejuni* após o congelamento (Stern et al., 1984; Alter et al., 2005). Diversos fatores, incluindo a formação do gelo e a desidratação da célula podem levar à injúria do micro-organismo, além disto, o estresse oxidativo pode levar a morte da célula, reduzindo significativamente a sobrevivência do *Campylobacter* ao congelamento (Park, 2002).

Lee et al. (1998) comprovaram que *C. jejuni* é hábil em sobreviver por longo período (56 dias) armazenado a -20 °C, temperatura da maioria dos freezers domésticos. Apesar da redução de aproximadamente 5 Log<sub>10</sub> nas contagens de UFC/g por plaqueamento direto, no entanto, *C. jejuni* permaneceu viável, mesmo em baixas contagens.

Bhaduri e Cottrell (2004) avaliaram a sobrevivência do *C. jejuni* durante o resfriamento a 4 °C e congelamento a -20 °C em amostras de frango irradiadas e artificialmente contaminadas. A refrigeração causou um pequeno decréscimo nas contagens somente após 3 e 7 dias, indicando que esta bactéria pode sobreviver ao período de estocagem utilizado durante a comercialização de carnes resfriadas. As amostras congeladas apresentaram um declínio significativo na contagem de *C. jejuni*, porém, células viáveis foram detectadas após 14 dias de estocagem. Indicando que uma porção significativa de *C. jejuni* sobrevive ao resfriamento, congelamento e armazenagem combinada de resfriamento e congelamento. Esses resultados alertam que estes tratamentos sozinhos não garantem a segurança do alimento. As amostras foram analisadas em ágar tripticase soja contendo sangue e Ágar Charcoal Cefoperazona Desoxicolato Modificado (m-CCDA).

Um estudo feito no País de Gales, entre março a dezembro de 2003, mostrou que o

congelamento reduziu a contagem inicialmente, mas não prejudicou a recuperação do *Campylobacter* nas amostras de carne de frango analisadas. Neste estudo 73,5% das 544 amostras de carne de frango fresca e 71,9% das 192 amostras congeladas analisadas estavam contaminadas com *Campylobacter* (Meldrum, 2005).

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* e armazenadas a -20°C por 31, 73, 122 e 220 dias. Após 31 dias houve uma redução significativa ( $p \leq 0,05$ ) na contagem do micro-organismo em comparação com a amostra analisada logo após o abate. Após 73 dias esta contagem estabilizou, não havendo redução significativa até o período final. Os métodos de análise utilizados neste trabalho foram plaqueamento direto em Ágar m-CCDA e a técnica de NMP com caldo preston. Descrito em detalhes por Line et al. (2001).

Em 1999 a Islândia teve uma taxa de aproximadamente 116 casos de campilobacteriose por 100.000 pessoas, no ano seguinte, quando a Islândia decidiu empregar o congelamento da carne de frango como uma estratégia para reduzir a exposição humana ao *Campylobacter*, a taxa da doença reduziu para 33 casos por 100.000 pessoas. Em 2001, a Noruega adotou a mesma estratégia (Georgsson et al., 2006).

Maziero et al. (2007) encontrou *Campylobacter* spp. termotolerante em 28 (93,3%) das 30 amostras frescas, em 16 (53,3%) das 30 amostras refrigeradas e em 11 (36,67%) das 30 amostras congeladas analisadas pela técnica de plaqueamento direto. A contagem média das amostras congeladas foi de  $0,5128 \times 10^1$  UFC/g, sendo a contagem mínima obtida de  $5,1286 \times 10^1$  UFC/g e a máxima de  $1,9953 \times 10^2$  UFC/g. As contagens foram significativamente menores que as obtidas nas amostras frescas.

## 2.10. Métodos para identificação de *Campylobacter*

Por causa da baixa dose infectante, o diagnóstico do *Campylobacter* em alimentos está se tornando de grande importância. É necessário dispor de métodos rápidos e confiáveis para detectar a presença do *Campylobacter* em uma amostra suspeita.

A detecção de *Campylobacter* em alimentos deve levar em consideração que a população presente pode ser baixa, pois o *Campylobacter* é sensível a concentração de oxigênio do ar (21%) e não cresce em temperaturas abaixo de 30°C, utilizadas normalmente na conservação dos alimentos. O sucesso da detecção, geralmente, depende da análise de um grande número de amostras, concentração de células presentes e enriquecimento seletivo em condições microaerófilas à temperatura de 42 °C (Silva et al., 1997).

Diferentes métodos são usados, sendo importante avaliar se a técnica a ser utilizada é adequada ao tipo de alimento a ser examinado (Moore, 2001).

A manutenção de condições seletivas, tanto no enriquecimento quanto no plaqueamento subsequente, é garantida pela utilização de meios nutritivos suplementados com sangue de cavalo ou carneiro e diferentes antibióticos, tais como, vancomicina, polimixina, cicloheximida, trimetoprim, rifampicina, cefoperazona, anfotericina, cefalotina, colistina, cefazolina, novobiocina e bacitracina. A utilização de meios adicionados de carvão ativado em substituição ao sangue é comum, além da adição de agentes redutores, como o sulfato ferroso, metabissulfito de sódio e piruvato de sódio, na concentração de 0,025% cada (Silva et al., 1997).

Os antibióticos mais utilizados no isolamento de *Campylobacter* são: vancomicina (inibe cocos Gram-positivo); polimixina B (inibe Enterobacteriaceae e *Pseudomonas* spp.); trimetoprim (inibe *Proteus* spp. e cocos Gram-positivo) e

cefalosporinas (inibem *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, alguns *Proteus* spp., *Yersinia enterocolitica*) (Donnison, 2003).

Diferentes métodos de identificação são atualmente empregados. Dentre eles estão os métodos imunológicos, bioquímicos e moleculares.

### 2.10.1. Métodos imunológicos

Os métodos imunológicos foram desenvolvidos para quantificar a concentração de antígenos e anticorpos, por apresentarem grande sensibilidade e especificidade, tornaram-se técnicas padronizadas para pesquisa e aplicações clínicas. Entre esses métodos, um dos mais usados é o ELISA, do inglês Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima).

O método ELISA baseia na identificação de anticorpos e ou antígenos, por anticorpos marcados com uma enzima, de maneira que esta enzima age sobre um substrato e a reação faz com que o cromógeno mude de cor. O produto da reação, além de colorido, é insolúvel para não difundir do local da formação.

Teste de aglutinação de látex, esse método envolve o uso de “microesferas” de látex revestidas com o anticorpo espécie específico que, ao entrar em contato com os antígenos da superfície celular, ou extratos de antígeno das espécies bacterianas, desencadeia uma ligação cruzada, formando complexos antígeno-anticorpo, geralmente entre 2 e 5 minutos. A reação cruzada dos anticorpos é o maior problema do teste. Outra desvantagem é a detecção de apenas micro-organismos com antígenos acessíveis, além de não ser capaz de avaliar a susceptibilidade a antimicrobianos (Ferreira, 1996).

O Teste ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay), é um ensaio imunoenzimático fluorescente que associa o método sanduíche em duas etapas, com uma detecção final por fluorescência. A reação antígeno-anticorpo é marcada com um anticorpo associado com uma enzima

fosfatase alcalina, que reagirá com um substrato que produzirá um composto fluorescente. A emissão de fluorescência é proporcional a quantidade de Antígeno ou (anticorpo) presente na amostra.

O VIDAS® *Campylobacter* é um teste qualitativo automatizado nos aparelhos VIDAS®, que permite a detecção de *Campylobacter* nos produtos alimentares, após enriquecimento, pela técnica ELFA. O dispositivo VIDAS® CAM foi desenvolvido como um método de rastreamento rápido que assegura a detecção de três espécies patogênicas de *Campylobacter*: *C. coli*, *C. jejuni* e *C. lari*. É um teste imunoenzimático que permite a detecção de antígenos de *Campylobacter* pelo método ELFA com sistema automatizado VIDAS®. O interior do cone

está coberto por anticorpos anti *Campylobacter* adsorvidos em sua superfície. Os outros reagentes da reação imunológica estão prontos e pré-repartidos na barrete. Os antígenos, presentes na amostra, irão fixar-se aos anticorpos. Os elementos livres serão eliminados por lavagem. Em seguida, os anticorpos monoclonais conjugados com fosfatase alcalina são aspirados e vão fixar-se aos antígenos de *Campylobacter*, que já se encontram fixados na parede do cone. As etapas de lavagem eliminam o conjugado não fixado. Durante a etapa final de revelação, o substrato (4-metil-umbeliferil fosfato) é aspirado e dispensado no cone; a enzima do conjugado catalisa a reação de hidrólise deste substrato num produto (4-metil-umbeliferona) cuja fluorescência emitida é medida a 450 nm (Fig. 2).



Figura 2. Ligação antígeno anticorpo e fluorescência emitida no teste VIDAS® *Campylobacter*

Terminando o teste, os resultados são analisados automaticamente pelo aparelho que fornece um valor para cada amostra. Este valor é comparado com referências internas (limiares) e cada resultado é interpretado (positivo/negativo) (bioMérieux, VIDAS® *Campylobacter*, REF 30111-07999 H - pt - 2007/09).

### 2.10.2. Métodos bioquímicos

Um dos meios de enriquecimento mais utilizados é o caldo Bolton, que pode ser usado com sucesso sem sangue, e contém sulfato ferroso, metabissulfito de sódio e piruvato de sódio (Paulsen et al., 2005). Estes compostos suplementares aumentam a tolerância do *Campylobacter* ao oxigênio extinguindo ânions superóxidos e peróxido de hidrogênio que ocorrem espontaneamente no meio de cultura. O

sulfato ferroso, piruvato de sódio e o metabissulfito de sódio agem destruindo o radical superóxido, facilitando o desenvolvimento do micro-organismo (Gonçalves e Franco, 2002).

O caldo Bolton é recomendado pelo FDA (Food and Drug Administration) para recuperar *Campylobacter* em diferentes tipos de alimentos, associado ao pré-enriquecimento com incubação a 37°C por 4 horas. O pré-enriquecimento permite a recuperação das células de *Campylobacter* injuriadas pela desidratação, aquecimento, falta de nutrientes, congelamento ou exposição a radicais de oxigênio. Portanto, a incubação a 37 °C por 4 horas é recomendada antes da incubação a 42°C por mais 20 a 44 h em condições microaerófilas, seguido de estriamento em ágar seletivo (Donnison, 2003).



Os ágaros seletivos mais utilizados para a pesquisa do *Campylobacter* são, mCCDA, CampyFood, Skirrow ou Butzler. As colônias de *Campylobacter* nos diversos meios de plaqueamento são semelhantes, podendo apresentar-se lisas, convexas e brilhantes, ou com bordas perfeitas, ou planas, translúcidas e lustrosas, com bordas irregulares e espalhadas. Geralmente são incolores, levemente cremes ou acinzentadas, com dimensão variando de pontual a 4 a 5 mm de diâmetro.

Em amostras com uma elevada carga de microbiota competitiva os agentes seletivos do meio de enriquecimento podem ser insuficientes para inibir a multiplicação desta e comprometer a detecção de *Campylobacter* (Dufrenne et al., 2001).

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

O VITEK® 2 é um sistema de identificação automática, através de provas bioquímicas para diversas espécies bacterianas e fúngicas. Possui um cartão de identificação de micro-organismos fastidiosos (NH), que

se baseia em métodos bioquímicos e substratos recentemente desenvolvidos, que medem a utilização da fonte de carbono e atividade enzimática, que são detectadas por leituras ópticas.

Este cartão NH é capaz de identificar 171 espécies sem a necessidade de testes adicionais pois contém 30 testes bioquímicos nas seguintes categorias: 11 glicosidase e testes peptidase, 10 testes de acidificação, 5 testes alcalinização, e 4 testes diversos.

O cartão NH é um bom método para a identificação de diversos grupos de organismos exigentes. A vantagem desta técnica sobre outras de identificação de micro-organismos são na facilidade quanto a rastreabilidade, garantia de precisão, rapidez na técnica e segurança para o analista.

### 2.10.3. Métodos moleculares

A técnica PCR foi desenvolvida primeiramente por Kary B. Mullis em 1985, esta técnica permite obter milhões de cópias de um segmento específico de DNA por meio da ação da enzima Taq DNA polimerase e de oligonucleotídeos iniciadores (primers) sobre um DNA molde. É realizada em um equipamento automatizado e computadorizado, denominado termociclador, que promove a alternância de temperaturas por determinados períodos de tempo, possibilitando a ocorrência de ciclos repetitivos de desnaturação e síntese do DNA (Gandra et al., 2008).

Num panorama mais moderno, no que diz respeito à identificação de bactérias do gênero *Campylobacter*, a técnica PCR (Polymerase Chain Reaction) tornou-se muito difundida e bastante utilizada para o diagnóstico laboratorial de *Campylobacter* spp, principalmente pelas vantagens que oferece, aliadas à alta sensibilidade e especificidade, além da facilidade de sua execução (Butzler, 2004).

A PCR é uma técnica de biologia molecular que permite a replicação “in vitro” do DNA de forma extremamente

rápida. Na PCR convencional os produtos de amplificação são detectados pela coloração de brometo de etídio no gel de agarose após separação por eletroforese. No entanto, diversas variações de padrão de PCR têm surgido, dentre eles está a PCR multiplex e a PCR em tempo real. Na PCR multiplex, vários alvos podem ser amplificados na mesma reação devido a utilização de vários pares de “primers” (Yoshitomi et al.2006).

A técnica de PCR em tempo real tem sido utilizada para detecção e quantificação de *Campylobacter* em alimentos e amostras clínicas (Oberst et al.; 1998; Sharma et al., 1999; Bellin et al., 2001) O uso de sondas fluorogênicas específicas tem facilitado a detecção automatizada e quantificação do gene amplificado. A aplicação do PCR em tempo real oferece vantagens de ser mais sensível e rápido por não requerer procedimentos pós PCR para detectar produtos de amplificação, necessários nos procedimentos baseados em PCR convencional (Jinneman et al., 2003).

Botteldoorn et al. (2008), na Bélgica, quantificaram *Campylobacter* em carcaças de frango utilizando a PCR em tempo real e encontraram média de população de 8,25 log<sub>10</sub> UFC. Utilizando a metodologia tradicional de enumeração em ágar mCCDA, tiveram uma média de contagem de 4,64 log<sub>10</sub> UFC.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

As 240 carcaças de frango analisadas neste trabalho foram obtidas, diretamente das indústrias (abatedouros avícolas), pelas coordenadorias regionais do Serviço de Inspeção Estadual do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) e Serviço de Inspeção Federal (SIF) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), localizadas no Estado de Minas Gerais. As amostras foram enviadas em caixas isotérmicas com gelo reciclável, ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos

do IMA, onde foram congeladas para posterior pesquisa de *Campylobacter* nas carcaças.

#### 3.1. Amostras

Para maior representatividade das regiões, o Estado de Minas Gerais foi dividido em doze meso-regiões, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) conforme descrito abaixo e ilustrado na Figura 3.

Campo das Vertentes, compreendendo três micro regiões e 36 municípios

Central mineira, compreendendo três micro regiões e 30 municípios Jequitinhonha, compreendendo seis micro regiões e 53 municípios

Metropolitana de Belo Horizonte, compreendendo oito micro regiões e 105 municípios

Noroeste de Minas, compreendendo duas micro regiões e 19 municípios

Norte de Minas, compreendendo sete micro regiões e 89 municípios

Oeste de Minas, compreendendo cinco micro regiões e 44 municípios

Sul e Sudoeste de Minas, compreendendo dez micro regiões e 146 municípios

Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, compreendendo sete micro regiões e 20 municípios

Vale do Mucuri, compreendendo duas micro regiões e 23 municípios

Vale do Rio Doce, compreendendo duas micro regiões e 99 municípios

Zona da Mata Mineira, compreendendo sete micro regiões e 142 municípios



Figura 3. Meso-regiões de acordo com IBGE

Depois de determinadas as meso-regiões, foram verificados em quais delas existiam estabelecimentos fiscalizados pelo SIF e pelo IMA. Em seguida, foi sorteado

aleatoriamente, por meso-regiões e por sistema de inspeção, um estabelecimento produtor de carne de frango conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 2. Municípios dos estabelecimentos sorteados por meso-região e por sistema de fiscalização

Meso-Regiões	Municípios	
	S.I.F.	IMA
Triângulo Mineiro	Uberaba	Araguari
Metropolitana	Pará de Minas	Itabira
Sul e Sudoeste	Passos	Alfenas
Campos das Vertentes	Barbacena	Lavras
Oeste	São Sebastião do Oeste	Igaratinga

Para cada estabelecimento selecionado foram coletadas seis amostras (sendo que cada uma foi considerada uma repetição, totalizando 240 amostras), em cada estação do ano. As amostras foram coletadas durante o período junho de 2010 até maio de 2011.

### 3.2. Pesquisa de *Campylobacter*

Para a pesquisa de *Campylobacter* foi utilizada a técnica imunoenzimática ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay), realizado no sistema automatizado VIDAS® 30 (bioMérieux, VIDAS® *Campylobacter*, REF 30111-07999 H - pt - 2007/09), e a confirmação dos positivos foi realizada através de testes bioquímicos no equipamento VITEK® 2.

### 3.3. Preparação das amostras

De cada carcaça foram retiradas, assepticamente, 25 g compostas por porções de pele de diferentes partes (cloaca, pescoço, peito e coxa).

Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em sacos estéreis e congeladas em freezer doméstico. No momento das análises as amostras foram refrigeradas por três dias e em seguida, foram adicionado no saco Combibag as 25 gramas da amostra e 225mL do caldo Bolton (Oxoid) Suplementado com SR183E (Oxoid Ltda., Hampshire, England) (cefoperazone, 10mg/500 mL; vancomicina, 10 mg/500 ml; trimetopim, 10mg/500

mL e cyclohexemide, 25mg/500 mL). O saco estéril contendo a amostra e o meio de cultura foram colocados no homogeneizador de amostra- tipo Stomacher por 60 segundos. Foi adicionado na bolsa interna do saco Combibag, um gerador de microaerofilia (GENbox microaer).

Foi utilizada uma barra para fechar saco Combibag. É necessário fechar imediatamente e hermeticamente todo o comprimento do saco, para assegurar uma perfeita vedação, e foram incubados à 37°C por quatro horas e logo após à 42 ± 0.5°C por 44 horas sob condições de microaerofilia (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> e 85% N<sub>2</sub>) (Fig. 4).



Figura 4. Pesagem da amostra, homogeneização e a amostra dentro do saco Combibag com o gerador de microaerofilia e barra de vedação

Após a incubação, foram transferidos 2 mL do conteúdo homogenizado para tubos estéreis que foram fervidos a 100°C por 15

minutos. Após a fervura das amostras, foi transferido 0,5 mL para a barrete VIDAS® CAM (Fig.5).

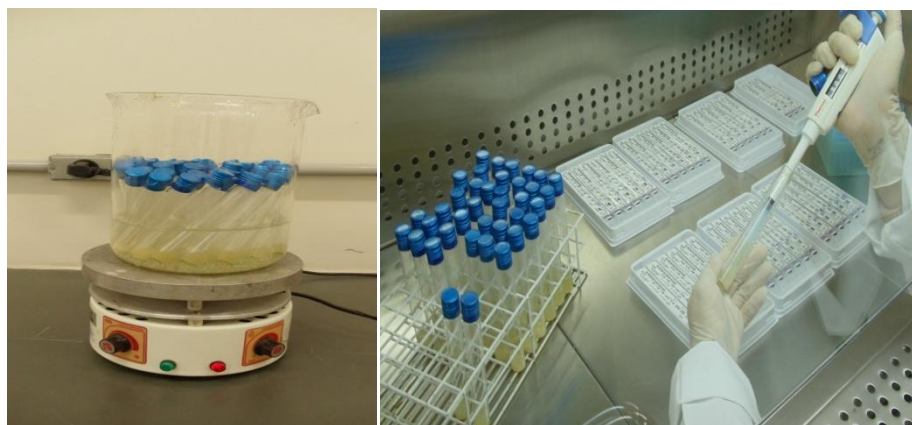


Figura 5. Aquecimento dos tubos e distribuição da amostra nas barretes

Logo após, os cones e as barretes foram inseridos no equipamento (Fig. 6). Todas as etapas foram geridas automaticamente pelo aparelho e os resultados foram obtidos em aproximadamente 70 minutos. O caldo que

não foi aquecido foi conservado para confirmação em caso de resultado positivo. As confirmações foram realizadas através de provas bioquímicas no VITEK® 2 para caracterização das espécies encontradas.



Figura 6. Equipamento VIDAS, com cones e barretes

### 3.4. Confirmação e testes bioquímicos

Uma vez positivas no Vidas 30, as amostras foram estriadas uma alçada do caldo de enriquecimento do tubo não aquecido, em placa de Ágar m-CCDA, (m-CCDA; Oxoid, Hampshire, Inglaterra). As placas foram acondicionadas invertidas em jarra com atmosfera de microaerofilia e incubadas a 42°C por 48 horas. Após o período de

incubação, foram verificadas o desenvolvimento de colônias típicas de *Campylobacter*.

Das amostras positivas neste ágar, as colônias de *Campylobacter jejuni* apresentaram-se lisas, convexas e brilhantes, com bordas irregulares e espalhadas. Geralmente, são incolores com tonalidade creme ou acinzentada (Fig.7).

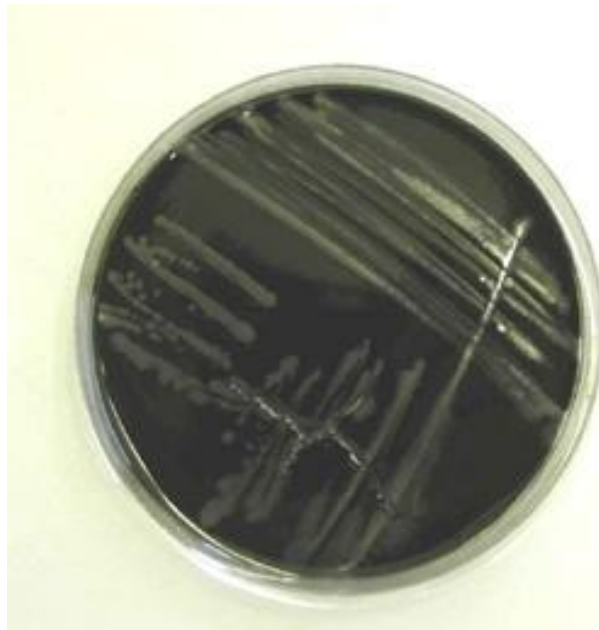


Figura 7. Crescimento característico de *Campylobacter* em ágar mCCDA. Fonte: Oxoid, s.d.

Colônias típicas neste ágar foram estriadas em ágar sangue utilizando alça estéril. Em seguida, as colônias presentes no ágar foram transferidas com o auxílio de uma alça descartável para um tubo de poliestireno transparente com 3 mL de

solução fisiológica (0,45%) e uma suspensão bacteriana foi feita e ajustada para um padrão de McFarland de 2,70 a 3,30 usando o calibrador DensiCheck 2 (bioMérieux).

O período de tempo desde a preparação do inoculo até a introdução do cartão no aparelho deve ser inferior a 30 min. O cartão e a solução foram colocados sobre a cassete e levados para o VITEK® 2, onde foram realizada a transferência da solução

para os poços do cartão através de uma câmara sugadora e depois levado para outro compartimento do aparelho onde o cartão foi selado e incubado, o qual realizou-se a leitura em até seis horas.

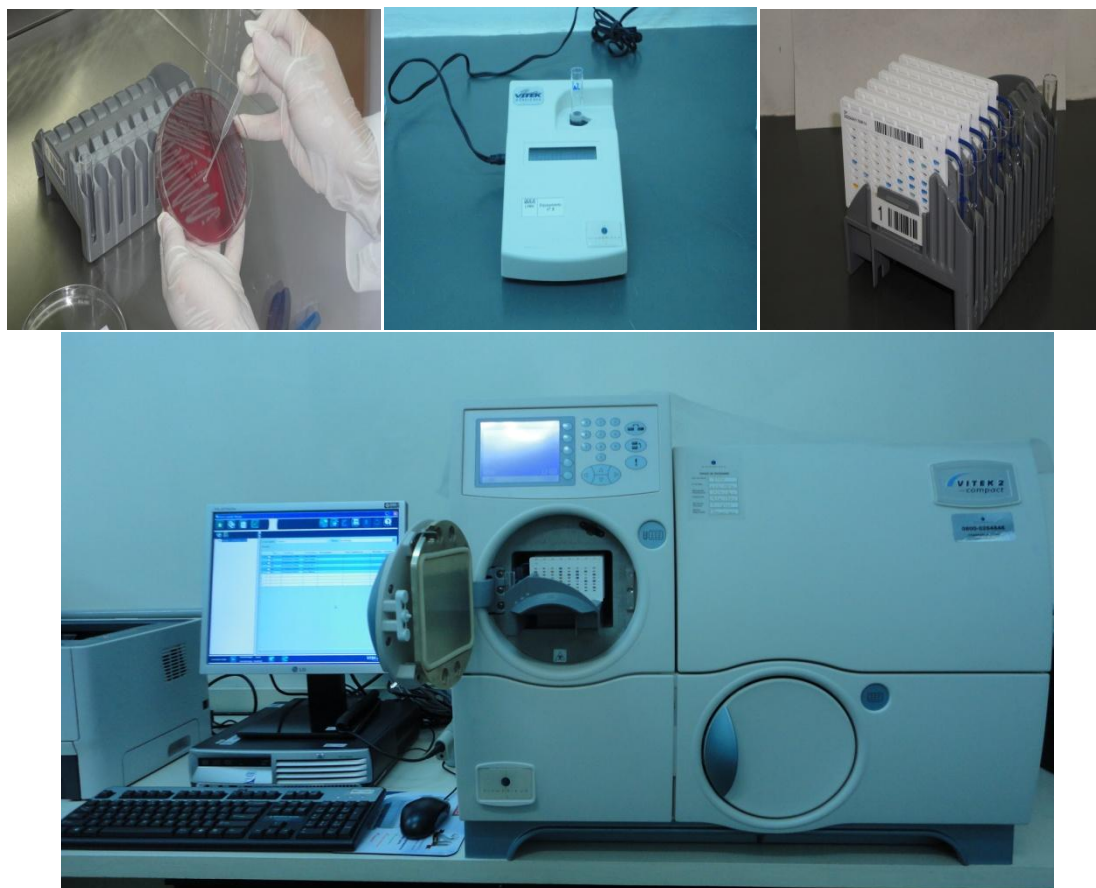


Figura 8. Etapas do procedimento para identificação das provas bioquímicas no VITEK®2

### 3.5. Delineamento Experimental

O ensaio, das análises, foi conduzido no delineamento experimental inteiramente ao acaso e os resultados foram analisados através da estatística descritiva, devido ao baixo índice de identificação.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 240 amostras analisadas neste trabalho, apenas cinco (2,03%) apresentaram resultado positivo para *Campylobacter jejuni*. As 235(97,96%) amostras restantes apresentaram uma população de *Campylobacter jejuni*, abaixo do limite de

detecção do método, sendo consideradas negativas (Tab. 3). A impossibilidade de enumerar o micro-organismo na maioria das amostras examinadas pelo método utilizado pode ser explicada por algumas hipóteses. *Campylobacter*, quando em condições de injúria como deficiência nutritiva ou pH ácido, sofre alterações morfológicas, passando da forma original de espiroqueta móvel para cocóide. Essas formas não são cultiváveis em meios de cultura, porém, são infectivas. Desta maneira, pode-se inferir que as células do patógeno poderiam estar injuriadas, devido ao processo de congelamento, assumindo a forma viável mas não cultivável (VNC).

Tabela 3. Análises de *Campylobacter jejuni* em 240 amostras de frangos coletadas em abatedouros do estado de Minas Gerais.

Número de amostras identificadas	Resultados	Porcentagem %
12	0,03	4,87
100	0,04	42,27
119	0,05	49,18
03	0,06	1,21
01	0,08	0,41
01	0,12*	0,41
01	0,14*	0,41
01	0,19*	0,41
01	0,39*	0,41
01	0,59*	0,41

\*Resultados positivos= amostras com valores acima do limite de detecção do método, acima de 0,1

Segundo Mead (2004), células VNC não são passíveis de recuperação pelos métodos tradicionais, mas mantém sua capacidade de causar doença.

A liberação de amostras falso-negativas (não detectadas na análise, porém contaminadas) para comercialização representa um perigo potencial à saúde, uma vez que um lote de alimento pode ser liberado devido à não detecção de patógenos.

Meldrum et al. (2005) encontraram 71,9% das amostras de frango congeladas positivas para *Campylobacter* spp. Neste mesmo estudo, os autores não encontraram diferenças significativas na taxa de positividade de *C. jejuni*, utilizando a técnica de plaqueamento direto, entre as amostras frescas e as submetidas a baixas temperaturas.

Apesar de haver grande variação na frequência de positividade de *Campylobacter* spp. em carne de frango do varejo dos diferentes países, os valores obtidos nesse estudo estão bem abaixo dos estudos relatados por pesquisadores de outros países (Dominguez et al., 2002; Pezzotti et al., 2003; Paulsen et al.; 2005; Paresi et al., 2007 e Bardon et al., 2009).

Os resultados encontrados no presente estudo indicam que, apesar de prática e rápida, a metodologia utilizada pelo VIDAS®CAM, pode subestimar a contaminação real de amostras submetidas a baixas temperaturas, uma vez que não recupera as células injuriadas.

Lee et al. (1998) comprovaram que *C. jejuni* é hábil em sobreviver por longo período (56 dias) armazenado em temperaturas inferiores a - 20°C (temperatura da maioria dos freezers domésticos). Apesar da redução de aproximadamente  $1 \times 10^5$  nas contagens de UFC/g por plaqueamento direto. Este fato demonstrou que durante este período o micro-organismo pode manter-se viável e ser um risco para a saúde pública por ser capaz de causar infecção.

Alter et al. (2005) avaliaram em um experimento 43 amostras de peru e verificaram uma redução significativa na taxa de positividade (de 67,4 para 25,6%) das amostras após o resfriamento entre 0 e 3°C por 24 h. As amostras foram enriquecidas em caldo Bolton, isoladas em ágar mCCDA e identificadas através de análise de PCR. Estas diferenças podem ser explicadas pelas diferentes técnicas de análise empregadas.

Georgsson et al. (2006) avaliaram a contaminação de carcaças de frangos por *Campylobacter* no momento da coleta e após 31 dias de estocagem à -20°C utilizando a técnica de plaqueamento direto. Estes autores verificaram uma redução nas contagens de *Campylobacter* de  $0,447 \times 10^1$  a  $7,413 \times 10^2$  UFC/g após os 31 dias de estocagem. No entanto, apesar da redução significativa nas contagens, o índice de contaminação após este período permaneceu na faixa de  $1,349 \times 10^3$  a  $1,023 \times 10^4$  UFC/g.

Figuroa et al. (2009), no Chile, quantificaram *Campylobacter* spp. em carcaças de frango no abatedouro obtendo população média de  $2,51188 \times 10^6$  UFC/carcaça, utilizando a técnica de plaqueamento em ágar mCCDA. A sensibilidade do método em detectar o micro-organismo foi estimada em 2,0 UFC/carcaça, ou seja, maior que a sensibilidade do método utilizado neste estudo.

A enumeração de *Campylobacter* em alimentos através de métodos tradicionais é muito trabalhosa pelo fato de se tratar de um micro-organismo fastigioso (Solomon e Hoover, 1999). Métodos baseados na análise do DNA da bactéria, como a metodologia do PCR, têm sido cada vez mais utilizados, pois proporciona uma rápida, sensível e específica detecção do micro-organismo.

Os resultados obtidos em diversos trabalhos, (Lee et al., 1998; Bhaduri e Cottrell, 2004 e Meldrum, 2005), indicam que não existe diferença significativa na taxa de positividade em amostras de carne de frango frescas e congeladas indicando que uma porção significativa de *C. jejuni* sobrevive a tais condições. Esses resultados alertam que estes tratamentos sozinhos não garantem a segurança do alimento, com respeito a este microrganismo.

A população de *Campylobacter* presente na carne de frangos representa, de maneira geral, risco à saúde dos consumidores, uma vez que 500 células já podem desencadear a doença. A manipulação e cozimento adequados dos produtos avícolas eliminam os riscos. Entretanto, as pessoas continuam cometendo erros durante o manuseio e preparo dos alimentos, o que propicia a ocorrência da campilobacteriose (Manfreda et al., 2006).

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho demonstram alto índice de negatividade de *Campylobacter jejuni* em amostras de carcaças de frangos colhidas diretamente das indústrias avícolas, localizadas no

Estado de Minas Gerais, utilizando o teste imunoenzimático ELFA no sistema automatizado VIDAS® 30. Porém, amostras que foram congeladas em freezer doméstico por longo período, despertando necessidade de técnicas mais sensíveis, como as metodologias moleculares para pesquisa de *Campylobacter jejuni* em carcaças congeladas.

O processo de congelamento das carcaças de frangos de corte pode levar à redução significativa da capacidade de sobrevivência do *Campylobacter jejuni* ou levá-lo a uma fase estacionária de crescimento em que não é possível detectá-lo por metodologias convencionais estando na forma viável, porém, não cultivável.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAK, G.K.; MEAKINS, S.M.; YIP, H.; LOPMAN, B.A.; O'BRIEN, S.J. Disease risks from foods, England and Wales, 1996–2000. *Emerging Infectious Diseases*, v.11, n.3, p. 365–372, 2005.

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

ARSENAULT, J.; LETELLIER, A.; QUESSY, S.; BOULIANNE, M. Prevalence and risk factors for *Salmonella* and *Campylobacter* spp. carcass contamination in broiler chickens slaughtered in Quebec, Canada. *Journal of Food Protection*, v. 70, n.8, p.1820–1828, 2007.

ATANASSOVA, V.; REICH, F.; BECKMANN, L.; KLEIN, G. Prevalence of *Campylobacter* spp. in turkey meat from a slaughterhouse and in turkey meat retail products. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v.49, n.1, p.141–145, 2007.

BAM, Bacteriological Analytical Manual. 2001. U.S. Food and Drug Administration. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/ebam/bam-7.html>> Acesso: 05 out. 2011.



- BARATÉIA, R.C.; SARIDAKIS, H.O.; GAZIRI, L.C.J.; PELAYO, J.S. Effects of medium composition, calcium, iron and oxygen on haemolysin production by *Plesiomonas shigelloides* isolated from water. *Journal of Applied Microbiology*, v.90, n.3, p.482-487, 2001.
- BARDON, J.; KOLAR, M.; CEKANOVA, L.; HEJNAR, P.; KOUKALOVA, D. Prevalence of *Campylobacter jejuni* and its resistance to antibiotics in poultry in the Czech Republic. *Zoonoses and Public Health*, v.56, n.3, p.111-116, 2009.
- 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.
- BIOMÉRIEUX. VIDAS® *Campylobacter*. REF 30111-07999 H - pt - 2007/09, 6 páginas.
- BLACK, R.E., LEVINE, M.M., CLEMENTS, M.L. et al. Experimental *Campylobacter jejuni* in humans. *J. Infect. Dis.* v.157. p. 472-9. 1998.
- BLASER, M. E. RELLER, L. B. *Campylobacter enteritis*. N. ENGL., V. 305, P.1444-1452, 1981.
- BOTTELDOORN, N.; VAN COILLIE, E.; PIESSENS, V.; RASSCHAERT, G.; DEBRUYNE, L.; HEYNDRICKX, M.; HERMAN, L.; MESSENS, W. Quantification of *Campylobacter* spp. in chicken carcass rinse by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*, v.105, n.6, p.1909-1918, 2008.
- BOVILL, R.A.; MACKAY, B.M. Resuscitation of 'non-culturable' cells from aged cultures of *Campylobacter jejuni* *Microbiology*, v.143, n.5, p.1575-1581, 1997.
- BOURGEOIS, C.M.; MESCLE, J.F.; ZUCCA, J. Microbiologia alimentaria: aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria. Vol.I. Zaragoza: Acribia, 1994.
- 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. *Higiene Alimentar*, v.16, p.89-94, 2002.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Chicks by cecum-colonizing bacteria producing anti-*C.jejuni* metabolites. APPL 2007. Disponível em: <[http://www.cdc.gov/ncidod/diseaseinfo/Campylobacter\\_g.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/diseaseinfo/Campylobacter_g.htm)> Acesso em: 01 jun. 2010.
- COCKER, A. O. et al. Human campylobacteriosis in developing countries *Emerging Infectious Diseases*, Atlanta, v. 8, n. 3, p. 237-242, May/Jun. 2002
- CVE/SES-SP- Normas e Instruções 2002 Vigilância Ativa Doenças Transmitidas por Alimentos. Doenças Transmitidas por Alimentos. Disponível em: <<http://www.cve.saude.sp.gov.br>> Acesso em: 20 abr. 2010.
- CVE – Centro de Vigilância Epidemiológica. Surtos de doenças transmitidas por água e alimentos notificados à Divisão do DDTHA – CVE por Semana Epidemiológica, DIR e Município – Estado de São Paulo, 2003. Disponível em: <[http://www.cve.saude.sp.gov.br/hm/hidrica/dados/dta03\\_surto.xls](http://www.cve.saude.sp.gov.br/hm/hidrica/dados/dta03_surto.xls)> Acesso em: 13 jan. 2012.
- DE WIT, M.A.; KOOPMANS, M.P.; KORTBEEK, L.M.; VAN LEEUWEN, N.J.; VINJE, J.; VAN DUYNHOVEN, Y.T. Etiology of gastroenteritis in sentinel general practices in the Netherlands. *Clinical Infectious Diseases*, v.33, n.3, p.280-288, 2001.
- DICKINS, M.A.; FRANKLIN, S.; STEFANOVA, R.; SCHUTZE, G.E.;

- EISENACH, K.D.; WESLEY, I.; CAVE, M.D. Diversity of *Campylobacter* isolates from retail poultry carcasses and from humans demonstrated by pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Food Protection*, v.65, n.6, p.957-962, 2002
- DOIG, P.; YAO, R.J.; BURR, D.H.; GUERRY, P.; TRUST, T.J. An environmentally regulated pilus-like appendage involved in *Campylobacter* pathogenesis. *Molecular Microbiology*, v.20, n.4, p.885-894, 1996.
- DOMÍNGUEZ, C.; GOMEZ, I.; ZUMALACÁRREGUI, J. Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in retail chicken meat in Spain. *International Journal of Food Microbiology*, v.72, n.1/2, p.165-168, 2002.
- DONNISON, A. 2003. Isolation of Termotolerant *Campylobacter* – Review and methods for New Zealand laboratories. Prepared for the Ministry of Health of New Zealand Disponível em: <www.moh.govt.nz/moh.nsf> Acesso em: 10 fev. 2012.
- DUFRENNE, J.; RITMEESTER, W.; ASH, E.D.; LEUDSEN, F.; JONGE, R. Quantification of the contamination of chicken products in the Netherlands with *Salmonella* and *Campylobacter*. *Journal of Food Protection*. Vol. 64, nº 4, pg 538-541, 2001.
- ENGBERG, J. Contributions to the epidemiology of *Campylobacter* infections: a review of clinical and microbiological studies. *Danish Medical Bulletin*, v.53, n.4, p.361-389, 2006.
- FELLOWS, P. Tecnologia 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, p.357-362, 2008.
- FERNANDEZ, H.; TORRES, N. *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* en tres grupos de gallinas de diferente origen geográfico del sur de Chile. *Arch. Med. Vet.*, vol.32, no 2, p, 241-244, 2000.
- FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. M. *Diagnóstico Laboratorial*. 1996, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro - RJ.
- 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, p.94, 2009.
- FORSYTHE, S. 2002. Microbiologia da segurança alimentar. Artmed Editora.
- FOSTER, G.; HOLMES, B.; STEINGERWALT, A.G.et al. *Campylobacter insulaenigrae* sp. nov., isolated from marine mammals. *Int.J. Syst. Evol. Microbiol*, v. 54, n. 6, p. 2369-2373, 2004.
- FRANCHIN, P.R.; AIDOO, K.E.; BATISTA, C.R.V. Sources of poultry meat contamination with thermophilic *Campylobacter* before slaughter. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.36, n.2, p.157-162, 2005.
- FRANCHIN, P.R.; OGLIARI, P.J.; BATISTA, C.R.V. Frequency of thermophilic *Campylobacter* in broiler chickens during industrial processing in a Southern Brazil slaughterhouse. *British Poultry Science*, v.48, n.2, p.127-132, 2007.
- FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. 1996. Microbiologia dos Alimentos. São Paulo. Ed. Atheneu, 182p.
- GEORGSSON, F.; PORKELSSON, A.; GEIRSDÓTTIR, M.; REIERSEN, J.; STERN, N.J. 2006. The influence of freezing and duration of storage on *Campylobacter* and indicator bacteria in broiler carcasses. *Food Microbiology*; vol. 23 pg 677-683.

- GHAFIR, Y.; CHINA, B.; DIERICK, K.; ZUTTER, L.; DAUBE, G. A seven-year survey of *Campylobacter* contamination in meat at different production stages in Belgium. *International Journal of Food Microbiology*, v.116, n.1, p.111–120, 2007.
- GONÇALVES, P.M.R.; FRANCO, R.M. 2002. Avaliação de meios de enriquecimento para a pesquisa de *Campylobacter jejuni* em produtos de origem animal. *Higiene Alimentar*; vol. 16, n° 98, pg 79-84.
- HAVELAAR, A.H.; NAUTA, M.J.; MANGEN, M.J.J.; DE KOEIJER, A.G.; BOGAARDT, M.J.; EVERS, E.G.; JACOBS-REITSMA, W.F.; PELT, W.; VAN WAGENAAR, J.A.; DEWIT, G.A.; VAN DER ZEE, H. *Campylobacter* risk management and assessment : costs and benefits of controlling *Campylobacter* in The Netherlands: integrating risk analysis, epidemiology and economics. (RIVM Report 250911009/2005). Bilthoven: Microbiological Laboratory for Health Protection, 2005. 53p. Disponível em: <<http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/250911009.pdf>> Acesso em: 20 fev. 2012.
- HUGHES, R. 2004, *Campylobacter jejuni* in Guillain-Barré syndrome. *The Lancet Neurology*. Vol 3.
- HUMPHREY, T.; 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.
- JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. *Modern Food Microbiology*. New York: Springer, 2005, 790 p.
- JIMÉNEZ, M.; SOLER, P.; VENANZI, J.D.; CANTÉ, P.; MARTINEZ-NAVARRO, F. An outbreak of *Campylobacter jejuni* enteritis in school of Madri, Spain. *Eurosurveillance* , v.10, cap.4, 2005. Disponível em: <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=533>> Acesso em: 28 fev. 2009.
- JONES, F. S.; LITTLE, R. B. The etiology of infectious diarrhea (winter scours) in cattle. *The Journal of Experimental Medicine*, Washington. 53, p. 835-844, 1931.
- JORGENSEN, F.; BAILEY, R.; WILLIAMS, S.; HENDERSON, P.; WAREING, D.R.A.; BOLTON, F.J.; FROST, J.A.; WARD, L.; HUMPHREY, T.J. Prevalence and numbers of *Salmonella* and *Campylobacter* spp.. on raw, whole chickens in relation to sampling methods. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 76 pg 151-164, 2002.
- KEENER, M.K. 2004. *Campylobacter* in Poultry Processing – a Continuing Challenge. Department of Food Science, North Carolina State University, Raleigh, NC, USA
- KETLEY, J.M. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. *Microbiology*. v.143, n.1, p.5-21, 1997.
- KUANA, S.L.; SANTOS, L.R.; RODRIGUES, L.B.; BORSOI, A.; MORAES, H.L.S.; SALLE, .T.P.; NASCIMENTO, V.P. Occurrence and characterization of *Campylobacter* in the Brazilian production and processing of broilers. *Avian Diseases*, v.52, n.4, p.680–684, 2008.
- LEE, A.; SMITH, S.C.; COLOE, P.J. Survival and growth of *Campylobacter jejuni* after artificial inoculation onto chicken skin as a function of temperature and packaging conditions. *Journal of Food Protection*, v.61, n.12, p.1609–1614, 1998.
- LINDBLAD, M.; LINDMARK, H.; THISTED LAMBERTZ, S.; LINDQVIST, R. Microbiological baseline study of broiler chickens at Swedish slaughterhouses. *Journal of Food Protection*, v.69, n.12, p.2875–2882, 2006.
- LINE, J.E. 2001. Development of a selective differential agar for isolation and enumeration of *Campylobacter* spp. *Journal of Food Protection*. Vol.64, n°11, pg 1711-1715.

MANFREDA, G.; CESARE, A.; BONDILOLO, V.; STERN, N.J.; FRANCHINI, A. Enumeration and identity of *Campylobacter* spp. in Italian broilers. *Poultry Science*, v.85, n.3, p.556–562, 2006.

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. Disponível em: <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=622>> Acesso em: 28 fev. 2009.

MCFADYEAN, J.; STOCKMAN. Report of the Departmental Committee Appointed by the Board of Agriculture and Fisheries to Enquire into Epizootic Abortion. Appendix to Part II. Abortion in Sheep, p. 1-64. His Majesty's Stationery office, London, United Kingdom, 1913.

MEAD, G., 2004. *Campylobacter* update – the challenge. *International Poultry Production*. Vol.12, n.4 pg 26-29.

MELDRUM, R.J.; TUCKER, D.; SMITH, R.M.M.; EDWARDS, C. 2005. Survey of Salmonella and *Campylobacter* of whole, raw poultry on retail sale in Wales in 2003. *Journal of Food Protection*. Vol. 68. Nº 7. pg 1447-1449

MMWR. *Campylobacter jejuni* infection associated with unpasteurized milk and cheese – Kansas, 2007. MMWR, Morbidity and Mortality Weekly Report, v.57, n.51, p.1377-1379, 2009. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5751a2.htm>> Acesso em: 31 mar. 2009.

MOORE, J. E.; CORCORAN, D.; DOOLEY, J. S. G.; FANNING, S.; LUCEY, B.; MATSUDDA, M.; MCDOWELL, D. A.; MÉGRAUD, F.; MILLAR, B. C.; O'MAHONY, R.; O'RIORDAN, L.; O'ROURKE, M.; RAO, J. R.; ROONEY, P. J.; SSAISL, A.

WHYTE, P. *Campylobacter*. *Veterinary Research*, Les Ulis, v. 36, p. 351-382, 2005. NACHAMKIN, I. *Campylobacter jejuni*. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R. *Food Microbiology : fundamental and frontiers*. 3.ed. Washinton: ASM Press, 2007. p.237-248.

NEWELL, D.G., 2004. *Campylobacter's* in Poultry: Epidemiology, ecology and the potential for control up to the point of slaughter. Veterinary Laboratories Agency, New Haw, Addlestone, Surrey, UK .

OVERELL, J.R.; WILLISON, H.J. Recent developments in Miler Fisher syndrome and related disorders. *Current Opinion in Neurology* , v.18, p.562-566, 2005.

PARDI, M.C.; SANTOS, I.F.; SOUZA, E.R.; PARDI, H. S. 1995. Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne. Volume 1. Editora UFG, pg 316-317.

PARISI, A.; LANZILOTTA, S.G.; ADDANTE, N.; NORMANNO, G.; DI MODUGNO, G.; DAMBROSIO, A.; MONTAGNA, C.O. Prevalence, molecular characterization and antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter* isolates from cattle, hens, broilers and broiler meat in South-eastern Italy. *Veterinary Research Communications*, v.31, n.1, p.113–123, 2007.

PARK, S.F. 2002. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*. Vol 74 pg 177-188.

PAULSEN, P.; KANZLER, P.; HILBERT F.; MAYRHOFER S.; BAUMGARTNER S.; SMULDERS F.J.M. 2005. Comparasion of three methods for detecting *Campylobacter*.

PEPE, T.; DOMINICS, R.; ESPOSITO, G.; VENTRONE, I.; FRATAMICO, P.; CORTESI, M.L. Detection of *Campylobacter* from poultry carcass skin samples at slaughter in Southern Italy. *Journal of Food Protection*, v.72, n.8, p.17718-1721, 2009.

- PEZZOTTI, G.; SERAFÍN, A.; LUZZI, I.; MIONI, R.; MILAN, M.; PERIN, R. 2003. Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in animals and meat in northeastern Italy. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 82 pg 281-287.
- PURDY, D.; BUSWELL, C.M.; HODGSON, A.E.; McALPINE, K.; HENDERSON, I.; LEACH, S.A. Characterisation of cytolethal distending toxin (CDT) mutants of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Medical Microbiology*, v.49, p.473-479, 2000.
- RANTHUM, M. A. Subnotificação e alta incidência de doenças veiculadas por alimentos e de seus fatores de risco: causas e conseqüências no município de Ponta Grossa-PR. Disponível em : <teses.cicf.fiocruz.br/pdf/ranthummam.pdf >. Acesso em: 14 ago. 2011.
- ROSENQUIST, H.; SOMMER, H.M.; NIELSEN, N.L.; CHRISTENSEN, B.C. 2006. The effect of slaughter operations on the contamination of chicken carcasses with thermotolerant *Campylobacter*. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 108 pg 226-232.
- SALLAM, K.I. Prevalence of *Campylobacter* in chicken and chicken by-products retailed in Sapporo area, Hokkaido, Japan. *Food Control*, v.18, n.9, p.1113-1120, 2007.
- SCHERER, K.; BARTELT, E.; SOMMERFELD, C.; HILDEBRANDT, G. Quantification of *Campylobacter* on the surface and in the muscle of chicken legs at retail. *Journal of Food Protection*, v.69, n.4, p.757-761, 2006.
- SEBALD, M.; VÉRON, M. Teneur en baases de l'AND et classification des vibriouns. *Annales de l'Institut Pasteur*, Paris, v. 105, p. 897-910, 1963.
- SHOENI, J.L.; DOYLE, M.P. Reduction of *Campylobacter jejuni* colonization of chicks by cecum colonizing bacteria producing anti-*Campylobacter jejuni* metabolites. *Appl. Environ. Microbiol.* p.664-670, 1992.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA V.C.A.; SILVEIRA N.F.A. 1997. Manual de métodos de análise microbiológica em alimentos. Livraria Varela. São Paulo, SP.
- SOLOMON, E.B.; HOOVER, D.G. *Campylobacter jejuni*: a bacterial paradox. *Journal of Food Safety*, v.19, n.2, p.121-136, 1999.
- SIVADON, V.; ORLIKOWSKI, D.; ROZENBERG, F.; QUINCAMPOIX, J.C., CLAUDIE, C.; DURAND, M.C.; FAUCHÈRE, J.L.; SHARSHAR, T.; RAPHAËL, J.C.; GAILLARD, J.L. 2005. Prévalence et caractéristiques des Syndromes de Guillain-Barré associé à *Campylobacter jejuni* et au cytomégalovirus en région parisienne. *Pathologie Biologie*. Vol. 53, Issues 8-9, pg 536-538.
- SKIRROW, M.B.; BLASER, M.J. Clinical aspects of *Campylobacter* infection. In: NACHAMKIN, I.; BLASER, M.J., eds. *Campylobacter*. Washington: ASM Press, 2000. cap.4, p.69-88.
- SNELLING, W.J.; MATSUDA, M.; MOORE, J.E.; DOOLEY, J.S.G. Under the microscope – *Campylobacter jejuni*. *Letters in Applied Microbiology*, v.41, n.4, p.297-302, 2005.
- SON, I.; ENGLER, M.D.; BERRANG, M.E.; FEDORKA-CRAY, P.J.; HARRISON, M.A. Prevalence of Arcobacter and *Campylobacter* on broiler carcasses during processing. *International Journal of Food Microbiology*, v.113, n.1, p.16-22, 2007.
- STERN, N.J.; GREEN, S.S.; THAKER, N.; KROUT, D.J.; CHIU, J. 1984. 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.

STROHL, W.A.; ROUSE, H.; FISHER, B.D. 2004. Microbiologia Ilustrada. Editora Artmed. pg.531.

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; British Columbia, Canada, June-July 2007. Presented at: *The International Conference on Emerging Infectious Diseases 2008*; March 16-19, 2008; Atlanta.

TRESIERRA-AYALA, A., FERNADÉZ, H., BENDAYÁN, M.E., PEREYRA, G.,BERNUY, A., 1995. Aislamiento de especies termotolerante de *Campylobacter* en dos poblaciones de pollos criados con y sin confinamiento. *Revista Saúde Pública*. Vol. 29 pg 389-392

UBA- União Brasileira de Avicultura. Relatório Annual 2011. Disponível em: <[http://www.abef.com.br/uba/uba\\_relatorios\\_anuais.php](http://www.abef.com.br/uba/uba_relatorios_anuais.php)> Acesso em: 12 jan. 2012.

VAN VLIET, A.H.M.; KETLEY, J.M. Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. *Society for Applied Microbiology*. Symposium Series, v.90, n.30, p.45S-56S, 2001.

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

VANDAMME, P.; DE LEY, J. Proposal of a new family, Campylobacteraceae. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 41, p. 451-55, 1991.

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