

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Avaliação de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* em etapas do processamento
de frangos de corte

Gustavo Perdoncini

PORTO ALEGRE

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Avaliação de Campylobacter jejuni e Campylobacter coli em etapas do processamento de frangos de corte

Autor: Gustavo Perdoncini

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias na área de Ciências Veterinárias com ênfase em Sanidade Avícola.

Orientador: Vladimir Pinheiro do Nascimento.

PORTO ALEGRE

2015

CIP - Catalogação na Publicação

Perdoncini, Gustavo

Avaliação de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* em etapas do processamento de frangos de corte / Gustavo Perdoncini. -- 2015.
133 f.

Orientador: Vladimir Pinheiro do Nascimento.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Saúde Pública. 2. Campilobacteriose. 3. *Campylobacter jejuni*. 4. Sanidade Avícola. 5. Frango de corte. I. Pinheiro do Nascimento, Vladimir, orient. II. Título.

Gustavo Perdoncini

Avaliação de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* em etapas do processamento
de frangos de corte

Aprovado em 05 de Março de 2015.

APROVADO POR:

Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento
Orientador e Presidente da Comissão

APROVADO POR:

Dra. Laura Beatriz Rodrigues
Membro da Comissão

APROVADO POR:

Dr. Elci Dickel
Membro da Comissão

APROVADO POR:

Dr. Guiomar Pedro Bergmann
Membro da Comissão

*Dedico este trabalho aos meus pais Lauri e Elda
e aos meus irmãos João e Rafael.*

AGRADECIMENTO

Sonhar, lutar, acreditar e ter uma meta faz com que muitas portas se abram. A caminhada acadêmica que iniciei em 2010 na UFRGS possibilitou-me conhecer pessoas maravilhosas e adquirir novos conhecimentos que serão lembrado eternamente. Este trabalho é fruto de um grupo de pesquisadores, porque sozinho, não seria possível chegar até aqui.

Sempre serei grato ao professor Vladimir Pinheiro do Nascimento. Ele confiou em mim, compartilhou ideias, abriu minha visão e me apoiou durante toda a minha jornada na pós-graduação. Orientação, paciência e todo este suporte foram fundamentais neste processo de formação. Meu muitíssimo obrigado a você, meu mestre!

Professor Marcos Gomes, muitas foram as horas de trabalho, conversas e cafés que compartilhamos no Laboratório de Bacteriologia Veterinária da UFRGS. Foi neste laboratório que aprendi a trabalhar com esta bactéria que até então assustava nosso recém iniciado grupo de pesquisa. Seu conhecimento e sua paciência permitiu com que nós progredíssemos semanalmente. Muito obrigado por toda a base que nos foi compartilhada para que pudéssemos chegar aqui.

Meu agradecimento mais que especial a Yuli Melissa, Leonardo, José e Gabriel, que trabalharam incessantemente para garantir que esta pesquisa continuasse a evoluir, não deixando a peteca cair, inclusive nos finais de semana e feriados. Vocês são 10! Jamais esquecerei de quando você, Leonardo Lima, disse: "sempre lembrarei de cada pilotagem que fiz tentando a perfeição para que teu trabalho mantivesse a excelência!" A vocês e aos outros nossos colegas, Rafaela, Camila e Michele que fazem parte do *Campylobacter Team*, MUITO OBRIGADO!

Muito obrigado Thales, Karen, professores Tadeu e Hamilton e colegas do CDPA, por me auxiliarem no dia a dia do laboratório e por compartilhar momentos de muita aprendizagem. Agradeço ao apoio do Ministério da Agricultura estagiários de Medicina Veterinária da UPF e funcionários da UFRGS serviço que foi prestado e apoiado.

Muitas foram as viagens para os frigoríficos e trabalhos na UPF que tive com o Leonardo Isolan, Luciana Ruschel e Laura Rodrigues. Obrigado por permitir compartilhar comigo momentos de aprendizado e amizade.

As oportunidades que tive de conhecer pessoas, culturas e crescer intelectualmente são que nos movem e suportam nosso crescimento. Ao atravessar

fronteiras, agreguei excelentes bagagens no meu currículo acadêmico e pessoal. Agradeço a Martha Pulido da Universidade Nacional da Colômbia e aos membros da Unidad de Evaluación de Riesgos para la Inocuidad de los Alimentos da Colômbia, ao PhD. Alejandro Banda e PhD. Michael Muel da Universidade do Mississippi por permitirem estas experiências.

Minha família de Porto Alegre – Daiane, Gabriela e Thiago - centenas de momentos compartilhamos. Sorrisos, tristezas, euforias vários sentimentos nós vivemos juntos. Saibam que vocês sempre estarão comigo e sempre farão parte de mim!

Serei eternamente grato a minha família - ao meu pai Lauri e a minha mãe Elda, e aos meus irmãos João e Rafael, por me darem força pra seguir sempre em frente. Mesmo que não possamos conviver diariamente, levo vocês sempre no meu coração. Obrigado, muito obrigado!

À Deus, por permitir que eu finalizasse mais esta etapa importantíssima da minha caminhada.

“Tell me and I forget, teach me and I may remember,
involve me and I learn.”
(Autor desconhecido)

RESUMO

Campylobacter jejuni e *Campylobacter coli* têm sido associados a problemas gastroentericos em seres humanos, principalmente devido ao consumo de carne de frango. Embora medidas de controle sejam adotadas para mitigar o risco de contaminação por estas bactérias, a contaminação cruzada no processo corrobora para o aumento da prevalência de *Campylobacter* em produtos avícolas, além da diversidade genotípica que permite que alguns isolados possuam melhores condições para se disseminar e causar doenças. No primeiro trabalho foram realizadas avaliações em 13 diferentes pontos ao longo do processo de abate, da recepção dos frangos na plataforma até a refrigeração das carcaças em 12 lotes independentes. A presença foi caracterizada pelo método convencional (ISO 10272-1:2006) e a quantificação por Número Mais Provável (NMP), com confirmação de *C. jejuni* e *C. coli* através da técnica de *Multiplex-PCR*. Paralelamente foi utilizado *Real Time PCR* para identificar e quantificar *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* e *Campylobacter lari*. A ocorrência de *Campylobacter* nos lotes foi de 83% em concordância com os ensaios microbiológico convencional e molecular. *C. jejuni* foi a espécie isolada com maior frequência através do uso do *multiplex-PCR*. Através do isolamento convencional e do uso da *Real Time PCR*, respectivamente foram identificados 67% e 50% dos lotes positivos na plataforma de recepção e 67 e 75% de carcaças resfriadas. As principais variáveis identificadas através da quantificação pelo NMP/mL de *Campylobacter* spp. foram o ponto 6 (carcaça após a depenagem, antes da lavagem) e o ponto 8 (carcaça após evisceração, antes da lavagem) e importante correlação entre o suabe de cloaca com os estágios: carcaça após a depenagem, depois da lavagem; carcaça após evisceração, antes da lavagem e carcaça após a lavagem final. Este aumento da contaminação foi significativo com incremento diretamente proporcional à positividade e concentração bacteriana nas carcaças refrigeradas. O uso da lavagem das carcaças após estes dois estágios influenciaram diretamente na redução da contaminação porém a passagem pelo chiller aumentou a contaminação. No segundo trabalho foram analisadas 105 carcaças pelo método convencional de *C. jejuni* e *C. coli* em cinco abatedouros sob Inspeção Federal no sul do Brasil em 2012 e nos três primeiros meses de 2013. *Campylobacter* spp. foram isolados de 37,1% das carcaças analisadas com variação entre matadouros de zero a 71,4%. Das amostras positivas, 97,5% foram caracterizadas como *C. jejuni* e

2,5% como *C. coli*. No terceiro trabalho foram coletados cortes de frangos para verificar a ocorrência de *Campylobacter* e genes associados a virulência. Das amostras analisadas, 17 (40,48%) foram positivas para *Campylobacter jejuni*, única espécie identificada. As amostras de coxas e asas apresentaram os cortes com maior e menor ocorrência com 87,5% e 12,5% respectivamente. Dos isolados, 29 (82,85%) foram positivas para todos os três genes do *cluster* CDT - *cdtA*, *cdtB*, *cdtC* e positivos para o *cluster* CDT mais o gene *flaA* totalizaram 25 (71,42%). A identificação de genes relacionados com a virulência não garante que a amostra seja patogênica, porém estes são fatores identificados como relevantes em isolados de casos clínicos e para esclarecer a patogênese da campilobacteriose.

ABSTRACT

Campylobacter jejuni and *Campylobacter coli* have been associated to gastrointestinal disorders in human being, mainly due to poultry meat consumption. Although methods of control have been adopted in order to mitigate risk of contamination from these bacterias, cross contamination on process helps for increasing prevalence of *Campylobacter* in poultry products, besides genotype diversity, which allows that some strains have better conditions for disseminating and causing diseases. In the first work have been performed evaluations in thirteen different places throughout slaughtering process, from poultry receipt until chilling of carcass in twelve independent flocks. Presence and absence have been evaluated through conventional diagnostic method (ISO 10272-1:2006) and quantification through Most Probable Number, with confirmation of *C. jejuni* and *C. coli* through *Multiplex*-PCR assay. Simultaneously it has been used *Real Time* PCR in order to identify and quantify *Campylobacter* spp. Occurrence of *Campylobacter* in flocks was of 83% in agreement with both of essays. *C. jejuni* was an isolated specie with largest frequency through usage of *Multiplex*-PCR. Through conventional isolation and usage of *Real Time* PCR, respectively have been identified 67% and 50% of positive flocks on reception deck and 67% and 75% of carcass after chilling. The main variants identified through quantification by NMP/mL of *Campylobacter* spp. were step 6 (poultry after defeathering but before washing) and step 8 (carcass after evisceration but before washing). Significant correlation between the cloacal swab with the stages: poultry after defeathering but before washing; carcass after evisceration but before washing and substrate, and carcass after the final wash. This increase of contamination was significant with increment directly proportional to positivity and bacterial concentration on chilled carcasses. Usage of carcass washing after these two stages influence directly in a reduction of contamination, however chiller stage enabled contamination increase in both performed tests. In the second work have been analyzed 105 carcasses through horizontal detection method of *C. jejuni* and *C. coli* in five slaughterhouses under Federal Inspection in south of Brazil in 2012 and in the first three months of 2013. *Campylobacter* spp. have been isolated in 37,1% out of analyzed carcasses with a variation among slaughterhouses from zero to 71,4%. From positive samples, 97,5% were characterized as *C. jejuni* and 2,5% as *C. coli*. In the third work were collected chicken retail in order to verify an occurrence of *Campylobacter* and *virulence-associated genes* isolated of these samples. From analyzed samples, 17

(40,48%) were positive for *Campylobacter jejuni*, unique identified specie. Thighs and wing samples showed higher and less occurrence of *Campylobacter* spp., with 87,5% and 12,5%. The strain identification 29 (82,85%) were positive for all of the three genes of *cluster* CDT plus *flaA* gene totalized 25 (71,42%). Identification of these genes related to virulence does not assure that a sample will be pathogenic, however these are factors identified as important in isolated clinical cases and for clarifying pathogenesis of campylobacteriosis.

BIOGRAFIA DO AUTOR

É técnico em Agropecuária pelo Colégio La Salle em 2005, bacharel em Medicina Veterinária pela Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC, 2009). Na Universidade Federal do Rio Grande do Sul UFRGS, conquistou o grau de Mestre em Medicina Veterinária Preventiva com ênfase em Sanidade Avícola (UFRGS, 2011) e Especialista em Produção, Tecnologia e Higiene de Produtos de Origem Animal (UFRGS, 2012). Foi membro do Centro Acadêmico de Medicina Veterinária da Unoesc, da Associação de Pós-graduandos e do Conselho de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFRGS. Atualmente é aluno de doutorado em Sanidade Avícola também pela UFRGS. Desenvolve trabalhos com foco na melhoria da qualidade sanitária de carcaças de frangos de corte processadas em estabelecimentos com Sistema de Inspeção Federal. Tem trabalhado com projetos de pesquisa e extensão que envolve produção e processo de produção de carne de frango e ovos para consumo. Entre 2012 e 2014 foi *expert* convidado para participar da elaboração de documentos científicos juntamente com a Unidad de Evaluación de Riesgos para la Inocuidad de los Alimentos, UERIA, Colômbia. Durante os anos de 2013 até 2014 foi integrante do grupo de apoio técnico científico do programa Ovos RS que busca o desenvolvimento de estudos e atividades para a melhoria da produção e da qualidade dos ovos e seus derivados. Ainda participa de grupos de pesquisa e trabalhos envolvendo principalmente as bactérias *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni* e *C. coli* e *Pasteurella multocida* na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Universidade de Passo Fundo e Mississippi State University.

LISTA DE GRÁFICO

Gráfico 1 Tendência da confirmação de casos clínicos em humanos na União Europeia	32
---	----

LISTA DE TABELA

Tabela 1 Ocorrência de <i>Campylobacter</i> spp. em carcaças e cortes de frango	33
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Características morfológicas do <i>C. jejuni</i> por microscopia eletrônica.	24
Figura 2 - Ciclo e fontes de contaminação de <i>Campylobacter</i> spp.....	28
Figura 3 - Fotografia eletrônica da penetração de <i>C. fetus</i> subsp. <i>jejuni</i> em células epiteliais no intestino de aves com ruptura da membrana.....	40

LISTA DE ABREVIATURA

APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
APT	Água peptonada
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CAP	Placas de ágar <i>Campylobacter</i>
CASA	Ágar seletivo para <i>Campylobacter</i>
CCA	Ágar Campy-Cefex
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CFA	CampyFoodID
CLA	Placas de ágar <i>Campylobacter</i>
CMS	<i>Charcoal-Based Selective Medium</i>
CVNC	Células Viáveis porém Não Cultiváveis
EFSA	European Food Safety Authority
ISSO	International Standard. Orgazination
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
mCCDA	Ágar charcoal cefoperazone deoxycholate ágar modificado
NMP	Número mais Provável
OR	Odds Ratio
PCR	Reação da Cadeia da Polimerase
Ph	Potencial de hidrogênio
PI	Pós infecção
PPHO	Procedimento Padrão de Higiene Operacional
rtPCR	Real Time PCR
SF	Síndrome de Fisher
SGB	Síndrome de Guillain-Barré
SIF	Sistema de Inspeção Federal
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UNOESC	Universidade do Oeste de Santa Catarina
USDA	United States Department of Agriculture
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	19
CAPÍTULO I	22
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
1.1 O Gênero <i>Campylobacter</i>	23
1.2 Cultivo, detecção e identificação	25
1.3 Aspectos Epidemiológicos	28
1.3.1 Epidemiologia	28
1.3.2 Fontes de contaminação de aves	34
1.3.3 Transmissão vertical	34
1.3.4 Transmissão horizontal	35
1.4 Aspectos clínicos de infecções causadas pelo <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>	37
1.4.1 Patogenese	37
1.4.1.1 Aves	39
1.4.1.2 Seres humanos	41
1.5 Medidas para reduzir contaminação por <i>Campylobacter jejuni</i> e <i>C. coli</i>	42
1.5.1 Granjas avícolas	42
1.6 Custo da campilobacteriose no mundo	45
1.7 Requisitos sanitários para o comércio internacional de frangos	46
CAPÍTULO II	50
Identificação e quantificação de <i>Campylobacter jejuni</i> e <i>Campylobacter coli</i> no processamento de frango de corte no sul do Brasil	51
CAPÍTULO III	77
Occurrence of <i>Campylobacter jejuni</i> and <i>C. coli</i> on broiler carcass after chilling in southern Brazil	78
CAPÍTULO IV	87
Identificação de <i>Campylobacter jejuni</i> e <i>Campylobacter coli</i> e genes associados a virulência em cortes de frango	88
CONSIDERAÇÕES FINAIS	104
REFERÊNCIAS	106
APÊNDICE A	130
Fotos dos pontos de coleta do capítulo III - Identificação e quantificação de <i>Campylobacter</i> no processamento de frango de corte no sul do Brasil	130

INTRODUÇÃO

A avicultura no Brasil assume o papel de produzir proteína animal de altíssima qualidade e com reconhecimento mundial. Esta atividade que é de grande importância social e econômica é representada por dezenas de milhares de produtores, e que respondem economicamente por quase 1,5% do Produto Interno Bruto. Toda esta dimensão faz com que Brasil esteja entre os três principais produtores e maior exportador, com exportação para mais de 150 países (UBABEF, 2013).

O crescimento da cadeia avícola e sua representatividade no mundo só foram possíveis devido ao trabalho em conjunto de todo o setor e com o objetivo de produzir alimentos seguros. O desafio atual é o controle de bactérias do gênero *Campylobacter*, que são as mais notificadas em relatos de gastroenterites bacterianas União Europeia e Estados Unidos e tem as aves como fonte principal.

O controle desta contaminação dá-se através do esboço de medidas de controle no campo e na indústria, além de ações para melhor conhecer o comportamento desta bactéria. Frente essa grande responsabilidade de produzir alimento em quantidade e com qualidade, esse trabalho foi elaborado para melhor conhecer a contaminação de *Campylobacter* na linha de abate de frangos e as características genotípicas destes isolados. Estas bactérias, além de ser um dos principais agentes de infecções alimentares associadas a produtos de origem aviária, já são amplamente discutidas em importantes fóruns internacionais que abordam segurança alimentar, sob o ponto de vista de inocuidade alimentar e comércio internacional.

A preocupação de órgãos como *Codex Alimentarius* e Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) está centrada no controle de *Salmonella* em produtos cárneos, principalmente de origem aviária devido ao crescimento acelerado dos casos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) em humanos por *Campylobacter*, este agente passou a ser considerado para o controle em um nível de importância equivalente ao da *Salmonella*.

No Brasil, dados sobre a ocorrência e disseminação deste agente na cadeia avícola são escassos e baseados em métodos qualitativos e não quantitativos, sendo este último uma tendência por caracterizar melhor esta contaminação. Quando a pauta de discussão é sobre o conceito de tolerância zero para *Salmonella* em carne de frango, atualmente em discussão na *Codex Alimentarius* (FAO – WHO *Food Standard*

Programme), supõem-se que em um futuro não muito distante esse tema será discutido também frente o *Campylobacter*.

A ocorrência de *Campylobacter* em carne de aves poderia até ser encarada com naturalidade, uma vez que este gênero faz parte da microbiota destes animais. A incidência e a quantidade desses microrganismos nas carcaças e cortes de frangos variam conforme as condições de manejo durante a criação e com os cuidados higiênico-sanitários nas operações de abate e posterior manipulação das carcaças. Medidas inespecíficas para o controle bacteriano são adotadas desde as primeiras fases do ciclo de produção de frangos, passando pelo transporte, abate, processamento, armazenagem e distribuição.

Entretanto, existe um consenso entre os pesquisadores de que eliminar a contaminação bacteriana das carcaças durante o abate é uma tarefa complexa, já que a tecnologia de abate não tem meios de eliminar completamente uma contaminação pré-existente. As contaminações podem ocorrer tanto por contato entre aves sadias e aves contaminadas, como por contaminação cruzada durante o processo de abate e subsequente manipulação das carcaças.

Para manter a qualidade dos produtos e atender as exigências dos mercados internacionais, o Brasil dispõe de uma legislação, onde se destacam o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA, 1950), Programas de autocontrole (Circulares 175 e 176, MAPA, 2005), Padrões Microbiológicos para Alimentos (RDC 12, ANVISA, 2001) e, mais especificamente para aves, o Plano Nacional de Sanidade Avícola (PNSA, 1995), o Programa de Redução de Patógenos (Instrução Normativa 70/2003) e o Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carnes de Aves (Portaria 210, 1998).

A observância destas normas têm por objetivo assegurar a qualidade sanitária da carne de frango que são constituídas de uma série de medidas que visam diminuir a contaminação bacteriana durante a tecnologia de abate. Entretanto, apenas exames qualitativos destas contaminações seria insuficiente, enquanto que a quantificação possibilitaria realmente avaliar a efetividade destas medidas.

Diante do exposto, a análise microbiológica e quantificação desse agente no recebimento de aves para abate, processamento de abate e a armazenagem são fundamentais para estimar a extensão da carga microbiana existente nos produtos avícolas nas várias etapas. Estas avaliações servem de subsídio para a reavaliação e validação dos Pontos Críticos de Controle do plano de APPCC (Análise de Perigos e

Pontos Críticos de Controle), obrigatório nas empresas avícolas exportadoras e que visam a qualidade microbiológica da carne de frango.

CAPÍTULO I
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 O Gênero *Campylobacter*

A primeira descoberta do gênero *Campylobacter* se deu por pesquisas do bacteriologista Theodor Escherich no ano de 1886, quando descreveu um organismo com formato de “S”. Após esta descoberta, em 1906, dois britânicos relataram a presença de uma “grande quantidade de organismos peculiares” na mucosa uterina de uma ovelha prenhe (SKIRROW, 2006). Nos anos seguintes Smith e Taylor isolaram de aborto de bovinos novamente estes microrganismos, e desta vez foram caracterizados por *Vibrio fetus* (SMITH e TAYLOR, 1919). A identificação destas bactérias continuou nas décadas seguintes com a caracterização de isolados de fezes diarreicas de bovinos em 1927 (SMITH e ORCUTT, 1927) e de suínos em 1944 (DOYLE, 1948) e que foram denominadas de *Vibrio jejuni* e *Vibrio coli*. A identificação destas estruturas também foi relatada por Elizabeth King em cultura de sangue de pacientes com gastroenterites. Entretanto, foi na década de 70 que foi proposto o gênero *Campylobacter* por Verón e Catelani (1973), devido estas bactérias possuírem diferenças das demais presentes no gênero *Vibrio*. Avanços no cultivo e identificação também tiveram grandes progressos nesta década. A caracterização da dimensão e motilidade foram avaliadas por Butzler e colaboradores (1973) e o desenvolvimento de meios e suplementos antimicrobianos permitiram a rotina de diagnóstico microbiológica desta bactéria (SKIRROW, 1977; BOAALTON & ROBERTSON, 1982).

Desde então, a estrutura taxonômica teve várias mudanças devido a semelhanças e diferenças nas estruturas gênicas, classificando-as na família *Campylobacteraceae* (VANDAMME & DE LEY, 1991) qual também faz parte bactérias que antes eram caracterizadas como *Campylobacter* e que agora pertencem ao gênero *Arcobacter*. Atualmente, o gênero *Campylobacter* está na “*List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*” e cita 33 espécies e 14 subespécies.

Campylobacter spp. são bactérias Gram negativas que apresentam forma de bastonetes curvos ou espiralados, com forma de asa de gaivota ou formato de “S” – Figura 1 – com dimensão de 0,2µm a 0,9 µm de largura e 0,2 µm a 0,5µm de comprimento (BUTZLER, 2004; DUBRUYNE et al., 2008). As células velhas ou estressadas apresentam forma cocóide – caracterizadas de “Células Viáveis porém Não

Cultiváveis” – CVNC - (DUBRUYNE et al., 2008), contudo possuem a capacidade de manter a virulência e reverter este quadro quando o meio de cultivo o for adequado (OLIVER, 2005). A grande maioria dos isolados de *Campylobacter* são móveis e apresentam somente um flagelo. Exceções são observadas no *Campylobacter gracilis* que não é móvel e no *Campylobacter showae* que é multiflagelar. Apresentam oxidase positiva em todas as espécies, com exceção do *C. gracilis* (VANDAMME & DE LEY 1991).

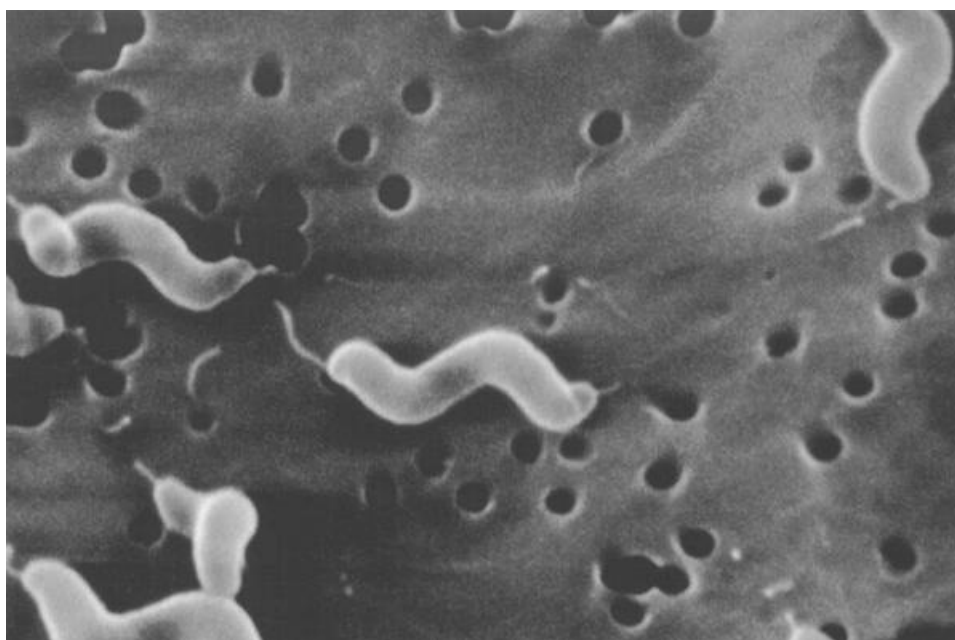


Figura 1 – Características morfológicas do *C. jejuni* por microscopia eletrônica.
Fonte: Virginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine, Blacksburg, Virginia.

Estas bactérias obtêm energia de aminoácidos devido não fermentarem e hidrolisarem carboidratos. As espécies *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* estão entre os mais importantes campilobacteres isolados de humanos. Bioquimicamente o *C. jejuni* possui duas subespécies: *C. jejuni* subsp. *jejuni* e *C. jejuni* subsp. *doyle* (STEELE & OWEN 1988). São bactérias termotolerantes, oxidase positiva, hidrolisam indoxil acetato e reduzem nitratos, com exceção da sub espécie *C. jejuni* subsp *jejuni* que possui habilidade em hidrolisar hipurato. Entretanto o *C. coli* e o *C. jejuni* subsp *doyle* não possuem esta mesma capacidade (DUBRUYNE et al., 2008).

As espécies *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari* são termotolerantes, crescem a 41,5°C e necessitam uma atmosfera de 5 a 7% de oxigênio, 10% de gás carbônico e 85% de nitrogênio para serem cultivados (SNELLING, 2005; JOES, 2010). Os *Campylobacter* spp. não sobrevivem em condições com pH menor que 4,9 e maior que 9 – com pH

ideal entre 6,5 e 7,5. As temperaturas altas (42°C) na presença de oxigênio reduz a população bacteriana, porém temperatura baixa reduz o estresse oxidativo (GARÉNAUX et al., 2008). Da mesma forma são mais sensíveis ao estresse osmótico que outras bactérias patogênicas e não crescem em concentrações de cloreto de sódio superiores a 2%. Apesar dos isolados não sobreviverem por período de 3 dias a -15°C (STERN e KOTULA, 1982), quando presente em alimentos congelados há redução significativa a partir de 31 dias, porém ainda é isolado com 220 dias quando congelado a -20°C (GEORGSSON et al., 2006). Na cocção *Campylobacter* é rapidamente inativado em Valor-D de 60°C em menos de 1 minuto ou 55°C por um minuto (BASERISALEHU et al., 2006).

1.2 Cultivo, detecção e identificação

O cultivo, detecção e a identificação de *Campylobacter* spp. são limitantes na pesquisa desta bactéria. Por ser um organismo de difícil cultivo, com requerimento nutricional complexo e com ambiente atmosférico microaerófilo (KELLY, 2001) são necessários meios de cultivos mais exigentes para crescerem e que reduzem a flora competitiva. Os protocolos descritos para o cultivo desta bactéria subdividem-se em meios líquidos e sólidos, com o uso de sangue ou carvão ativado (LAI-KING et al., 1985; CORRY et al., 1995; ISO, 2006). Para ampliar as chances de isolamento foi proposto por Hutchinson & Bolton (1984) o uso de suplementos antimicrobianos e antifúngicos como a cefalosporina, trimetropim, vancomicina, ciclohexamida e anfotericina para permitir a seletividade de *Campylobacter*.

Meios contendo sangue mostram eficiência no diagnóstico laboratorial ao adicionar sangue de ovelha (BOLTON et al., 1984) e sangue de equino lisado (BUTZLER, 1973; SKIRROW, 1977; BOLTON & ROBERTSON, 1982). Além do sangue em meios de cultura, o carvão ativado também é uma opção utilizada pra favorecer o crescimento de *Campylobacter* spp. Os principais meios de cultura que o empregam é o *Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar* - CCDA (BOLTON et al., 1984) e o *Charcoal-Based Selective Medium* – CMS. O uso do suplemento FBP (combinação sulfato ferroso, metabilsufito de sódio e piruvato de sódio) também pode ser adicionado nos meios para aumentar a aerotolerância do microrganismo por meio da redução dos componentes tóxicos derivados do oxigênio.

As principais metodologias internacionais recomendadas para isolar e identificar *Campylobacter* spp. são a ISO 10272-1 (*International Organization for Standardization*) e o MLG 41.02 do USDA (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos). A ISO 10272-1 descreve o uso de água peptonada tamponada (APT), com enriquecimento seletivo com caldo Bolton, inoculação em ágar charcoal cefoperazone deoxycholate modificado – mCCDA, e confirmação de colônias suspeitas em ágar sangue Columbia. Já a metodologia MLG 41.02 do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2014) consiste em método de plaqueamento direto em ágar Cefex para isolamento, identificação e enumeração de *Campylobacter jejuni*, *C. coli* e *C. lari* presente em amostras de rinsagem de carcaças de aves, esponjas e produtos de aves crus. Estas duas normas se diferenciam principalmente pela diferença entre os meios sólidos utilizados e emprego de pré-enriquecimento somente na primeira metodologia.

A avaliação da eficácia de diversos meios de cultura e suplementos são relatados em vários estudos. BOLTON & ROBERTSON (1982) avaliaram os ágares Skirrow e Preston para isolar campilobacteres oriundas de fezes humanas, animais, aves e meio ambiente. Ao adicionar combinação de antimicrobianos – polimixina, rifampicina, trimetoprim e actidione – foi observado maior seletividade no meio Skirrow do que no meio Preston. Ao realizar o plaqueamento de *C. jejuni* direto em ágar charcoal cefoperazone deoxycholate - CCDA e Preston por Bolton e colaboradores (1984), o ágar mCCDA mostrou-se menos seletivo que o Preston. No mesmo estudo também concluíram que temperatura de 42°C também foi necessário para maximizar o isolamento de *C. jejuni*.

A avaliação dos ágares Campy-Line (CLA), Campy-Cefex (CCA), CCA modificado, placas de ágar *Campylobacter* (CAP) e mCCDA foram estudados por Kiess e colaboradores (2010). Nenhuma diferença foi observada nos meios testados quanto a habilidade de crescimento de *Campylobacter*. Embora não tenham encontrado diferença nos meios testados, o CCA, mCCA e mCCDA não suprimiram a contaminação nas placas da mesma forma que nos meios CLA e CAP. O que dificulta isolar e identificar campilobacteres suspeitos em diversos casos são os contaminantes presentes nas amostras. Kiess e colaboradores (2010) ainda relatam que conforme a técnica empregada para o cultivo são observados diferentes crescimentos bacterianos. Corroborando com este trabalho, Ahmed e colaboradores (2012) avaliaram randomicamente 483 amostras suspeitas de *Campylobacter* dos meios CCA, CampyFoodID (CFA), Brilliance™ CampyCount (BBCA), mCCDA e ágar seletivo

para *Campylobacter* (CASA) e com recuperação de 84%, 87%, 88%, 90% e 100%. Neste mesmo trabalho o uso CCA, CFA e CASA são meios indicados para a contagem direta e diferenciação de *Campylobacter* devido pouca formação de *swarming* e variação das colônias em comparação com os ágares mCCDA e CCA.

Os trabalhos que envolvam o emprego de métodos que permitam agregar novos ensaios para a detecção e quantificação de *Campylobacter* spp. têm sido utilizados para driblar o cultivo de bactérias e a redução do tempo do processo. O cultivo microbiológico é considerado padrão ouro para o isolamento e caracterização de *Campylobacter*, entretanto métodos baseados em caracterização genotípica, como a Reação em Cadeia da Polimerase – PCR – para identificar as espécies (DENIS et al., 1999) é uma alternativa que substitui a identificação através de testes fenotípicos que não apresentam padrões característicos para 100% dos isolados da espécie (ZORMAN et al., 2002). O uso do Real Time PCR (rtPCR) também é uma opção para caracterizar os isolados, além de permitir a quantificação a partir de amostras não enriquecidas ou não detectadas por métodos tradicionais, além de reduzir o tempo total de diagnóstico (LaGIER et al., 2004; MELERO et al., 2011).

Embora o acesso ao rtPCR seja difícil, esta técnica permite uma alternativa para identificar, quantificar e avaliar o patógeno alvo em um curto espaço de tempo e para obter dados para futuras análises de risco. Esta técnica possibilita além da quantificação, a diferenciação de espécies (HONG et al., 2007; LEBALANC-MARIDOR et al., 2011), empregos em trabalhos epidemiológicos (Ridley et al., 2008), identificação de amostras resistentes a antimicrobianos (WILSON, et al., 2000) bem como identificação em alimentos (SAILS et al., 2003). Uma das desvantagens da técnica do PCR convencional são os falsos positivos que são atribuídos a contaminação cruzada por ácidos nucleicos na manipulação de material amplificado (KITCHIN et al., 1990) que são evitadas no rtPCR por não manipular o produto já amplificado (LUND et al., 2004).

Métodos clássicos de quantificação como o Número Mais Provável – NMP (BLODGET, 2006) se diferenciam do rtPCR devido ao tempo gasto para gerar resultados, do alto trabalho laboral e os elevados custos de processo (MAYR et al., 2010). O resultado esperado do NMP é a sensibilidade do crescimento em múltiplos tubos e plaqueamento em meios específicos para cada microrganismo. Para evitar o trabalho dispendioso e de alto custo, a miniaturização do NMP foi proposto Chenu et al., (2013) para enumerar *Campylobacter* spp. de fonte aviária sem afetar a sensibilidade e a especificidade. A padronização de métodos miniaturizados que

permitam quantificar de forma eficiente já foram relatadas com outras bactérias (JAGALS et al., 2000; PAVIC et al., 2010) porém ainda dependem de muito trabalho.

1.3 Aspectos Epidemiológicos

1.3.1 Epidemiologia

A campilobacteriose é uma zoonose emergente de origem alimentar causada principalmente pelas espécies *C. jejuni* e *C. coli*. Supõem-se que a alta incidência dessas infecções relatadas em seres humanos está associada ao consumo de produtos avícolas (DICKINS, 2002; EFSA, 2011) que é a principal espécie animal envolvida no ciclo epidemiológico desta bactéria – figura 2 – e que tem preocupado autoridade de saúde de todo o mundo.

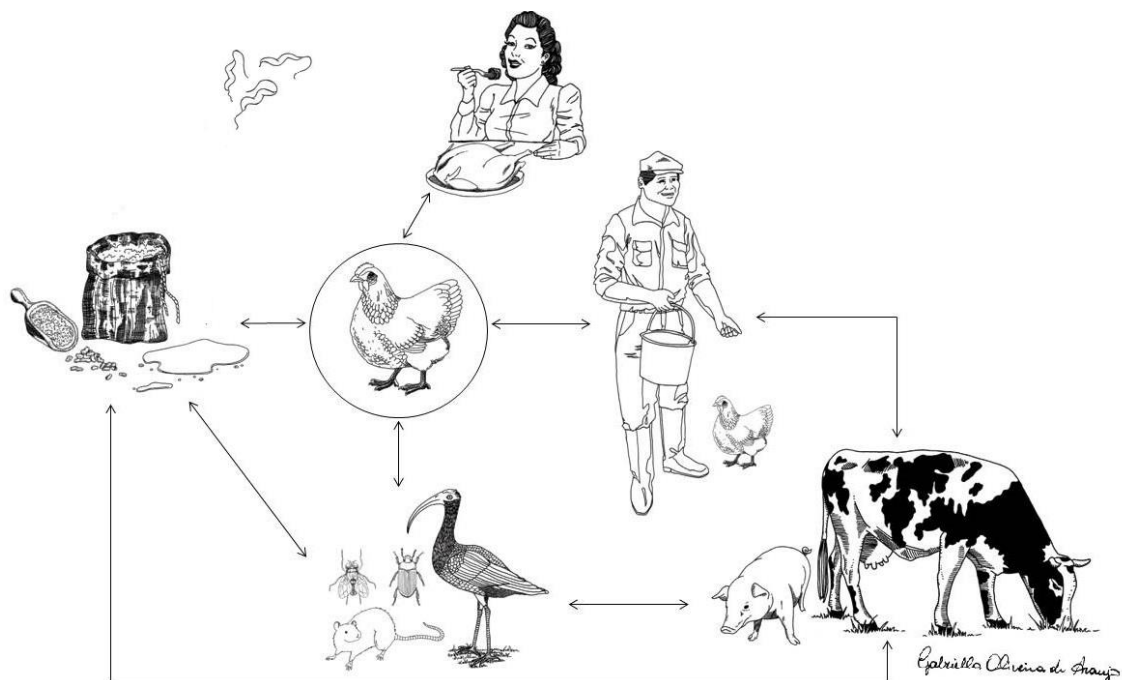


Figura 2 - Ciclo e fontes de contaminação de *Campylobacter* spp.

Vários são os reservatórios de *Campylobacter* spp. e que os frangos podem infectar-se. Aves silvestres, insetos, roedores e animais de produção podem contaminar-se pela ingestão de água ou ração contaminada ou através do contato direto entre os animais. Fontes de água com a presença de biofilmes formado por esta bactéria ou a associação do *Campylobacter* spp. com protozoários permitem a manutenção da contaminação. Fômites e colaboradores também contribuem para sua disseminação. Após os frangos serem colonizados, tornam-se a principal fonte de contaminação para humanos. (Fonte: o autor).

Em 2013 nos Estados Unidos da América o FoodNet identificou 6.611 casos de infecção, 1.010 hospitalizações e 12 mortes decorrentes do envolvimento do

Campylobacter (CDC, 2014). Porém, este número está aquém do notificado pela União Europeia. Em 2012, *Campylobacter* continuou sendo o principal patógeno reportado de gastroenterites de seres humanos desde 2005. O número de casos confirmados foram 214.268, os quais tiveram diminuição de 4.23% ao comparar com o ano de 2011 (EFSA, 2014). Notificações de *Campylobacter* tem sido relatadas em diversos países do mundo, com taxas de 13,82 casos nos Estados Unidos (CDC, 2014) 154,2 na Nova Zelândia (NZPHSP, 2014) e 55,49 na União Europeia (EFSA, 2014) para 100 mil habitantes.

A ocorrência de *Campylobacter* em lotes de aves tem variado nos últimos anos. Na União Europeia a prevalência ficou entre 0 a 83,6 % em 2014 (EFSA, 2014) contra 2 a 100% em 2010 (EFSA, 2010). No ano de 2010 foi retratado prevalência de 75,8% das carcaças processadas (EFSA, 2010a) e estes dados são próximos à prevalência de 64,4% e 84,3% verificada em lotes e carcaças na Austrália (FSANZ, 2010).

A alta ocorrência de lotes positivos para *Campylobacter* está relacionado a sazonalidade, alta densidade de aves em um mesmo local, distância entre granjas, animais silvestres e outros fatores que corroboram para facilitar a permanência desta bactéria no setor avícola (BOYSEN et al., 2011). Adoção de medidas específicas de controle nas granjas e nas indústrias são objetivos propostos para minimizar a contaminação de carcaças por *Campylobacter* spp., e conseqüentemente reduzir o risco de contaminação para humanos (HALD et al., 2000).

Ainda na União Europeia e mais dois países não pertencentes ao grupo, foi identificado e quantificado *Campylobacter* spp. em lotes e carcaças de frangos de corte durante o ano de 2008. Do total de 10.132 lotes amostrados de 561 matadouros frigoríficos, a prevalência verificada foi de 71,2% de positividade para os lotes e de 75,8% para as carcaças. Houve uma grande variação entre países, encontrando de 2% a 100% e 4,9% a 100% para cecos e carcaças, respectivamente (EFSA, 2010), e *Campylobacter jejuni* foi a espécie mais prevalente.

A colonização de lotes de frangos é mais comum em granjas onde não são seguidos os princípios da biosseguridade que envolvem o controle do fluxo de pessoas e veículos, controle da qualidade de água e rações, controle de roedores, piolhos e moscas, desinfecção dos materiais, além de barreiras físicas para impedir a entrada de animais silvestres no perímetro das granjas. Telas nas portas e laterais dos galpões para bloquear a entrada de aves silvestres também contribuem com este manejo. Sasaki et al.,

(2011) suportam estes dados ao demonstrar onde não há cloração da água há maior colonização de lotes, ao comparar com lotes com água clorada.

Na China ao avaliarem 5 diferentes regiões foi identificado 35,9% dos lotes avaliados como positivos, também predominando o *C. jejuni* (CHEN et al., 2010). Já no Japão, Haruna et al., (2012) identificaram uma maior incidência de lotes positivos. Ao avaliar 142 lotes foi identificado uma média de 47,2% de positividade ao longo do ano, com diferenças sazonais significativas.

Embora muitos estudos tenham confirmado a presença de *Campylobacter* spp. nas criações comerciais de aves, a avaliação quantitativa do risco de carrear esta contaminação para o frigorífico e contaminar o produto final deve ser levada em consideração. Apesar do ID₅₀ ser menor de 40 UFC para colonizar a ave de um dia (CAWTHAR et al., 1996) a presença de quantidades menores já é um risco e pode iniciar a contaminação. Da mesma forma, estima-se que a dose infectante para seres humanos é próxima a 500 UFC (CDC, 2011), uma dose baixa para iniciar a infecção que contrasta com a falta de padrão microbiológico para carnes de aves, ainda não estabelecido. A ocorrência de *Campylobacter* em carne de aves poderia até ser encarada com naturalidade, uma vez que este gênero faz parte da microbiota destes animais. A incidência e a quantidade desses microrganismos nas carcaças e cortes de frangos variam conforme as condições de manejo durante a criação e com os cuidados higiênico-sanitários nas operações de abate e posterior manipulação das carcaças.

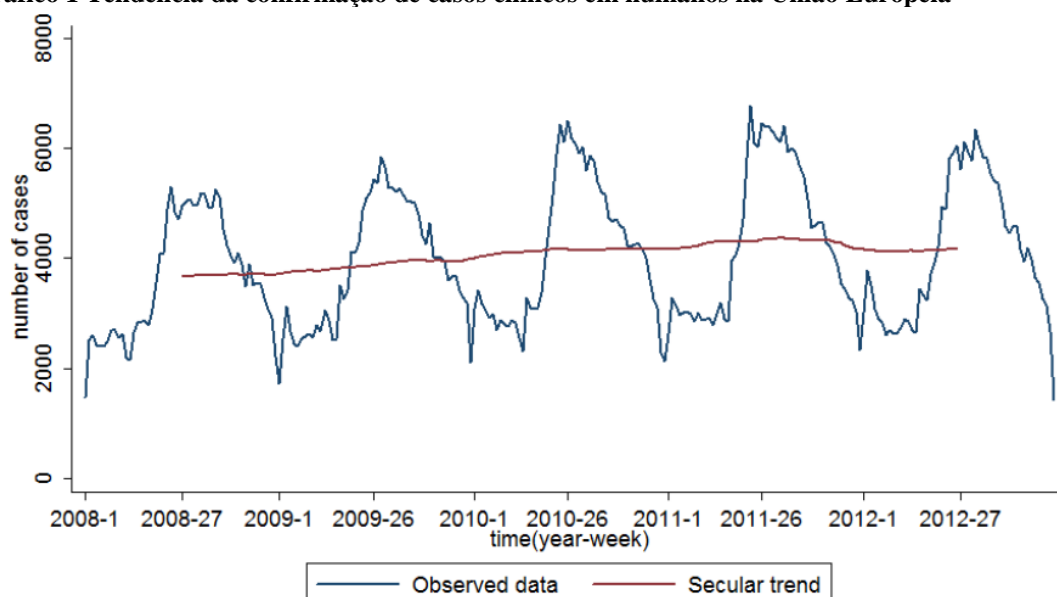
A Autoridade de Segurança Alimentar da Europa (EFSA, 2010), ao correlacionar a prevalência e a concentração de *Campylobacter* em carcaças de frango verificou que quanto maior a prevalência de *Campylobacter* spp. nos países avaliados maior a contagem final nas carcaças processadas. Quase metade (47%) das carcaças avaliadas continham menos de 10 UFC/g e 12,2% continham entre 10-99 UFC/g. Altas contagens (100-999 UFC/g) foram detectadas em 19,3% das amostras, entre 1.000 e 10.000 UFC/g em 15,8% e mais de 10.000 UFC/g em 5,8% das carcaças. *Campylobacter jejuni* (44,3%), *Campylobacter coli* (2,7%) e seguido por *Campylobacter lari* (0,3%) foram as principais espécies identificadas. A caracterização destas espécies são semelhantes às identificadas em trabalho realizado pelo mesmo órgão em 2007 (EFSA, 2009).

Na Alemanha, Atanassora et al., (2007), avaliaram 144 perus retirados diretamente de frigorífico e 100 amostras de peru coletadas no varejo. Das amostras coletadas no frigorífico, 29,2% foram positivas para *Campylobacter*, observando uma

variação de 8,3% a 91,7% entre lotes. No varejo, as carcaças de perus apresentaram uma prevalência de 34%. Estudos quantitativos também foram realizados com essas amostras de perus, e verificou-se que as amostradas oriundas do matadouro frigorífico apresentaram uma média logarítmica de 1,9 a 2,5 UFC g⁻¹, já as carcaças oriundas do varejo, obtiveram um valor logarítmico de 2,1 UFC g⁻¹

Dados epidemiológico do Brasil gerados por Kuana et al., (2008) identificaram 81,81% de lotes positivos para *Campylobacter* spp., porém este número aumenta para 100% após o processamento no frigorífico. Os níveis médios de colonização dos lotes foram de 7,0 UFC g⁻¹ e 4,24 UFC g⁻¹ no conteúdo cecal e na carcaça após o último *chiller*. Seguindo a mesma tendência das espécies citadas nos trabalhos anteriores, *C. jejuni* subsp *jejuni* foi o mais isolado, com 68,8%, seguido de 8,3% para *Campylobacter coli*, 6,3% para *Campylobacter jejuni* subsp *doylei*, 4,2% *Campylobacter upsaliensis* e 2,1% para *Campylobacter fetus* subsp *fetus*.

Embora seja observado uma ocorrência alta de *Campylobacter* em produtos avícolas, Andrzejewska e colaboradores (2015) investigaram na Polônia a presença de *Campylobacter* em carcaças resfriadas entre 2009 e 2013. Neste período foi observado uma tendência da redução na prevalência de 60,2% para 32% ao longo dos anos. Na contramão destes dados, o número de casos de campilobacteriose aumentou entre 2008 e 2012 na União Europeia– gráfico 1, apesar de ter reduzido o número de casos de campilobacteriose entre 2012 e 2011 (EFSA, 2014). Entretanto a prevalência de *Campylobacter* spp. não teve variação significativa entre os anos e também não foi influenciada pela sazonalidade (WILLIAMS & OYARZABAL 2012).

Gráfico 1 Tendência da confirmação de casos clínicos em humanos na União Europeia

Fonte: EFSA Journal (2014)

No panorama geral é possível observar que a ocorrência de *Campylobacter* spp. é alta, e medidas de controle devem ser focadas no campo para impedir, ou reduzir, que esta contaminação seja carregada para as plantas frigoríficas. Na Tabela 1 está sumarizado dados de trabalhos realizados em diversas partes do mundo. A variação verificada foi entre 15,5% a 91% em carcaças de frango e de 31,6% a 87,2% nos cortes. Esta amplitude observada entres os trabalhos envolve variáveis climáticas, intervenções associadas a biosseguridade, características genéticas de cada isolado, boas práticas de fabricação no abate, APPCC, entre outras premissas que permitem maior ou menor taxa de infectividade de lotes, e consequentemente dos produtos finais.

Tabela 1 Ocorrência de *Campylobacter* spp. em carcaças e cortes de frango

Amostras	Ocorrência	Espécie	País	Referência
Carcaças de frango				
Carcaças de frango	15%	<i>C. jejuni</i>	Suécia	Lindblad et al., 2006
Carcaças de frango	35,8%	<i>Campylobacter</i> spp.	Canadá	Arsenault et al., 2007
Carcaças de frango	52%	<i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>	EUA	Son et al., 2007
Carcaças de frango	40%	<i>Campylobacter</i> spp.	Alemanha	Klein et al., 2007
Carcaças de frango	90,5%	<i>Campylobacter</i> spp.	Austrália	Pointon et al., 2008
Carcaças de frango	91%	<i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> e <i>C. lari</i>	Irlanda	Moran et al., 2009
Carcaças de frango	87,5%	<i>Campylobacter</i> spp.	França	Hue et al., 2010
Carcaças de frango	77,2%	<i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> e <i>C. lari</i>	França	Hue et al., 2011
Carcaças de frango	70,2%	<i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>	Brasil	Perdoncini, 2012
Carcaças de frango	34,7%	<i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>	Brasil	Oliveira et al., 2013
Carcaças de frango	37,5%	<i>Campylobacter</i>	EUA	Schroeder et al., 2014
Carcaças de frango	41,6%	<i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>	Polônia	Andrzejewska et al., 2015
Carcaças de frango	63,1%	<i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>	Iran	Zendehbad et al., 2015
Carcaças de frango	16,8%	<i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>	Brasil	Hungaro et al., 2015
Cortes de frango				
Corte de frango	81,3%	<i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>	Itália	Pezzotti et al., 2003
Cortes de frango	49,5%	<i>Campylobacter</i> spp.	Espanha	Dominguez et al., 2002
Pele de frango e coxa	46,5%	<i>Campylobacter</i> spp.	Correia	Scherer et al., 2006
Peito com pele	33,3%	<i>Campylobacter</i> spp.	Alemanha	Klein et al., 2007
Cortes de frango	31,6%	<i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>	EUA	Son et al., 2007
Cortes de frangos e produtos	64,7%	<i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>	Japão	Sallam, 2007

1.3.2 Fontes de contaminação de aves

A prevenção e o controle da colonização de frangos por *Campylobacter* passa pelas condições de planos de estratégias de biosseguridade nas granjas. Devido a disseminação ser basicamente horizontal, não transmitida pela progênie, o foco é voltado em intervenções e estratégias para evitar a entrada ou reduzir a contaminação nas propriedades avícolas.

1.3.3 Transmissão vertical

A contaminação vertical ocorre quando há contaminação interna dos ovos por *Campylobacter*, ou outro agente oriundo do trato reprodutivo, anterior à deposição da casca (NEWELL et al., 2011), porém esta via de contaminação se difere da extravaginal, onde a contaminação dos ovos ocorre durante a ovoposição ao ter contato direto com as fezes.

A transmissão de *Campylobacter* via ovo foi estudada por SHANKER et al., (1986) em granjas de matrizes e demais avaliações do conteúdo interno dos ovos de matrizes sabidamente positivas e a hipótese desta via foi refutada. Caliccott colaboradores (2006) também suportam estes dados e não identificaram *Campylobacter* na progênie de lotes positivos. Entretanto ao ser reportado 0,75% das amostras positivas por Byrd e colaboradores, (2007), deve-se levar em consideração que debris da incubação, provavelmente contaminado com material fecal seja uma fonte de contaminação.

A comparação do perfil genético de isolado de lotes positivos com os progenitores indicam pouco ou nenhuma semelhança entre eles (PETERSEN et al., 2001; CALLICOTT et al., 2006) o que enfatiza a importância da transmissão horizontal e, praticamente, não caracteriza como importante uma possível contaminação vertical.

1.3.4 Transmissão horizontal

Já a transmissão horizontal é caracterizada como principal meio de disseminação da contaminação. As fontes são amplas e cada uma possui um nível de relevância por permitir carrear outros patógenos ou permitir a perpetuação nas granjas. A multiplicação de *Campylobacter* ocorre no trato gastrointestinal de hospedeiros de sangue quente e através do material fecal contaminado, ocorre a disseminação para o ambiente e/ou para a produção de aves.

Quando a questão de discussão é como ocorre a colonização em lotes novos e por que a ocorrência de *Campylobacter* é alta em frangos, vários esclarecimentos ainda são necessários. Nas primeiras semanas de vida das aves é observado que existe uma colonização limitada e após os 14 dias é observado um aumento gradual de organismos recuperados de cecos (GLUNDER et al., 1992) que varia conforme o isolado envolvido (RINGOIR & KOROLIK 2002). Uma redução da presença de anticorpos maternos podem auxiliar na proteção das aves nos primeiros dias (SAHIN et al., 2001), apesar de não ser observado com maior intensidade após a segunda semana de alojamento.

O risco de contaminação de *Campylobacter* é maior quando há galpões de múltiplas idades e este nível é cada vez mais elevado ao aumentar o número de galpões na mesma unidade (GIBBENS et al., 2001; BOUWKNEGT et al., 2004). Outros riscos, como inadequada conservação do galpão, higiene precária, limpeza e desinfecção insuficiente entre alojamentos, curto vazão sanitário, proximidade com outras granjas são pontos que devem ser levados em conta e que aumentam as chances de contaminação. Variáveis como a idade, o verão e a presença de três ou mais galpões na propriedade também foram associados ao aumento significativo da infecção em trabalho realizado por McDowell e colaboradores (2008) no nordeste da Irlanda. Modelos elaborados na Holanda acrescentam que a transmissão é reduzida entre 41 a 44% quando há outras espécies de animais na mesma propriedade (KATSMA et al., 2007) como bovino e suínos que também são fontes de *Campylobacter* spp.

O *C. jejuni* pode ser recuperado de reservatórios e de linhas de água, e o controle do cloro na água ajuda a reduzir a concentração bacteriana nestes locais com consequente redução na incidência de *Campylobacter* isolado das aves (PEARSON et al., 1993). O estresse causado pela água ou por ambientes pobres em nutrientes induz que o *C. jejuni* procure alternativas para sobreviver. O formato de cocóides que

permitem ficar viáveis porém não cultiváveis e a incorporação e ou a formação de biofilmes permite sobreviver por longos períodos nestes ambientes hostis (BUSWELL et al., 1998). Apesar dos sistemas de água permitirem sua sobrevivência em biofilmes junto com outros microcosmos naturais, não é frequente o isolamento na água, principalmente quando tratada. Da mesma forma, a ração é outro local aonde não favorece o desenvolvimento de *Campylobacter*, não considerando como importante fonte de infecção (HANSSON et al., 2007).

Dentre as fontes que pode ser recuperado *Campylobacter* spp. está insetos, roedores, pets e animais silvestres. Dando ênfase em insetos e roedores, o controle de pragas deve ser ativo, com verificação periódico das iscas e aplicação de produtos para este fim. A presença de roedores nas granjas possui uma associação forte com lotes positivos (McDOWELL et al., 2008). Isolados de fezes de aves silvestres, não surpreendem ao apresentar as mesmas características genotípicas e fenotípicas de frangos de aviários (NEWELL et al., 2011). Campilobacteres também podem ser isolados de insetos como cascudinho (*Alphitobius diaperinus*), moscas, piolhos e baratas que estão próximos aos aviários. Estes insetos permitem que a contaminação dos granjas permaneçam ativa entre lotes. Insetos estão relacionados com o aumento do risco de colonização dos lotes (PETERSEN et al., 2001) e medidas para reduzir a população de vetores como os piolhos, moscas e cascudinhos são necessários (NEWELL & FEARNLEY 2003).

O tráfego de objetos, pessoas e veículos são importantes fontes de carreamento entre granjas (NEWELL et al., 2011), além de possibilitar a contaminação de lotes negativos durante o transporte para o abate (HANSSON et al., 2005). *Campylobacter* isolado de botas, equipamentos, gaiolas de transporte, falta de restrição de fluxo e programas de segurança alimentar, associado com a contaminação ambiental oriundo da falta de higiene, barreiras e vazios sanitárias e desinfecção de equipamentos e ambiente caracterizam fontes importantes de *Campylobacter* para frangos (AGUNOS et al., 2014).

Um dos passos importantes que tem sido dado no Brasil nas últimas décadas foram as construções de barreiras sanitárias nas granjas progenitoras e de produção de frango de corte e produção de ovos para consumo humano. A utilização destas ferramentas para a desinfecções de materiais, higienização e troca de roupas de

veterinários e colaboradores são maneiras de evitar a disseminação de microrganismos e barrar contaminações horizontais.

2.4 Aspectos clínicos de infecções causadas pelo *C. jejuni* e *C. coli*

1.4.1 Patogênese

Pesquisas para elucidar os fatores e os processos que envolvem a patogênese do *Campylobacter* spp. e suas espécies nos seres humanos e animais vêm sendo desenvolvida nas últimas décadas (FAUCHERE, 1986). As diferentes características identificadas entre os isolados estão relacionadas com a capacidade de promover adesão, invasão e conseqüentemente produzir lesões (GRIPP et al., 2011). Para conhecer melhor estas bactérias, algumas cepas de referências são utilizados em experimentos laboratoriais *in vitro* para demonstrar a infectividade de diferentes amostras e expressão de genes em diferentes condições. O que tem dificultado a comparação entre trabalhos e isolados são os atuais modelos empregados, não havendo uma padronização mundial entre os diversos grupos que realizam estas avaliações. Em contrapartida, o emprego de linha de células Caco-2 de células epiteliais humanas heterogêneas de adenocarcinoma colorretal, desenvolvido pelo Instituto Sloan-Kettering de Pesquisa do Câncer através da investigação conduzida pelo Dr. Jorgen Fogh tem possibilitado chegar próxima de uma padronização.

Estas células, quando cultivadas sob condições específicas se assemelham aos enterócitos do intestino delgado (HIDALGO et al., 1989) e são utilizadas por indústrias farmacêuticas para melhor avaliar as drogas produzidas. Este modelo tem apresentado resultados fenotípicos semelhantes quando são utilizadas amostras de *C. jejuni* 81-176 em experimentos usando células INT-407 (POLY et al., 2007), além de que *C. jejuni* tem demonstrado menor eficiência em invadir Caco2 do que INT-407 (HU et al., 2008).

Outro mecanismo relacionado com o processo de infecção de *C. jejuni* é a colonização do muco que não tem sido avaliada com frequência em trabalhos celulares utilizadas (ALEMKA, 2012). Recentemente Alemka e colaboradores (2010) utilizaram células HT29MTXE12 (E12) que apresentam uma camada de muco que interage como o *C. jejuni* e possibilita utilizar estas células como modelo de estudos. Faz-se necessário

ressaltar que a dinâmica das respostas imunes do hospedeiro também dever ser exploradas (BACKERT & HOFREUTER 2013). O emprego de diferentes células conduzem a resultados diferentes, como por exemplo o uso de células INT-407 conduzem a uma rápida e pronunciada secreção de IL-8 quando comparada com estimulação de Hella cells (MaCCALLUM et al., 2006).

A interação entre *C. jejuni* com as células hospedeiras demonstram melhores resultados ao utilizar o emprego da imunofluorescência microscópica. O uso de imagens para avaliar a interação com as células são observadas em trabalhos com imunomarcação que mostram o aumento de anticorpos contra *C. jejuni* (APEL, 2012, KONKEL et al., 2007; NOVIK et al., 2009, 2010). A interação com a flora intestinal também é um fator que contribui a regulação da célula com o hospedeiro. A presença de lactobacilos, incluindo o *Lactobacillus acidophilus*, inibem a expressão por exemplo do gene *flaA* ou interferem com outros genes, modulando a virulência das cepas (DING et al., 2005).

Os campilobacteres são bactérias móveis mediado por um flagelo polar que é importante para a patogênese (GUERRY, 2007). Estes flagelos são compostos por flagelina (*flaA* e *flaB*) e esta característica é necessária para a invasão do epitélio celular, requerendo principalmente o *flaA* do que o *flaB* para a invasão (WASSENAAR et al., 1991). Por ser uma bactéria móvel, a presença de muco facilita a motilidade, aderência e invasão das células intestinais (SZYMANSKI et al., 1995), porém outros fatores estão envolvidos na virulências do *Campylobacter* (GUERY, 2007).

A habilidade em produzir toxina citoletal distensiva – CDT (WHITEHOUSE et al., 1998) que foi primeiramente descoberto em *Escherichia coli*, depois em amostras de *Shigella flexneri* e *Salmonella Typhi* está associada ao desenvolvimento dos sinais clínicos (JOHNSON & LIOR 1988). Esta toxina que é codificada por três genes - *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* – interrompe o ciclo celular através da introdução do gene *cdtB* pelos genes *cdtA* e *cdtC* na célula hospedeira. Dentro da célula a proteína *cdtB* entra no núcleo e possui papel semelhante a uma DNase, corta o DNA dupla fita e interrompe o ciclo celular através do bloqueio do G2/M da divisão celular e induz a uma distensão citoplasmática que leva a morte celular (McSWEENEY & DREYFUS 2004; DASTI et al., 2010). É observado indução da produção de IL8 causada pela lise celular, mas a existência de alguns mutantes que possuem uma provável falta de *Ec-cdtB* perdem sua

função e não são capazes em interromper o ciclo celular (McSWEENEY & DREYFUS 2004; FOX et al., 2004) e que intensificam os sinais clínicos.

As variações genotípicas existentes entre os isolados e as condições que o meio oferece para o desenvolvimento bacteriano são fatores que devem ser avaliados para melhor caracterizar o processo patogênico, a virulência e interação das estirpes com o hospedeiro (DING et al., 2005; BACKERT & HOFREUTER, 2013). Sabe-se que isolados de produtos avícolas possuem uma relação próxima as estirpes de surtos e a identificação dos genes envolvidos na virulência dos isolados contribui com o conhecimento das características das cepas circulantes

1.4.1.1 Aves

A campilobacteriose nas aves difere de casos clínicos em seres humanos por não caracterizar sinais clínicos. Entretanto, nas aves, algumas associações de *C. coli* tem sido relatadas em casos de hepatites em perus (STEPHENS et al., 1998), lesões necróticas de fígado causada por *Campylobacter* spp. (LEMOS et al., 2015) e outras hepatites em frangos (JENNINGS et al., 2011).

Campylobacter tem sido isolado do fígado, intestino, bili e ceco de aves (RUIZ-PALACIOS et al., 1981; SANYAL et al., 1984; SMITH et al., 2008). O principal sinal clínico que pode ser observado em aves após serem infectadas com amostras de origem clínica é a presença de diarreia (RUIZ-PALACIOS et al., 1981; SANYAL et al., 1984). A inoculação de aves com a cepa de *C. fetus* subsp. *jejuni* INN-1-79 (RUIZ-PALACIOS et al., 1981; SKIRROW, 1977) apresenta considerável perda de peso e com diarreia presente em 88% das aves em até 72 horas pós infecção (PI). Mortalidade pode ser observada após 7 dias de infecção com ocorrência de 32%. Apesar de colite não ser observado em aves, diarreia com sangue foi observado em casos clínicos de humanos (SKIRROW, 1977). Ruiz-Palacios e colaboradores (1981) descrevem que após infecção oral de aves com até 9.000 UFC é possível verificar replicação no intestino fino, com penetração na mucosa nas 12 horas seguinte, como pode ser observado na Figura 3, e sendo fagocitadas já com 24 horas.



Figura 3 Fotografia eletrônica da penetração de *C. fetus* subsp. *jejuni* em células epiteliais no intestino de aves com ruptura da membrana.

Fonte: Ruiz-Palacios et al., 1981.

Sanyal e colaboradores (1984) inocularam aves com isolados de *C. jejuni* de pacientes com diarreia fluída com ou sem sangue para verificar os sinais clínicos. Embora estas amostras demonstrem este tipo de sinais clínicos em seres humanos, ao serem inoculadas foi observado algumas aves com diarreia mucoide, sem sangue, principalmente no dia 5 PI. A habilidade do *Campylobacter* em invadir células e causar sinais aparenta ser cepa dependente e variar de hospedeiro para hospedeiro (KONKEL et al., 2001). Ao analisar cortes histológicos de intestinos de aves com diarreia, edemas de submucosa foram observadas no jejuno, ílio e ceco. Aves com diarreia mucoide é passível de observar aderência de bactérias nas bordas em escova e penetração nas células epiteliais (SANYAL et al., 1984).

A inoculação de $8 \log_{10}$ UFC de *C. jejuni* G1 no primeiro dia de vida e na segunda semana de idade foram realizadas por Smith et al., (2008) observaram que 6 horas após infecção, *Campylobacter* estava presente no ceco em níveis de 4 e $5 \log_{10}$ UFCg⁻¹, aumentando rapidamente para $9 \log_{10}$ UFCg⁻¹ 24 horas PI. Neste trabalho é observado uma variação na contagem bacteriana nas aves de um dia, provavelmente devido à falta de flora competitiva no trato gastrointestinal. A indução de citocinas proinflamatórias podem ser observadas após a infecção por *Campylobacter* e demonstraram resposta inflamatória nas aves (SMITH et al., 2005).

No trabalho exposto anteriormente por Smith et al., (2008) foi observado que existe uma variação na indução de citocina proinflamatórias IL-1B e IL-6 e as quimiocinas (CXCL1 e CXCL2), com expressão e atração de heterofilos principalmente em aves mais velhas. Para impedir infecções nos primeiros dias de idade, a hipótese atual é que aves jovens são protegidas por anticorpos maternos e possuem ação principalmente nas primeiras duas semanas, que caracteriza controle da infecção nesta fase (SAHIN et al., 2003).

1.4.1.2 Seres humanos

A campilobacteriose em seres humanos é uma infecção relatada cada vez com maior frequência e o custo referente a esta enfermidade e danos subsequentes relacionadas são bilionárias (HAVELAAR, 2005; HOFFMANN et al., 2012 LAKE et al., 2013). Estas infecções, como as salmoneloses e shigeloses (BLASER & ENGBERG, 2008), são responsáveis por enterites que cursam com diarreia e as vezes com a presença de muco ou sangue (SKIRROW, 1977). Clinicamente estas enfermidades não podem ser distinguidas entre si, embora o período prodrômico inclui febre, diarreia, dor abdominal ou prostração. O diagnóstico definitivo do envolvimento de *Campylobacter* spp. pode ser realizado somente com a detecção desta bactéria nas fezes (BLASER & ENGBERG, 2008).

Historicamente a principal espécie envolvida em infecções em seres humanos é o *C. jejuni* que demonstra dose infectante entre 500-800 UFC para causar diarreia (BLACK et al., 1988). Outras espécies também estão associadas a esta doença. *C. upsaliensis* tem sido associado a síndrome urêmica hemolítica (CARTER & CIMOLAI, 1996) ou septicemia (NAKAMURA et al., 2015) e aborto espontâneo (GURGAN & DICKER 1994). Participação de outras espécies como o *C. fetus* a endocardites (MIKI et al., 2005) *C. hyointestinalis* a diarreia em pacientes imunocomprometidos (MINET et al., 1988) diarreias, bacteremias causadas por *C. fetus*, *C. hyointestinalis* e *C. lari* (KLEIN et al., 1986; SKIRROW, 1993; LASTOVICA & ALLOS et al., 2008; MORISHITA et al., 2013; WAGENNAR et al., 2014) também têm sido relatadas e comprometido a saúde humana.

A campilobacteriose vai muito mais além de enterites. O *C. jejuni* é um dos responsáveis pela síndrome de Guillain-Barré (SGB) que é uma doença neurológica

aguda e autolimitante mediada por linfócitos T contra a bainha mielina que recobrem os nervos e que resulta na inibição da atividade neural funcional (HADDEN et al., 2001). Os sintomas geralmente estão relacionados com fraqueza ascendente dos membros inferiores para os superiores, bilateral e simétrico (WINER et al., 1988). Uma variante da SGB é conhecida como a Síndrome de Fisher (SF), que caracteriza uma tríade clínica de instalação aguda de ataxia da marcha, oftalmoplegia e arreflexia (TEENER, 2012) com a presença de anticorpos contra glicosídeos GQ1b, também presente em pacientes com SGB.

Dados levantados por Hughes & Ornblath (2005) reportaram incidência entre 1,2 a 1,9 casos para SGB e 1 caso para SF por 100.000 habitantes na União Europeia. Indiferente da síndrome em que o *Campylobacter* spp. esteja envolvida, redução da infecção de seres humanos por esta bactéria vai ao encontro da redução de problemas relacionados.

1.5 Medidas para reduzir contaminação por *Campylobacter jejuni* e *C. coli*.

1.5.1 Granjas avícolas

Estratégias utilizadas para reduzir colonização entérica de *Campylobacter* tem apresentado limitações. Desde que antimicrobianos foram banidos como promotores de crescimento na União Europeia (*Feed Additives Regulation* 1831/2003/EC) pesquisas voltadas para substituir estas práticas com o uso de aditivos, bacteriófagos ou outros moduladores da microbiota estão sendo testadas (BAFFONI et al., 2012; NEAL-McKINNEY et al., 2012; NEAL-McKINNEY et al., 2014).

Uma alternativa encontrada para reduzir a colonização por bactérias patogênicas é o uso de probióticos - *Lactobacillus*. A habilidade de espécies de *Lactobacillus* inibirem o crescimento de *C. jejuni* in vitro foi verificada por Neal-McKinney e colaboradores (2012) auxiliando na redução do pH intestinal através da produção de ácido lático, peróxido de hidrogênio ou ácido acético.

Na indústria, estes ácidos já foram testados com êxito para reduzir a contaminação por *C. jejuni* em cortes de aves (ZHAO & DOYLE, 2006), da mesma forma para reduzir a colonização fecal (MORISHITA et al., 1997). Otimizar

microrganismos que possuam a capacidade de reduzir a transmissão de *Campylobacter* é fundamental para segurança alimentar dos consumidores. A administração de simbióticos (*Bifidobacteria*, *Lactobacilli*) também auxiliam a modulação intestinal e promovem a exclusão competitiva (BAFFONI et al., 2012).

Terapias com o uso de bacteriófagos que multiplicam-se nas aves e eliminam bactérias susceptíveis é outra opção encontrada para controlar este patógeno (CONNERTON et al., 2011; JANEŽ et al., 2013). A aplicação do bacteriófago como terapêuticos é atraente por permitir eliminar bactérias susceptíveis e não causar danos na flora intestinal (CONNERTON et al., 2011). Os fagos por estarem presentes naturalmente tanto nos animais como nos alimentos, possibilitam controle natural e não implicam em resíduos como o uso de antimicrobianos. Esta técnica torna-se laboriosa pela necessidade do trabalho *in loco*, com isolamento de fagos do local onde é desejado controlar este patógeno.

Estratégias com o emprego de vacinas para controlar *C. jejuni* em aves estão sendo estudadas (SAXENA et al., 2013; NEAL-McKINNEY et al., 2014) e o resultado obtido até o momento não permitiu a produção de uma vacina universal. Embora vacinação é estabelecida como um método efetivo de controle, não existe uma vacina eficaz disponível, mas o conhecimento do ciclo biológico, melhorias nas questões de biossegurança e investimentos em pesquisas são premissas para controlar o aumento da contaminação de *Campylobacter* na avicultura e evitar que lotes positivos ingressem nas plantas industriais de alimentos.

Para efeito de evitar a contaminação cruzada entre lotes positivos e negativos, o emprego da logística de abate poderia ser uma solução pautada e eficaz. Evers (2004) descreve que a logística de abate é afetada pela prevalência de *Campylobacter* spp. no campo. Embora trabalho de Swanenburd e colaboradores (2001) com *Salmonella* da suporte que a logística é importante na redução do aumento da prevalência de amostras positivas, a identificação de contaminação cruzada pode questionar o papel da logística para *Campylobacter* spp. O próprio transporte com o uso de gaiolas é fonte de infecção para aves e pode permitir que as aves contaminem-se no trajeto da granja até o frigorífico (HANSSON et al., 2005).

1.5.2 Indústria avícola

A disseminação da infecção através de aves portadoras em um lote é muito rápida, uma vez havendo aves positivas é possível detectar níveis de contaminação microbiológica no produto final. A dieta hídrica realizada no campo também corrobora para reduzir a contaminação, evitando extravasamento de alimento e conteúdo intestinal no processo de abate (NEWELL et al., 2001; SLADER, et al., 2002). A escaldagem, retirada das penas e evisceração caracterizam estágios que permeiam aumento da contaminação cruzada (CARVALHO et al., 2002; RIVERA-PÉREZ et al., 2014). Trabalhos relatam a correlação de *Campylobacter* em intestinos e a quantidade encontrada nas carcaças (KUANA, et al., 2008; REICH, et al., 2008). As correlações positivas foram observadas por Reich e colaboradores (2008) ao comparar o nível de colonização dos cecos e das carcaças. Kuana e colaboradores (2008) também observaram correlação positiva e destacaram a importância da contaminação cruzada dos lotes ao longo dos estágio de abate.

Danos no trato gastrointestinal causados por máquinas não reguladas ou por variações do tamanho das carcaças contribuem para o aumento da incidência de *Campylobacter* após a resfrição das carcaça. O alinhamento dos equipamentos para adaptar-se ao tamanho dos frangos, abate separado por sexo, velocidade de abate e retirada de frangos com extravasamento de conteúdo intestinal são pontos que devem estar alinhados para reduzir potenciais aumentos de contaminação cruzada. Excesso de pressão na cavidade celomática com extravasamento de conteúdo intestinal ou rupturas intestinais, também são significativos para aumentar o nível de contaminação (BERRANG et al., 2004; TAKAHASHI et al., 2006). A aplicação dos princípios da Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC, ou HACCP de sua sigla em inglês) na produção, processamento e distribuição também reforça as medidas necessárias para obter um produto inócuo.

A temperatura durante a escaldagem, além de facilitar a retirada das penas, influencia na concentração de *Campylobacter* spp. na água. O controle deste e de outros parâmetros, como o pH, possuem papel importante na redução na contaminação (DUFFY et al., 2014). Dados de Izat e colaboradores (1988) indicam que a redução da contaminação por *Campylobacter* se dá ao utilizar temperatura maior de 58°C na escaldagem. Apesar de não se desenvolver bem em ambientes com pH baixo, a

combinação necessária de pH e cloro ainda não está definida para o uso no tanque de escalda (BERRANG et al., 2011).

A diferença entre o processo de abate entre frigoríficos, implicam em diferentes formas de controle. Seliwiorstow e colaboradores (2015) analisaram quatro frigoríficos na Bélgica que apresentaram altas contagem com 11%, 50%, 56 e 78% de positividade por *Campylobacter* spp. nas carcaças após o *chiller* e redução significativa somente em dois frigoríficos. O tempo que as carcaças permanecem no *chiller* e o fluxo de água são outros fatores que influenciam a contaminação (ALLEN et al., 2007). Burfoot e colaboradores (2015) investigaram a eficiência da redução de *Campylobacter* spp. através de água eletrolisada, porém não permitiu redução eficaz. Além da água eletrolisada, a literatura cita água com diferentes temperaturas, concentração de cloro, ozônio, fosfato trisódico, ácidos orgânicos e demais aditivos, sempre com o objetivo para reduzir de forma eficaz a contaminação das carcaças no *chiller*, além da possibilidade de utilização de ultrassom para reduzir a contaminação (OYARZABAL, 2005; JASASS, 2008; TURANTAŞ et al., 2015).

1.6 Custo da campilobacteriose no mundo

A campilobacteriose é uma doença que causa poucos custos diretos na produção de aves, entretanto o maior impacto é na saúde humana. Apesar da manifestação mais comum ser gastroenterites agudas, outras manifestações extra intestinais como a síndrome de Guillain-Barré e Artrite Reativa são documentadas como formas da enfermidade de se apresentar e também tem gerado prejuízos financeiros.

Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA, 2011) estimou que ocorram nove milhões de casos anuais de campilobacteriose humana, e que resultam em 350.000 dias não trabalhados e com custo total próximo a 2,14 bilhões de Euros. Registros de gastos também foram verificados na Holanda. Foi estimado 80.000 casos de campilobacteriose por ano neste país, com custo anual de 21 milhões de Euros e destes 75% são referentes a gastos com problemas gastrointestinais (HAVELAAR, 2005).

Estima-se que o custo da campilobacteriose nos Estados Unidos no ano de 2006 foi de 1,7 bilhões de Dólares (HOFFMANN et al., 2012). Estes dados do custo da doença se contrastam com os publicados por Frenzen em 2008 que referencia somente

os custos com SGB no ano 2004 foi de \$1,7 bilhões, que incluiu custo com perda da produtividade e morte prematura de cada indivíduo.

Além dos custos com tratamentos paliativos e curativos destas doenças em humanos, o custo das medidas sanitárias também devem ser consideradas, já que a redução do número de lotes positivos reflete na redução de casos de campilobacteriose (EFSA 2011, LAKE et al., 2013). A falta de dados da prevalência e incidência em países latino americanos prejudica a estimativa dos custos de tratamento. Medidas de controle da campilobacteriose no campo dificulta a busca de soluções para este problema devido a carência de dados essenciais que baseia-se para realizar os trabalhos de controle.

1.7 Requisitos sanitários para o comércio internacional de frangos

Dentre as formas empregadas para reduzir a contaminação por *Campylobacter* em abatedouros, o controle deve ser iniciado principalmente a campo, impedindo que as aves cheguem positivas ao abate (GIBENS et al., 2001). O emprego de medidas no processamento das aves, como o APPCC para a identificação e controle de microrganismo, junto com higienização e limpeza adequada favorece a redução de perigos microbiológicos.

Existe uma preocupação crescente com a qualidade e a inocuidade dos alimentos consumidos. A preocupação com a segurança microbiológica para obter um produto livre de patógenos baseia-se em critérios microbiológicos pré-estabelecidos. A adoção desses critérios vêm ao encontro da segurança alimentar, que segundo a WHO, (2007) é uma questão de saúde pública, onde órgãos públicos e privados estão intensificando esforços para melhorá-las. Estes esforços são em virtude ao número crescente de problemas identificados e o crescimento das preocupações entre os consumidores.

Os padrões e critérios microbiológicos envolvidos durante a produção e processamento, refletem diretamente na qualidade dos produtos finais. Desta maneira, é necessário que produtores e as indústrias trabalhem ativamente com ferramentas que possam assegurar baixos ou nenhum risco de transmissão de microrganismos.

Em virtude do comércio internacional de alimentos estar em plena expansão, adoção de medidas práticas de prevenção e redução de risco em todo ciclo produtivo tornou-se fundamental. No campo, a utilização do programa de Boas Práticas Agrícolas

foi implantada para reduzir os índices de infecções nas aves. Já nas plantas frigoríficas, a utilização de APPCC, PPHO, (Programas de Procedimento Padrão de Higiene Operacional), BPF (Boas Práticas de Fabricação) surgiram com o intuito de identificar e controlar os Pontos Críticos de Controle (PPC) nas etapas de processamento.

O APPCC é um sistema que possui uma base científica, identificando os perigos específicos e as medidas eficazes para o seu controle. Essa ferramenta pode ser aplicada em toda cadeia alimentar, desde a produção primária até o consumo final do alimento. A aplicação desse sistema pode auxiliar na inspeção por autoridades reguladoras que promovem o comércio internacional e aumentam a confiança na segurança alimentar (FAO, 1997).

No Brasil, a legislação referente ao APPCC teve início em 1993, estabelecendo pelo SEPES/MAARA normas e procedimentos para pescados. Somente no ano de 1998, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu o Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos e Controle, através da portaria 46 de 10 de fevereiro de 1998. O APPCC foi implantado gradativamente nas indústrias de origem animal sob o regime do Serviço de Inspeção Federal (SIF).

Outro regulamento implantado para assegurar qualidade nos produtos, foi a Circular n° 272 (DIPOA/DAS/MAPA, 1997), onde instituiu o início da implantação do Programa de Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (PPHO). Já no ano de 2003 o Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal – DIPOA - estabeleceu uma instrução para a elaboração de implantação dos sistemas PPHO e APPCC através da circular n°369 (DCI/DIPOA, 2003). A partir dessa circular, todos os estabelecimentos habilitados à exportação tiveram que desenvolver, implantar e manter programas de higiene operacional, devendo estes estarem descritos nos procedimentos de limpeza e sanitização executadas diariamente pelos estabelecimentos para evitar contaminação do produto.

As exigências de medidas requeridas pelos importadores de produtos de origem animal do Brasil fizeram com que sejam necessárias melhorias na produção e processamento dos produtos brasileiros, mudanças necessárias para se manter ativo no mercado internacional. Exigências impostas pela Comunidade Europeia nos anos de 2001 e 2002, obrigou que todos os estabelecimentos habilitados a exportar para a União Europeia implantassem o sistema APPCC, não podendo mais exportar a partir de 8 de junho de 2003 empresas com o sistema não implantado (BRASIL, 2003).

Anteriormente a implantação do APPCC, as BPF e os PPHO eram pré-requisitos para ser habilitado a exportar, principalmente do setor de carnes. O regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos produtores e industrializadores de alimentos, foram publicadas através da Portaria 326 de 30 de janeiro de 1997. Essa Portaria teve como objetivo estabelecer requisitos gerais de higiene e de boas práticas de fabricação para alimentos produzidos e fabricados para o consumo humano. Os PPHO e as BPF, quando implantadas, deram apoio ao APPCC, evitando desvio do objetivo de ser focal e agir nos pontos específicos.

O sistema APPCC é muito eficaz quanto à identificação, avaliação e controle de pontos essenciais para a segurança alimentar (FAO, 1997). Desses pontos, a análise dos perigos que os consumidores podem estar expostos são classificados em três categorias: perigos químicos, físicos e microbiológico.

Os perigos químicos podem ser resultados de adição de forma intencional ou não nos alimentos durante a produção, processamento, armazenamento ou distribuição de alimentos. Este grupo de produtos químicos é muito amplo, podendo incluir componentes oriundos da ração animal, medicamentos, pesticidas, tintas, revestimento, produtos de limpeza entre outros componentes (USDA, 1999). O mesmo órgão explana que os perigos físicos são outros componentes inesperados, podendo causar prejuízo para quem consumir o alimento. Materiais como plástico, vidro ou metal podem ser encontrados em produtos ou carnes de aves quando os equipamentos não passam por uma manutenção adequada (MORENO, 2006).

Já os perigos microbiológicos são organismos vivos que podem tornar os alimentos impróprios para o consumo. Esses perigos são frequentemente associado com a matéria prima e que podem vir posteriormente contaminar os produtos e infectar seres humanos. A identificação dos riscos microbiológicos durante o processo de produção é uma tarefa importante e ao mesmo tempo difícil, exigindo conhecimento do recurso humano que está trabalhando neste segmento. Atualmente, há uma grande ênfase em riscos microbiológicos associados a carnes e produtos avícolas, dentre os patógenos que são relatados com uma maior frequência e pode-se citar: *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Clostridium botulinum*, entre outros (USDA, 1999). Apesar de existir legislações para o controle de *Salmonella*, padrão da presença ou ausência, bem como o limite permitido de

Campylobacter por amostragem ainda é discutida. Os Estados Unidos saiu na frente quando o assunto e implantação de padrão para *Campylobacter* em frangos.

Com a necessidade de criar estes padrões, e considerando a falta de experiência para verificar a presença desta bactéria em plantas de abate de frangos, o FSIS (sigla em inglês para Serviço de Inspeção e Segurança Alimentar) começou a acompanhar os resultados de *Campylobacter* e não relatará os nomes de empresas que não atenderem os novos padrões para *Campylobacter*. O critério adotado é positividade de 8 amostras aceitáveis em um conjunto de 51 amostras de frangos e 3 amostras positivas aceitáveis para 56 amostras em perus. O FSIS acredita que estas medidas possibilitarão incentivar que os estabelecimentos melhorem o controle para *Campylobacter* e *Salmonella* (USDA, 2011).

A existência destas limitações em conjunto com a necessidade de produzir de forma mais adequada, com ausência de perigos químicos, físicos e microbiológicos, resultou na produção da ferramenta de gestão de segurança (WHITING, et al., 1997). Os mesmos autores ainda complementam que dentro da análise de risco, os processos são avaliados e o resultado interpretado. Essas ações são realizadas até encontrar uma alternativa de gestão que impacte positivamente na solução do problema, chegando a um nível de controle aceitável.

No comércio internacional de alimentos, a ferramenta de avaliação de risco vem auxiliar as regulamentações de higiene e segurança do alimento, o qual auxilia efetivamente na gestão de riscos adotadas (SANT'ANA, 2009). Os resultados obtidos a partir do emprego desse método de análise geram resultados favoráveis para a segurança alimentar, que impactam diretamente na qualidade de vida.

Visto a necessidade de controlar *Campylobacter* na avicultura e nas carcaças de frangos e cortes, medidas devem abranger cuidados do campo a indústria. Para melhor eficiência do controle, conhecer a ocorrência de *Campylobacter* spp. e os principais pontos que influenciam a contaminação durante o processo de abate colabora no direcionamento das ações. Neste mesmo sentido, a identificação das cepas circulantes, os genes que são associados a virulência, possibilitam conhecer melhor as variantes que podem estar associadas em casos clínicos humanos. A atenção dada a estas contaminações e o conhecimento do extensão da contaminação, contribuem para melhorar a qualidade dos produtos avícolas comercializados e garantir futuros mercado.

CAPÍTULO II
IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE *Campylobacter jejuni* e
***Campylobacter coli* NO PROCESSAMENTO DE FRANGO DE CORTE NO SUL**
DO BRASIL

Identificação e quantificação de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* no processamento de frango de corte no sul do Brasil

(Artigo a ser submetido para a revista International Journal of Food Microbiology)

Resumo

Foi estudada a contaminação de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* através da quantificação e detecção em etapas do processamento de frangos de corte em abatedouros no sul do Brasil. Foram avaliados 13 pontos diferentes, da recepção dos frangos na plataforma até a refrigeração das carcaças em 12 lotes independentes. A presença e ausência foi avaliada pelo método convencional (ISO 10272-1:2006) e a quantificação por Número Mais Provável (NMP), com confirmação de *C. jejuni* e *C. coli* através a técnica de *Multiplex*-PCR. Paralelamente foi utilizado *Real Time* PCR para identificar e quantificar *Campylobacter* spp. A ocorrência de *Campylobacter* foi de 83% em concordância com ambas metodologias utilizadas *C. jejuni* foi a espécie isolada com a maior frequência. Através do isolamento convencional e do uso do *Real Time* PCR, respectivamente foram identificados 67% e 50% dos lotes positivos na plataforma de recepção e de 67 e 75% de carcaças resfriadas. As principais variáveis identificadas através da quantificação pelo NMP/mL de *Campylobacter* spp., com correlação alta e positiva, significativa ao nível de significância de 1% foi entre o suabe de cloaca com os estágios: carcaça após a depenagem, depois da lavagem; carcaça após evisceração, antes da lavagem e carcaça após a lavagem final. A lavagem das carcaças após a depenagem e a evisceração influenciaram diretamente na redução da contaminação com correlação alta e positiva ao nível de significância de 1%.

Key words: *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, quantificação, *Real Time* PCR, *Multiplex*-PCR,

1 INTRODUÇÃO

Os *Campylobacter* spp. estão entre as bactérias mais envolvidas em gastroenterites nos Estados Unidos (CDC, 2014) e na União Europeia (EFSA, 2014). A campilobacteriose tem sido conhecida como doença de animais desde 1909, porém o papel desta doença em seres humanos foi reconhecido somente após a década de 80. As principais espécies envolvidas são - *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari* e *Campylobacter upsaliensis*. São caracterizadas como termotolerantes e acometem uma grande variedade de espécies de animais, incluindo os homens e as aves, estas consideradas o principal reservatório responsável pela transmissão desta enfermidade (HUMPHREY, 2014).

A alta frequência relatada em produtos avícolas preocupa as autoridades de saúde de todo o mundo. A prevalência de *Campylobacter* em lotes de aves tem variado nos últimos anos, com resultados entre 0 e 83,6 % em 2014 (EFSA, 2014) contra 2 e 100% em 2010 (EFSA, 2010). No ano de 2010 foi relatada prevalência de 75,8% das carcaças processadas (EFSA, 2010a) e estes dados são próximos à prevalência de 64,4% e 84,3% verificada em lotes e carcaças na Austrália (FSANZ, 2010). Dados sobre a ocorrência deste patógeno no Brasil mostram variação de prevalência em carcaças até de 70,2% no Brasil (PERDONCINI, 2011; OLIVEIRA, et al., 2013, HUNGARO et al., 2014) com importante influencia da contaminação cruzada no abate (KUANA et al., 2008).

Trabalhos que envolvam o emprego de métodos que permitam agregar novos ensaios para a detecção e quantificação de *Campylobacter* spp. têm sido utilizados para facilitar o cultivo destas bactérias e reduzir o tempo do resultado do diagnóstico final. O cultivo microbiológico é considerado o padrão ouro para o isolamento e caracterização de *Campylobacter* spp. Entretanto, métodos clássicos de quantificação como o Número Mais Provável (NMP) (Blodget, 2006) e plaqueamento direto são técnicas demoradas, requerem alto trabalho laboral e possuem custos elevados. Por estas razões, têm sido elaboradas ferramentas moleculares que deem suporte, economizem tempo e reduzam o custo de processamento (Mayr et al., 2010). O uso de caracterização genotípica, como a reação em cadeia pela polimerase (PCR), para identificar as espécies (Denis et al., 1999), é uma alternativa aos testes fenotípicos sem padrões característicos para 100% das espécies (Zorman et al., 2002).

O Real Time PCR (rtPCR) também é uma opção para caracterizar os isolados, que permite a quantificação a partir de amostras não enriquecidas ou não detectadas por métodos tradicionais, e reduz o tempo total de diagnóstico (LaGier, 2004; Melero et al., 2011).

O emprego de ferramentas que possam avaliar a extensão da contaminação e os pontos críticos de controle para prevenir, eliminar ou reduzir a contaminação por *Campylobacter* (Sampers et al., 2008) auxiliam na diminuição da positividade de lotes e do produto final (Hue et al., 2011). Uma correlação estatisticamente positiva na redução de *Campylobacter* ao longo do abate foi observado por Kuana et al., (2008), estabelecendo que, quanto maior a o nível de contaminação após a depenadeira, maior

será a contaminação das carcaças após a refrigeração, enfatizando a necessidade da redução da contaminação cruzada durante o processo.

A pesquisa sobre a ocorrência de *Campylobacter* termófilos, bem como os principais pontos de contaminação cruzada e as reais condições de disseminação ao longo do processamento faz-se necessário para avaliar novas ações que mitiguem a contaminação por esta bactéria. Diante do exposto, este estudo visou avaliar a contaminação por *Campylobacter* spp., através da presença e ausência pelo método convencional (ISO 10272-1:2006), quantificação pelo Número Mais Provável (NMP) e paralelamente uso do ensaio *Real Time* PCR para identificar e quantificar *Campylobacter jejuni*, *C. coli* e *C. lari* com o intuito de auxiliar na validação dos pontos críticos de controle.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Desenho do estudo

Foram avaliados 12 lotes de frangos de corte, em 13 pontos diferentes, com 3 repetições em cada ponto, sendo coletadas 39 amostras por lote, totalizando 468 amostras analisadas neste estudo, realizado em cooperação com três frigoríficos de abate de aves no sul do Brasil e também com o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

Os pontos de coleta foram determinados para servirem de subsídios para verificação dos programas de controle e higiene operacionais realizados, desde a chegada das aves até o resfriamento das carcaças após o processamento e a água de abastecimento dos frigoríficos, sendo: 1 - suabe de cloaca; 2 - suabe com esponja em gaiolas antes da higienização; 3 - suabe com esponja em gaiolas após a higienização; 4 - frango antes da escaldagem; 5 - frango após a escaldagem; 6 - frango após a depenagem, antes da lavagem; 7 - frango após depenagem, depois da lavagem; 8 - frango após evisceração, antes da lavagem; 9 - carcaça após a lavagem final; 10 - água do pré-chiller; 11 - água do chiller; 12 - carcaça após o chiller; 13 - água de abastecimento do abatedouro. Também foi verificada a temperatura das carcaças no momento da coleta, o pH e o cloro da água.

2.2 Procedimento de coletas de amostras

Suabe de cloaca: após a chegada das aves no matadouro-frigorífico foram realizados 3 *pools* de 50 suabes de 100 aves, totalizando 300 frangos por lote e foram imersos em 50 mL de caldo Brucella (CM0169 Oxoid®).

Esponjas de gaiolas de transporte: as coletas do fundo das gaiolas de transporte das aves foram realizadas através de esponja umedecida (3M sponge stick with neutral®) com solução neutralizante tamponada antes e após a higienização.

Frangos e carcaças: Os frangos antes da escaldagem e após a escaldagem; frangos após a depenagem, antes da lavagem; frangos após depenagem, depois da lavagem; carcaças após evisceração, antes da lavagem; carcaças após a lavagem final e carcaças resfriadas foram retirados da nória e armazenados em sacos plásticos de polietileno. Cada amostra foi rinsada com 400 mL de água peptonada taponada 1% - APT (Oxoid®) vigorosamente homogeneizados por 30 segundos. Depois de homogeneizadas, o caldo rinsado de cada amostra foi assepticamente coletado e transferido para frascos de vidro estéreis.

Água: A água do abastecimento, água do *chiller* e *pré-chiller* foram coletas em frascos de plástico estéreis.

Verificação de temperatura, pH e cloro: Foi verificado a temperatura das carcaças após a evisceração, antes da lavagem final e carcaças após o pré-resfriamento por imersão. O pH e cloro foram avaliados nos pontos da água do *pré-chiller*, *chiller* e da água de abastecimento.

Antes do processamento foram coletadas alíquotas de 1,5 mL de cada amostra para serem processadas em rtPCR, mantidas congeladas em -20°C.

2.3 Isolamento microbiológico convencional de *Campylobacter* spp.

De cada amostra analítica processada foi retirado uma alíquota de 1 mL e homogeneizado em 9 mL de caldo Bolton (1:10), suplementado com cefoperazona, trimetoprim, vancomicina e cicloheximida e incubada em microaerofilia (5% O₂, 10% CO₂ e 85% N₂), por 48 horas a uma temperatura de 41,5°C. Após incubação, 100 µL do caldo foi filtrado em uma membrana de acetato com poro de 0,65 µm (SKIRROW, 1977; BOLTON, 1982) e inoculado sobre o *Modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar* – mCCDA, (CM739, Oxoid®). As placas foram incubadas por 48

horas a uma temperatura de 41,5°C. Esta metodologia seguiu as especificações da ISO 10272-1:2006 para isolamento de *Campylobacter* (ISO, 2006) com adição da filtragem das amostras.

2.3.1 Identificação de *Campylobacter jejuni* e *C. coli*

As colônias suspeitas foram repicadas em ágar acrescido de 5% de sangue desfibrinado de ovino e avaliadas em microscopia em contraste de fase para caracterizar a motilidade e à coloração de Gram. Para a identificação final utilizou-se a técnica de Multiplex-PCR com alterações ao protocolo apresentado por DENIS et al., (1999). As colônias foram coletadas e ressuspensas em 1mL de água ultra pura, transferidas para microtubos e congeladas a uma temperatura de -20°C até a extração do DNA pelo calor. A identificação e caracterização de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* foram através da detecção de três genes selecionados para identificar as regiões alvos específicos – fotografia 1. Os *primers* utilizados foram *C. jejuni* (*mapA*) F^a – CTATTTTATTTTGGAGTGCTTGTG e R^b – GCTTTATTTGCCATTTGTTTTATTA com 589 pb; *C. coli* (*ceuE*) F^a – AATTGAAAATTGCTCCAACATATG e R^b – TGATTTTATTATTTGTAGCAGCG com 462 pb e uma região em comum entre as espécies (16S rRNA) F^a – ATCTAATGGCTTAACCATTA AAC e R^b – GGACGGTAACTAGTTTAGTATT com 857 pb. A reação final que foi empregada possuiu um volume final de 30µL, composto por um tampão 10X, 1,5mM de MgCl₂, mix de 5mM de dNTP's, 10pmol/µL de cada *primer*, 2 unidades de Taq polimerase, DNA e completado o volume final com água ultrapura. As condições utilizadas no termociclador (Biocycler – Peltier Thermal Cycler MJ96+ / MJ96G) foram: desnaturação por 10 minutos a 95°C, seguido com 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento por 1 minuto e 30 segundos a 59°C, extensão de 1 minuto a 72°C, e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. A amplificação dos produtos foi realizada em gel de agarose a 1,5% com brometo de etídio e corrido a 85V, observado e fotografado em luz UV do transluminador e fotodocumentador, respectivamente.

Fotografia 1 - Gel de agarose apresentando produtos da amplificação para as cepas de *Campylobacter*.

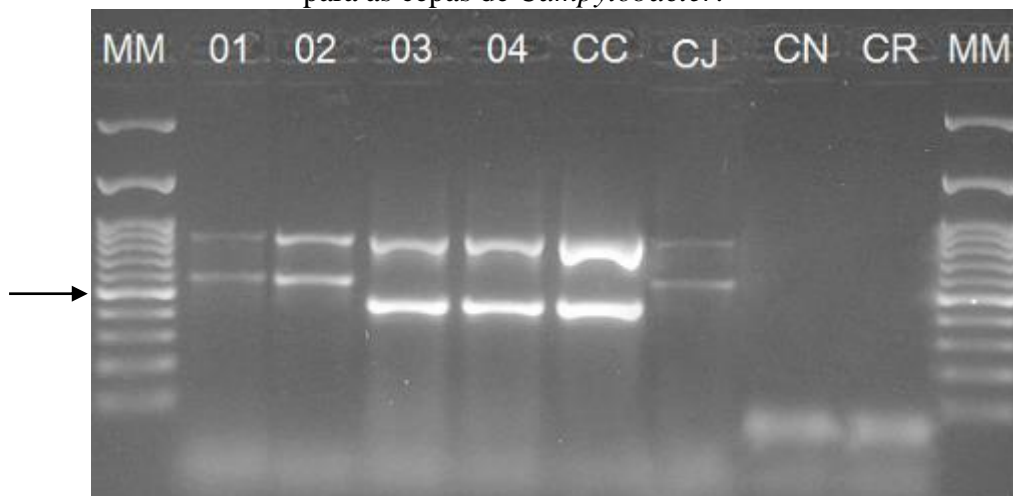


Figura 1 – Eletroforese em 1,5% corado com brometo de etídio com amplificação dos genes que caracterizam *C. jejuni* e *C. coli*. Seta apontando 500 pb; MM – Marcador Molecular (100pb); 1,2 amostras positivas para *C. jejuni* (589pb); 3,4 amostras positivas para *C. coli* (462pb); CC – ATCC 43478 *Campylobacter coli*; CJ – ATCC 29428 *Campylobacter jejuni* subsp *jejuni*; CN – Controle Negativo – *Arcobacter* sp.; CR – Controle da Reação. Amostras positivas para ambas as espécies apresentam região em comum na região 16S com 857pb.

2.3.2 Armazenamento das amostras

Uma colônia de cada amostra confirmada para *Campylobacter* sp. foi subcultivada em ágar acrescido de 5% de sangue desfibrinado de ovino e em seguida inoculada em caldo Brucela com 20% de glicerol e estocados a -80°C. Atualmente estas amostras fazem parte da coleção de culturas do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária/CDPA-UFRGS.

2.4 Número mais Provável de *C. jejuni* e *C. coli*

Para a enumeração de *C. jejuni* e *C. coli* foi utilizada a técnica do Número Mais provável (NMP) conforme descrito por Silva et al., (2010). A leitura dos positivos foi realizada em série de três placas e o resultado composto por três números, correspondendo ao total de placas positivas por diluição, conforme descrito por Blodgett (2006). A confirmação das amostras para *C. jejuni* e *C. coli* foi através do ensaio da PCR descrito anteriormente no item 2.3.1.

2.5 Coleta de amostras para Real Time PCR e procedimentos de análises

A partir das alíquotas das amostras de 1,5 mL armazenadas e não incubadas, foram realizadas as quantificações de *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari* em kit para a quantificação simultânea destas três espécies pela rtPCR. A extração do DNA foi realizada com auxílio *PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent*[®] seguindo recomendações do fabricante.

A identificação da presença de *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari* nas amostras analíticas foi realizada com a utilização do kit *mericon Campylobacter triple Kit*[®] da Qiagen[™] seguindo as recomendações do fabricante. Para a quantificação absoluta foi montada uma curva padrão em triplicata com o cultivo de *C. jejuni* subsp. *jejuni* ATCC 29428 em caldo Brucella para obter do valor C_t obtidos pelo rtPCR em relação à enumeração de UFC/mL de *Campylobacter jejuni* calculada em cada diluição pelo cultivo microbiológico. A curva padrão gerada utilizou a diluição de 10^{-1} até 10^{-5} . A amplificação dos alvos nas diluições e nas amostras analíticas foi realizada em poços diferentes com emprego do kit *mericon Campylobacter triple Kit*[®] e analisados em Rotor-Gene[®]Q. O valor do C_t das amostras padrões foi relacionado para gerar a enumeração de cada amostra.

2.6 Estatística

Os dados gerados foram avaliados pelo software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 22. Foi realizada análise descritiva dos dados ao longo dos 13 pontos de avaliação, e correlação de postos de Spearman, representada pela letra ρ (rho) em 1 e 5%, e modelo de regressão logística para os dois métodos empregados nesse estudo: convencional e detecção rtPCR (tabelas 2 e 3). Os valores foram transformados usando a função logaritmo base 10 (Log10) e módulo da função logaritmo base 10 (Log10), respectivamente, visando obter a normalização dos dados.

3 RESULTADOS

A ocorrência de *C. jejuni* e *C. coli* nos 12 lotes avaliados foi de 83,33% em concordância com as técnicas empregadas. Os dados da ocorrência e da concentração estão resumidos na tabela 1, porém observa-se através da identificação de *C. jejuni* e *C. coli* pelo cultivo microbiológico e pela quantificação pelo Número Mais Provável/mL que a ocorrência no suabe de cloaca e nas carcaças após a refrigeração por imersão foi de 67%, com aumento da concentração no final do processo. Os dados gerados através do uso do rtPCR demonstram ocorrência maior de *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari* nas carcaças após a refrigeração (75%) ao comparar com o suabe de cloaca (50%), com redução quantitativa destas bactérias nas carcaças após a refrigeração por imersão.

Através da técnica do *multiplex-PCR* o *C. jejuni* foi a espécie identificada em 96,52% dos isolados, seguido de *C. coli* com 3,48% e a presença de ambas as espécies em 7,82% das amostras. O *C. jejuni*, isolado com maior frequência, tem sido caracterizado como a principal espécie envolvida em surtos de doenças transmitidas por alimentos decorrente da ingestão de produtos avícolas e alguns sorotipos possuem maior capacidade de colonizar as aves e sobreviver no ambiente (SLADER et al, 2002).

Tabela 1- Dados qualitativos e quantitativos de *Campylobacter* spp. ao longo do processo de abate.

		Método convencional – NMP*			Método molecular – rt PCR**		
Variável / Ponto		Nº lotes positivos/ Nº total de lotes	(%)	Quantificação - (log10 NMP/mL)***	Nº lotes positivos/ Nº total de lotes	(%)	Quantificação (log10 UFC/mL)***
1	Suabe de cloaca	8/12	66,7	0,43	6/12	50,0	0,61
2	Esponjas das gaiolas antes da higienização	8/12	66,7	0,36	1/12	8,3	0,14
3	Esponjas das gaiolas após a higienização	6/12	50,0	0,39	4/12	33,3	0,47
4	Frangos antes da escaldagem	3/12	25,0	0,16	2/12	16,7	0,44
5	Frangos após a escaldagem	3/12	25,0	0,14	1/12	8,3	0,06
6	Frangos após a depenagem, antes da lavagem	8/12	66,7	0,36	4/12	33,3	0,46
7	Frangos após a depenagem, depois da lavagem	6/12	50,0	0,31	3/12	25,0	0,53
8	Carcaça após evisceração, antes da lavagem	10/12	83,3	0,70	4/12	33,3	0,69
9	Carcaça após a lavagem final	6/12	50,0	0,37	6/12	50,0	0,47
10	Água do pré-chiller	7/12	58,3	0,38	2/12	16,7	0,08
11	Água do chiller	6/12	50,0	0,44	8/12	66,7	0,33
12	Carcaça resfriada	8/12	66,7	0,50	9/12	75,0	0,42
13	Água de abastecimento	0/12	0	0	0/12	0	0

*Número mais provável; **rtPCR identificação simultaneamente de *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari*; *** Média dos lotes

Apesar da importância da contaminação das aves nas granjas, o transporte pode estar relacionado com o aumento do número de lotes positivos na recepção dos matadouro-frigoríficos (Hansson et al. 2005; HALD et al., 2010). Neste trabalho, o isolamento microbiológico identificou que 66,7% das gaiolas foram positivas para *Campylobacter jejuni* e *C. coli*, mesma ocorrência identificada no suabe de cloaca dos frangos e com correlação alta e positiva do número de lotes positivos com a contaminação de carcaças finais (Quadro 2). Ao avaliar a eficiência da lavagem das

gaiolas de transporte foi observado que este estágio não foi efetivo na redução da contaminação destas bactéria de gaiolas naturalmente contaminadas.

Os diversos estágios do processo de abate podem contribuir para reduzir ou elevar a contaminação. Na escaldagem, o nível médio observado de colonização dos frangos antes e após a escaldagem foram de 0,37 e 0,33 NMP/mL com correlação alta e positiva e significância estatística de Valor-P < 0,05 (tabela 2). Apesar de verificar redução da colonização, a ocorrência foi de 25% antes e após a escaldagem através do isolamento bacteriano. Neste mesmo trabalho ao analisar os dados da identificação e a quantificação pelo rtPCR foi observado redução da ocorrência de frangos positivos de 25 para 8,33% (tabela 3).

O controle da temperatura e de outros parâmetros, como o pH, possuem papel importante na redução na contaminação (DUFFY et al., 2014). A redução da contaminação por *Campylobacter* se dá ao utilizar temperatura maior de 58°C na escaldagem (IZAT et al., 1988) com redução efetiva de *Campylobacter* na superfícies dos frangos a 61,5°C por dois minutos. A temperatura média verificada foi de 60,6°C com variação entre 59 e 61,3°C e o pH da água variou entre 6,1 a 8 (Quadro 1). Apesar de não se desenvolver bem em ambientes com pH baixo, a combinação necessária de pH e cloro ainda não está definida para o uso no tanque de escalda (BERRANG et al., 2011), porém o uso de multi-tanques criam melhores oportunidades para reduzir o número de bactérias aderidos nas penas (CASON et al., 2000; CASON et al., 2006).

Tabela 2 Correlações de Spearman para cargas de *Campylobacter* nos pontos avaliados em 12 lotes de frango de corte – NMP

Variável / Ponto	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1		0,55	0,34	0,13	0,46	0,48	0,72**	0,82**	0,82**	0,40	0,50	0,63*
2	0,55		0,54	0,26	0,51	0,56	0,64*	0,53	0,62*	0,66*	0,60*	0,76**
3	0,34	0,54		0,71**	0,69*	0,24	0,41	0,00	0,23	0,57	0,67*	0,33
4	0,13	0,26	0,71**		0,61*	0,18	0,09	-0,18	0,13	0,09	0,20	0,06
5	0,46	0,51	0,69*	0,61*		0,37	0,36	0,07	0,41	0,36	0,49	0,36
6	0,48	0,56	0,24	0,18	0,37		0,44	0,41	0,42	0,23	0,16	0,37
7	0,72**	0,64*	0,41	0,09	0,36	0,44		0,51	0,87**	0,47	0,56	0,51
8	0,82**	0,53	0,00	-0,18	0,07	0,41	0,51		0,64*	0,36	0,29	0,63*
9	0,82**	0,62*	0,23	0,13	0,41	0,42	0,87**	0,64*		0,30	0,55	0,69*
10	0,40	0,66*	0,57	0,09	0,36	0,23	0,47	0,36	0,30		0,63*	0,62*
11	0,50	0,60*	0,67*	0,20	0,49	0,16	0,56	0,29	0,55	0,63*		0,79**
12	0,63*	0,76**	0,33	0,06	0,36	0,37	0,51	0,63*	0,69*	0,62*	0,79**	

^aDados Transformados (log₁₀ NMP/mL). Significância estatística: *. Valor-P < 0,05; **. Valor-P < 0,01. Pontos: 1 - suabe de cloaca; 2 - suabe com esponja em gaiolas antes da higienização; 3 - suabe com esponja em gaiolas após a higienização; 4 - frango antes da escaldagem; 5 - frango após a escaldagem; 6 - frango após a depenagem, antes da lavagem; 7 - frango após depenagem, depois da lavagem; 8 - frango após evisceração, antes da lavagem; 9 - carcaça após a lavagem final; 10 - água do pré-chiller; 11 - água do chiller; 12 - carcaça após o chiller

Tabela 3 Correlações de Spearman para cargas de *Campylobacter* nos pontos avaliados em 12 lotes de frango de corte - rtPCR

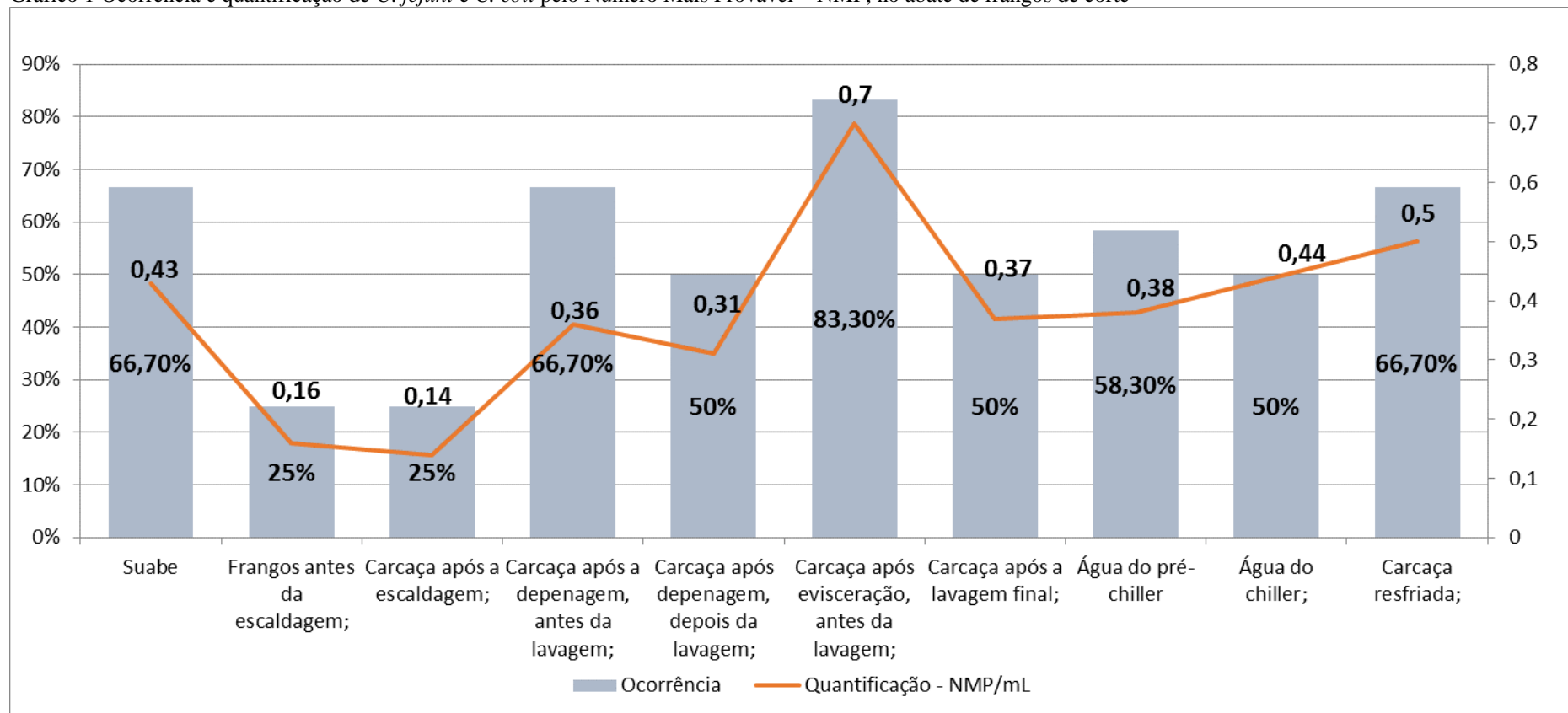
Variável / Ponto	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1		0,23	0,30	0,43	-0,28	0,25	-0,15	0,39	-0,47	-0,41	-0,13	0,49
2	0,23		0,57	-0,13	-0,09	0,57	0,63*	-0,21	-0,28	-0,13	-0,36	-0,40
3	0,30	0,57		0,23	-0,21	0,37	0,54	0,11	-0,07	0,08	0,10	0,10
4	0,43	-0,13	0,23		-0,13	-0,31	-0,25	-0,31	-0,41	-0,20	-0,06	0,36
5	-0,28	-0,09	-0,21	-0,13		-0,21	-0,17	-0,21	0,51	-0,13	-0,13	-0,13
6	0,25	0,57	0,37	-0,31	-0,21		0,43	0,19	0,14	-0,31	0,06	0,08
7	-0,15	0,63*	0,54	-0,25	-0,17	0,43		-0,03	0,01	0,21	0,19	-0,06
8	0,39	-0,21	0,11	-0,31	-0,21	0,19	-0,03		0,20	0,08	0,23	0,42
9	-0,47	-0,28	-0,07	-0,41	0,51	0,14	0,01	0,20		0,42	0,56	0,11
10	-0,41	-0,13	0,08	-0,20	-0,13	-0,31	0,21	0,08	0,42		0,53	-0,15
11	-0,13	-0,36	0,10	-0,06	-0,13	0,06	0,19	0,23	0,56	0,53		0,64*
12	0,49	-0,40	0,10	0,36	-0,13	0,08	-0,06	0,42	0,11	-0,15	0,64*	

^aDados Transformados (log₁₀ UFC/mL). Significância estatística: *. Valor-P < 0,05. Pontos: 1 - suabe de cloaca; 2 - suabe com esponja em gaiolas antes da higienização; 3 - suabe com esponja em gaiolas após a higienização; 4 - frango antes da escaldagem; 5 - frango após a escaldagem; 6 - frango após a depenagem, antes da lavagem; 7 - frango após depenagem, depois da lavagem; 8 - frango após evisceração, antes da lavagem; 9 - carcaça após a lavagem final; 10 - água do pré-chiller; 11 - água do chiller; 12 - carcaça após o chiller

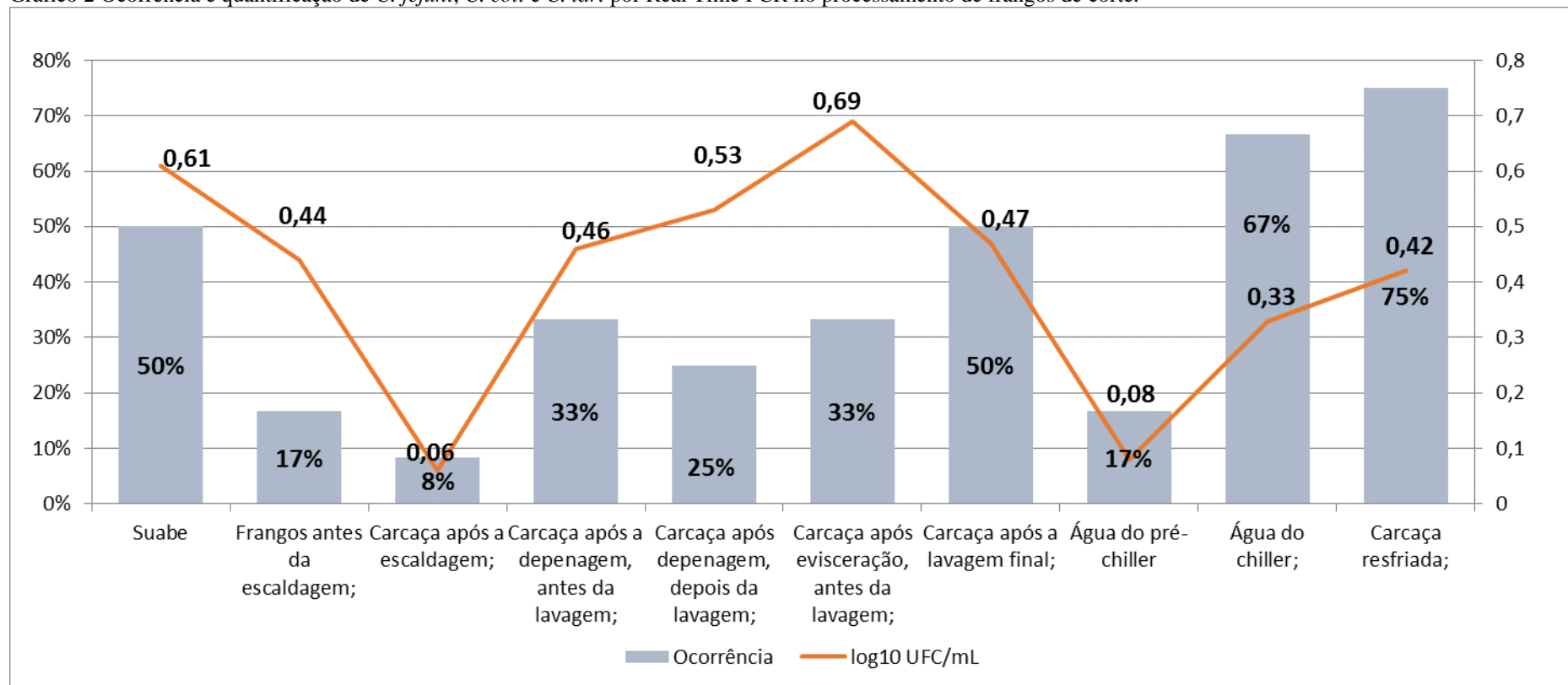
Quadro 1 Características do processo de escalda.

LOTES	Temp. °C água escald.	pH água escald.	Temp. °C carçaça após eviscer.
1	60,5	6,3	39,2
2	60,6	6,8	39
3	62	6,1	39,3
4	60,4	6,8	39,9
5	62	7,16	40
6	61,2	7,08	40
7	63	6,54	36,8
8	61,3	6,9	37,96
9	59,4	8	39
10	59	8	39,06
11	59	8	40,36
12	59	7,5	40,36
Média	60,6	7,1	39,24

Temp.= Temperatura; esclad. = escaldagem;
eviscer.=evisceração

Gráfico 1 Ocorrência e quantificação de *C. jejuni* e *C. coli* pelo Número Mais Provável – NMP, no abate de frangos de corte

Pontos: 1 - suabe de cloaca; 2 - suabe com esponja em gaiolas antes da higienização; 3 - suabe com esponja em gaiolas após a higienização; 4 - frango antes da escaldagem; 5 - frango após a escaldagem; 6 - frango após a depenagem, antes da lavagem; 7 - frango após depenagem, depois da lavagem; 8 - frango após evisceração, antes da lavagem; 9 - carcaça após a lavagem final; 10 - água do pré-chiller; 11 - água do chiller; 12 - carcaça após o chiller

Gráfico 2 Ocorrência e quantificação de *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari* por Real Time PCR no processamento de frangos de corte.

Pontos: 1 - suabe de cloaca; 2 - suabe com esponja em gaiolas antes da higienização; 3 - suabe com esponja em gaiolas após a higienização; 4 - frango antes da escaldagem; 5 - frango após a escaldagem; 6 - frango após a depenagem, antes da lavagem; 7 - frango após depenagem, depois da lavagem; 8 - frango após evisceração, antes da lavagem; 9 - carcaça após a lavagem final; 10 - água do pré-chiller; 11 - água do chiller; 12 - carcaça após o chiller

No NMP foi observado correlação alta e positiva, significativa ao nível de significância de 1%, entre as variáveis/ ponto 1 (suabe de cloaca) com as variáveis/ ponto 7 (carcaça após a depenagem, depois da lavagem), 8 (carcaça após evisceração, antes da lavagem) e 9 (carcaça após a lavagem final), com valores de 0,72, 0,816 e 0,815, respectivamente e descritos no quadro 2. A contaminação das carcaças foi acentuada principalmente após a depenagem, antes da lavagem e nas carcaça após evisceração antes da lavagem como pode ser observado nos gráficos 1 e 2. Os chuveiros após estes estágios auxiliaram redução quantitativa pelo NMP de 0,36 para 0,31 log₁₀ NMP/mL e de 0,70 para 0,37 log₁₀ NMP/mL após a lavagem de carcaças na depenagem e evisceração e com correlação alta e positiva, significativa ao nível de significância de 1% entre as carcaças após a depenagem, depois da lavagem (ponto 7) e após a lavagem final (ponto 9). Apesar de não ter sido observado redução significativa através dos dados obtidos pelo *rtPCR* foi observado redução da concentração de *Campylobacter jejuni/coli/lari* de 0,67 log₁₀UFC/mL para 0,47 log₁₀ UFC/mL após a lavagem final.

Após avaliação das carcaças antes e após a refrigeração por imersão foi observado através do isolamento microbiológico aumento da ocorrência de *Campylobacter* spp. de 50 para 66,7%. Maior sensibilidade na identificação foi observada através do *rtPCR* com aumento da ocorrência de *Campylobacter* spp. de 50 para 75% ao passar pelo mesmo estágio. Estes dados concordam com os descrito por Melero et al., (2011), demonstrando maior sensibilidade na detecção de *Campylobacter* spp. através do uso do *rtPCR* ao analisar produtos prontos. O crescimento de *E. coli* ou *Proteus* spp. nos meios do método convencional, mesmo com a adição dos suplementos, pode inibir o crescimento de *Campylobacter* e ser a razão pela menor ocorrência de *Campylobacter* em comparação com o *rtPCR* (JASSON et al., 2009).

O *chiller* se caracteriza como importante ponto de contaminação cruzada. Através da quantificação pelo *rtPCR* a água do *chiller* apresentou correlação alta e positiva significativa ao nível de significância de 5% com as carcaças resfriadas. Correlação alta e positiva significativa ao nível de significância de 1% também foi observada pelo dados obtidos pelo NMP.

A equação de regressão logística final estimada para detectar a presença simultânea das bactérias *C. jejuni*, *C. Coli* e *C. lari*, pelo método *rtPCR*, em lotes de frango de corte no decorrer do abate e armazenamento das carcaças foi significativo no

ponto 11 (água do chiller) e o ponto 12 (carcaça resfriada) – Quadro 2. Os ORs foram de $1,16E+12$ e $1,06E+34$, logo influenciam positivamente a presença de *Campylobacter* spp. e quanto maior forem os valores nestes pontos, maior será a probabilidade da bactéria estar presente ao longo dos pontos avaliados. Através dos dados obtidos pelo NMP os pontos que foram significativos para a ocorrência da bactéria *Campylobacter* foram o ponto 6 (carcaça após a depenagem, antes da lavagem) e o ponto 8 (carcaça após evisceração, antes da lavagem) com OR de 6,59 e $4,20E+33$, respectivamente.

Quadro 2 Matriz de Correlações de Spearman - Dados do NMP transformados (\log_{10} UFC/mL)

Variável / Ponto		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
rô de Spearman	1	CC	1,00	0,55	0,34	0,13	0,46	0,48	,721**	,816**	,815**	0,40	0,50	,625*
		Sig.		0,07	0,28	0,68	0,14	0,11	0,01	0,00	0,00	0,20	0,10	0,03
	2	CC	0,55	1,00	0,54	0,26	0,51	0,56	,643*	0,53	,618*	,658*	,598*	,758**
		Sig.	0,07		0,07	0,41	0,09	0,06	0,02	0,08	0,03	0,02	0,04	0,00
	3	CC	0,34	0,54	1,00	,708**	,693*	0,24	0,41	0,00	0,23	0,57	,673*	0,33
		Sig.	0,28	0,07		0,01	0,01	0,45	0,19	1,00	0,47	0,06	0,02	0,30
	4	CC	0,13	0,26	,708**	1,00	,606*	0,18	0,09	-0,18	0,13	0,09	0,20	0,06
		Sig.	0,68	0,41	0,01		0,04	0,57	0,79	0,58	0,68	0,79	0,52	0,85
	5	CC	0,46	0,51	,693*	,606*	1,00	0,37	0,36	0,07	0,41	0,36	0,49	0,36
		Sig.	0,14	0,09	0,01	0,04		0,23	0,25	0,84	0,19	0,26	0,11	0,25
	6	CC	0,48	0,56	0,24	0,18	0,37	1,00	0,44	0,41	0,42	0,23	0,16	0,37
		Sig.	0,11	0,06	0,45	0,57	0,23		0,15	0,19	0,17	0,47	0,61	0,23
7	CC	,721**	,643*	0,41	0,09	0,36	0,44	1,00	0,51	,873**	0,47	0,56	0,51	
	Sig.	0,01	0,02	0,19	0,79	0,25	0,15		0,09	0,00	0,13	0,06	0,09	
8	CC	,816**	0,53	0,00	-0,18	0,07	0,41	0,51	1,00	,642*	0,36	0,29	,632*	
	Sig.	0,00	0,08	1,00	0,58	0,84	0,19	0,09		0,02	0,25	0,36	0,03	
9	CC	,815**	,618*	0,23	0,13	0,41	0,42	,873**	,642*	1,00	0,30	0,55	,688*	
	Sig.	0,00	0,03	0,47	0,68	0,19	0,17	0,00	0,02		0,34	0,06	0,01	
10	CC	0,40	,658*	0,57	0,09	0,36	0,23	0,47	0,36	0,30	1,00	,630*	,618*	
	Sig.	0,20	0,02	0,06	0,79	0,26	0,47	0,13	0,25	0,34		0,03	0,03	
11	CC	0,50	,598*	,673*	0,20	0,49	0,16	0,56	0,29	0,55	,630*	1,00	,792**	
	Sig.	0,10	0,04	0,02	0,52	0,11	0,61	0,06	0,36	0,06	0,03		0,00	
12	CC	,625*	,758**	0,33	0,06	0,36	0,37	0,51	,632*	,688*	,618*	,792**	1,00	
	Sig.	0,03	0,00	0,30	0,85	0,25	0,23	0,09	0,03	0,01	0,03	0,00		

** . A correlação é significativa no nível 0,01 (2 extremidades).
 * . A correlação é significativa no nível 0,05 (2 extremidades).

Quadro 3 Matriz de Correlações de Spearman - Dados rtPCR transformados (log₁₀ UFC/mL)

Variável / Ponto		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
rô de Spearman	1	CC	1,00	0,23	0,30	0,43	-0,28	0,25	-0,15	0,39	-0,47	-0,41	-0,13	0,49
		Sig.		0,47	0,34	0,16	0,38	0,44	0,64	0,21	0,12	0,18	0,69	0,10
	2	CC	0,23	1,00	0,57	-0,13	-0,09	0,57	,631*	-0,21	-0,28	-0,13	-0,36	-0,40
		Sig.	0,47		0,05	0,68	0,78	0,05	0,03	0,52	0,38	0,68	0,26	0,20
	3	CC	0,30	0,57	1,00	0,23	-0,21	0,37	0,54	0,11	-0,07	0,08	0,10	0,10
		Sig.	0,34	0,05		0,47	0,52	0,23	0,07	0,72	0,83	0,80	0,75	0,77
	4	CC	0,43	-0,13	0,23	1,00	-0,13	-0,31	-0,25	-0,31	-0,41	-0,20	-0,06	0,36
		Sig.	0,16	0,68	0,47		0,68	0,33	0,43	0,33	0,18	0,54	0,85	0,25
	5	CC	-0,28	-0,09	-0,21	-0,13	1,00	-0,21	-0,17	-0,21	0,51	-0,13	-0,13	-0,13
		Sig.	0,38	0,78	0,52	0,68		0,52	0,59	0,52	0,09	0,68	0,68	0,68
	6	CC	0,25	0,57	0,37	-0,31	-0,21	1,00	0,43	0,19	0,14	-0,31	0,06	0,08
		Sig.	0,44	0,05	0,23	0,33	0,52		0,17	0,56	0,65	0,33	0,85	0,80
7	CC	-0,15	,631*	0,54	-0,25	-0,17	0,43	1,00	-0,03	0,01	0,21	0,19	-0,06	
	Sig.	0,64	0,03	0,07	0,43	0,59	0,17		0,92	0,96	0,51	0,55	0,86	
8	CC	0,39	-0,21	0,11	-0,31	-0,21	0,19	-0,03	1,00	0,20	0,08	0,23	0,42	
	Sig.	0,21	0,52	0,72	0,33	0,52	0,56	0,92		0,53	0,80	0,47	0,18	
9	CC	-0,47	-0,28	-0,07	-0,41	0,51	0,14	0,01	0,20	1,00	0,42	0,56	0,11	
	Sig.	0,12	0,38	0,83	0,18	0,09	0,65	0,96	0,53		0,18	0,06	0,74	
10	CC	-0,41	-0,13	0,08	-0,20	-0,13	-0,31	0,21	0,08	0,42	1,00	0,53	-0,15	
	Sig.	0,18	0,68	0,80	0,54	0,68	0,33	0,51	0,80	0,18		0,08	0,65	
11	CC	-0,13	-0,36	0,10	-0,06	-0,13	0,06	0,19	0,23	0,56	0,53	1,00	,638*	
	Sig.	0,69	0,26	0,75	0,85	0,68	0,85	0,55	0,47	0,06	0,08		0,03	
12	CC	0,49	-0,40	0,10	0,36	-0,13	0,08	-0,06	0,42	0,11	-0,15	,638*	1,00	
	Sig.	0,10	0,20	0,77	0,25	0,68	0,80	0,86	0,18	0,74	0,65	0,03		

Rosenquist e colaboradores (2006) verificaram aumento da média de *Campylobacter* termotolerante nas carcaças durante a evisceração, com redução após o resfriamento. Aumento da contaminação também foi observado por Izat et al., (1988) e Stern e Robach (2003) durante o processo de evisceração. O nível de contaminação de *Campylobacter* spp. no intestino tem sido relacionada com a contaminação durante a evisceração (ALLEN et al., 2007; DUFFY et al., 2014) e que possibilita o aumento ou redução de quantidades de bactérias durante o processo de abate.

Outro fator que impacta diretamente na contaminação é a regulação dos equipamentos e a uniformidade dos lotes, que influenciam a ruptura de vísceras, contaminação por material fecal e a ocorrência de amostras positivas no produto final (BERRANG et al., 2004). Estas variáveis vão ao encontro dos avaliados neste trabalho, onde lotes com diferentes concentrações de bactérias influenciam o nível de contaminação final e, conseqüentemente, a contaminação cruzada. Neste trabalho foi

observado o lote 4 (positivo) e o 5 (negativo) na plataforma de recepção, porém, após a refrigeração por imersão o lote 4 apresentou carcaças negativas e o lote 5 carcaças positivas, caracterizando eliminação e contaminação cruzada durante o processamento destes lotes. O controle de diferentes parâmetros, como por exemplo, temperatura, pH, concentração de cloro e fluxo de água da escalda e do resfriamento possuem papel que influenciam de forma direta na concentração e viabilidade de *Campylobacter* na água e nas carcaças. É necessário ressaltar que, com vista à inocuidade dos produtos, assegurar o funcionamento dos programas de auto controle da indústrias são pontos chaves para reduzir a ocorrência e concentração de *Campylobacter* spp. nos produtos finais.

A refrigeração, considerada um ponto crítico de controle, pode contribuir para a contaminação cruzada devida ao contato direto das carcaças com a água que carrega esta bactéria. A pele das aves proporciona um ambiente para proteção bacteriana no interior dos folículos das penas ou adjacente ao tecido adiposo (CHANTARAPANONT et al., 2003). Além do *chiller*, a depena e a evisceração demonstraram serem importantes pontos que proporcionam contaminação cruzada entre as carcaças. Kuana e colaboradores (2008), também já relataram que há relação entre as variáveis para os níveis de contaminação por *Campylobacter* spp. na depenadeira e nas carcaças após o *chiller*. Estes resultados sugerem que medidas que mitiguem a contaminação nestes dois importantes estágios auxiliarão no controle da contaminação bacteriana entre as carcaças. Medidas de boas práticas de produção e análise dos perigos e pontos críticos de controle podem auxiliar nestas ações.

Duffy e colaboradores (2014) observaram redução de 3.5 log₁₀ UFC por carcaça ao avaliar a contaminação por *Campylobacter* spp. antes e após o *chiller*. A ocorrência de *Campylobacter* em carcaças resfriadas, verificada neste trabalho, são inferiores aos relatados em países da União Europeia em 2008 (EFSA, 2010), onde 75,3% das carcaças resfriadas avaliadas foram positivas para *Campylobacter* spp. Apesar do fato do *chiller* ser responsável por contaminação cruzada e possibilitar o aumento da contaminação após este processo, este método também possibilita a remoção de lavar *Campylobacter* das superfícies das carcaças (ROSENQUIST et al., 2006) e contribui para a inocuidade dos produtos. Durante a imersão no *chiller*, o número de outra bactéria muito importante neste processo, a *Salmonella*, pode reduzir. Entretanto, a contaminação cruzada permite aumento da ocorrência deste microrganismo nas carcaças (WHYTE et al., 2001; LINDBLAD et al., 2006; ROSENQUIST, 2006). Para evitar o

contato entre carcaças o *air chiller* tem sido utilizado como método alternativo, embora ambos sistemas colaboração para reduzir *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. (HUEZO et al. 2007).

A contaminação cruzada é influenciada por diferentes variáveis dentro do tanque de imersão. O controle da temperatura, cloro e renovação de água proporcionam um ambiente não favorável para a manutenção e proliferação de bactérias mesófilas e termófilas, como *Salmonella* e *Campylobacter*. Neste estudo a temperatura média da água dos tanques de resfriamento, pré-*chiller* e *chiller* estiveram de acordo com a legislação (BRASIL, 1998). As carcaças saíram do *chiller* com temperaturas abaixo dos 7°C, com exceção de dois lotes e com redução para menos de 4°C em menos de duas horas após a refrigeração por imersão.

Somente a identificação da bactéria a campo não seria um bom indicador de possibilidade de campilobacteriose humana, devido à influência da tecnologia de abate, o que torna a identificação de *Campylobacter* em carcaças uma ferramenta indispensável para avaliação de risco de aquisição da enfermidade. O emprego de medidas que visem mitigar a contaminação dos produtos finais deve ser empregado de forma constante e principalmente e baseados na situação da realidade local. Ressalta-se que a qualidade das carcaças após o processo de abate é influenciada pelo nível de contaminação dos lotes que são recebidos para o abate no frigorífico e que a responsabilidade da redução da contaminação final das carcaças está interligada com a produção das aves no campo.

Trabalhos que abordem o controle no campo para impedir que cheguem até a indústria devem ser realizados simultaneamente com melhorias de constante de biossegurança e de processo nos matadouros-frigoríficos (HALD et al., 2000). Pesquisas voltadas a pontos específicos e desenvolvimento de inovações tecnológicas e educação contínua dos funcionários também vão ao encontro de alimentos inócuos e de qualidade.

4 CONCLUSÃO

Em conclusão, este trabalho mostrou que a ocorrência de *Campylobacter* é alta em lotes de frangos de corte e o sistema de abate não permite que seja eliminada esta bactéria ao longo do processo, entretanto permite que lotes negativos mantenham-se

negativos. A evisceração e a depenagem são importantes estágios que possibilitam o aumento da contaminação, porém o uso de chuveiro após estes estágios permitiram sua redução, com aumento da contaminação após a passagem pelo *chiller*. O cultivo bacteriano pelo ensaio microbiológico permitiu identificar maior número de amostras positivas do que o rtPCR, entretanto, o rtPCR foi mais sensível em carcaças após a refrigeração por imersão ao comparar com o método convencional.

Emprego de planos de ação para o controle deste patógeno na indústria é possível, porém, o controle da disseminação desta bactéria deve ser iniciado no campo através da adoção de medidas de biossegurança. Conhecer as características da indústria e a situação epidemiológica de cada região suportam tomadas de ações mais eficazes para mitigar o risco de transmissão de *Campylobacter* spp.

REFERÊNCIAS

- Allen, M.V.; Bull, S.A.; Corry, J.E.L.; Domingue, G.; Jørgensen, F.; Frost, J.A.; Whyte, R.; Gonzalez, A.; Elviss, N.; Humphrey, T.J. (2007). *Campylobacter* spp. contamination of chicken carcasses during processing in relation to flock colonisation. *Int. J. Food Microbiol.* v.113, p.54–61.
- Berrang ME, Dickens (2000) Presence and level of *Campylobacter* on broiler Carcasses throughout the Processing plant. *J Appl Poultry Res* 9:43-47.
- Berrang ME.; Windham WR, Meinersmann RJ (2011) *Campylobacter*, *Salmonella*, and *Escherichia coli* on broiler carcasses subjected to a high pH scald and low pH postpick chlorine dip. *Poultry Science* 90:896–900.
- Blodgett, R. Appendix 2 – Most Probable Number from serial dilutions. In: US Food and Drug Administration (FDA), **Bacteriological Analytical Online**. 2006. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm109656.htm#authors> acessado em novembro 2014.

BRASIL - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (1998) Portaria 210, de 10 de Novembro de 1998. Regulamento técnico de inspeção tecnológica e higiênico sanitária de carne de aves. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 26 de nov. 1998.

Cason JA, Hinton A, Ingram KD (2000) Coliform, *Escherichia coli*, and *Salmonella* concentrations in a multiple tank, counter flow poultry scalding tank. J Food Prot 63:1184-1188.

Cason JA, Hinton A Jr (2006) Coliforms, *Escherichia coli*, *Campylobacter* and *Salmonella* in a Counter flow Poultry Scalding Tank with a Dip Tank. Int J Poult Sci 5:846-849.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention (2014) Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food — Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2006–2013. Morb. Mortal. Wkly Rep. 63:328-332.

Chantarapanont W, Berrang M, Frank JF (2003) Direct microscopic observation and viability determination of *Campylobacter jejuni* on chicken skin. J Food Prot 6:2222–2230.

Denis M, Soumet C, Rivoal K, Ermel G, Blivet D, Salvat G, Colin P (1999) Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. Lett Appl Microbiol 29:406–410.

Duffy LL, Blackall PJ, Cobbold RN, Fegan N (2014) Quantitative effects of in-line operations on *Campylobacter* and *Escherichia coli* through two Australian broiler processing plants. Int J Food Microbiol 188:128–134.

EFSA - European Food Safety Authority (2010) The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. The EFSA Journal 8:1496.

- EFSA - European Food Safety Authority (2010a) Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses in the EU, 2008, Part A: *Campylobacter* and *Salmonella* prevalence estimates. The EFSA Journal 8:1-99.
- EFSA - European Food Safety Authority (2014) Scientific Report of EFSA and ECDC The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. EFSA Journal 12: 312 p.
- Georgsson, F.; Thornorkelsson, A.E.; 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. v.23, p. 677–683, 2006.
- Hald B, Wedderkopp A, Madsen M (2000) Thermophilic *Campylobacter* spp. in Danish broiler production: A cross-sectional survey and a retrospective analysis of risk factors for occurrence in broiler flocks. Avian Pathol 29:123-131.
- Hansson, I.; Ederoth, M.; Andersson, L.; Vagsholm, I.; Olsson, E.E. (2005) Transmission of *Campylobacter* spp. to chickens during transport to slaughter. Journal of Applied Microbiology. v. 99, p.1149–1157.
- Hungaro H.M.; Mendonça R.C.M.; Rosa V.O.; Badar A.C.L.; Moreira M.A.S.; Chaves, J.B.P (2015) Low contamination of *Campylobacter* spp. on chicken carcasses in Minas Gerais state, Brazil: Molecular characterization and antimicrobial resistance. Food Control 51: 15-22.
- Hue O, Allain V, Laisney MJ, Bouquin SL, Lalande F, Petetin I, Rouxel S, Quesne S, Gloaguen PY, Picherot M, Santolini J, Bougeard S, Salvat G, Chema M (2011) *Campylobacter* contamination of broiler caeca and carcasses at the slaughterhouse and correlation with *Salmonella* contamination. Food Microbiology 28: 862-868.

Huezo R, Northcutt JK, Smith DP, Fletcher DL, Ingram KD (2007) Effect of Dry Air or Immersion Chilling on Recovery of Bacteria from Broiler Carcasses. *J Food Protect* 8:1784-1993.

Humphrey,S, Chaloner G, Kemmett K, Davidson N, Williams N, Kipar A, Humphrey T, Wigley P (2014) *Campylobacter jejuni* Is Not Merely a Commensal in Commercial Broiler Chickens and Affects Bird Welfare. *Bio* 5:1364-14.

International Standard. ISO 10272-1:2006 describes a horizontal method for the detection of *Campylobacter* spp. ISO.

Izat AL, Gardner FA, Denton JH, Golan FA (1988) Incidence and level of *Campylobacter jejuni* in broiler processing. *Poult Sci* 67:1568–1572.

Jasson V, Sampers I, Botteldoorn N, López-Gálvez F, Baert L, Denayer S, Rajkovic A, Habib I, De Zutter L, Debevere J, Uyttendaele M (2009) Characterization of *Escherichia coli* from raw poultry in Belgium and impact on the detection of *Campylobacter jejuni* using Bolton broth. *Int J Food Microbiol* 135:248-253.

Kuana SL, Santos LR, Rodrigues LB, Borsoi A, Moraes HL, Salle CT, Nascimento VP (2008) Occurrence and Characterization of *Campylobacter* in the Brazilian Production and Processing of Broilers. *Avian Disease* 88:680-684.

LaGier MJ, Joseph LA, Passaretti TV, Musser KA, Cirino NM (2004) A real-time multiplexed PCR assay for rapid detection and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Molecular and Cellular Probes* 18:275–282.

Lindblad M, Hansson I, Vagsholm I, Lindqvist R (2006) Postchill *Campylobacter* prevalence on broiler carcasses in relation to slaughter group colonization level and chilling system. *J Food Prot* 69:495-499.

- Mayr, A.M.; Lick, S.; Bauer, J.; Thärigen, D.; Busch, U.; Huber, I. (2010) Rapid detection and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter lari* in food, using multiplex real time PCR. *Journal Food Protection*. v. 73, p. 241-250.
- Melero, B.; Cocolin, L.; Rantsiou, K.; Rantsiou, K.; Jaime, I.; Rovira, J. (2011) Comparison between conventional and qPCR methods for enumeration *Campylobacter jejuni* in a poultry processing plant. *Food Microbiology*. v. 28, p.1353-1358.
- Oliveira A.F. & R.B.P. Oliveira. (2013) Enumeração de *Campylobacter* spp. e presença de *Campylobacter jejuni* em carcaças de frango no Estado de Minas Gerais. *Cienc Rural* 43: 480-484.
- NZPHSP - New Zealand Public Health Surveillance Report. (2014). March 2014: Covering October to December 2013. Volume 12 Issue 1 ISSN 1176-2888 (Print) ISSN 1178-8313 (Online)
- Rosenquist H, Sommer HM, Nielsen NL, Christensen BB (2006) The effect of slaughter operations on the contamination of chicken carcasses with thermotolerant *Campylobacter*. *Int J Food Microbiol* 108: 226–232.
- Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA, Taniwaki MH, Santos RFS, Gomes RAR (2010) Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água. Ed.4, 625p.
- Slader, J.; Dominue, G.; Jørgensen, F.; Mcalpine, K.; Owen, R.J.; Bolton, F.J.; Humphrey, T.J. Impact of transport crate reuse and of catching and processing on *Campylobacter* and *Salmonella* contamination of broiler chickens. *App and Environmen Microbiol*. 68, 713–719, 2002.
- Stern NJ, Robach MC (2003) Enumeration of *Campylobacter* spp. in broiler feces and in corresponding processed carcasses. *J Food Prot* 66:1557-1563.

Whyte P, Collins JD, McGill K, Monahan C, O'Mahony H (2001) Distribution and prevalence of airborne microorganisms in three commercial poultry processing plants. *J Food Prot* 64:388-391.

Zorman T, Smole MS (2002) Thermotolerant *Campylobacters* in Poultry Meat. *Food Technol Biotechnol* 40:177–184.

CAPITULO III

OCCURRENCE OF *Campylobacter jejuni* AND *C. coli* ON BROILER CARCASS AFTER CHILLING IN SOUTHERN BRAZIL

Occurrence of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* on broiler carcass after chilling in southern Brazil

(Artigo aceito para publicação na revista Pesquisa Veterinária Brasileira)

ABSTRACT.- Perdoncini, G., et al., 2014. [Occurrence of *Campylobacter jejuni* and *C. Coli* on broiler carcass after chilling in south Brazil.] *Campylobacter jejuni* e *C. coli* em carcaças de frangos após a refrigeração por imersão no sul do Brasil. Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00. Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 8824, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. E-mail: gustavo.perdoncini@yahoo.com

Campylobacter jejuni and *C. coli* have been associated with gastrointestinal disorders in human beings, due mainly to the consumption of chicken meat. Despite control measures for reducing contamination by these bacteria, the detection of *Campylobacter* in carcasses after chilling remains high. A total of 105 carcasses were assessed by the horizontal detection method in five federally inspected slaughterhouses in southern Brazil in 2012 and in the first three months of 2013. *Campylobacter* was isolated in 37.1% of the carcasses, of which 97.5% contained *C. jejuni* and 2.5% were infected by *C. coli*. The rate of positive carcasses across the slaughterhouses ranged from 0 to 71.4%. Determining the occurrence of *Campylobacter* among flocks is crucial for estimating the microbial load at specific points along the slaughtering process and for minimizing the risk of contamination of end products by *Campylobacter*.

INDEX TERMS: Campylobacteriosis, cross-contamination, broilers, zoonosis.

Resumo. *Campylobacter jejuni* e *C. coli* têm sido associados a problemas gastroentericos em seres humanos principalmente devido ao consumo de carne de frango. Embora medidas de controle sejam realizadas para reduzir a contaminação por estas bactérias, a identificação de *Campylobacter* em carcaças após a refrigeração por imersão é alto. Foram analisadas 105 carcaças pelo método de detecção horizontal em cinco abatedouros sob Inspeção Federal no sul do Brasil em 2012 e nos três primeiros meses de 2013. *Campylobacter* foi isolada em 37,1% das carcaças analisadas, as quais 97,5% foram identificados como *C. jejuni* e 2,5% como *C. coli*. A ocorrência de carcaças positivas entre matadouros variou de zero a 71,4%. O conhecimento sobre a ocorrência de *Campylobacter* entre os lotes é fundamental para estimar a extensão da carga microbiana em pontos específicos do abate e conseqüentemente minimizar o risco de contaminação por *Campylobacter* em produtos finais de frangos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Campilobacteriose, contaminação cruzada, frangos, zoonose.

INTRODUCTION

Thermotolerant *Campylobacter* spp. are the causative agents of campylobacteriosis (Butzler, 2004), a zoonotic disease (WHO, 2000) transmitted to human beings mainly by the consumption of contaminated poultry products (Dicknis et al., 2002). In the European Union (EFSA, 2010) and in the United States (CDC, 2013) *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* are often associated with gastroenteritis, and *C. jejuni* is also implicated in Guillain-Barré syndrome (Vucic et al., 2009). The rise in the incidence of campylobacteriosis in several countries, especially after 1990, has caused a lot of concern due to the growing morbidity and mortality rates among children and immunocompromised individuals (WHO, 2000). This has encouraged research studies in an attempt to minimize the number of positive flocks and to have a better understanding of the intrinsic characteristics of these bacteria.

Seeking to reduce the impact of this pathogen on public health, research studies have investigated the factors that contribute to contamination and persistence of *Campylobacter* spp. on poultry farms. The direct contact of birds with feces, untreated water, rodents, wild birds, or vectors such as *Alphitobius diaperinus* (darkling beetles) infected with this bacterium may contaminate the flocks to be slaughtered (Eberle *et al.*, 2013).

At meat-packing plants, contaminated feces and feathers help disseminate *Campylobacter* in the slaughtering process. Defeathering is critical for contamination as the concentration of *Campylobacter* increases at this stage, as well as in evisceration (Herman et al., 2003; Rosenquist et al., 2006 and Figueroa et al., 2009), and measures such as rinsing and chilling of carcasses are alternatives for reducing the incidence of *Campylobacter* (Reich et al., 2008; Figueroa et al., 2009).

However, contamination may occur at any time during the slaughtering process, for instance, in scalding, defeathering, and chilling (Rosenquist et al., 2006, Allen et al., 2007, Figueroa et al., 2009). A study that investigated previous colonization of carcasses by *Campylobacter* spp. detected contamination with *C. jejuni* and *C. coli*, in broiler carcasses in two out of five previously negative flocks (Allen et al., 2007).

Given the importance of this bacterium to public health and to poultry production, this paper assesses the occurrence of *C. jejuni* and *C. coli* in broiler carcasses after chilling at meat-packing plants in southern Brazil.

MATERIALS AND METHODS

A cross-sectional observational study was conducted and convenience samples were used (Thusfield, 2004). In total, 105 broiler carcasses were collected after chilling from five differently slaughterhouses in southern Brazil in 2012 and in the first three months of 2013. The samples were stored in isothermal ice boxes and taken to the laboratory for identification of *C. jejuni* and *C. coli* by the horizontal method (ISO 10272-1:2006). The chilled carcasses were rinsed in sterile polyethylene bags containing 400 mL with buffered peptone water (Oxoid®) and aliquots of 1mL were obtained and homogenized in 9mL of Bolton broth - Oxoid® (1:9), which were then incubated in a microaerophylic environment (5% O₂, 10% CO₂ and 85% N₂) at 41.5°C ±0.5 for 48 hours. Thereafter, 100µL of the broth suspension was filtered in acetate membrane measuring 0.65µm x 47mm (Skirrow, 1977; Bolton, 1982) plated onto mCCD agar (CM739, Oxoid®) for 30 minutes, followed by incubation under the conditions described earlier. The *Campylobacter*-compatible colonies were grown on 7% sheep blood agar.

For positive control of isolation and PCR assays were used two references strains, *C. jejuni* subsp. *jejuni* ATCC 29428 and *C. coli* ATCC 43478. The negative control for PCR assay was used *Arcobacter* sp. strain.

The DNA of the colonies was obtained by thermal extraction and used for multiplex PCR as proposed by Denis et al., (1999) with some changes, which allows distinguishing *C. jejuni* from *C. coli*. Three primer pairs were used for each reaction, based on the sequence of primers for the common 16rRNA region between the species: MD16S1, (16S rRNA) *F*^a – ATCTAATGGCTTAACCATTAAC e *R*^b – GGACGGTAACTAGTTTAGTATT with 857 pb. The identification of *C. jejuni* and *C. coli* was based on the genes *mapA* *F*^a – CTATTTTATTTTGAGTGCTTGTG and *R*^b – GCTTTATTTGCCATTTGTTTTATTA with 589 pb and *ceuE* *F*^a – AATTGAAAATTGCTCCAACATG and *R*^b – TGATTTTATTATTTGTAGCAGCG with 462 pb, respectively.

The amplification conditions were as follows: denaturation (10 minutes at 95°C), 35 cycles of denaturation (30 seconds at 95°C), annealing (1 minute and 30 seconds at 59°C), extension (1 minute at 72°C), followed by final extension (10 minutes at 72°C). All reactions were performed in a thermocycler (Biocycler – Peltier Thermal Cycler MJ96+MJ96G) and visualized by 1.5% agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide and by ultraviolet transillumination imaging.

RESULTS AND DISCUSSION

Campylobacter was detected in 37.1% of the 105 analyzed carcasses, showing prevalence of *C. jejuni* (97.5%) followed by *C. coli* (2.5%). Both species were detected in two samples (5.1%).

These rates are lower than those reported for European Union countries in 2008 (EFSA 2010), where 75.3% of chilled carcasses were positive for *Campylobacter* spp., with a range from 4.9% (Estonia) to 100% (Luxembourg) and detection of *C. jejuni* in 60.8% of the flocks, followed by *C. coli* and *C. lari* with 41.5%. Carcasses before final rinsing may have a high incidence (up to 100%) of *Campylobacter*, but contamination at this stage is significantly reduced by rinsings and later refrigeration (Son et al., 2007).

In this study the rates of *Campylobacter*-positive samples varied from 0 to 71.4% in chilled carcasses at the five meat-packing plants. In fact, the bacterium was not isolated from only one of the plants (Table 1). These differences can be attributed to the procedures carried out at meat-packing plants, their characteristics, quality management, and minimum operating health standards throughout the slaughtering process, indicating that any problems with these items will be closely related to the final contamination of carcasses (Habib et al., 2012). Another important factor concerns positive flocks, which influence the contamination of equipment and, consequently, the microbiological quality of the end product (Smith et al., 2007, Malher et al., 2011). Consonant with these findings, Kuana et al., (2008) assessed 22 broiler flocks and observed that only four of them were not positive for *Campylobacter* spp. before slaughter but that changed during the processing stage with the isolation of the bacterium in chilled carcasses.

Tabela 1 Occurrence of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* at meat-packing plants and in carcasses after chilling

Meat-packing plant	Positive carcasses	(%)	Negative carcasses	(%)	Total
A	5*	27,78	13	72,22	18
B	12**	50	12	50	24
C	12	57.14	9	42.86	21
D	10	71.42	14	28.58	24
E	0	0	18	100	18
TOTAL	39	37.14	66	62.86%	105

*One positive sample only for *C. coli*; **Two positive samples for both species. The other isolates were identified as *C. jejuni*.

The increase in carcass contamination is often related to fowl size and to equipment setup. It should be noted, though, that even when the equipment is properly regulated, there may be intestinal rupture in broilers and contamination of the slaughter line. Two different approaches can be used for reducing and/or eliminating the bacterium: adoption of specific control measures for the reduction of *Campylobacter*-positive farms at the primary level, and actions for minimizing the contamination of ready-to-sell carcasses at the industry level (Hald et al., 2000).

Rinsing and refrigeration of carcasses are alternatives for controlling contamination during the slaughtering process, while the immersion of carcasses in water at 75°C for 30 seconds (Corry et al., 2007) or the use of vapor at 90°C for 12 seconds (Whyte et al., 2003) after chilling yielded *Campylobacter* reduction rates of 1.6 log₁₀ CFU/cm² and 1.3 log₁₀ CFU/g, respectively. The use of organic acids in the chilling process has been assessed and has reduced contamination, but these products have an impact on the sensory features of carcasses (Nagel et al., 2013).

Investment in logistics and verification of flocks for the presence of *Campylobacter* before slaughter help reduce cross-contamination (Nauta & Havelaar 2008) and would be an alternative for avoiding putting negative and positive flocks together. Nevertheless, this strategy is not successful when traditional detection methods are used, as such methods require at least 48 hours for confirmation of positive results. Once negative flocks are identified in the field, it is necessary to ensure that broilers will not be contaminated during transportation from the farms to the slaughterhouse (Hansson et al., 2005). However, a study conducted in the Netherlands

by Nauta et al (2009) assessed 62 broiler flocks and did not find significant support for the implementation of control strategies targeted at the identification of positive flocks in the field and at slaughtering time. The correlation between the contamination of feces and of breast cuts by *Campylobacter* suggests these assessed criteria are not good indicative signs of human exposure to *Campylobacter*.

Only the identification of the bacterium in the field would not be an indication of possible human campylobacteriosis, due to the influence of slaughtering technology, which makes the detection of *Campylobacter* in carcasses an essential tool for evaluating the risk of contamination. The adoption of measures that can reduce the number of positive carcasses goes beyond slaughtering logistics (Evers 2004), as other measures such as improvements in scalding, in the configuration of defeathering equipment and techniques, in evisceration, and additional rinsings of carcasses are also important.

The inclusion of qualitative microbiological analysis of carcasses is paramount in checking for the presence of pathogens after the processing stage. This allows estimating the microbial load at specific points along the process, thereby minimizing the incidence of *Campylobacter* in carcasses after chilling and improving the microbiological quality of chicken meat.

Acknowledgments.- We thank CNPq (Brazilian National Council for Scientific and Technological Development) and CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel) for the financial support and fellowship grants. We are also indebted to professor Marcos José Pereira Gomes, head of the Laboratory of Veterinary Bacteriology of Universidade Federal do Rio Grande do Sul, and to the CDPA (Diagnostic and Research Center for Avian Pathology) for their technical and structural support.

REFERENCES

- Allen M.V., Bull S.A., Corry J.E.L., Domingue G., Jørgensen F., Frost J.A., Whyte R., Gonzalez A., Elviss N. & Humphrey T.J. 2007. *Campylobacter* spp. contamination of chicken carcasses during processing in relation to flock colonisation. Int. J. Food Microbiol. 113:54–61.

- Butzler J.P. 2004. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. Clin Microbiol Infect.10:868-876.
- Bolton F.J., Hutchinson D.N. & Coates D. 1984. Blood-free selective medium for isolation of *Campylobacter jejuni* from feces. J. Clin Microbiol. 19:169-171.
- CDC. 2013. Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food - Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 1996–2012. Morbidity and Mortality Weekly Report. 19:283-287.
- Corry J.E.L., James S.J., Purnell G., Pinto C.S., Chochois Y., Howell M. & James C. 2007. Surface pasteurisation of chicken carcasses using hot water. J. Food Eng. 76:913–919.
- Dickins M.A., Franklin, S., Stefanova R., Schutze G. E., Eisenach, K. D., Wesley I. & Cave M D. 2002. Diversity of *Campylobacter* isolates from retail poultry carcasses and from humans demonstrated by pulse-field gel electrophoresis. J. Food Protect. 65:957-962.
- Denis M., Soumet C., Rivoal K., Ermel G., Blivet D., Salvat G. & Colin P. 1999. Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. Lett Appl Microbiol. 29:406–410.
- Eberle K.N., Davis J.D., Purswell J.P., Parker H.M., McDaniel C.D. & Kiess A.S. 2013. A One Year Study of Newly Constructed Broiler Houses for the Prevalence of *Campylobacter*. Int. J. Poultry Sci. 12: 29-36.
- EFSA - European Food Safety Authority. 2010. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses in the EU, 2008, Part A: *Campylobacter* and *Salmonella* prevalence estimates. The EFSA Journal. 8:1-99.
- EFSA - European Food Safety Authority. 2012. Scientific Opinion on a review on the European Union Summary Reports on trends and sources zoonoses, zoonotic agents and food borne outbreaks in 2009 and 2010 – specifically for the data on *Salmonella*, *Campylobacter*, verotoxigenic *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and foodborne outbreaks. The EFSA Journal. 10:1-25.
- Evers EG. 2004. Predicted quantitative effect of logistic slaughter on microbial prevalence. Prev. Vet. Med. 65:31-46.

- Figueroa G., Troncoso M., López C., Rivas P. & Toro M. 2009. Occurrence and enumeration of *Campylobacter* spp. during the processing of Chilean broilers. *BMC Microbiology*. 9:1-6.
- Habib I., Berkvens D., Zutter L. De., Dierick K., Huffel X.V., Speybroeck N., Geeraerd A.H. & Uyttendaele M. 2012. *Campylobacter* contamination in broiler carcasses and correlation with slaughterhouses operational hygiene inspection. *Food Microbiology* 29: 105-112.
- Hald B., Wedderkopp A. & Madsen M. 2000. Thermophilic *Campylobacter* spp. in Danish broiler production: A cross-sectional survey and a retrospective analysis of risk factors for occurrence in broiler flocks. *Avian Pathol.* 29: 123-131.
- Hansson I., Ederoth M., Andersson L., Vagsholm I. & Olsson Engvall E. 2005. Transmission of *Campylobacter* spp. to chickens during transport to slaughter. *J. Appl Microbiol.* 99:1149–1157.
- Herman L., Heyndrickx M., Grijspeerdt, K., Vandekerchove, D., Rollier, I. & De Zutter, L. 2003. Routes for *Campylobacter* contamination of poultry meat: epidemiological study from hatchery to slaughterhouse. *Epidemiol Infect.* 131:1169–1180.
- ISO - International Standard Organization. 2006. ISO 10272-1:2006 describes a horizontal method for the detection of *Campylobacter* spp.
- Kuana S.L., Santos L. R., Rodrigues L. B. Salle C. T. P. S., Moraes, H. L. S. & Nascimento V. P. 2008. Occurrence and Characterization of *Campylobacter* in the Brazilian Production and Processing of Broilers. *Avian Dis.* 88:680-684.
- Malher X., Simon M., Charnay V., Déserts R.D., Lehébel A. & Belloc C. 2011. Factors associated with carcass contamination by *Campylobacter* at slaughterhouse in cecal-carrier broilers. *Int. J. Food Microbiol* 150: 8-13.
- Nagel G.M., Bauermeister L.J., Bratcher C.L., Singh M. & McKee R.S. 2013. *Salmonella* and *Campylobacter* reduction and quality characteristics of poultry carcasses treated with various antimicrobials in a post-chill immersion tank. *Int. J. Food Microbiol.* 165: 281–286.
- Nauta M.J. & Havelaar A.H., 2008. Risk-based standards for *Campylobacter* in the broiler meat chain. *Food Control.* 19: 372–381.

- Nauta M.J., Van Der Wal F.J., Putirulan F.F., Post J., Van de Kasstele J. & Bolder N.M. 2009. Evaluation of the “testing and scheduling” strategy for control of *Campylobacter* in broiler meat in The Netherlands. *Int. J. Food Microbiol.* 134: 216-222.
- Reich F., Atanassova V. & Klein G. 2008. The effects of *Campylobacter* numbers in caeca on the contamination of broiler carcasses with *Campylobacter*. *Int J Food Microbiol.* 127:116 –120.
- Rosenquist H, Nielsen N.L. Sommer H.M, Nørrung B. & Christense B.B. 2003. Quantitative risk assessment of human campylobacteriosis associated with thermophilic *Campylobacter* species in chickens. *Int J Food Microbiol.* 83:87–103.
- Rosenquist H., Sommer H.M., Nielsen N.L. & Christensen B.B. 2006. The effect of slaughter operations on the contamination of chicken carcasses with thermotolerant *Campylobacter*. *Int. J. Food Microbiol.* 108: 226–232.
- Skirrow M.B. *Campylobacter enteritis*: a "new" disease. 1977. *Brit Med J.* 2:9-11.
- Smith D.P., Northcutt J.K., Cason J.A., Hinton Jr.A., Buhr R.J. & Ingram K.D. 2007. Effect of external or internal fecal contamination on numbers of bacteria on pre-chilled broiler carcasses. *Poultry Sci.* 86:1241-1244.
- Son I., Englen M.D., Berrang E.B., Fedorka-Cray P.J. & Harrison M.A. 2007. Prevalence of *Arcobacter* and *Campylobacter* on broiler carcasses during processing. *Int J Food Microbiol.* 113:16-22.
- Thrusfield M. 2004. *Epidemiologia Veterinária*. São Paulo, ROCA. 556p.
- Vucic S., Kierman M. & Comblath D.R., 2009. Guillain-Barré syndrome: An update. *J. clin. Neurosci.* 16:733–741.
- Whyte P., McGill K. & Collins J.D. 2003. An assessment of steam pasteurisation and hot water immersion treatments for the microbiological decontamination of broiler carcasses. *Food Microbiol.* 20:111-117
- World Health Organization - WHO. *Campylobacter*. 2000. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/en/print.html>>. Acesso em: agosto de 2013.

CAPITULO IV
IDENTIFICAÇÃO DE *Campylobacter jejuni* E *Campylobacter coli* E GENES ASSOCIADOS A VIRULÊNCIA EM CORTES DE FRANGO

Identificação de *Campylobacter jejuni* E *Campylobacter coli* em cortes de frango e genes associados a virulência.

(Artigo a ser submetido para a revista Brazilian Journal of Microbiology)

Resumo

Produtos avícolas estão entre as principais fontes de contaminação de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* para seres humanos. Apesar de medidas de controle serem adotadas para mitigar o risco de contaminação por estas bactérias, a contaminação cruzada no processo corrobora para o aumento da prevalência de *Campylobacter* em cortes de frangos, além da diversidade genotípica que permite que alguns isolados possuam melhores condições para se disseminar e causar doenças. Foram coletadas cortes de frangos para a pesquisa de *C. jejuni* e *C. coli* e genes de virulência associados a estes isolados. Os genes associados a virulência pesquisados foram o *flaA* que está associado a motilidade, aderência e invasão e os genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* que são responsáveis pela produção da Toxina Citoletal Distensiva – CDT. A única espécie identificada foi *C. jejuni* em 40,48% das amostras analisadas. As amostras de coxas e asas foram os cortes com maior e menor ocorrência de *C. jejuni*, com 87,5% e 12,5%. De 35 amostras isoladas 29 foram positivas para os três genes do *cluster* CDT - *cdtA*, *cdtB*, *cdtC* e em 26 amostras foi detectado o gene *flaA*. A identificação de *Campylobacter jejuni* como única espécie constatado neste trabalho retrata sua importância, principalmente por protagonizar altíssima prevalência nos casos de campilobacteriose humana. Ressalta-se a identificação dos genes associados a virulência nestes isolados também contribuem para caracterizar as estirpes circulantes e que estão presentes em produtos avícolas que podem estar à disposição para comercialização.

Palavras chaves: campilobacteriose, toxina citoletal distensiva.

Introdução

O envolvimento de bactérias intestinais em relatos de doenças transmitidas por alimentos tem caracterizado os campilobacteres termófilos, principalmente *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*, como as principais espécies envolvidas. Estas bactérias encontraram nas aves um ambiente que favorece seu desenvolvimento e tem em especial os produtos avícolas como meio de disseminação (EFSA, 2014) e contaminação de seres humanos (CDC 2014). Dor abdominal, febre e diarreia são os principais sinais clínicos relatados na campilobacteriose humana, porém o quadro pode

ser mais grave ao desenvolver síndromes como a de Guillain-Barré (GBS) e Reiter (Blaser *et al.*, 2008).

A aplicação de estratégias para reduzir a contaminação de produtos avícolas nas indústrias são realizadas através de medidas de higiene operacional, boas práticas de fabricação e da análise de perigos e pontos críticos de controle - APPCC. Porém, inevitavelmente, a dificuldade na identificação de lotes positivos é um dos fatores que aumenta a contaminação cruzada (KUANA *et al.*, 2008) e tem proporcionado alta incidência desta bactéria em produtos refrigerados (Sampers *et al.*, 2010). O emprego de ferramentas para eliminar ou reduzir o risco de contaminação por *Campylobacter* e outras bactérias de origem intestinal colaboram para a redução de produtos contaminados após o processo e de casos clínicos em seres humanos (Rosenquist *et al.*, 2003; Hue *et al.*, 2011).

Dados que reforcem a ocorrência de *Campylobacter* e o seu perfil genético são poucos relatados no Brasil. As características dos isolados influenciam na capacidade de disseminação e de causar doenças. A habilidade de aderir, colonizar e invadir os enterócitos para causar lesões diferenciam isolados identificados em diversos trabalhos (Fauchere *et al.*, 1986; Van Putten *et al.*, 2009; Gripp *et al.*, 2011) em relação a mediação de genes envolvidos no maior ou menor grau de virulência (Gerry *et al.*, 2006; Guerry 2007, Backert *et al.*, 2013).

Os campilobacteres são bactérias móveis mediadas por um flagelo polar que é importante para a patogênese (Guerry 2007). Estes flagelos são compostos por flagelina (*flaA* e *flaB*) e esta característica é necessária para a invasão do epitélio celular, requerem principalmente o *flaA* ao *flaB* para a invasão (Wassenaar *et al.*, 1991). Por ser uma bactéria móvel, a presença de muco facilita a motilidade, aderência e invasão das

células intestinais (Szymanski *et al.*, 1995), porém outros fatores estão envolvidos na virulências do *Campylobacter* (Guery, 2007).

A habilidade em produzir toxina citoletal distensiva – CDT (Whitehouse *et al.*, 1998) foi primeiramente descoberta em *E. coli*, depois em amostras de *Shigella flexneri* e *S. Typhi* está associada ao desenvolvimento dos sinais clínicos (Johnson e Lior 1988). Esta toxina que é codificada por três genes - *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* – interrompe, o ciclo celular através da introdução do gene *cdtB* pelos genes *cdtA* e *cdtC* na célula hospedeira. Dentro da célula a proteína *cdtB* entra no núcleo e possui papel semelhante a uma DNase, corta o DNA dupla fita e interrompe o ciclo celular através do bloqueio do G2/M da divisão celular e induz a uma distensão citoplasmática que leva a morte celular (McSweeney e Dreyfus, 2004; Dasti *et al.*, 2010). É observada indução da produção de IL8 causada pela lise celular, mas a existência de alguns mutantes que possuem uma provável falta de *Ec-cdtB* perdem sua função e não são capazes de interromper o ciclo celular (McSweeney e Dreyfus, 2004, FOX *et al.*, 2004) o que intensificam os sinais clínicos.

As variações genótípicas existentes entre os isolados e as condições que o meio oferece para o desenvolvimento bacteriano são fatores que devem ser avaliados para melhor caracterizar o processo patogênico, a virulência e interação das estirpes com o hospedeiro (Backert *et al.*, 2013). Visto a importancia de produtos avícolas na disseminação de *Campylobacter* spp. a identificação destas características contribuem para conhecer as cepas circulantes no Brasil e correlacionar estas características com as de isolados de surtos ocorridos em humanos.

Materiais e métodos

Coleta das amostras

A coleta das amostras foi realizada através de um estudo observacional transversal e amostragem por convivência de cortes de frangos (Thusfield 2004). Foram analisados 42 cortes de frangos resfriados em matadouros-frigoríficos, sendo: 10 peitos, 8 coxas, 8 asas + coxa das asas, 8 asas e 8 sobre coxas. As amostras coletadas na sala de corte acondicionadas em sacos plásticos estéreis, armazenados em caixas isotérmicas com gelo e encaminhadas ao laboratório para processamento bacteriológico e molecular.

Isolamento Bacteriano

Os cortes de frango foram rinsados com 225 mL de água peptonada tamponada – APT (Oxoid®). A partir da rinsagem foram coletadas alíquotas de 1mL e foram homogeneizadas em 9 mL de caldo Bolton - Oxoid® (1:9), e incubadas em microaerofilia (5% O₂, 10% CO₂ e 85% N₂ a 41,5°C ± 0,5 por 48 horas. Após, 100µL da suspensão do caldo foi filtrada em membrana de acetato de 0,65µm x 47mm (Skirrow 1977; Bolton 1982) depositada por 30 minutos sobre Ágar mCCD (CM739, Oxoid®), seguido da incubação nas mesmas condições anteriores. Colônias compatíveis com *Campylobacter* spp. foram repicadas em ágar columbia (Oxoid®) acrescida de 5% de sague desfibrinado de ovino (ISO 10272-1:2006). Para confirmar a presença das espécies *C. jejuni* e/ou *C. coli* foram selecionadas de uma a três colônias suspeitas por amostra. Os *C. jejuni* subsp. *jejuni* ATCC 29428 e *C. coli* ATCC 43478 foram utilizados como controle positivo para o cultivo.

Identificação das espécies e dos genes do complexo CDT e *flaA*

O DNA das colônias foram obtidos por termo extração e empregados em 4 protocolos: identificação das espécies *C. jejuni* e *C. coli* – protocolo 1; identificação dos genes *cdtA*, *cdtC* – protocolo 2; identificação do gene *cdtB* – protocolo 3; identificação do gene *flaA* – protocolo 4. Os *primers* empregados em todas as reações estão descritos na tabela 1.

Protocolo 1: para identificar e diferenciar as espécies em *C. jejuni* ou *C. coli*, foi utilizado o multiplex PCR proposto por Denis *et al.*, (1999). –O *C. jejuni* subsp. *jejuni* ATCC 29428 e *C. coli* ATCC 43478 foram utilizados como controles positivos da reação. Foram utilizados três pares de *primers*: (1) identifica o gene *16S rRNA* que codifica região em comum entre *C. jejuni* e *C. coli*; (2) identifica o gene *mapA*, específico para *C. jejuni*; (3) identifica o gene *ceuE*, específico para *C. coli*. A reação final empregada possuiu um volume final de 30 μ L, composto por um tampão 10X, 1,5mM de MgCl₂, mix de 5mM de dNTP's, 10 pmol/ μ L dos *primers*, 2 unidades de Taq polimerase, DNA e completado o volume final com água ultrapura. As condições de amplificação foram: desnaturação (10 minutos a 95°C), 35 ciclos de desnaturação (30 segundos a 95°C), anelamento (1 minuto e 30 segundos a 59°C), extensão (1 minuto a 72°C), seguido por extensão final (10 minutos a 72°C).

Protocolo 2: para a identificação dos genes *cdtA*, *cdtC* foram otimizados dois protocolos de PCR baseados nos trabalhos de Datta *et al.*, (2003) e Wieczorek & Osek (2008). A reação final empregada possuiu 30 μ L composto por um tampão 10X, 1mM de MgCl₂, mix de 2,5mM de dNTP's, 20 pmol/ μ L dos *primers*, 2 unidades de Taq polimerase, DNA e completado o volume final com água ultrapura. As condições de amplificação

foram: desnaturação (5 minutos a 94°C), 30 ciclos de desnaturação (1 minuto a 94°C), anelamento (1 minuto a 49°C), extensão (1 minuto a 72°C), seguido por extensão final (5 minutos a 72°C).

Protocolo 3: para a identificação do gene *cdtB* foi otimizado protocolo de PCR baseado no trabalho de Wieczorek & Osek (2008). O controle positivo utilizado foi amostra clínica de *Arcobacter* sp. positiva para o gene *cdtB* e controle negativo *C. jejuni* negativo para este gene. A reação final empregada possuiu 30 µL composto por um tampão 10X, 1,5mM de MgCl₂, mix de 2,5mM de dNTP's, 20 pmol/µL dos primers, 2 unidades de Taq polimerase, DNA e completado o volume final com água ultrapura. As condições de amplificação foram: desnaturação (5 minutos a 94°C), 30 ciclos de desnaturação (1 minuto a 94°C), anelamento (1 minuto a 51°C), extensão (1 minuto a 72°C), seguido por extensão final (5 minutos a 72°C).

Protocolo 4: para a identificação do gene *flaA* foi otimizado protocolo de PCR baseados no trabalho de Ertas *et al.*, (2004). O controle positivo utilizado foi *C. jejuni* ATCC 33560 e controle negativo isolado de origem avícola de *C. jejuni*. A reação final foi composta por 25µL com: tampão 10X, 1,2mM de MgCl₂, mix de 2,5mM de dNTP's, 10 pmol/µL dos primers, 2 unidades de Taq polimerase, DNA e completado o volume final com água ultrapura. As condições de amplificação foram: desnaturação (5 minutos a 94°C), 30 ciclos de desnaturação (1min a 94°C), anelamento (1 minuto e 30 segundos a 48°C), extensão (1 minuto a 72°C), seguido por extensão final (10 minutos a 72°C).

Após amplificação, os produtos da PCR (*amplicons*) dos protocolos 1 e 4 foram submetidos à eletroforese realizada em gel de agarose a 1,5% e dos protocolos 2 e 3

realizada em gel de agarose a 2%, e corados com brometo de etídio. Todas as reações foram realizadas em Termociclador (Biocycler – Peltier Thermal Cycler MJ96+MJ96G) e o tamanho dos fragmentos gerados e a sequência dos *primers* empregados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 Sequências dos primers utilizada para detecção dos genes pesquisados.

Gene	Sequência (5' → 3')	Tamanho	Referência
<i>16S rRNA</i>	<i>F</i> ^a - ATCTAATGGCTTAACCATTAAAC <i>R</i> ^b - GGACGGTAACTAGTTTAGTATT	857 pb	Denis <i>et al.</i> , (1999)
<i>Mapa</i>	<i>F</i> ^a - CTATTTTATTTTTGAGTGCTTGTG <i>R</i> ^b - GCTTTATTTGCCATTTGTTTTATTA	589 pb	Denis <i>et al.</i> , (1999)
<i>ceuE</i>	<i>F</i> ^a - AATTGAAAATTGCTCCAACACTATG <i>R</i> ^b - TGATTTTATTATTTGTAGCAGCG	462 pb	Denis <i>et al.</i> , (1999)
<i>cdtA</i>	<i>F</i> ^a - CCTTGTGATGCAAGCAATC <i>R</i> ^b - ACACTCCATTTGCTTTCTG	370 pb	Wieczorek & Osek (2008).
<i>cdtB</i>	<i>F</i> ^a - CAGAAAGCAAATGGAGTGTT <i>R</i> ^b - AGCTAAAAGCGGTGGAGTAT	620 pb	Datta <i>et al.</i> , (2003)
<i>cdtC</i>	<i>F</i> ^a - CGATGAGTTAAAACAAAAAGATA <i>R</i> ^b - TTGGCATTATAGAAAATACAGTT	182 pb	Datta <i>et al.</i> , (2003)
<i>flaA</i>	<i>F</i> ^a - GGATTTTCGTATTAACACAAATGGTGC <i>R</i> ^b - CTGTAGTAATCTTA AACATTTTG	1700 pb	Ertas <i>et al.</i> , (2004)

Resultados

Das amostras analisadas 17 (40,48%) foram positivas para *Campylobacter jejuni*, única espécie identificada. As amostras de coxas e asas apresentaram os cortes com maior e menor ocorrência de isolados, com 87,5% e 12,5% - Tabela 2. De cada amostra analisada foram selecionadas de uma a três colônias totalizando 35 isolados positivos e que foram utilizados para verificar a presença de genes *cdtA*, *cdtB*, *cdtC* e *flaA*.

Foi observado que das 35 amostras analisadas 29 (82,85%) foram positivas para todos os três genes do *cluster* CDT - *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*. Positivas para o *cluster* CDT mais o gene *flaA* totalizaram 25 (71,42%). Do total de amostras isoladas 26 foram positivas para o *flaA*. Somente três apresentaram um gene cada - *cdtB*, *cdtC* ou *flaA*. Duas amostras não apresentaram nenhum dos genes de virulência pesquisados.

Tabela 2 Ocorrência de *Campylobacter jejuni* e *C. coli* nos cortes de frango.

Amostra	Número de amostra positiva/total de amostras	Ocorrência
Peito	2/10	20%
Coxa	7/8	87,50%
Asa + coxa da asa	3/8	37,50%
Sobre coxa	4/8	50%
Asa	1/8	12,50%

Discussão

A presença de *C. jejuni* como única espécie identificada dos isolados dos cortes e a ocorrência de 40,48% está de acordo com a espécie mais isolada e com uma alta incidência em produtos avícolas (Garin *et al.*, 2012; Oyarzabal *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2014) porém, é necessário ressaltar que existem diferenças genotípicas mediadas por um conjunto de fatores de virulência (Zhang *et al.*, 2010) que influenciam na patogenicidade dos isolados.

Baseado no processo operacional há uma relação positiva entre a contaminação cruzada entre lotes (Rivoal *et al.*, 1999) e as superfícies durante o processo de abate (Bily *et al.*, 2010) que tendem a aumentar a contaminação dos cortes (Baré *et al.*, 2013). A ocorrência de *C. jejuni* neste trabalho foi de 87,50% nas coxas e 50% nas sobrecoxas. Altos índices de isolamento podem estar relacionada com a proximidade destes cortes com a abertura da cavidade celomática, proporcionando maior contaminação cruzada. A pendura das aves pelas coxas e gotejamento de líquidos através da carcaça também pode explicar a ocorrência alta nos cortes das asas. Entretanto, esforços devem ser somados para evitar que haja menor número possível de lotes positivos durante o abate, já que independente da forma de comercialização de produtos avícolas, a cadeia de frio que

auxilia na redução da contaminação não é suficiente para reduzir o número de *Campylobacter* a números seguros (Sampers *et al.*, 2010).

A incidência de *Campylobacter* em produtos avícolas varia de 0 a 100%, entretanto, a capacidade de cada isolado causar efeito patogênico em seres humanos difere entre eles. A presença de alguns fatores intrínsecos e extrínsecos que envolvem o desenvolvimento de diarreia, febre e outros processos inflamatórios nos animais e nos seres humanos são cruciais para a infecção por *Campylobacter* (Van Vliet & Ketley, 2001; Zhang *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010a). A motilidade mediada por flagelo, à secreção de proteínas não flagelares que modulam a virulência, a capacidade de aderência na mucosa intestinal, invasão e produção de toxinas são distintas entre os isolados, e caracteriza a patogenicidade de cada cepa como dependente de uma gama de fatores (Fauchere, 1986; Guerry, 2007; Gomzáles-Hein *et al.*, 2013). Quando é avaliado somente o gene *flaA*, 74,2% das amostras foram positivas, porém ao avaliar a presença do *flaA* e de todos genes do cluster CDT, 71,43% foram positivas e podem caracterizar maior virulência.

A motilidade que é mediada pelo flagelo é reconhecida como crucial para a patogênese (Guerry *et al.*, 2007), devido sua requisição para a colonização do intestino (Van Vliet & Ketley, 2001). Este processo invasivo é agravado pelo processo inflamatório causado durante o processo de colonização, seguido da lesão do epitélio intestinal causada pela produção de citotoxinas e responsável por diarreia e febre. As diferentes condições intestinais que são requeridas para o *Campylobacter* encontrar um nicho adequado para aderir, colonizar e penetrar nas células intestinais também é corregulada por fatores flagelares. Utilizando *microarrays*, Carrillo *et al.*, 2004, demonstraram através da análise de dois isolados propriedades que regulam genes de virulência e motilidade. Entre estes genes, existem alguns não flagelares regulados por dois fatores sigmas flagelares (σ_{54} ou σ_{28}), e a presença destes genes não flagelares podem interferir na virulência das cepas conforme a supressão ou não destes fatores sigmas.

É conhecido que o flagelo atua muito mais além do que somente na motilidade. Seu papel também é importante na aderência e formação inicial dos biofilmes de *Campylobacter* spp. (Misawa *et al.*, 2000; Sherlock *et al.*, 2005), porém a ausência ou a inativação genes flagelares - *fliA*, *flaA*, *flaB*, *flaG* - (Kalmokoff *et al.*, 2006) que estão envolvidos na expressão flagelar ou na expressão da adesão pelo *flaC* – operado pelo

σ^{28} (Carrillo *et al.*, 2004) não garante total inibição da formação do agregado celular. A inibição dos operons da motilidade no início pode ser observado, porém ressalta-se que expressão da motilidade é importante para a manutenção dos biofilmes maduros (Kalmokoff *et al.*, 2006).

Pesquisas de genes têm sido realizadas com intuito de elucidar as regras que envolvem o processo patogênico que é mediado pela presença da associação de genes de virulência. Estruturas da superfície das bactérias também interagem com o tecido e influenciam o *C. jejuni* em colonizar o trato gastrointestinal, desenvolver diarreia, febre e outros processos inflamatórios em animais e humanos (Fauchere *et al.*, 1986). Estas observações estão associados à presença de toxina citoletal distensiva induzida pela presença dos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*, principalmente em amostra de *Campylobacter jejuni* que possuem prevalência maior que 90% em trabalhos que abordam isolados humanos (Datta *et al.*, 2003; Rozynek *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2014).

Os resultados obtidos neste trabalho são próximos aos encontrados na literatura consultada, com frequências próximas a 100% para os três genes como pode ser observado no Gráfico 1. A relação entre a prevalência em isolados de humanos e produtos avícolas dão suporte para demonstrar a importância deste agente como causador de problemas decorrentes da infecção. Rozynek (*et al.*, 2005) já relacionava a alta frequência em isolados de *C. jejuni* de humanos, com 98,4, 97 e 98% para *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* e 100% dos três genes isolados de frangos. Da mesma forma Datta e colaboradores (2003) obtiveram 100% de frequência para os três genes a partir de amostras de origem humana, avícola e bovina. Jain *et al.*, (2008) já demonstraram em trabalhos realizados em camundongos que a presença dos três genes CDT são importantes para a virulência e possuem a capacidade de causar lesão no trato gastrointestinal. No mesmo trabalho, foi verificado que presença do *cdtB* em *C. jejuni* está associado a aderência, invasão e a toxicidade nas células Hela e o cólon é o principal local de desenvolvimento das lesões. A presença do *cdtA* e *cdtC* também possui papel importante na ligação e na internalização da célula hospedeira (AbuOun *et al.*, 2005) e para degradação do DNA celular pelo *cdtB*.

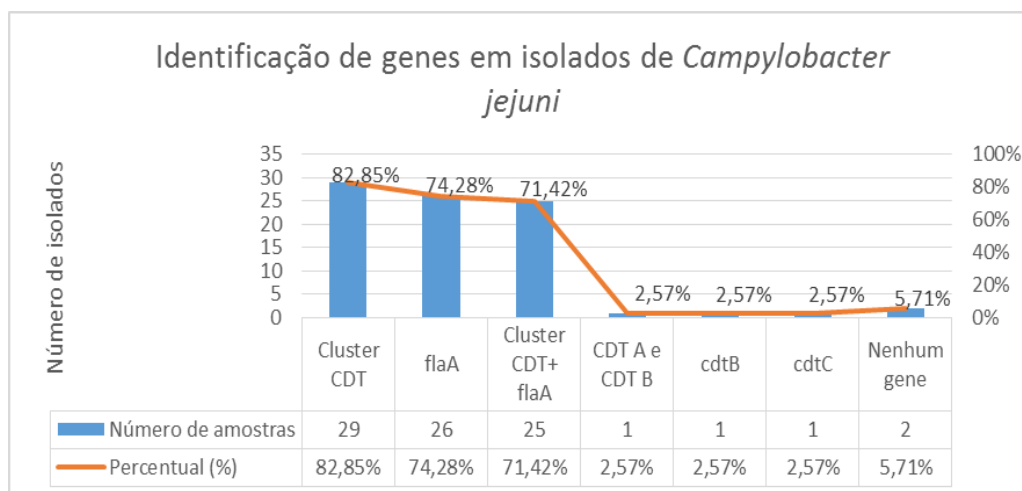


Gráfico 1 – Identificação de genes em isolados de *Campylobacter jejuni*.

A mutação, deleção ou inserção de nucleotídeos podem impedir a identificação dos genes ao serem processadas - CDT negativa (Asakura *et al.*, 2007), porém estas sequências não caracterizam as cepas como não propensas a causar lesões como já citado por Jain *et al.*, (2008). A identificação de *C. jejuni* com 100% dos três genes do cluster CDT também foi descrito por Zhang *et al* (2010a) em surto de Guillain Barré na China. Silva *et al.*, (2014) descreveram a identificação de 100% dos três genes dos isolados de fezes e de frangos, além da presença na única amostra isolada de humanos. A presença de gene *cdtB* também foi identificado 100% das amostras de bovinos, frangos e humanos analisadas por González-Hein *et al* (2013). No Japão Kabir *et al.*, (2011) relacionou humanos com gastroenterite causada por *Campylobacter jejuni* e identificou a presença dos três genes CDT nestes isolados.

Apesar da necessidade de intensificar trabalhos para melhor relacionar os genes que estão envolvidos na virulência da campilobacteriose com quadros clínicos e avaliações da situação epidemiológica, vários avanços sobre seu conhecimento já foram obtidos. A relação de infecções humanas causadas pelo consumo de produtos avícolas contaminados com estes genes, presença dos genes do *cluster* CDT e do *flaA*, além de outros genes são alguns dos fatores que são identificados como importantes no esclarecimento desta patogênese. Estudos que permitam comparar maior quantidade de genes de virulência de isolados de diferentes fontes – humanos, frangos e leite – e analisar o perfil genético contribuirá para elucidar melhor sua patogênese e virulência.

Referências

- Abuoun M, Manning G, Cawthraw SA, Ridley A, Ahmed IH, Wassenaar TM, Newell DG (2005) Cytolethal Distending Toxin (CDT)-Negative *Campylobacter jejuni* strains and anti-CDT neutralizing antibodies are induced during human infection but not during colonization in chickens. *Infect Immun* 73:3053-3062.
- Asakura M, Samosornsuk W, Taguchi M, Kobayashic K, Misawa N, Kusumoto M, Nishimura K, Matsuhisa A, Yamasaki S (2007) Comparative analysis of cytolethal distending toxin (*cdt*) genes among *Campylobacter jejuni*, *C. coli* and *C. fetus* strains. *Microbiol Path* 42:174-183.
- Backert S, Hofreuter D (2013) Molecular methods to investigate adhesion, transmigration, invasion and intracellular survival of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. *J Microbiol Meth* 95:8-23.
- Baré J, Uyttendaele M, Habib I, Depraetere O, Houf K, Zutter LD (2013) Variation in *Campylobacter* distribution on different sites of broiler carcasses. *Food Control* 32:279-282.
- Bily L, PETTON J, LALANDE F, ROUXEL S, DENIS M, CHEMALY M, SALVAT G, FRAVALO F (2010) Quantitative and Qualitative Evaluation of *Campylobacter* spp. Contamination of Turkey Cecal Contents and Carcasses during and following the Slaughtering Process. *J Food Prot* 73:1212–1218.
- Blaser MJ, Engber J (2008) Clinical aspects of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* infections In: Nachamkin I, Szymanski CM, Blaser M.J. *Campylobacter*. ASM Press, Washinton, D.C.
- Carrillo CD, Taboada E, Nash JHE, Lanthier P, Kelly J, Lau PC, Verhulp R, Mykytczuk O, Sy J, Findlay WA, Amoako K, Gomis S, Willson P, Austin JW, Potter A, Babiuk L, Allan B, Szymansk CM (2004) Genome-wide expression analyses of *Campylobacter jejuni* NCTC11168 reveals coordinate regulation of motility and virulence by *flhA*. *J Biol Chem* 279:20327–20338.
- CDC – Centers for Disease Control and Prevetion (2014) Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food — Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2006–2013. *Morb Mortal Wkly Rep* 63:328-332.

- Dasti JI, Tareen AM, Lugert R, Zautner AE, Grob U (2010) *Campylobacter jejuni*: a brief overview on pathogenicity – associated factors and disease-mediating mechanisms. *Int J Med Microbiol* 300:205-211.
- Datta S, Niwa H, Itoh K (2003) Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler and bovine faeces. *J Med Microbiol* 52:345-348.
- Denis M, Soumet C, Rivoal K, Ermel G, Blivet D, Salvat G, Colin P (1999) Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Lett Appl Microbiol* 29:406–410.
- EFSA - European Food Safety Authority (2014) The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA Journal* 12: 312 p.
- Ertas HB, Çetinkaya B, Muz A, Öngör H, (2004) Genotyping of broiler-originated *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates using fla typing and random amplified polymorphic DNA methods. *Int J Food Microbiol* 94:203–209.
- Fauchere JL, Rosenau A, Veron M, Moyen EN, Richard S, Pfister A (1986). Association with HeLa cells of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from human feces. *Infect Immun* 54:283-7.
- Fearnley C, Manning G, Bagnall M, Javed MA, Wassenaar TM, Newell DG (2008) Identification of hyperinvasive *Campylobacter jejuni* strains isolated from poultry and human clinical sources. *J Med Microbiol* 57:570–580.
- Fox JG, Rogers AB, Whary MT, Ge Z, Taylor NS, Xu S, Horwitz BH, Erdman SE (2004) Gastroenteritis in NF-B-Deficient Mice Is Produced with Wild-Type *Campylobacter jejuni* but Not with *C. jejuni* Lacking Cytolethal Distending Toxin despite Persistent Colonization with Both Strains. *Infect Immun* 72:1116–1125.
- Garin B, Gouali M, Wouafo M, Perchec AM, Zhu PM, Ravaonindrina N, Urbès F, Gay F, Diawara A, Leclercq A, Rocourt J, Pouillot R (2012) Prevalence, Quantification and Antimicrobial Resistance of *Campylobacter* spp. on Chicken Neck-Skins at Points of Slaughter in 5 Major Cities Located on 4 Continents. *Int J Food Microbio* 157:102-107.

- González-Hein G, Huaracán B, García P, Figueroa G (2013) Prevalence of virulence genes in strains of *Campylobacter jejuni* isolated from human, bovine and broiler. *Braz J Microbiol* 44:1223-1229.
- Guerry P, Ewing CP, Schirm M, Lorenzo M, Kelly J, Pattarini D, Majam G, Thibault P, Logan S (2006) Changes in flagellin glycosylation affect *Campylobacter* autoagglutination and virulence. *Mol Microbiol* 60:299–311.
- Guerry P (2007). *Campylobacter* flagella: not just for motility. *Trends Microbiol* 15:456–461.
- Gripp E, Hlahla D, Didelot X, Kops F, Maurischat S, Tedin K, Alter T, Ellerbroek L, Schreiber K, Schomburg D, Janssen T, Bartholomaeus P, Hofreuter D, Woltemate S, Uhr M, Brenneke B, Gruning P, Gerlach G, Wieler L, Suerbaum S, Josenhans C (2011) Closely related *Campylobacter jejuni* strains from different sources reveal a generalist rather than a specialist lifestyle. *BMC Genomics* 12:1-21.
- Jain D, Prasad KN, Sinha S, Husain N (2008) Differences in virulence attributes between cytolethal distending toxin positive and negative *Campylobacter jejuni* strains. *J Med Microbiol* 57:267–272.
- Johnson WM, Lior H (1988). A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Campylobacter* spp. *Microb Pathog* 4:115-126.
- Hue O, Allain V, Laisney MJ, Bouquin SL, Lalande F, Petetin I, Rouxel S, Quesne S, Gloaguen P, Picherot M, Santolini J, Bougeard S, Salvat G, Chemaly M (2011) *Campylobacter* contamination of broiler caeca and carcasses at the slaughterhouse and correlation with *Salmonella* contamination. *Food Microbiol* 28:862-868.
- Humphrey T, O'Brien S, Madsen M (2007). *Campylobacters* as zoonotic pathogens: a food production perspective. *Int J Food Microbiol* 117:237–257.
- International Standard. ISO 10272-1:2006 describes a horizontal method for the detection of *Campylobacter* spp. 2006
- Kalmokoff M, Lanthier P, Tremblay TL, Foss M, Lau PC, Sanders G, Austin J, Kelly J, Szymanski CM (2006) Proteomic Analysis of *Campylobacter jejuni* 11168 Biofilms Reveals a Role for the Motility Complex in Biofilm Formation. *J Bacteriol*, 188:4312–4320.

- Kuana SL, Santos LR, Rodrigues LB, Borsoi A, Moraes HL, Salle CT, Nascimento VP (2008) Occurrence and Characterization of *Campylobacter* in the Brazilian Production and Processing of Broilers. *Avian Disease* 88:680-684.
- McSweeney LA, Dreyfus LA (2004). Nuclear localization of the *Escherichia* colicytotoxic distending toxin CdtB subunit. *Cell Microbiol* 6:447-458.
- Misawa N, Blaser MJ (2000) Detection and characterization of autoagglutination activity by *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun* 68:6168-6175.
- Oyarzabal OA, Williams A, Zhou P, Samadpour M (2013) Improved protocol for isolation of *Campylobacter* spp. from retail broiler meat and use of pulsed field gel electrophoresis for the typing of isolates. *J Microbiol Methods* 95:76-83.
- Rivoal K, Denis M, Salvat G, Colin P, Ermel G (1999) Molecular characterization of the diversity of *Campylobacter* spp. Isolates collected from a poultry slaughterhouse: analysis of cross-contamination. *Letters Appl Microbiol* 29:370-374.
- Rozynek E, Dzierzanowska-Frangat K., Jozwiak P, Popowski J, Korsak D, Dzierzanowska D (2005) Prevalence of potential virulence markers in Polish *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates obtained from hospitalized children and from chicken carcasses. *J Med Microbiol* 54:615-619.
- Rosenquist H, Nielsen NL, Sommer HM, Nørrung B, Christensen BB (2003) Quantitative risk assessment of human campylobacteriosis associated with thermophilic *Campylobacter* species in chickens. *Int J Food Microbiol* 83:87-103.
- Sampers I, Habib I, Zutter LD, Dumoulin A, Uyttendaele M (2010) Survival of *Campylobacter* spp. in poultry meat preparations subjected to freezing, refrigeration, minor salt concentration, and heat treatment. *Int J Food Microbiol* 137:147-153.
- Silva J, Leite D, Fernandes M, Mena C, Gibbs PA, Teixeira P (2011) *Campylobacter* spp. as foodborne pathogen: a review. *Front Microbiol* 2:1-12.
- Silva DT, Tejada TS, Cunha CC, Lopes NA, Agostinetto A, Collares T, Leon PMM, Timm CD (2014) Ocorrência de *Campylobacter* em carne de frango, fezes de frango e humanas e pesquisa dos genes *cdt*. *Arq Bras Med Vet Zootec* 66:297-304.

- Sherlock O, Munk R, Klemm P (2005) The TibA adhesin/invasion from enterotoxigenic *Escherichia coli* is self-recognizing and induces bacterial aggregation and biofilm formation. *Infect Immun* 73:1954–1963
- Szymanski CM, King M, Haardt M, Armstrong GD (1995) *Campylobacter jejuni* motility and invasion of Caco-2 cells. *Infect Immun* 63:4295–4300.
- Van Vliet AH, Ketley JM (2001) Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. *J Appl Microbiol* 90:45S–56S.
- Van Putten JP, Van Alphen LB, Wosten MM, Zoete MR (2009) Molecular mechanisms of *Campylobacter*. *Curr Top Microbiol Immunol* 337:197–229.
- Wassenaar TM, Bleumink-Pluym NM, Van Der Zeijst BA (1991) Inactivation of *Campylobacter jejuni* flagellin genes by homologous recombination demonstrates that flaA but not flab is required for invasion. *EMBO J* 10:2055–2061.
- Whitehouse CA, Balbo PB, Pesci EC, Cottle DL, Mirabito PM, Pickett CL (1998) *Campylobacter jejuni* Cytolethal Distending Toxin Causes a G₂-Phase Cell Cycle Block. *Infect Immun* 66:1934–1940.
- Wieczorek K, Osek J (2008) Identification of virulence genes in *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolates by PCR. *Bull Vet Inst Pulawy* 52:211–216.
- Zhang M, He L, Li Q, Sun H, Gu Y, You Y, Meng F, Zhang J (2010) Genomic Characterization of the Guillain-Barre Syndrome-Associated *Campylobacter jejuni* ICDCCJ07001 Isolate. *PLoS ONE* 5: e15060.
- Zhang M, Li Q, He L, Meng F, Gu Y, Zheng M, Gong Y, Wang P, Ruan F, Zhou L, Wu J, Chen L, Fitzgerald C, Zhang J (2010a) Association Study Between an Outbreak of Guillain-Barre Syndrome in Jilin, China and Preceding *Campylobacter jejuni* Infection. *Foodborne Path Dis* 7:913–918.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A ocorrência de *Campylobacter jejuni* e *C. coli* foi alta nos lotes de frangos de corte avaliados no sul do Brasil.
- A lavagem das gaiolas de transporte de frangos não favoreceu a eliminação de *C. jejuni* e *c. coli*, o que demonstra a necessidade de reavaliação do sistema de lavagem e desinfecção para evitar a disseminação de *Campylobacter* spp.
- A avaliação qualitativa e quantitativa destas bactérias permitiu determinar que a depenagem e evisceração são importantes para aumentar a contaminação, com redução após a passagem das carcaças pelos chuveiros.
- O cultivo bacteriano pelo ensaio microbiológico permitiu identificar maior número de amostras positivas do que o *rtPCR*. Entretanto, o *rtPCR* foi mais sensível nas carcaça após a refrigeração por imersão comparado com o ensaio microbiológico.
- Existe uma correlação alta e positiva, significativa ao nível de significância de 1%, entre o suabe de cloaca com os estágios de processo: carcaça após a depenagem, depois da lavagem; carcaça após evisceração, antes da lavagem e carcaça após a lavagem final.
- Foi identificado que os estágios da depenagem antes da lavagem e após a evisceração antes da lavagem final como pontos críticos de controle na contaminação para *Campylobacter jejuni* e *C. coli*.
- Foi observado variação da ocorrência de carcaças refrigeradas positivas em 5 plantas frigoríficas. Estas diferenças podem ser atribuídas as diferentes condições sanitárias entre granjas e a qualidade das operações de abate.
- Foram identificadas maior ocorrência de *C. jejuni* e *C. coli* nos corte de coxa e nos de sobre coxa. Estes altos índices de isolamento podem estar relacionados com a proximidade do local de abertura dos frangos para realizar a evisceração.
- A identificação dos genes do *cluster* CDT e do *flaA* nos isolados destas amostras podem caracterizá-las como de maior virulência e permite caracterizar os genes envolvidos nas cepas circulantes.
- Devido a alta contaminação de carcaças e frangos de cortes, trabalho simultâneos que permitam reduzir a contaminação das carcaças após a

refrigeração, como a utilização de atmosfera modificada, pode permitir redução da contaminação.

REFERÊNCIAS

AGUNOS, A.; WADDELL, L.; LÉGER, D.; TABOADA, E. A Systematic Review Characterizing On-Farm Sources of *Campylobacter* spp. for Broiler Chickens. **PLoS ONE**. v. 9, n. 8, p.e104905, 2014.

AHMED, R.; LEÓN-VELARDE, C.G.; ODUMERU, J.A. Evaluation of novel agars for the enumeration of *Campylobacter* spp. in poultry retail samples. **Journal of Microbiological Methods**. v. 88, p. 304–310, 2012.

ALEMKA, A.; CLYNE, M.; SHANAHAN, F.; TOMPKINS, T.; CORCIONIVOSCHI, N.; BOURKE B. Probiotic Colonization of the Adherent Mucus Layer of HT29MTXE12 Cells Attenuates *Campylobacter jejuni*

ALEMKA, A.L.; CORCIONIVOSCHI, N.; BOURKE, B. Defense and adaptation: the complex inter-relationship between *Campylobacter jejuni* and mucus. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v. 2, n. 15, p. 1-6, 2012.

ALLEN, M.V.; BULL, S.A.; CORRY, J.E.L.; DOMINGUE, G.; JØRGENSEN, F.; FROST, J.A.; WHYTE R.; GONZALEZ, A.; ELVISS, N.; HUMPHREY, T.J. *Campylobacter* spp. contamination of chicken carcasses during processing in relation to flock colonisation. **International Journal of Food Microbiology**. v. 113, p. 54–61, 2007.

ANDRZEJEWSKA, M.; SZCZEPANSKA, B.; SPICA, D.; KLAWE, J.J. Trends in the occurrence and characteristics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from poultry meat in Northern Poland. **Food Control**. v. 51 p. 190 -194, 2015.

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.

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

BACKERT, S.; HOFREUTER, D. Molecular methods to investigate adhesion, transmigration, invasion and intracellular survival of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. *Journal of Microbiological Methods*. v. 95, p.8-23, 2013.

BAFFONI, L.; GAGGIÀ, F.; DI GIOIA, D.; SANTINI, C.; MOGNA, L.; BIAVATI, B. A Bifidobacterium-based synbiotic product to reduce the transmission of *C. jejuni* along the poultry food chain. *International Journal of Food Microbiology*. v. 157, p.156–161, 2012.

BASERISALEHU, M.; BAHADOR, N.; KAPADNIS, B.P. Effect of Heat and Food Preservatives on Survival of Thermophilic *Campylobacter* Isolates in Food Products. *Research Journal of Microbiology*. v.1, p. 512-519.

BERRANG, M.E.; NORTHCUTT, J.K.; CASON, J.A. Recovery of *Campylobacter* from Broiler Feces During Extended Storage of Transport Cages. *Poultry Science*. v. 83, p.1213–1217, 2004.

BERRANG, M.E.; WINDHAM, W.R.; MEINERSMANN, R.J. *Campylobacter*, *Salmonella*, and *Escherichia coli* on broiler carcasses subjected to a high pH scald and low pH postpick chlorine dip. *Poultry Science*. v.90, p.896–900, 2011.

BLACK, R.E.; LEVINE, M.M.; CLEMENTS, M.L.; HUGHES, T.P.; BLASER, M.J. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *Journal of Infectious Diseases*. v. 157 p.472-479, 1988.

BLASER, M.J.; ENGBERG, J. Clinical aspects of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* infection. . In: NACHAMKIN, I.; SZYMANSKI, C.M.; BLASÉ, M.J.; *Campylobacter*. ASM Press. 3 ed, 2008.

BLODGETT, R. Appendix 2 – Most Probable Number from serial dilutions. In: US Food and Drug Administration (FDA), **Bacteriological Analytical Online**. 2006.

Disponível em:

<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm109656.htm#authors> acessado em março de 2011.

BOLTON, F.J.; HUTCHINSON, D.N.; COATES, D. Blood-free selective medium for isolation of *Campylobacter jejuni* from feces. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 19, p. 169-171, 1984.

BOLTON, J. F & ROBERTSON, L. A selective medium for isolating *Campylobacter jejuni/coli*. **Jornal of Clinical Pathology**. v.35, p.462-467, 1982.

BOLTON, J.F.; & ROBERTSON, L. A selective medium for isolating *Campylobacter jejuni/coli*. **Journal of Clinical Pathology**. v. 35, p. 462-467, 1982.

BOUWKNEGT, M., GIESSEN, V.; DAM DEISZ, W.D.; HAVELAAR A.H.; NAGELKERKE, N.J.;HENKEN, A.M. Risk factors for the presence of *Campylobacter* spp. in Dutch broiler flocks. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 62, p.35–49, 2004.

BOYSEN, L.; VIGRE, H.; ROSENQUIST. Seasonal influence on the prevalence of thermotolerant *Campylobacter* in retail broiler meat in Denmark. **Food Microbiology**. v. 28, p. 1028e1032, 2011.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 70, de 06 de outubro de 2003. Institui o Programa de Redução de Patógenos, Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* sp em Carcaças de F Perus. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 de out. 2003.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria 210, de 10 de Novembro de 1998. Regulamento técnico de inspeção tecnológica e higiênico sanitária de carne de aves. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 de out. 2003. seção 1, p.9.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n°12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 de jan. 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Portaria n. 326, de 30 de julho de 1997. Aprova o Regulamento técnico “Condições Higiênico Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para estabelecimentos produtores/industrializadores de Alimentos”. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 01 ago. 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Portaria n. 46, de 10 de fevereiro de 1998. Institui o sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle: APPCC a ser implantado nas indústrias de produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 fev. 1998. Seção I.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Portaria n. 46, de 10 de fevereiro de 1998. Institui o sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle: APPCC a ser implantado nas indústrias de produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 fev. 1998. Seção I.

BURFOOT, D.; MULVEY, E.; JEWELL, K.; FOY, E.; HOWELL, M. Effect of electrolysed water on *Campylobacter* numbers on poultry carcasses under practical operating conditions at processing plants. **Food Control**. v.50, p.472-476, 2015.

BUSWELL, C.M.; HERLIHY, Y.M.; LAWRENCE, L.M.; MCGUIGGAN, J.T.M.; MARSH, P.D.; KEEVIL, C.W.; LEACH, S.A. Extended Survival and Persistence of *Campylobacter* spp. in Water and Aquatic Biofilms and Their Detection by Immunofluorescent-Antibody and -rRNA Staining. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 64, p. 733-741, 1998.

BUTZLER, J.P. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. **Clinical Microbiology and Infection**. v.10, p. 868-876, 2004.

BUTZLER, J.P.; DEKEYSER, P.; DETRAIN, M.; DEHAEN, F.; Related *Vibrio* in stools. **The Journal of Pediatrics**. v. 82 p. 493-495, 1973.

BYRD, J.; BAILEY, R.H.; WILLIS, R.; NISBET, D. 2007. Recovery *Campylobacter* from comercial broiler hatchery trayliners. **Poultry Science** v.86, p.26-29, 2007.

CALLICOTT, K.A.; FRÍÐRIKSDÓTTIR, V.; REIERSEN, J.; LOWMAN, R.; BISAILLON, J.R.; GUNNARSSON, E.; BERNDTSON, E.; HIETT, K.L.; NEEDLEMAN, D.S.; STERN, N.J. Lack of Evidence for Vertical Transmission of *Campylobacter* spp. in Chickens. **Applied And Environmental Microbiology**. v. 72, n. 9, p.5794-5794, 2006.

CAWTHRAW, S.; WASSENAAR, T.; AYLING, R.; NEWELL, D. Increased colonization potential of *Campylobacter jejuni* strain 81116 after passage through chickens and its implication on the rate of transmission within flocks. **Epidemiology and Infection**. v. 117, p. 213–215, 1996.

CAWTHRAW, S.A.; WASSENAAR, T.M.; AYLING, R.;NEWELL D.G. Increased colonization potential of *Campylobacter jejuni* strain 81116 after passage through chickens and it simplication on the rate of transmission within flocks. **Epidemiology & Infection**.v. 117, p. 213-215, 1996.

CDC - **Centers for Disease Control and Prevention**. Vital signs: incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food. Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 1996-2010, United States of America. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.60, n.22, p.749-775, 2011.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food — Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2006–2013. **Morbidity and Mortality Weekly Report**. v. 63, p. 328-332, 2014.

CHEN, X.; NAREN, G.M.; WU, C.M.; WANG, Y.; DAI, L.; XIA L.N.; LUO P.J.; ZHANG, Q.; SHEN, J.Z. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolates in broilers from China. **Veterinary Microbiology**. v. 144, p. 133-139, 2010.

CHENU, J.W.; PAVIC, A.; COX, J.M. A novel miniaturized most probable number method for the enumeration of *Campylobacter* spp. from poultry-associated matrices **Journal of Microbiological Methods**. v. 93, p. 12-13, 2013.

CONNERTON, P.L.; TIMMS A.R.; CONNERTON, I.F. *Campylobacter* bacteriophages and bacteriophage therapy. **Journal of Applied Microbiology**. v.111, p.255–265, 2011.

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

DASTI, J.I.; TAREEN, A.M.; LUGERT, R.; ZAUTNER, A.E.; GROB, U. *Campylobacter jejuni*: a brief overview on pathogenicity – associated factors and disease-mediating mechanisms. **International Journal of Medical Microbiology**. v. 300 p. 205-211, 2010.

DENIS, M.; SOUMET, C.; RIVOAL, K.; ERMEL, G.; BLIVET, D.; SALVAT, G.; COLIN, P. Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. **Letters in Applied Microbiology**. v. 29, p. 406–410, 1999.

DICKINS M.A.; FRANKLIN, S.; STEFANOVA R.; SCHUTZE G.E.; EISENACH, K.D.; WESLEY I. Diversity of *Campylobacter* isolates from retail poultry carcasses and from humans demonstrated by pulse-field gel electrophoresis. **Journal of food Protection**. v. 65, n.6, p.957-962, 2002.

- DING, W.; WANG, H.; GRIFFITHS, M.W. Probiotics down-regulate *flaA* sigma28 promoter in *Campylobacter jejuni*. **Journal of Food Protection**. v.68, p.2295–2300, 2005.
- DOMÍNGUEZ, C.; GÓMEZ, I.; ZUMALACÁRREGUI, J. Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in retail chicken meat in Spain. *International Journal Food Microbiology*. v. 72, n.1-2, p. 165-168, 2002.
- DOYLE, L.P.; The etiology of swine dysentery. **American Journal of Veterinary Research**. v.9, p.50-51, 1948.
- DUBRUYNE L., GEVERS D. & VANDAMME P. Taxonomy of the Family *Campylobacteraceae*. In: NACHAMKIN I. SZYMANSKI CM, BLASER M.J. *Campylobacter*. Washinton, D.C.: ASM Press, 2008, p. 3-25
- DUFFY, L.L.; BLACKALL, P.J.; COBBOLD, R.N.; FEGAN, N. Quantitative effects of in-line operations on *Campylobacter* and *Escherichia coli* through two Australian broiler processing plants. **International Journal of Food Microbiology**. v. 188, p.128–134, 2014.
- EFSA - European Food Safety Authority. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses in the EU, 2008, Part A: *Campylobacter* and *Salmonella* prevalence estimates. **The EFSA Journal**. v. 8, p. 1-99, 2010.
- EFSA - European Food Safety Authority. Scientific Opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. **The EFSA Journal**. v. 9, n. 4, p. 1-141, 2011.
- EFSA - European Food Safety Authority. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. **The EFSA Journal**. v. 12, n. 2, p. 1-314, 2014.

EVERS, E.G. Predicted quantitative effect of logistic slaughter on microbial prevalence. **Preventive Veterinary Medicine**. v.65, p.31-46, 2004.

FAUCHERE, J.L.; ROSENAU, A.; VERON, M.; MOYEN, E.N.; RICHARD, S.; PFISTER, A. Association with HeLa cells of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from human feces. **Infection and Immunity**. v. 54, p. 283-287, 1986.

FOX, J.G.; ROGERS, A.B.; WHARY, M.T.; GE, Z.; TAYLOR, N.S.; XU, S.; HORWITZ, B.H.; ERDMAN, S.E. Gastroenteritis in NF-B-Deficient Mice Is Produced with Wild-Type *Campylobacter jejuni* but Not with *C. jejuni* Lacking Cytolethal Distending Toxin despite Persistent Colonization with Both Strains. **Infection and Immunity**. v. 72, p. 1116–1125, 2004.

FSANZ - Food Standards Australia New Zealand (2010) Baseline survey on the prevalence and concentration of *Salmonella* and *Campylobacter* in chicken meat on farm and at primary processing.

<http://www.foodstandards.gov.au/publications/documents/Poultry%20survey%20rept%20March%202010.pdf>. Acessada: 09 01 2015.

GARÉNAUX, A.; JUGIAU, F.; RAMA, F.; DE JONGE, R.; DENIS, M.; FEDERIGHI, M.; RITZ, M. Survival of *Campylobacter jejuni* strains from different origins under oxidative stress conditions: effect of temperature. **Current Microbiology**. v.56, n.4, p. 293-297, 2008.

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

GIBBENS, J.C.; PASCOE, S.J.; EVANS, S.J.; DAVAIES, R.H.; SAYERS, A.R. A trial of biosecurity as a means to control *Campylobacter* infection of broiler chickens. **Preventive Veterinary Medicine**. v.48, p.85–99, 2001.

GIBBENS, J.C.; PASCOE, S.J.;EVANS, S.J.; DAVIES, R.H.; SAYERS A.R. A trial of biosecurity as a means to control *Campylobacter* infection of broiler chickens.

Preventive Veterinary Medicine. v. 48:85–99, 2001.

GLÜNDER, G.; NEUMANN, U.; BRAUNE, S. Occurrence of *Campylobacter* spp. in Young Gulls, Duration of *Campylobacter* Infection and Reinfection by Contact. *Zoonoses and Public Health.* v. 39, n.1-10, p. 119-122, 1992.

GRIPP, E.; HLAHLA, D.; DIDELOT, X.; KOPS, F.; MAURISCHAT, S.; TEDIN, K.; ALTER, T.; ELLERBROEK, L.; SCHREIBER, K.; SCHOMBURG, D.; JANSSEN, T.; BARTHOLOMAUS, P.; HOFREUTER, D.; WOLTEMATE, S.; UHR, M.; BRENNEKE, B.; GRUNING, P.; GERLACH, G.; WIELER, L.; SUERBAUM, S.; JOSENHANS, C. Closely related *Campylobacter jejuni* strains from different sources reveal a generalist rather than a specialist lifestyle. **BMC Genomics.** v. 12, p. 1-21, 2011.

GUERRY, P. *Campylobacter* flagella: not just for motility. **Trends Microbiology** v. 15, p. 456–461, 2007.

GURGAN, T.; DIKER, K.S. Abortion Associated with *Campylobacter upsaliensis*. **Journal of Clinical Microbiology.** v. 32, n. 12, p. 3093-3094, 1994.

HADDEN, R.D.M.; GREGSON, N.A. Guillain-Barré syndrome and *Campylobacter jejuni* infection. **Journal of Applied Microbiology.** v. 90, p.145S±154S, 2001.

HALD, B.; WEDDERKOPP, A.; MADSEN, M. Thermophilic *Campylobacter* spp. in Danish broiler production: A cross-sectional survey and a retrospective analysis of risk factors for occurrence in broiler flocks. **Avian Pathology.** v. 29, p. 123-131, 2000.

HANSSON, I.; EDEROTH, M.; ANDERSSON, L.; VAGSHOLM, I.; OLSSON, E.E. Transmission of *Campylobacter* spp. to chickens during transport to slaughter. **Journal of Applied Microbiology.** v. 99, p.1149–1157, 2005

HARUNA¹, M.; SASAKI¹, Y.; MURAKAMI¹, M.; IKEDA¹, A.; KUSUKAWA¹, M.; TSUJIYAMA¹, Y.; ITO¹, K.; ASAI, T.; YAMADA, Y. Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of *Campylobacter* in Broiler Flocks in Japan. **Zoonoses and Public Health**. v.59, p. 241–245, 2012.

HAVELAAR, A.H.; NAUTA, M.J.; MANGEN, M.-J.J.; KOEIJER, A.G.; BOGAARDT, M.J.; EVERS, E.G.; JACOBS-REITSMA, W.F.; PELT, W.V.; WAGENAAR, J.A.; WIT¹, G.A.; ZEE, H.V. Costs and benefits of controlling, *Campylobacter* in the Netherlands: Integrating risk analysis, epidemiology and economics, **RIVM - National Institute for Public Health and the Environment**.v. 53 p. 2005.

HIDALGO, I.J.; RAUB, T.J.; BORCHARDT, R.T. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. **Gastroenterology**. p.96, p. 736–749, 1989.

HOFFMANN, S.; BATZ, M.B.; MORRIS, J.G.Jr. Annual cost of illness and quality-adjusted life year losses in the United States due to 14 foodborne pathogens. **Journal of Food Protection**. v.75, n. 7, p.1292-302, 2012.

HONG, J.; JUNG,W.;KIM, J.M.; KIM, J.H.;KOO,H.V.; SER, J.; PARK, Y.O. Quantification and Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Raw Chicken Meats Using a Real-Time PCR Method. **Journal of Food Protection**. v. 70, n.9, p. 2015-2022, 2007.

HU, L.; TALL, B.D.; CURTIS, S.K.; KOPECKO, D.J. Enhanced Microscopic Definition of *Campylobacter jejuni* 81-176 Adherence to, Invasion of, Translocation across, and Exocytosis from Polarized Human Intestinal Caco-2 Cells. **Infection and Immunity**. V.79, n. 11, p. 5294-5304.

HUE, O.; ALLAIN, V.; LAISNEY, M.J.; LE BOUQUIN, S.; LALANDE, F.; PETETIN, I.; ROUXEL, S.; QUESNE, S.; GLOAGUEN, P.Y.; PICHEROT, M.; SANTOLINI, J.; BOUGEARD, S.; SALVAT, G.; CHEMALY, M. *Campylobacter*

contamination of broiler caeca and carcasses at the slaughterhouse and correlation with *Salmonella* contamination. **Food Microbiology**. v. 28, n. 5, p. 862-868, 2011.

HUE, O.; LE BOUQUIN, S.; LAISNEY, M.J.; ALLAIN, V.; LALANDE, F.; PETETIN, I.; ROUXEL, S.; QUESNE, S.; GLOAGUEN, P.Y.; PICHEROT, M.; SANTOLINI, J.; SALVAT, G.; BOUGEARD, S.; CHEMALY, M. Prevalence of and risk factors for *Campylobacter* spp. contamination of broiler chicken carcasses at the slaughterhouse. **Food Microbiology**. v. 27, n. 8, p.992-999, 2010.

HUGHES, R.A.C.; CORNBLATH, D.R. Guillain-Barré syndrome. **Lancet**. v. 366, p. 1653–1666, 2005.

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

HUNGARO, H.M.; MENDONÇA, R.C.S.; ROSA, V.O.; BADARO, A.C.L.; MOREIRA M.A.S; CHAVES, J.B.P. Low contamination of *Campylobacter* spp. on chicken carcasses in Minas Gerais state, Brazil: Molecular characterization and antimicrobial resistance **Food Control**. v. 51 p. 15-22, 2015.

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

INTERNATIONAL STANDARD. ORGAZINATION – ISO. ISO 10272-1:2006 describes a horizontal method for the detection of *Campylobacter* spp. **ISO**. 2006.

IZAT, A.L.; GARDNER, F.A.; DENTON, J.H.; GOLAN, F.A. Incidence and level of *Campylobacter jejuni* in broiler processing. **Poultry Science**. v. 67, p.1568–1572, 1988.

JAGALS, P.; GRABOW, W.O.K.; GRIESEL, M.; JAGALS, C. Evaluation of a selected membrane filtration and most probable number methods for enumeration of faecal

coliforms, *Escherichia coli* and enterococci in environmental waters. **Quantitative Microbiology**. v. 2, p. 129-140.

JANEŽ, N.; LOC-CARRILLO, C. Use of phages to control *Campylobacter* spp. **Journal of Microbiological Methods**. v. 95 p.68–75, 2013.

JASASS, F.M.B. 2008. Effectiveness of trisodium phosphate, lactic acid, and acetic acid in reduction of *E. coli* and microbial load on chicken surfaces. **African Journal of Microbiology Research**. v. 2, p. 50-55, 2008.

JENNINGS, J.L.; SAIT, L.C.; PERRETT, C.A.; FOSTER, C.; WILLIAMS, L.K.; HUMPHREY, T.J.; COGAN, T.A. *Campylobacter jejuni* is associated with, but not sufficient to cause vibriotic hepatitis in chickens. **Veterinary Microbiology**. v. 149, p. 193-199, 2011.

JOHNSON, W.M.; LIOR, H. A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Campylobacter* spp. **Microbial Pathogenesis**. v. 4, p.115-126, 1988.

KATSMA, W.E.; DE KOEIJER, A.A.; JACOBS-REITSMA, W.F.; MANGEN, M.J.; WAGENAAR, J.A. Assessing interventions to reduce the risk of *Campylobacter* prevalence in broilers. **Risk Analysis**. v. 27, p.863–876, 2007.

KELLY, D.J. The physiology and metabolism of *Campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori*. **Journal of Applied Microbiology**. v. 90, p. 16S±24S, 2001.

KIESS, A.S.; PARKER, H.M.; McDANIEL, C.D. Evaluation of different selective media and culturing techniques for the quantification of *Campylobacter* ssp. from broiler litter. **Poultry Science**. v. 89, p. 1755–1762, 2010.

KITCHIN, P.A.; SZOTYORI, Z.; FROMHOLE, C.; ALMOND, N. Avoidance of PCR false positives. **Nature**. v. 344, 1990.

KLEIN, B.S.; VERGERONT, J.N.; BLASER, M.J.; EDMONDS P.; BRENER, D.J.; JANSEEN, D.; DAVIS, J.P. *Campylobacter* infection associated with raw milk: an outbreak of gastroenteritis due to *Campylobacter jejuni* and thermotolerant *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*. **JAMA**. V. 255, P. 361-364, 1986.

KLEIN, G.; BECKMANN, L.; VOLLMER, H.M.; BARTELT, E. Predominant strains of thermophilic *Campylobacter* spp. in a german poultry slaughterhouse. **International Journal of Food Microbiology**. v. 117, p. 234-328, 2007.

KONKEL, M.E.; MONTEVILLE, M.R.; RIVERA-AMILL, V.; JOENS, L.A. The Pathogenesis of *Campylobacter jejuni*-Mediated Enteritis. **Current Issues in Intestinal Microbiology**. v. 2, v. 2, p. 55-71, 2001.

KUANA, S.L.; SANTOS, L.R.; RODRIGUES, L.B.; SALLE, C.T.P.S.; MORAES, H.L.S.; NASCIMENTO, V.P. Occurrence and Characterization of *Campylobacter* in the Brazilian Production and Processing of Broilers. **Avian Disease**. v.88, p.680-684, 2008.

LaGIER, M.J.; JOSEPHA, L.A.; PASSARETTIA, T.V.; MUSSERA, K.A.; CIRINO, N.M. A real-time multiplexed PCR assay for rapid detection and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **Molecular and Cellular Probes**. v.18, p. 275–282, 2004.

LAI-KING, N.G.; STILES, M. E.; TAYLOR, D. E. Comparison of basal media for culturing *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 21, n. 2, p. 226-230, 1985.

LAKE, R.J.; HORN, B.J.; DUNN, A.H.; PARRBLIS, R.; GREEN, F.T; MCNICKLE, D.C. Cost-Effectiveness of Interventions To Control *Campylobacter* in the New Zealand Poultry Meat Food Supply. **Journal of Food Protection**. n.7, p.1120-1299, 2013.

LASTOVICA, A.; ALLOS, B.M. Clinical significance of *Campylobacter* and related species other than *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. In: Nachamkin, I.; Szymanski, C.M.; Blaser, M.J. *Campylobacter*. ASM Press. 3 ed, 2008.

LEBLANC-MARIDOR, M.; BEAUDEAU, F.; SEEGER, H.; DENIS, M.; BELLOC, C. Rapid identification and quantification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* by real-time PCR in pure cultures and in complex samples. **MC Microbiology**. v. 11, p. 2011.

LEMO, A.; MORAIS, L.; FONTES, M.C.; PIRES, I.; VIEIRA-PINTO, M. *Campylobacter* spp. isolation from infected poultry livers with and without necrotic lesions. **Food Control**. v. 50, p. 236-242, 2015.

LINDBLAD, M.; HANSSON, I.; VAGSHOLM, I.; LINDQVIST, R. Postchill *Campylobacter* prevalence on broiler carcasses in relation to slaughter group colonization level and chilling system. **Journal Food Protection**. v. 69, p. 495-499, 2006.

LUND, M.; NORDENTOFT, S.; PEDERSE, K.; MADSEN, M. Detection of *Campylobacter* spp. in chicken fecal samples by Real Time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, p. 5125-5132, 2004.

MACCALLUM, A.J.; HARRIS, D.; HADDOCK, G.; EVEREST, P.H. *Campylobacter jejuni*-infected human epithelial cell lines vary in their ability to secrete interleukin-8 compared to in vitro-infected primary human intestinal tissue. **Microbiology**. v. 152, p. 3661-3665, 2006.

MAYR, A.M.; LICK, S.; BAUER, J.; THÄRIGEN, D.; BUSCH, U.; HUBER, I. Rapid detection and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter lari* in food, using multiplex real time PCR. **Journal Food Protection**. v. 73, p. 241-250, 2010.

McDOWELL, S.W.J; MENZIES, F.D.; MCBRIDE, S.H.; OZA, A.N.; MCKENNA, J.P.; GORDON, A.W.; NEILL, S.D. *Campylobacter* spp. in conventional broiler flocks in Northern Ireland: epidemiology and risk factors. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 84, p.261–276, 2008.

McSWEENEY, L.A.; DREYFUS, L.A.; Nuclear localization of the *Escherichia colicytolethal* distending toxin *CdtB* subunit. **Cellular Microbiology**. v. 6, p. 447–458, 2004.

MELERO, B.; COCOLIN, L.; RANTSIOU, K.; RANTSIOU, K.; JAIME, I.; ROVIRA, J. Comparison between conventional and qPCR methods for enumeration *Campylobacter jejuni* in a poultry processing plant. **Food Microbiology**. v. 28, p.1353-1358, 2011.

MIKI, M.; MAEKURA, R.; HIRAGA, T.; HIROTANI, A.; HASHIMOTO, H.; KITADA, S; MIKI, M.; YOSHIMURA, K.; NAKA, N.; MOTONE. M.; FUJIKAWA, T.; TAKASHIMA, S.; KITAZUME, R.; KANZAKI, H.; NAKATANI, S.; WATANUKI, H.; TAGUSARI, O.; KOBAYASHI, J.; ITO, M. Infective tricuspid valve endocarditis with pulmonary emboli caused by *Campylobacter fetus* after tooth extraction. **Internal Medicine**. v. 44, n.10, p.1055-1059, 2005.

MINET, B.G.; MEGRAUD, F. *Campylobacter hyointestinalis*: an Opportunistic Enteropathogen? **Journal of Clinical Microbiology**. v. 26, n.12, p. 2659-2660, 1988.

MORAN, L.; SCATES, P.; MADDEN, R.H. Prevalence of *Campylobacter* spp. in Raw Retail Poultry on Sale in Northern Ireland. **Journal of Food Protection**. v. 72, n.9, p. 1830-1835, 2009.

MORENO, B. **Higiene e inspección de carnes**. Espanha: Díaz de Santos, 2006.

MORISHITA, S.; FUJIWARA, H.; Murota, H.; Maeda, Y.; Horii, A.H.T.; Bloodstream infection caused by *Campylobacter lari*. **Infection and Chemotherapy**. v.19, p.333–337, 2013.

MORISHITA, T.Y.; AYE, P.P.; HARR, B.S.; COBB, C.W.; CLIFFORD, J.R.

Evaluation of an avian-specific probiotic to reduce the colonization and shedding of *Campylobacter jejuni* in broilers. **Avian Disease**. v.41, p. 850–855, 1997.

NAKAMURA, I.; OMORI, N.; UMEDA, A.; OHKUSU, K.; MATSUMOTO, T. First case report of fatal sepsis due to *Campylobacter upsaliensis*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 53, p. 713–715, 2015.

NEAL-MCKINNEY, J.M.; LU, X.; DUONG, T.; LARSON, C.L.; CALL, D.R.; SHAH, D.H.; KONKEL, E.M. Production of Organic Acids by Probiotic Lactobacilli Can Be Used to Reduce Pathogen Load in Poultry. **PLoS ONE**. v. 7, n. 9, p.e43928.

NEAL-McKINNEY, J.M.; SAMUELSON, D.R.; EUCKER, T.P.; NISSEN, M.S.; CRESPO, R.; KONKEL, M.E. Reducing *Campylobacter jejuni* Colonization of Poultry via Vaccination. **PLoS ONE**. v. 9, n.12. p.e114254, 2014.

NEWELL, D.G.; ELVERS, K.T.; DOPFER, D.; HANSSON, I.; JONES, P.; JAMES, S.; GITTINS, J.; STERN, N.J.; DAVIES, R.; CONNERTON, I.; PEARSON, D.; SALVAT, G.; ALLEN V.M. Biosecurity-Based Interventions and Strategies To Reduce *Campylobacter* spp. on Poultry Farms. **Applied And Environmental Microbiology**. v.77, n.24, p. 8605–8614, 2011.

NZPHSP - New Zealand Public Health Surveillance Report. 2014. March 2014: Covering October to December 2013. v. 12, 2014.

of the First Isolation of *Campylobacter* Species. **Clinical Infectious Diseases**. v.43, p.1213–1217, 2006.

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

OLIVER, J. 2005. The Viable but Nonculturable State in Bacteria. **The Journal of Microbiology**. v. 43, p. 93-100, 2005.

OYARZABAL, A.O. Reduction of *Campylobacter* spp. by Commercial Antimicrobials Applied during the Processing of Broiler Chickens: A Review from the United States Perspective. **Journal of Food Protection**. v. 68, n.8, p.1752–1760, 2005.

PAVIC, A.; GROVES, P.J.; BAILEY, G.; COX, J.M. A validated miniaturized MPN method, based on ISO 6579:2002, for the enumeration of Salmonella from poultry matrices. **Journal of Applied Microbiology**. v. 109, p. 25–34, 2010.

PEARSON, A.D.; GREENWOOD, M.; HEALING, T.D.; ROLLINS, D.; SHAHAMAT, M.; DONALDSON, J.; COLWELL, R.R. Colonization of broiler chickens by waterborne *Campylobacter jejuni*. **Applied and Environmental Microbiology**. v.59, p. 987–996, 1993.

PERDONCINI, G. **Prevalência de *Campylobacter jejuni* e *C. coli* em carcaças de aves após o pré-resfriamento por imersão**. 2012. 35 F. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) - Especialista em Produção, Tecnologia e Higiene de Produtos de Origem Animal.- Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2012.

PETERSEN, L.; NIELSEN, E.M.; ON, S.L. Serotype and genotype diversity and hatchery transmission of *Campylobacter jejuni* in comercial poultry flocks. **Veterinary Microbiology**. v. 82, p.141–154, 2001.

PEZZOTTI, G.; SERAFIN, A.; LUZZI, I.; MIONI, R.; MILAN, M.; PERIN, R. Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in animals and meat in northeastern Italy. **International Journal of Food Microbiology**. v.82, p.281-287, 2003.

POINTON, A.; SEXTON, M.; DOWSETT, P.; SAPUTRA, T.; KIERMEIER, A.; LORIMER, M.; HOLDS, G.; ARNOLD, G.; DAVOS, D.; COMBS, B.;

FABIANSOON, S.; RAVEN, G.; MCKENZIE, H.; CHAPMAN, A.; SUMNER, J.A. Baseline Survey of the Microbiological Quality of Chicken Portions and Carcasses at Retail in Two Australian States (2005 to 2006). **Journal of Food Protection**. v. 71, n. 6, p.1123-1134.

POLY, F.; EWING, C.; GOON, S.; HICKEY, T.E.; ROCKABRAND, D.; MAJAM, G.; LEE L.; PHAN J.; SAVARINO, N.J.; GUERRY, P. Heterogeneity of a *Campylobacter jejuni* protein that is secreted through the flagellar filament. **Infection and Immunity**. v.75, p. 3859–3867, 2007.

REICH, F.; ATANASSOVA, V.; KLEIN, G.; The effects of *Campylobacter* numbers in caeca on the contamination of broiler carcasses with *Campylobacter*. **International Journal Food Microbiology**. v.127, p.116 –120, 2008.

RIDLEY, A.M.; ALLEN, V.M.; SHARMA, M.; HARRIS, J.A.; NEWELL, D.G. Real-Time PCR Approach for Detection of Environmental Sources of *Campylobacter* Strains Colonizing Broiler Flocks. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 74, n. 8, p. 2492–2504 2008.

RINGOIR, D. D.; KOROLIK. Colonisation phenotype and colonization differences in *Campylobacter jejuni* strains in chickens before and after passage in vivo. **Veterinary Microbiology**. v. 92, p.225–235, 2002.

RIVERA-PÉREZ, W.; BARQUERO-CALVO, E.; ZAMORA-SANABRIA, R. *Salmonella* contamination risk points in broiler carcasses during slaughter line processing. **Journal Food Protection**. v.77, n. 12, p.2031-2034, 2014.

RUIZ-PALACIOS,G.M.; ESCAMILLA, E.; TORRES, N. Experimental *Campylobacter* Diarrhea in Chickens. **Infection and Immunity**. v. 34, n.1, p. 250-255, 1981.

SAHIN, O.; LUO, N.; HUANG, S.; ZHANG, Q. Effect of *Campylobacter*-Specific Maternal Antibodies on *Campylobacter jejuni* Colonization in Young Chickens. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 69, p. 5372–5379, 2003.

SAHIN, O.; ZHANG, Q.; MEITZLER, J.C.; HARR, B.S.; MORISHITA, T.Y.; MOHAN.R. Prevalence, antigenic specificity, and bactericidal activity of poultry anti-*Campylobacter* maternal antibodies. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 67 p. 3951–3957, 2001.

SAILS, A.D.; FOX, A.J.; BOLTON, F.J.; WAREING D.R.; GREENWAY, D.L. A real-time PCR assay for the detection of *Campylobacter jejuni* in foods after enrichment culture. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 69, p.1383–1390, 2003.

SALLAM, K.I. Prevalence of *Campylobacter* in chicken and chicken by-products
SANYAL, S.C.; ISLAM, K.M.N; NEOGY, P.K.B.; ISLAM, M.; SPEELMAN, P.; HUQ, M.I. *Campylobacter jejuni* Diarrhea Model in Infant Chickens. **Infection and Immunity**. v. 43, n.3, p. 931-936, 1984.

SASAKI, Y.;TSUJIYAMA, Y.;TANAKA, H.; YOSHIDA, S.; GOSHIMA, T.; OSHIMA, K. KATAYAMA S.;YAMADA, Y. Risk Factors for *Campylobacter* Colonization in Broiler Flocks in Japan. **Zoonoses and Public Health**. v. 58, p. 350–356, 2011.

SAXENA, M.; JOHNB, B.; MUB, M.; VANB, T.T.H.; TAKIB, A.; COLOEB, P.J.; SMOOKERB, P.M. .Strategies to reduce *Campylobacter* colonisation in chickens. **Procedia in Vaccinology**. v. 7, p.40 – 43, 2013.

SCHERER, K.; BARTELT, E.; SOMMERFELD, C.; HILDEBRANDT, G. Comparison of different sampling techniques and enumeration methods for the isolation and quantification of *Campylobacter* spp. in raw retail chicken legs. **International Journal of Food Microbiology**. v.108, p. 115-119, 2006.

SCHROEDER, M.W.; EIFERT, J.D.; PONDER, M.A.; SCHMALE, D.G. *Campylobacter* spp. levels between chicken grow-out environmental samples and processed carcasses. **Poultry Science**.v. 93, n.3, p.734-741, 2014.

SELIWIORSTOW, T.; BARÉ, J.; DAMME, I.V.; UYTTENDAELE, M.; ZUTTER, L.D. *Campylobacter* carcass contamination throughout the slaughter process of *Campylobacter*-positive broiler batches. **International Journal of Food Microbiology**. v. 194, p.25–31, 2015.

SHANKER, s.; lee, a.; sorrel, t.c. *Campylobacter jejuni* in broilers: the role of vertical transmission. **The Journal of Hygiene**. v. 96, p. 153-159, 1986.

SKIRROW M.B. *Campylobacter enteritis*: a "new" disease. 1977. **British Medical Journal**. v.2, p.9-11, 1977.

SKIRROW, M.B. *Campylobacter enteritis*: a "new" disease. **British Medical Journal**. v.2, p.9-11, 1977.

Skirrow, M.B. *Campylobacter* Enteritis: a “new” disease. **British Medical Journal**. n. 1p. 9-11, 1977.

SKIRROW, M.B.; JONES, D.M.; SUTCLIFFE, E.; BENJAMIN, J. *Campylobacter* bacteremia in England and Wales, 1981-1991. **Epidemiology & Infection**. v. 110, p. 567-573, 1993.

SMITH, C.K.; ABUOUN, M.; CAWTHRAW, S.A.; HUMPHREY, T.J.; KAISER, L.T.P.; BARROW, P.A.; JONES, M.A. *Campylobacter* colonization of the chicken induces a proinflammatory response in mucosal tissues. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v. 54, p. 114–121, 2008.

SMITH, C.K.; KAISER, P.; ROTHWELL, L.; HUMPHREY, T.; BARROW, P.A.; JONES, M.A. *Campylobacter*-induced cytokine responses in avian cells. **Infection and Immunity**. v. 73, p. 2094–2100, 2005.

SMITH, T. & TAYLOR, M.S. Some morphological and biological characters of the spirilla (*Vibrio fetus*, n. sp.) associated with disease of the fetal membranes in cattle. **The Journal of Experimental Medicine**. v. xxviii, p. 299 – 312, 1919

SMITH, T., & ORCUTT M. Vibrios from calves and their serological relation to *Vibrio fetus*. **The Journal of Experimental Medicine**. v.45, 9.397-397, 1927.

SNELLING, W.J.; MATSUDA, M.; MOORE, J.E. Under the microscope *Campylobacter jejuni*. **Applied Microbiology**. v.41, 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, p. 16-22, 2007.

STEELE, T.W.; OWEN, R.J. *Campylobacter jejuni* subsp. *doylei* subsp. nov., a subspecies of nitrate-negative *Campylobacters* isolated from human clinical specimens. **International journal of systematic bacteriology**. v.38, p.316-318, 1988.

STEPHENS, C.P.; ON, S.L.W.; GIBSON, J.A. An outbreak of infectious hepatitis in commercially reared ostriches associated with *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*. **Veterinary Microbiology**. v. 61 p. 183-190, 1998.

STERN, N.J.; KOTULA, A.W. Survival of *Campylobacter jejuni* inoculated into ground beef. **Applied and Environmental Microbiology**. v.44, p. 1150-1153, 1982.

SWANENBURG, M.; VAN DER WOLF, P.J.; URLINGS, H.A.; SNIJDERS, J.M.; VAN KNAPEN, F. Salmonella in slaughter pigs: the effect of logistic slaughter procedures of pigs on the prevalence of Salmonella in pork. **International Journal Food of Microbiology**. v. 70, n. 3, p.231-42, 2001.

SZYMANSKI, C.M.; KING, M.; HAARDT, M.; ARMSTRONG, G.D. *Campylobacter jejuni* motility and invasion of Caco-2 cells. **Infection and Immunity**. v. 63, p. 4295–4300, 1995.

TAKAHASHI, R.; SHAHADA, F.; CHUMA, T.; OKAMOTO, K. Analysis of *Campylobacter* spp. contamination in broilers from the farm to the final meat cuts by

using restriction fragment length polymorphism of the polymerase chain reaction products. **International Journal of Food Microbiology**. v.110, p. 240-245, 2006.

TEENER, J.W. Miller Fisher's syndrome. **Seminar in Neurological**. v. 32, n. 5, p. 512-516, 2012.

TURANTAŞ, F.; KILIÇ, G.B.; KILIÇ, B. Ultrasound in the meat industry: General applications and decontamination efficiency. **International Journal of Food Microbiology**. v. 198, 59–69, 2015.

USDA - Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service. **Federal Register**. v. 76, n. 54, 2011.

USDA – United States Department of Agriculture. **Guidebook for the Preparation of HACCP Plans**. 1999, 91p.

USDA - United States Department of Agriculture. **MLG 41.03 - Isolation and Identification of *Campylobacter jejuni/coli/lari* from Poultry Rinse, Sponge and Raw Product Samples**. 2014

VANDAMME, P. & De LEY J. Proposal for a New Family, *Campylobacteraceae*. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v.41, p.451-455, 1991.

VÉRON, C & CHATELAIN R. Taxonomic Study of the Genus *Campylobacter* Sebald and Vcron and Designation of the Neotype Strain for the Type Species, *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and Vkon. **International Journal Of Systematic Bacteriology**. v.23, p.122-134, 1973.

WASSENAAR, T.M.; BLEUMINK-PLUYM, N.M.; VAN DER ZEIJST, B.A. Inactivation of *Campylobacter jejuni* flagellin genes by homologous recombination demonstrates that *flaA* but not *flab* is required for invasion. **EMBO Journal**. v. 10, p.2055–2061, 1991.

WHITEHOUSE, C.A.; BALBO, P.B.; PESCI, E.C.; COTTLE, D.L.; MIRABITO, P.M.; PICKETT, C.L. *Campylobacter jejuni* Cytolethal Distending Toxin Causes a G₂-Phase Cell Cycle Block. **Infection and Immunity**. v. 66, p. 1934–1940, 1998.

WHITING, R.C.; BUCHANAN, R.L. Development of a quantitative risk assessment model for *Salmonella* Enteritidis in pasteurized liquid eggs. **International Journal of Food Microbiology**. v.36, p.111-125, 1997.

WHO - World Health Organization. Food safety and foodborne illness. 2007.
Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/>>. Acesso em: agosto de 2011.

WIECZOREK, K.; SZEWCZYK, R.; OSEK, J. Prevalence, antimicrobial resistance, and molecular characterization of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolated from retail raw meat in Poland. **Veterinarni Medicina**. v. 57, n. 6, p. 293-299, 2012.

WILLIAMS, A.; OYARZABAL, O.A. Prevalence of *Campylobacter* spp. in skinless, WILSON, D.L.; ABNER, S.R.; NEWMAN, T.C.; MANSFIELD, L.S.; LINZ, J.E. Identification of ciprofloxacin-resistant *Campylobacter jejuni* by use of a fluorogenic PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 38, p. 3971–3978, 2000.

WINER, J.B.; HUGHES, R.A.C.; ANDERSON, M.J.; JONES, D.M.; KANGRO, H.; WATKINS, R.F.P. A prospective study of acute idiopathic neuropathy. II. Antecedent events. **Journal Neurol Neurosurg Psychiatry**. v.51, p.613–618, 1988.

ZENDEHBAD, B.; KHAYATZADEH, J.; ALIPOUR, A. Prevalence, seasonality and antibiotic susceptibility of *Campylobacter* spp. isolates of retail broiler meat in Iran. **Food control**. v. 53, p.41-45, 2015.

ZHAO, T.; DOYLE, M.P. Reduction of *Campylobacter jejuni* on chicken wings by chemical treatments. **Journal of Food Protection**. v.69, p. 762–767, 2006.

ZORMAN, T.; MOZINA, S.S. Thermotolerant *Campylobacters* in Poultry Meat, **Food Technology and Biotechnology**. v.40, n. 3, p. 177–184, 2002.

APÊNDICE A

Fotos dos pontos de coleta do capítulo III - Identificação e quantificação de *Campylobacter* no processamento de frango de corte no sul do Brasil



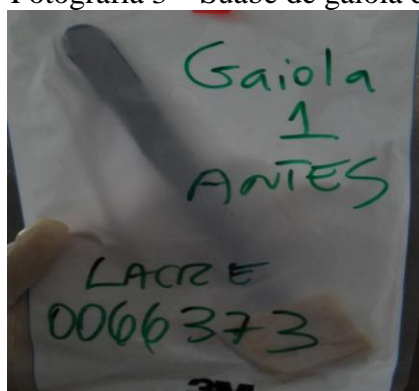
Fotografia 1- Caixa de transporte de frangos de corte.



Fotografia 2 – Suabe de cloaca.



Fotografia 3 – Suabe de gaiola de transporte.



Fotografia 4 – Identificação suabe de gaiola.



Fotografia 5 – Frangos antes da escaldagem.



Fotografia 6 – Frangos antes da depenagem.



Fotografia 7 – Frangos após a depegagem antes da lavagem.



Fotografia 8 - Frangos após a depenagem, após a lavagem.



Fotografia 9 – Armazenagem e identificação de amostras.



Fotografia 10 – Carcaça após a evisceração, antes da lavagem.



Fotografia 11 – Carcaça após a lavagem final.



Fotografia 12 – Água do pré-chiller.



Fotografia 13 – Água de abastecimento do *chiller*



Fotografia 14 – Água do *chiller*.



Fotografia 15 – Carcaça após a refrigeração no *chiller*.