

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOEXPERIMENTAÇÃO**

**DETECÇÃO DE *Campylobacter* spp. EM AMOSTRAS DE
ABATEDOUROS AVÍCOLAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Isabel Cristina Cisco

**Passo Fundo, RS, Brasil
2015**

**DETECÇÃO DE *Campylobacter* spp. EM AMOSTRAS DE ABATEDOUROS
AVÍCOLAS**

Isabel Cristina Cisco

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Área de Concentração em Bioexperimentação, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo (UPF), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestra em Bioexperimentação**

Orientador: Profa. Luciana Ruschel dos Santos

**Passo Fundo, RS, Brasil
2015**

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOEXPERIMENTAÇÃO**

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**DETECÇÃO DE *Campylobacter* spp. EM AMOSTRAS DE ABATEDOUROS
AVÍCOLAS**

Elaborada por
Isabel Cristina Cisco

Como requisito parcial para obtenção de grau de
Mestra em Bioexperimentação

Comissão examinadora

**Luciana Ruschel dos Santos, Dra, UPF
(Orientador/Presidente)**

Laura Beatriz Rodrigues, Dra, UPF

Kelly Cristina Tagliari de Brito, PhD, Fepagro

**Passo Fundo, RS, Brasil
2015**

CIP – Catalogação na Publicação

- C579d Cisco, Isabel Cristina
Detecção de *Campylobacter* spp. em amostras de
abatedouros avícolas / Isabel Cristina Cisco. – 2015.
54 f., il. ; 30 cm.
- Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luciana Ruschel dos Santos.
Dissertação (Mestrado em Bioexperimentação) –
Universidade de Passo Fundo, 2015.
1. Alimentos – Contaminação. 2. Frango de corte –
Abate. 3. Contaminação microbiana. I. Santos, Luciana
Ruschel dos, orientadora. II. Título.

CDU: 637.5.03

Catalogação: Bibliotecária Schirlei T. da Silva Vaz - CRB 10/1364

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus, pela capacidade e força para superar as dificuldades, pelas bênçãos recebidas ao longo dos últimos anos e por ter colocado em minha vida pessoas tão especiais.

À Profa. Dra. Luciana Ruschel dos Santos, pela valiosa orientação e por partilhar seu vasto conhecimento. Obrigada pelo carinho, apoio, dedicação e confiança durante estes dois anos.

À Profa. Dra. Laura Beatriz Rodrigues, por acreditar no meu potencial e me incentivar a cursar a pós-graduação, obrigada pelos ensinamentos e carinho.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Bioexperimentação da UPF, pelos ensinamentos transmitidos.

Ao meu amado Fabricio, meu porto seguro, por acreditar e partilhar dos meus sonhos. Obrigada pelo seu amor, paciência e companheirismo.

Aos meus amados e queridos pais, Anita e Genésio, e aos pais de coração, Carmelita e Agenor pelo carinho, incentivo e compreensão nos momentos de ausência.

Aos meus irmãos Cristiane e André, pelo incentivo e por torcerem sempre pelo meu sucesso pessoal e profissional.

Às colegas Eduarda, pela força nos momentos de sufoco, Raíssa, pelo auxílio de todas as horas e pelos ensinamentos e, principalmente, à Denise, meu braço direito, obrigada pela dedicação, parceria e auxílio ao longo de todo o projeto.

Aos colegas da UFRGS, principalmente ao Gustavo, pelos ensinamentos, à Sara e à Mariana. Muito obrigada por todo auxílio prestado.

Aos colegas e amigos do Centro de Pesquisa em Alimentação da UPF, pelo carinho e incentivo.

Aos meus amigos que estão por perto, e aos que estão longe, mas que estão guardados no coração, obrigada pela amizade, carinho, incentivo.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que eu pudesse concluir este trabalho tão importante. Muito obrigada.

EPÍGRAFE

“A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente, antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos”.

Charles Chaplin

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1 BACTÉRIAS DO GÊNERO <i>Campylobacter</i>	14
2.2 CAMPILOBACTERIOSE EM HUMANOS.....	15
2.3 <i>Campylobacter</i> spp. NA TECNOLOGIA DE ABATE DE FRANGOS DE CORTE....	16
2.4 MICROBIOLOGIA CONVENCIONAL	17
2.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	19
3. EXPERIMENTOS REALIZADOS.....	22
3.1 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1.1 Desempenho dos meios de cultura.....	22
3.1.2 Locais de coleta e amostragem	22
3.1.3 Pesquisa de <i>Campylobacter</i> spp. por microbiologia convencional.....	23
3.1.4 Identificação de <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> por <i>Multiplex</i>-PCR.....	23
3.1.5 Detecção de <i>Campylobacter</i> termotolerantes por PCR em tempo real	24
3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
3.2.1 Pesquisa de <i>Campylobacter</i> spp. por microbiologia convencional e identificação de <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> por <i>Multiplex</i>-PCR.....	25
3.2.2 Detecção de <i>Campylobacter</i> termotolerantes por PCR em tempo real	28
4. CAPÍTULO 1 Selectivity and productivity of culture media for isolation of <i>Campylobacter</i> spp.....	30
Abstract.....	31
1. INTRODUCTION	31
2. MATERIAL AND METHODS.....	32
2.1 Enumeration of target microorganisms.....	32
2.2 Enumeration of interfering microorganisms	33
2.3 Productivity and Selectivity of Bolton broth	33
2.4 Productivity and Selectivity of mCCDA	33

2.5 Artificially enriched samples	34
3. RESULTS AND DISCUSSION	34
ACKNOWLEDGMENTS	35
REFERENCES	35
5. CAPÍTULO 2 <i>Campylobacter jejuni</i> e <i>Campylobacter coli</i> em carcaças de frango resfriadas e congeladas coletadas em abatedouros avícolas	37
RESUMO	38
ABSTRACT	38
1. INTRODUÇÃO	39
2. MATERIAL E MÉTODOS	39
2.1 Amostragem e locais de coleta	40
2.2 Microbiologia convencional para identificação de <i>Campylobacter</i> spp.....	40
2.3 Extração de DNA e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).....	41
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4. CONCLUSÃO	44
AGRADECIMENTO	44
REFERÊNCIAS	44
6. CONCLUSÕES	48
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
8. REFERÊNCIAS	50

LISTA DE TABELAS**3.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

TABELA 1. Detecção de *Campylobacter* spp. e identificação de *C. coli* e *C. jejuni* por Multiplex-PCR em amostras oriundas de abatedouros avícolas..... 27

TABELA 2. *Campylobacter jejuni*, *C. coli* e *C. lari* identificados por PCR em tempo real em amostras oriundas de abatedouros avícolas..... 29

5. CAPÍTULO 2

TABELA 1. Ocorrência de *Campylobacter jejuni* e/ou *C. coli* em carcaças de frango resfriadas e congeladas coletadas em abatedouros avícolas..... 42

LISTA DE ABREVIATURAS

ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
APT	Água peptonada tamponada
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
<i>C. coli</i>	<i>Campylobacter coli</i>
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
<i>C. lari</i>	<i>Campylobacter lari</i>
CSM	<i>Charcoal-Based Selective Medium</i>
CT	<i>Cycle Threshold</i>
DNA	Ácido dextrorribonucleico
DTAs	Doenças transmitidas por alimentos
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EUA	<i>Estados Unidos da América</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GBS	Guillain-Barré Syndrome
ISSO	<i>International Organization for Standardization</i>
mCCDA	<i>Modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
pH	Potencial Hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
TSA	Ágar Trypticase de Soja
UFC	Unidades formadoras de colônia
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UPF	Universidade de Passo Fundo
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
VBNC	<i>Viable but non-culturable cells</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

RESUMO

**Dissertação de Mestrado
Programa de Pós Graduação em Bioexperimentação
Universidade de Passo Fundo**

DETECÇÃO DE *Campylobacter* spp. EM AMOSTRAS DE ABATEDOUROS AVÍCOLAS

Autor: Isabel Cristina Cisco
Orientador: Luciana Ruschel dos Santos
Passo Fundo, 31 de Julho de 2015

A campilobacteriose é uma zoonose emergente de origem alimentar causada por bactérias do gênero *Campylobacter* spp. onde *C. jejuni* e *C. coli* são as principais espécies envolvidas em surtos, e as aves e produtos avícolas relatados como fontes primárias de transmissão da doença. As dificuldades para isolamento e quantificação de *Campylobacter* por microbiologia convencional incentivaram a aplicação de técnicas moleculares de diagnóstico, como os métodos de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que vêm sendo utilizados em estudos epidemiológicos com resultados rápidos e precisos. Os objetivos deste trabalho foram verificar a contaminação por *Campylobacter* spp. em lotes de frangos de corte, desde a chegada aos abatedouros até os produtos finais, pelos métodos de microbiologia convencional, multiplex-PCR e PCR em tempo real para identificação de *Campylobacter jejuni*, *C. coli* e *C. lari*. Foram avaliados três abatedouros na região norte do Estado do Rio Grande do Sul, realizando duas coletas em cada um deles. As amostras foram coletadas, com três repetições, em seis diferentes pontos: recepção das aves (*swabs* de cloaca e esponjas de superfície de gaiolas de transporte, antes e após a higienização); carcaças após resfriamento em *chiller*; carcaças resfriadas a 4°C; e carcaças congeladas a -12°C; totalizando 108 amostras. Os resultados demonstraram a presença de *Campylobacter* spp. em todos os pontos amostrados, pelos dois métodos de detecção. A contaminação por espécies termofílicas (*Campylobacter jejuni* e *C. coli*) em produtos prontos para consumo humano, como carcaças resfriadas e congeladas, constitui preocupação para a saúde pública, uma vez que estes produtos cozidos inadequadamente ou agentes de contaminação cruzada são potencialmente capazes de causar doenças transmitidas por alimentos.

Palavras chaves: *Campylobacter*, frangos de corte, microbiologia convencional, reação em cadeia da polimerase, PCR em tempo real.

ABSTRACT

**Master's Dissertation
Programa de Pós Graduação em Bioexperimentação
Universidade de Passo Fundo**

**DETECÇÃO DE *Campylobacter* spp. EM AMOSTRAS DE ABATEDOUROS
AVÍCOLAS**

Author: Isabel Cristina Cisco
Advisor: Luciana Ruschel dos Santos
Passo Fundo, 31 de Julho de 2015

Campylobacteriosis is an emerging foodborne zoonotic disease caused by bacteria of the genus *Campylobacter* spp. where *C. jejuni* and *C. coli* are the major species involved in eating disorders and poultry and poultry products reported as primary sources of disease transmission. The difficulties for isolation and quantification of *Campylobacter* for conventional microbiology encouraged the application of molecular diagnostic techniques, such as the methods of polymerase chain reaction (PCR), which have been used in epidemiological studies with fast and accurate results. The aims of this work were to verify the contamination by *Campylobacter* spp. in broiler batches, from arrival to slaughterhouses until the final products, by conventional methods of microbiology, multiplex-PCR and real-time PCR for identification of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *C. lari*. Three inspected slaughterhouses in northern of Rio Grande do Sul, carrying out two collections in each of them. The samples were collected with three replications, in six points: reception of live birds (cloacal swabs and sponges surface transport cages before and after sanitation); carcass after chilling, refrigerated at 4°C and frozen -12°C, totaling 108 samples. The results demonstrated the presence of *Campylobacter* spp. in all sampled points, the two detection methods. Thermophilic species contamination (*Campylobacter jejuni* and *C. coli*) in products for human consumption, such as cooled and frozen carcasses, is concern for public health, since these products cooked inappropriately or agents of cross-contamination are potentially capable of causing food-borne illness.

Key words: *Campylobacter*, chicken meat, conventional microbiology, polymerase chain reaction, multiplex-PCR, real-time PCR.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil tem posição destacada na produção de aves e hoje é o maior exportador e terceiro produtor mundial de carne de frango (1). O aumento do consumo desta carne fez a indústria intensificar a produção e a tecnologia de abate, que ao tempo em que possibilita o abate de milhares de frangos também pode potencializar contaminações bacterianas oriundas das granjas. Os produtos avícolas brasileiros são competitivos no mercado externo e estima-se que bactérias do gênero *Campylobacter* spp. sejam uma barreira sanitária para as exportações, a exemplo do que já ocorre com as salmoneloses e sua relação com infecções alimentares.

A legislação vigente no Brasil impõe o controle *Salmonella* spp. nas carcaças de frango, porém não há legislação específica para controle de *Campylobacter* spp. em frangos de corte, evidenciando a necessidade de estudos sobre a ocorrência deste patógeno e seus potenciais riscos à saúde humana. As infecções associadas a *Campylobacter* spp. notificadas tem aumentado em muitos países desenvolvidos nos últimos 20 anos, mas a falta de notificação é um problema na maioria dos países e as taxas de incidência correspondem apenas aos casos confirmados em laboratório (2).

As bactérias do gênero *Campylobacter*, particularmente as espécies termofílicas, são reconhecidas como um dos principais patógenos de origem alimentar. A campilobacteriose representa um importante problema para saúde pública, sendo *C. jejuni* e *C. coli* as principais espécies envolvidas nos surtos (3, 4, 5). Aves e produtos avícolas são considerados fontes primárias de campilobacteriose humana e desempenham um papel importante na transmissão da doença, sendo a manipulação, preparação e consumo de carne de frango associadas com 20 a 30% dos casos (4, 6, 7).

Métodos convencionais de detecção são trabalhosos devido aos requisitos de crescimento fastidiosos do *Campylobacter* (8). Assim, existe um interesse crescente no desenvolvimento de ferramentas moleculares para permitir a detecção rápida de *Campylobacter* (8, 9, 10).

Métodos como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) são utilizados no estudo epidemiológico de *Campylobacter* spp., com resultados precisos e rápidos. Dentre as estratégias de PCR disponíveis, aquelas baseadas no monitoramento da reação de amplificação em tempo real são as mais promissoras. O uso da PCR em tempo real é uma opção para caracterizar os isolados, permitindo a rápida detecção e quantificação de patógenos por análise direta de amostras e assim reduzindo o tempo do diagnóstico (11, 12).

Neste contexto, os objetivos deste trabalho foram verificar a contaminação por *Campylobacter* spp. em lotes de frangos de corte, desde a chegada aos abatedouros até os produtos finais (carcaças resfriadas e congeladas) pelos métodos de Microbiologia Convencional, Reação em Cadeia pela Polimerase e PCR em tempo real.

A presente dissertação é composta por: introdução; breve revisão de literatura sobre o gênero *Campylobacter*, tecnologia de abate de frangos de corte e metodologias para detecção do agente; experimentos realizados; conclusões e considerações finais. Compõe também a dissertação dois artigos científicos derivados dos resultados obtidos. No Capítulo 1 consta o artigo “**Seletividade e produtividade de meios de cultura para isolamento de *Campylobacter* spp.**” submetido para publicação junto à Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. Este trabalho teve como objetivos avaliar o desempenho dos meios de cultura recomendados pelas normas oficiais internacionais para detecção de *Campylobacter* spp. e verificar a detecção do agente em amostras artificialmente contaminadas, subsidiando o desenvolvimento dos materiais e métodos desta dissertação. No Capítulo 2 consta o artigo intitulado “***Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* em carcaças de frango resfriadas e congeladas isoladas em abatedouros avícolas**”, formatado segundo as normas da Revista Ciência Rural. Neste artigo são abordados os resultados obtidos nos produtos finais, com a identificação de espécies termotolerantes de *Campylobacter*, associadas a surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs), em carcaças prontas para consumo humano, representando um perigo potencial a saúde pública.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 BACTÉRIAS DO GÊNERO *Campylobacter*

Campylobacter faz parte da família Campylobacteriaceae e, atualmente, na “*List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*”, organizada pelo pesquisador J.P. Euzéby, cita-se 32 espécies e 14 subespécies (13). São bactérias Gram negativas, não esporogênicas, na forma de bastonetes curvos espiralados, com uma ou mais espirais. Apresentam arranjo típico em forma de S ou asa de gaivota, quando duas células formam pequenas cadeias (14). Apresentam motilidade devido à presença de flagelos em uma (monotríquio) ou ambas as extremidades (anfítríquios). Os flagelos podem medir até três vezes o comprimento da célula e são responsáveis pelo movimento característico de “sacarolha” ou “vaivém” (3).

Quando submetidas a condições adversas como temperatura baixa, falta de nutrientes, altas concentrações de oxigênio ou em meios de cultivos velhos, *Campylobacter* spp. podem modificar sua morfologia, passando para forma cocóide através de uma retração citoplasmática. Assim, as células apresentam-se viáveis, porém não cultiváveis (VBNC - *Viable but non-culturable cells*) (15).

A transição da morfologia celular vibróide para uma forma cocóide ocorre na fase estacionária de crescimento e, durante este processo, não são detectáveis por metodologias convencionais, correspondendo a forma viável mas não cultivável, ou seja, são incapazes de se multiplicar em meios seletivos de isolamento, mas podem ser transmitidas e causar infecções em humanos. Esta característica representa um perigo potencial à saúde pública e é de grande importância em microbiologia de alimentos, visto que o alimento depois de analisado pode ser classificado como próprio para o consumo, mas apresentar células que não puderam ser detectadas (15, 16, 17). Quando as condições ambientais se tornam novamente favoráveis, é possível que a bactéria retorne a sua forma espiral e capacidade de multiplicação (17).

Campylobacter spp. são microrganismos de crescimento lento e extremamente exigente. A maioria das espécies são microaerófilas, com metabolismo respiratório complexo, necessitando de atmosfera com concentrações de Oxigênio entre 3 a 5%, 2 a 10% de Dióxido de Carbono e 85% de Nitrogênio (16). São sensíveis ao pH ácido, abaixo de 4,9, e à desidratação, sendo a atividade da água (A_w) ideal de 0,997 (18).

Apresentam metabolismo estritamente respiratório, não fermentando ou oxidando carboidratos, o que torna necessário para o seu cultivo, meios ricos em aminoácidos como fonte de energia. São oxidase-positivas e catalase variáveis, o que lhe conferem a capacidade de decomposição do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água e a capacidade de catalisarem reações de oxidação/redução, envolvendo o oxigênio molecular como aceptor de elétrons, respectivamente (19, 20).

Algumas espécies de *Campylobacter* se multiplicam bem entre 25°C e 37°C, mas não a 42°C. Outras espécies não se multiplicam a 25°C, mas a 37°C, com temperatura ótima de crescimento entre 42°C e 43°C, sendo denominadas termofílicas ou termotolerantes. Não são conhecidas grandes diferenças entre as espécies termotolerantes *C. coli* e *C. jejuni* com relação à patogenicidade, à composição antigênica e às características epidemiológicas relacionadas aos mecanismos de transmissão e sua distribuição em animais. As duas espécies são praticamente idênticas, a separação das duas espécies tem por base apenas o teste de hidrólise do hipurato que é positivo para *C. jejuni* e negativo para *C. coli*. (21).

Campylobacter está amplamente distribuído no intestino de animais de sangue quente, domésticos ou silvestres. São prevalentes em frangos, bovinos, suínos, ovinos e animais de estimação incluindo cães e gatos (22). Este microrganismo geralmente é isolado de carne de frangos recém-abatidos, contaminada durante o abate pela liberação do conteúdo intestinal ou da microbiota da superfície das carcaças. Ingestão de carnes de aves mal cozidas ou contaminação cruzada com carnes cruas é considerada uma das principais causas de infecção por *Campylobacter* spp., embora carnes de outros animais, leite não pasteurizado e água não tratada também possam ser vias de transmissão (23).

2.2 CAMPILOBACTERIOSE EM HUMANOS

A campilobacteriose é uma zoonose emergente de origem alimentar causada por bactérias do gênero *Campylobacter* e representa um importante problema para saúde pública. As principais espécies envolvidas nos surtos são *C. jejuni* e *C. coli*. (4). Dentre as espécies de *Campylobacter* termotolerantes, *C. jejuni* recebe maior atenção por ser frequentemente relatada como causador de gastroenterite em humanos, em muitos países associado com mais de 90% dos casos de campilobacteriose, enquanto *C. coli* é a segunda espécie mais frequentemente isolada de produtos avícolas (24).

O aparecimento dos sintomas da doença ocorre geralmente dois a cinco dias após a infecção, mas podem variar de um a dez dias. A dose infectante é baixa, sendo suficiente a ingestão de 400 a 500 células para o aparecimento de doença no homem (5). Nos casos em que se observam os sintomas inicia nos primeiros 2 a 3 dias, sendo dor de cabeça, vômito e febre os mais comuns. Posteriormente, observa-se o aparecimento de diarreia aquosa ou mesmo sanguinolenta e dores abdominais por 3 a 7 dias, e na maioria dos casos verifica-se evolução favorável do quadro clínico (25). Podem levar ao desenvolvimento de doenças autoimunes, como artrite reativa e doenças neurológicas, sendo a síndrome de Guillain-Barré (GBS) a mais importante. É caracterizada por doença autoimune e pós-infecciosa com destruição da bainha de mielina dos nervos periféricos, o que pode causar paralisia neuromuscular aguda e comprometer os músculos respiratórios, levando o paciente ao óbito (26).

Notificações de *Campylobacter* spp. tem sido relatadas em diversos países do mundo, com taxas de 13,82 casos nos Estados Unidos (5) 154,2 na Nova Zelândia (27) e 55,49 na União Europeia (4) para cada 100 mil habitantes. No entanto, muitas infecções não são diagnosticadas, declaradas ou não existem programas de vigilância. No Brasil, como em outros países em desenvolvimento, não há programas nacionais de vigilância que investiguem a ocorrência da campilobacteriose. Poucos laboratórios desenvolvem estudos sobre essa bactéria e, por conseguinte, os relatos na literatura com dados sobre isolamentos ou caracterizações de cepas brasileiras ainda são escassos (28).

2.3 *Campylobacter* spp. NA TECNOLOGIA DE ABATE DE FRANGOS DE CORTE

Aves e produtos avícolas são considerados fontes primárias de campilobacteriose humana e desempenham um papel importante na transmissão da doença. (6). Os frangos são colonizados por *Campylobacter jejuni* (65 a 95%), menos frequentemente por *Campylobacter coli* e raramente por outras estirpes de *Campylobacter*. A colonização dos frangos está relacionada com a idade. A maior parte das aves são negativas para este microrganismo até as duas semanas de idade e, uma vez ocorrida a colonização por *Campylobacter* spp., a transmissão por coprofagia é extremadamente rápida, podendo 100% dos frangos ser colonizados em 72 horas (29).

Uma ave colonizada por *Campylobacter* spp. pode secretar grandes quantidades deste microrganismo nas fezes e, conseqüentemente, contaminar todo o lote. A contaminação

externa pode ocorrer não só nas granjas, mas também durante o processo de transporte da ave ao abatedouro (30). Os veículos e caixas de transporte podem ser uma fonte adicional de contaminação, sendo que as caixas entram em contato direto com as excretas dos animais que podem ser positivos para *Campylobacter* spp.. Um fato agravante é que mesmo caixas higienizadas entre um transporte e outro podem apresentar matéria orgânica, tornando a eficiência da lavagem e desinfecção realizadas em frigoríficos questionável (30, 31, 32, 33). Takahashi et al. (26) avaliaram contaminação em gaiolas de transporte e afirmaram que o empilhamento e o tempo de espera em áreas de descarregamento favorecem a disseminação de *Campylobacter* spp..

A contaminação externa de pés, penas e pele dos frangos com fezes recém-excretadas provavelmente seja uma das principais causas da contaminação das carcaças de frango por *Campylobacter* spp.. Assim, equipamentos dos frigoríficos tornam-se contaminados e lotes negativos tornam-se positivos pela contaminação cruzada (34).

Klein et al. (35) avaliaram a ocorrência de *Campylobacter* spp. em três lotes de frangos de corte em diversos pontos da tecnologia de abate, verificando 51,5% de positividade e a seguinte distribuição: swab de cloaca (73,3%), água de escaldagem (77,8%), carcaças após escaldagem e depenagem (53,3%), carcaças após evisceração (66,7%), carcaças refrigeradas (40%), peito com pele (33,3%) e filé (26,7%).

No Brasil não existe uma legislação específica para *Campylobacter* spp. e os dados acerca da real contaminação em aves e produtos avícolas podem não refletir a realidade. A ocorrência de *C. jejuni* é monitorada em países desenvolvidos e naqueles onde houve grandes surtos em humanos, com leis, restrições e um acompanhamento regular desse patógeno na indústria de carne.

2.4 MICROBIOLOGIA CONVENCIONAL

Campylobacter spp. têm requisitos exigentes de crescimento, o que dificulta os procedimentos de detecção e identificação por microbiologia convencional. É extremamente susceptível ao estresse ambiental, oscilações de temperatura, exposição ao ar, ressecamento, pH ácido e armazenamento por longos períodos. Os principais fatores que dificultam o isolamento de *Campylobacter* spp. são: amostras com alta contaminação pela microbiota competitiva, baixo número de microrganismos e células injuriadas por condições ambientais adversas, tais como congelamento, dessecação, aquecimento, acidificação e exposição ao oxigênio (36).

A detecção de *Campylobacter* spp. em alimentos deve levar em consideração que a população presente pode ser baixa, devido ao fato deste microrganismo ser sensível a concentração de oxigênio do ar (21%) e não crescer a temperaturas abaixo de 30°C. Na microbiologia convencional o sucesso da detecção, geralmente, depende da análise de um grande número de amostras, concentração de células presentes e enriquecimento seletivo em condições microaerófilas à temperatura de 42°C (22).

Considerando sua característica fastidiosa são necessários alguns mecanismos que ampliem as chances de isolamento, como o enriquecimento da amostra e diminuição da microbiota competitiva. Para isso, tanto os meios de enriquecimento como os meios de cultura seletivos para o plaqueamento, necessitam da combinação de antibióticos específicos. Estes favorecem o crescimento destas espécies sobre as outras do mesmo gênero e em geral sobre a microbiota acompanhante, como vancomicina, que inibe as bactérias Gram positivas; trimetropina, com ação sobre *Proteus*; cefoperazona de sódio, que inibe bactérias Gram negativas entéricas e algumas Gram positivas, e ainda anfotericina B e cicloeximida, com ação sobre fungos (22, 37, 38).

É importante que os meios de cultura sejam suplementados com componentes que aumentem a aerotolerância através da redução dos componentes tóxicos derivados do oxigênio, como: peróxido de hidrogênio, oxigênio simples e íons superóxido. Meios de cultura seletivos que contenham sangue ou carvão bacteriológico e substâncias que estimulem o crescimento e a conservação de *Campylobacter* spp. tais como sulfato ferroso, metabissulfito de sódio, piruvato de sódio, heme, sangue e extrato de levedura, são indispensáveis para o isolamento. (39, 40, 41).

Vários meios têm sido reportados na literatura para o isolamento de *Campylobacter* spp. Os meios de enriquecimento descritos com maior frequência são: caldo Preston, caldo Bolton, caldo CEB. Os agares seletivos mais comumente utilizados são: ágar Skirrow, Blaser, Butzler, Preston e Campy-Cefex, todos contendo sangue e mCCDA (*Modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar*) e o CSM (*Charcoal-Based Selective Medium*) contendo carvão (38).

Metodologias internacionais recomendadas para isolar e identificar *Campylobacter* spp. descrevem a identificação principalmente pela morfologia e motilidade, observada através de microscopia de contraste de fase. As reações bioquímicas realizadas para as bactérias deste gênero incluem a redução do fumarato à succinato e vermelho de metila, assim como as reações para redução de cetona e indol. A diferenciação das espécies pode ser realizada através da prova de hipurato e da sensibilidade ao ácido nalidíxico. A diferenciação

bioquímica através do teste de hidrólise de hipurato é utilizada para diferenciar as espécies *C. jejuni* e *C. coli*, uma vez que somente *C. jejuni* possui a enzima hipuricase (37, 42, 43).

As colônias de *Campylobacter* spp. usualmente são planas, com coloração acinzentada ou translúcida e formato irregular, arredondadas ou convexas. Podem apresentar aspecto seco ou úmido, com brilho d'água ao refletir a luz ambiente. Tendem a apresentar crescimento confluyente ao longo da linha de semeadura. Reações hemolíticas não são observadas em ágar sangue (44, 22).

A dificuldade para isolamento e quantificação de *Campylobacter* spp. por microbiologia convencional, principalmente pelo fato destas técnicas serem muito laboriosas, incentivou a padronização e aplicação de técnicas moleculares de diagnóstico, baseadas em análise de DNA como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

2.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A reação em cadeia da polimerase, abreviada pela sigla PCR, é um processo prático para a amplificação de uma amostra de DNA. A amplificação pode ser resumida em quatro etapas: adição de dois iniciadores (*primers*) ao DNA molde, desnaturado termicamente; pareamento dos *primers* as regiões complementares no DNA; extensão dos iniciadores promovida pela DNA polimerase utilizando o DNA original como molde; hibridização dos *primers* as regiões complementares dos DNA's recém-sintetizados. Este ciclo é repetido de 20 a 30 vezes, promovendo um aumento de 10^6 a 10^9 na quantidade da sequência-alvo. A PCR é uma ferramenta de fácil realização, extremamente sensível, específica e altamente eficiente (45).

A PCR convencional utiliza eletroforese em gel de agarose para detecção dos produtos de amplificação, mas é demorada, carece de sensibilidade e especificidade e pode ser subjetiva em sua interpretação. Dentre as várias estratégias de PCR disponíveis, aquelas baseadas no monitoramento da reação de amplificação em tempo real (*PCR real time*) são provavelmente as mais promissoras.

Uma característica importante dos métodos baseados em PCR em tempo real é a possibilidade de detectar e quantificar patógenos difíceis de serem cultivados por métodos tradicionais de cultura. Além disso, o enriquecimento das amostras pode ser dispensado, permitindo rápida detecção e quantificação de patógenos por análise direta de amostras de alimentos (11).

A PCR em tempo real é adequada para detecção de patógenos por combinar as etapas de amplificação e detecção em uma única reação, minimizando o risco de contaminação da amostra. O principal diferencial entre a PCR convencional e a PCR em tempo real é que, nesta última, é possível detectar o aumento do número de cópias do DNA alvo à medida que a reação acontece. Isto ocorre porque componentes fluorescentes estão presentes no meio de reação e a intensidade da resposta é diretamente proporcional à amplificação do DNA alvo (46).

A PCR em tempo real monitora a reação a cada ciclo, associando a amplificação do alvo com a emissão de determinada quantidade de fluorescência, gerada por uma molécula repórter (fluoróforo) que aumenta enquanto a reação ocorre (46). A quantidade de fluorescência emitida é diretamente proporcional à quantidade de DNA alvo gerada durante a reação de PCR. Deste modo, é possível monitorar a quantidade do produto gerada em cada ciclo durante a fase exponencial da reação (47).

O emprego da PCR em tempo real para quantificação de microrganismos é baseada em uma curva previamente estabelecida, com concentração bacteriana já conhecida. A curva obtida pode ser dividida nas fases linear, exponencial inicial, logarítmica-linear e platô. A fase linear corresponde aos primeiros 10 a 15 ciclos, nos quais a fluorescência emitida não é suficiente para atingir o limiar de detecção (*threshold line*). Quando a emissão supera o limiar de detecção, inicia-se a fase exponencial inicial e fica estabelecido o ciclo de detecção (*cycle threshold - C_t*), ou seja, o número de ciclos necessários para que esta detecção ocorra. O valor do C_t é inversamente proporcional ao número de cópias do DNA alvo, ou seja, quanto maior a concentração do material genético na amostra, menor será o número de ciclos necessários para atingir o C_t . (45)

A PCR em tempo real seria uma alternativa rápida, simples e específica aos métodos convencionais para estimar *Campylobacter* spp. em carnes de frango, e uma ferramenta eficaz para o monitoramento da contaminação e ações de controle deste patógeno quando implementada em abatedouros (48)

Leblanc-Maridor et al. (49) citam que os ensaios de PCR em tempo real para *C. coli* e *C. jejuni* têm vantagens sobre as técnicas de microbiologia convencional ao permitir o processamento simultâneo de várias amostras em ensaios automatizados, reduzindo o tempo necessário para análise.

Assim, o objetivo deste trabalho foi utilizar as metodologias de Microbiologia Convencional, Reação em Cadeia pela Polimerase e PCR em tempo real para avaliar a

contaminação por *Campylobacter* spp. em diferentes pontos da tecnologia de abate de frangos de corte.

3. EXPERIMENTOS REALIZADOS

3.1 MATERIAL E MÉTODOS

3.1.1 Desempenho dos meios de cultura

Estabelecer critérios de desempenho para os meios de cultura são um pré-requisito para um trabalho microbiológico confiável e para tanto são utilizados parâmetros como Produtividade, Seletividade e Especificidade. Devido a este fato, os meios de cultura utilizados neste experimento foram testados e os resultados estão descritos no Capítulo 1 “Seletividade e produtividade de meios de cultura para isolamento de *Campylobacter* spp”.

3.1.2 Locais de coleta e amostragem

Foram selecionados três abatedouros de frangos de corte da região norte do Estado do Rio Grande do Sul, sendo dois sob sistema de Inspeção Federal e um sob sistema de Inspeção Estadual. As coletas foram realizadas entre novembro de 2014 a abril de 2015, com duas visitas em cada abatedouro. Foram selecionados seis pontos de coleta: recepção das aves (*swabs* de cloaca e esponjas de superfície de gaiolas de transporte, antes e após a higienização); carcaças após resfriamento em *chiller*; carcaças resfriadas a 4°C; e carcaças congeladas a -12°C.

Cada um dos pontos foi coletado em triplicata, totalizando 108 amostras. As coletas das amostras foram realizadas como segue:

- a) *Swabs* de cloaca: foi amostrado um *pool* com 50 *swabs* de 100 aves, utilizando um *swab* para cada duas aves, imersos em 50 mL de caldo Bolton (CM983, Oxoid[®],UK);
- b) Esponjas de gaiolas de transporte: a amostragem foi realizada com esponjas com solução neutralizante (*Sponge Stick Neutraling Buffer* 3M[®]) por toda a extensão interna da gaiola, antes e após a lavagem e sanitização. As esponjas foram acondicionadas em saquetas fornecidas pelo fabricante e no laboratório adicionou-se 50 mL de caldo Brucella (211088, BBL[™], USA). Identificou-se as gaiolas com lacres oficiais para controle das mesmas após a higienização em sistema automatizado de lavagem;
- c) Carcaças: as carcaças foram acondicionadas em sacos plásticos individuais e identificadas com lacres oficiais. No laboratório cada amostra foi rinsada com 400 mL de água peptonada tamponada (218105, BD Difco[™], USA), homogêneos por 30 segundos.

As análises de microbiologia convencional foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Centro de Pesquisa em Alimentação (CEPA) e os ensaios de PCR em tempo real no Laboratório de Imunologia e Microbiologia Avançada, ambos da Universidade de Passo Fundo (UPF). As análises de Reação em Cadeia pela Polimerase para identificação das colônias compatíveis com *Campylobacter* spp. foi realizada no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária/CDPA da UFRGS.

3.1.3 Pesquisa de *Campylobacter* spp. por microbiologia convencional

Para a detecção de *Campylobacter* spp foi utilizada a metodologia descrita na ISO 10272-1 (2006) (43), com algumas adaptações. Para o enriquecimento, 1 mL de cada uma das amostras foi transferido para tubos contendo 9 mL do caldo Bolton (CM983, Oxoid[®],UK), suplementado com o suplemento seletivo contendo Cefoperazona 20mg/L, Trimetoprim 20mg/L, Vancomicina 20mg/L e Cicloheximida 50mg/L (SR183E, Oxoid[®],UK). Os tubos foram incubados em atmosfera microaerófila (Microaerobac, Probac[®]) a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 4 horas e posteriormente transferidos para $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ por $44 \pm 4\text{h}$.

Após, de cada cultura do caldo Bolton inoculou-se uma alçada de 10 μL sobre a superfície dos ágaros Charcoal Cefoperazona Desoxicolato Modificado (mCCDA) (CM739, Oxoid[®],UK) e Columbia sangue (CBA) (CM331B, Oxoid[®],UK) com suplemento seletivo contendo Cefoperazona 32mg/L e Amfotericina B 10mg/L (SR155, Oxoid[®],UK), sendo as placas incubadas a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ por $44 \pm 4\text{h}$, em microaerofilia (Microaerobac, Probac[®]).

As colônias compatíveis com *Campylobacter* spp. foram estriadas por esgotamento em Ágar Columbia Sangue (CBA) e incubadas a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas em microaerofilia. Após, foram realizados os testes de coloração de Gram, motilidade, oxidase e catalase para identificação de *Campylobacter* spp. Como controle positivo utilizou-se *Campylobacter coli* ATCC 33559 e como controles negativos *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Proteus mirabilis* ATCC 35659.

3.1.4 Identificação de *C. jejuni* e *C. coli* por Multiplex-PCR

As colônias compatíveis com *Campylobacter* spp. identificadas na microbiologia convencional foram armazenadas em caldo Brucella (211088, BBL[™], USA) com glicerol e encaminhadas para confirmação por PCR. A extração de DNA e o multiplex-PCR foram realizados conforme Borsoi *et al.* (50). Para a extração de DNA as amostras foram

centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Ao *pellet* obtido foram acrescentados 800 µL de água ultrapura, homogeneizado e novamente centrifugado a 12.000 rpm por cinco minutos, repetindo-se este procedimento quatro vezes e suspendendo-se o *pellet* em 200 µL de água ultrapura. As amostras foram colocadas em bloco térmico entre 96°C a 98°C por 10 minutos. Após, foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante armazenado em eppendorf para análise por *multiplex*-PCR.

Utilizou-se o *Multiplex*-PCR proposto por Denis *et al.* (51) e adaptado por Perdoncini *et al.* (52). Como controle positivo utilizou-se *C. jejuni* subsp. *jejuni* ATCC 29428 e *C. coli* ATCC 43478 e controle negativo *Arcobacter* sp. Três pares de *primers* foram utilizados para cada reação, baseados na sequência comum 16rRNA entre as duas espécies (F^a - ATCTAATGGCTTAACCATTA AAC e R^b - GGACGGTAACTAGTTTAGTATT, com 857 pb) e a identificação de *C. jejuni* e *C. coli* baseada nos genes *mapA* F^a - CTATTTTATTTTGGAGTGCTTG TG e R^b - GCTTTATTTGCCATTTGTTTTATTA com 589 pb e *ceuE* F^a - AATTGAAAATTGCTCCA ACTATG e R^b - TGATTTTATTATTTGTAGCAGCG com 462 pb, respectivamente.

As condições de amplificação foram: desnaturação por 10 minutos a 95°C, 35 ciclos de desnaturação por 30 segundos a 95°C, anelamento por 1 minuto e 30 segundos a 59°C, extensão por 1 minuto 72°C, e 1 ciclo de extensão final por 10 minutos a 72°C, em termociclador *Biocycler – Peltier Thermal Cycler*. A eletroforese dos amplicons foi realizada em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio e visualizado em sistema de foto documentação com transluminador Ultra-Violeta (ATTO®).

3.1.5 Detecção de *Campylobacter* termotolerantes por PCR em tempo real

Para a extração do DNA utilizou-se *kit* comercial denominado *mericon DNA Bacteria Kit* (Qiagen®). Aliquotas de 1mL das amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionado 200 µL da solução de lise denominada *Fast Lysis Buffer* ao *pellet* bacteriano, centrifugando-se a 13000 rpm por 5 minutos. O *pellet* foi lavado por cinco vezes e os *eppendorfs* colocados em bloco térmico a 100 °C por 10 minutos, com agitação de 800 rpm. Após, as amostras foram mantidas entre 15 a 25 °C por 2 minutos e novamente centrifugadas a 13000 rpm por 5 minutos. Aliquotas de 100 µL do sobrenadante foram armazenadas para a PCR.

Para a amplificação de *Campylobacter* spp. por PCR em tempo real utilizou-se o *mericon Campylobacter triple kit* (Qiagen ®), designado para a detecção de *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* e *Campylobacter lari* em alimentos. Este *kit* é composto pelo

Multiplex PCR Master Mix que contém a enzima DNA polimerase *HotStarTaq Plus*, solução tampão de PCR e *mix* de dNTP, *primers* e sondas específicas para amplificação da sequência alvo e controle positivo de DNA.

A reação de amplificação foi composta por 20 µL, sendo 10 µL da amostra de DNA a ser amplificado e 10 µL do *mix* de reação. As condições de amplificação foram: aquecimento por 5 minutos a 95°C para ativação da DNA polimerase *HotStarTaq Plus*, 40 ciclos de desnaturação por 15 segundos a 95°C, anelamento por 15 segundos a 60°C e extensão por 10 segundos a 72°C.

3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados referem-se à ocorrência de *Campylobacter* spp. em lotes de frangos de corte, desde a chegada aos abatedouros até os produtos finais (carcaças resfriadas e congeladas) pelos métodos de microbiologia convencional, *Multiplex-PCR* e Reação em Cadeia pela Polimerase em tempo real. A amostragem foi realizada em três abatedouros com duas coletas em cada estabelecimento, em triplicata, totalizando 108 amostras e os resultados estão demonstrados nos itens 3.2.1 e 3.2.2.

3.2.1 Pesquisa de *Campylobacter* spp. por microbiologia convencional e identificação de *C. jejuni* e *C. coli* por *Multiplex-PCR*

Os resultados da pesquisa de *Campylobacter* spp. por microbiologia convencional e a identificação das espécies termotolerantes *C. coli* e *C. jejuni* em diferentes pontos de coleta em abatedouros de frangos de corte estão apresentados na Tabela 1.

A maior contaminação pelo patógeno ocorreu nos produtos finais (carcaças resfriadas e congeladas), identificando-se *Campylobacter* em 86% das amostras avaliadas, sendo 89,9% em carcaças resfriadas e 83,3% em carcaças congeladas, independentemente do abatedouro avaliado.

Não houve redução da contaminação por *Campylobacter* spp. nas gaiolas de transporte após a higienização (Tabela 1), indicando a ineficiência deste processo para a redução e/ou eliminação do agente nos abatedouros amostrados.

Os resultados sugerem também uma tendência de aumento da contaminação pela bactéria na tecnologia de abate de frangos de corte. Como exemplo, na 1ª coleta do abatedouro A (Tabela 1) não se detectou *Campylobacter* spp. quando da chegada das aves ao estabelecimento via *swabs* cloacais, mas a contaminação pelo agente nas gaiolas de transporte

antes da higienização foi de 33% e após a higienização alcançou 66%, enquanto que a contaminação nas carcaças foi de 33%.

Estes dados corroboram a característica de sobrevivência da bactéria em ambientes úmidos e mesmo em temperaturas consideradas limitantes para o crescimento bacteriano, como 4°C e -12°C, utilizadas rotineiramente como um dos métodos de conservação de alimentos via cadeia do frio.

Tabela 1: Detecção de *Campylobacter* spp. e identificação de *C. coli* e *C. jejuni* por Multiplex-PCR em amostras oriundas de abatedouros avícolas.

PONTOS AMOSTRADOS	ABATEDOURO A						ABATEDOURO B						ABATEDOURO C						
	COLETA 1		COLETA 2		COLETA 1		COLETA 2		COLETA 1		COLETA 2		COLETA 1		COLETA 2				
	<i>C. spp.</i>	<i>C. j.</i>	<i>C. c.</i>	<i>C. spp.</i>	<i>C. j.</i>	<i>C. c.</i>	<i>C. spp.</i>	<i>C. j.</i>	<i>C. c.</i>	<i>C. spp.</i>	<i>C. j.</i>	<i>C. c.</i>	<i>C. spp.</i>	<i>C. j.</i>	<i>C. c.</i>	<i>C. spp.</i>	<i>C. j.</i>	<i>C. c.</i>	
Swabs de cloaca	0%	0%	0%	33%	0%	0%	66%	0%	0%	0%	33%	0%	0%	33%	0%	0%	100%	0%	66%
Gaiolas AH	33%	0%	0%	66%	0%	0%	33%	0%	0%	0%	33%	0%	0%	33%	0%	0%	100%	33%	100%
Gaiolas DH	66%	0%	0%	66%	0%	0%	100%	66%	33%	33%	100%	100%	66%	66%	0%	0%	100%	33%	100%
Carcças depois <i>chiller</i>	33%	0%	0%	33%	0%	0%	66%	33%	0%	100%	100%	66%	0%	66%	0%	0%	100%	0%	100%
Carcças a 4°C	33%	0%	0%	100%	66%	0%	100%	100%	0%	100%	100%	100%	100%	66%	0%	0%	100%	0%	100%
Carcças a -12°C	33%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	33%	0%	100%	100%	66%	66%	66%	33%	100%	100%	0%	100%
Total	33%	0%	0%	66%	11%	0%	78%	39%	5,5%	78%	50%	55,5%	61%	22%	5,5%	100%	100%	11%	94%

Legenda: *C. spp* = *Campylobacter* spp.; *C. c.* = *Campylobacter coli*; *C. j.* = *Campylobacter jejuni*; AH = antes da higienização; DA = depois da higienização

As colônias compatíveis com *Campylobacter* spp., identificadas por microbiologia convencional, foram armazenadas em caldo Brucella com glicerol, e submetidas para confirmação por *Multiplex*-PCR, sendo processadas conforme o item 3.1.4 desta dissertação.

Entretanto, ao comparar-se os resultados de microbiologia convencional e o *Multiplex*-PCR, observa-se discrepância entre os resultados, com a não confirmação por PCR de colônias identificadas como *Campylobacter* spp. por testes de coloração de Gram, motilidade, oxidase e catalase, além de crescimento em meios de cultura específicos, condições de temperatura e microaerofilia indicadas para este gênero.

Esta incoerência pode ter ocorrido em função da presença de *Campylobacter* spp. diversas de *C. jejuni* e *C. coli*, para as quais foram designados os *primers* de amplificação utilizados no *Multiplex*-PCR.

Entretanto, nos abatedouros B e C, a porcentagem de positividade para *C. jejuni* e *C. coli* por *Multiplex*-PCR em carcaças resfriadas e congeladas variou entre 33 e 100%, indicando a ocorrência de espécies termofílicas em carcaças prontas para consumo humano. O mesmo ocorreu no abatedouro A, onde 66% das carcaças resfriadas avaliadas foram positivas para *C. jejuni*.

3.2.2 Detecção de *Campylobacter* termotolerantes por PCR em tempo real

Os resultados da identificação das cepas termofílicas de *Campylobacter jejuni*, *C. coli* e *C. lari* por PCR em tempo real das amostras coletadas em abatedouros avícolas estão apresentados na Tabela 2.

A interpretação dos resultados seguiu as recomendações do fabricante do *kit* de reação que constam no *mericon Pathogen Detection Handbook* (53). Segundo esta referência, todos os resultados que apresentarem ciclo de detecção (*cycle threshold* - C_t) devem ser considerados positivos, desde que o controle interno da amostra apresente um C_t entre 28 e 32.

Os resultados do PCR em tempo real mostraram positividade para *Campylobacter* nos abatedouros A e C, com variação de zero a 100% na amplificação do DNA alvo.

Tabela 2: *Campylobacter jejuni*, *C. coli* e *C. lari* identificados por PCR em tempo real em amostras oriundas de abatedouros avícolas.

Pontos de Amostragem	Abatedouros e Coletas					
	A		B		C	
	Coleta1	Coleta 2	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 1	Coleta 2
Swabs de cloaca	100%	100%	0%	0%	33%	100%
Gaiolas antes da higienização	0%	66%	0%	0%	0%	100%
Gaiolas depois da higienização	100%	100%	0%	0%	100%	100%
Carcaças depois do <i>chiller</i>	0%	33%	0%	0%	33%	33%
Carcaças resfriadas a 4°C	33%	0%	0%	0%	0%	33%
Carcaças congeladas a -12°C	33%	0%	0%	0%	33%	0%
Total	44%	50%	0%	0%	33%	61%

No abatedouro A *Campylobacter* estava presente em 100% das aves amostradas na chegada ao abatedouro, nas duas coletas, e também, se manteve presente nas gaiolas após a higienização, evidenciando a ineficiência dos sanitizantes e do processo de lavagem utilizados por este estabelecimento. Este resultado corrobora a hipótese de que as gaiolas de transporte são potencial fonte de contaminação cruzada e disseminação para os lotes.

Não houve positividade de *Campylobacter* nas amostras do abatedouro B, possivelmente devido ao resultado do *Ct* do controle positivo ter sido 33,03. Conforme orientação do fabricante, um *threshold* acima de 33 pode indicar inibição da reação e nestes casos o DNA das amostras deve ser diluído na proporção de 1:10 com água *RNase free* e o ensaio repetido.

4. CAPÍTULO 1

Selectivity and productivity of culture media for isolation of *Campylobacter* spp.

Isabel Cristina Cisco¹, Denise Tedesco², Gustavo Perdoncini³, Mariana Paravisi⁴,
Laura Beatriz Rodrigues¹, Luciana Ruschel dos Santos¹.

(Submetido à Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo)

¹Universidade de Passo Fundo. Mestrado em Bioexperimentação.

²Universidade de Passo Fundo. Curso de Engenharia de Alimentos. Bolsista PIBIC CNPq

³Médico Veterinário. Doutor em Ciências Veterinárias

⁴Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias.

*Autor para correspondência: isacisco21@gmail.com

Abstract

Campylobacteriosis is an emerging foodborne zoonotic disease caused by bacteria of the genus *Campylobacter*. Several factors hinder the isolation of this pathogen in naturally contaminated samples; therefore, standardized methods as well as high performance culture media should be used to avoid false negative results. Thus, the present study assessed the performance of culture media recommended by ISO 10272-1 for the detection of *Campylobacter* spp. using selectivity and productivity testing in pure cultures and the efficiency of these media in artificially contaminated, samples. ATCC strains of *C. coli* and *C. jejuni* and of the interfering organisms *S. aureus*, *E. coli* and *Proteus mirabilis* were inoculated into the media indicated by official standards and later inoculated into enriched samples. The media tested both in pure cultures and in enriched samples yielded satisfactory results, with good selectivity and productivity, thereby allowing laboratories to combine high performance methods for the isolation and identification of *Campylobacter* in naturally contaminated samples.

Keywords: *Campylobacter*; selectivity, productivity, chicken meat

1. INTRODUCTION

Campylobacteriosis is an emerging foodborne zoonotic disease caused by bacteria of the genus *Campylobacter*, and *C. jejuni* and *C. coli*⁴ are the major species involved in eating disorders. The main factors that hinder the isolation of *Campylobacter* are samples which are highly contaminated by competitive flora, small number of microorganisms, and cells damaged by adverse environmental conditions, such as freezing, desiccation, heating, acidification, and oxygen exposure.¹

Recommended international methods for the isolation and identification of *Campylobacter* spp. include ISO 10272-1 (International Organization for Standardization, 2006), MLG 41.03 by the USDA (U.S. Department of Agriculture, 2014) and BAM (Bacteriological Analytical Manual, 2001). The enrichment media cited in the standards as efficient for the recovery of *Campylobacter* are Bolton broth, for several types of samples, and Preston broth, widely used for the isolation of *Campylobacter* from foods.¹¹ Selective culture media containing blood or charcoal and substances that stimulate growth and preservation of *Campylobacter*, such as ferrous sulfate, sodium metabisulfite, sodium pyruvate, heme, blood, and yeast extract¹¹ are indicated for plating.^{10,7}

These culture media also require the combined use of specific antibiotics that favor the growth of *Campylobacter* in the accompanying microbiota, such as vancomycin, which inhibits gram-positive bacteria; trimethoprim, against *Proteus*; cefoperazone sodium, which inhibits enteric gram-negative bacteria and some gram-positive bacteria, and amphotericin B and cycloheximide, which act upon fungi.^{11,6,2}

Setting performance criteria for culture media is a prerequisite for a reliable microbiological analysis, and parameters such as productivity, selectivity, and specificity are used for that purpose. Productivity is the recovery rate of a target microorganism in culture medium under defined conditions. Selectivity denotes the level of inhibition of an undesirable microorganism in a selective culture medium under defined conditions, and specificity is the

demonstration, under defined conditions, that an interfering microorganism does not have the same gross characteristics as the target microorganisms.⁹ These parameters should be tested in pure cultures, but the media should also be checked against field samples or artificially contaminated samples, the so-called enriched samples. The use of enriched samples in routine laboratory tests is aimed at evaluating the stages of the analytical process and at assessing the recovery of target bacteria according to the method recommended for a given microorganism. Enriched samples should be analyzed simultaneously in each test, representing positive, negative, and blank controls.

The enriched samples used as positive control should be prepared with addition of the target microorganism to the matrix; the negative control should be prepared with the addition of an interfering microorganism whose characteristics are similar to those of the target microorganism, and culture media and diluents used in the test should be assessed for the blanks, without the addition of microorganisms or use of a matrix. Chicken meat was used as the matrix in this study, as EFSA⁵ data hold poultry products, especially chicken meat, accountable for 20-30% of the human cases of campylobacteriosis.

Therefore, the goals of this study were to assess the performance of the culture media recommended by official standards for the detection of *Campylobacter* spp. using selectivity and productivity and to check the detection of the pathogen in artificially contaminated samples.

2. MATERIAL AND METHODS

The culture media used for the detection of *Campylobacter* spp. were prepared according to ISO 10272-1 (2006).⁸ Bolton broth (CM 983 Oxoid) with selective supplement containing cefoperazone 20mg/L, trimethoprim 20mg/L, vancomycin 20mg/L and cycloheximide 50mg/L (SR183E, Oxoid) and modified charcoal cefoperazone deoxycholate agar (mCCDA) (CM739, Oxoid), with selective supplement containing cefoperazone 32mg/L and amphotericin B 10mg/L (SR155, Oxoid) and Columbia blood agar (CBA), also enriched (SR155, Oxoid), according to the manufacturer's instructions.

A qualitative control method was used for the tests with Bolton broth in selective liquid culture media containing the target microorganism, interfering organisms, and a mix of target and interfering organisms.⁹ The following target microorganisms were used: *Campylobacter coli* ATCC 33559, *C. jejuni* subsp *jejuni* ATCC 29428, with an inoculum of 10² CFU; in addition to *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Proteus mirabilis* ATCC 35659, with an inoculum of 10³ CFU.

An inoculum of 10² CFU of *Campylobacter coli* ATCC 33559 and *C. jejuni* subsp *jejuni* ATCC 29428 was used for the mCCDA productivity test. For the analysis of selectivity, a qualitative streaking method was utilized, employing *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, and using an inoculum of 10⁴ CFU.⁹

2.1. Enumeration of target microorganisms

C. coli ATCC 33559 and *C. jejuni* subsp *jejuni* ATCC 29428 were cultured in Brucella broth (BBL/USA) for 44 + 4 hours of incubation at 41.5 ± 1°C. After incubation, each culture was diluted to 10⁻⁹ in a 0.85% saline solution and 100µL was extracted from each dilution,

streaked onto CBA, in duplicate, for enumeration of the strain. The plates were incubated at $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$ for 44 + 4 hours under microaerophilic conditions (Microarobac/Probac) and the colonies were counted for enumeration of the strains.

2.2. Enumeration of interfering microorganisms

Escherichia coli ATCC 25922, *Proteus mirabilis* ATCC 35659 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 were cultured in BHI broth (CM1135, Oxoid) for 18/24 hours at $35 \pm 1^\circ\text{C}$. Thereafter, each culture was diluted to 10^{-9} in 0.85% saline solution. 1mL was extracted from each dilution and plate count agar (PCA, Difco) was incubated, in duplicate, at $35 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24 hours, and the colonies were then counted.

2.3. Productivity and Selectivity of Bolton broth

C. coli ATCC 33559 and *C. jejuni* subsp *jejuni* ATCC 29428 were cultured in Brucella broth (BBL/USA) for 44 + 4 hours of incubation at $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$. After that, up to 10^{-9} was diluted in 0.85% saline solution. The tube containing Bolton broth was inoculated with 1 mL of the dilution with 10^2 CFU, which was incubated at $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$ for 44 + 4 hours under microaerophilic conditions (5 to 15% of O₂) and 10% of CO₂ using a generator (Microarobac/Probac). *E. coli* ATCC 25922 and *P. mirabilis* ATCC 35659 strains were cultured in BHI broth (CM1135, Oxoid) for 18 to 24 hours at $35 \pm 1^\circ\text{C}$ and diluted to 10^{-9} in 0.85% saline solution after incubation. 1 mL of the dilution with 10^2 CFU of target microorganisms and with 10^3 CFU of interfering organisms was inoculated. 1 mL of target strains, 1 mL of interfering strains and 1mL of a pool containing all the strains were inoculated in Bolton broth, initially incubated at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ for 5 ± 1 hours and later transferred to an oven at $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$ for 44 + 4 hours under microaerophilic conditions (Microarobac/Probac).

Afterwards, 10 μ L from the tube containing the target microorganism was inoculated onto Tryptic Soy Agar (TSA) (Difco). 10 uL from the tube containing interfering microorganisms was inoculated onto the selective mCCDA, and 10 uL from the tube containing the target and interfering organisms was inoculated onto mCCDA. All plates were incubated at $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$ for 44 + 4 hours under microaerophilic conditions (Microarobac/Probac).

2.4 Productivity and Selectivity of mCCDA

For the analysis of productivity, 10uL with 10^2 CFU of *C. coli* ATCC 33559 and *C. jejuni* subsp *jejuni* ATCC 29428 strains was inoculated onto mCCDA and onto the reference medium - CBA, as established by the ISO standard.

For the assessment of selectivity, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 strains with 10^4 CFU were used, and 1 μ L of each strain was inoculated onto mCCDA. All plates were incubated in an oven at $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$ for 44 + 4 hours under microaerophilic conditions (Microarobac/Probac).

2.5. Artificially enriched samples

Boneless and previously ground chicken meat was sterilized for matrix preparation. After sterilization, aliquots of 25g were aseptically weighed in sterile plastic bags specifically designed for use in Stomacher homogenizers. A total of 225 mL of BPW was aseptically added. Target microorganism *Campylobacter coli* ATCC 33559 and interfering organisms *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus mirabilis* ATCC 35659 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, in stationary phase, were diluted to 10^{-9} in 0.85% saline solution and 1 mL of each dilution was placed in each of the nine bags, leading to artificial contamination by the target and interfering microorganisms in all dilutions.

All the samples were homogenized in Stomacher for 60 seconds, and the method for detection of *Campylobacter* spp. followed ISO 10272-1 (2006).⁸ 1 mL from each bag was transferred into tubes containing 9 mL of Bolton broth, in duplicate, and used for enrichment. The tubes were incubated under microaerophilic conditions at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ for 4 hours and later transferred to $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$ for $44 \pm 4\text{h}$. Thereafter, 100 μL from each culture in Bolton broth was inoculated onto mCCDA and onto the enriched CBA, using Drigalski spatulas. The plates were incubated at $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$ for $44 \pm 4\text{h}$ under microaerophilic conditions.

After incubation, typical colonies of *Campylobacter* spp. were selected and streaked onto CBA and incubated at $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24 to 48 hours under microaerophilic conditions. After incubation, gram staining, motility, and oxidase tests were performed for confirmation of the colonies.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The culture media were evaluated according to the acceptance criterion described by the standard,⁹ which cites the growth of more than 10 CFUs of the target microorganism and inhibition of growth/multiplication of microorganisms that interfere with the productivity of Bolton broth. Regarding selectivity, Bolton broth is considered to be appropriate when the growth/multiplication of interfering microorganisms in TSA plates is inhibited.

The productivity results for Bolton broth were satisfactory as there were 15 CFUs of *C. coli* and 12 CFUs of *C. jejuni* in TSA plates inoculated with this broth. The mCCDA plates seeded with Bolton broth inoculated with target and interfering microorganisms revealed the growth of target microorganisms only, demonstrating the high selectivity of this medium.

The acceptance criterion for the productivity of mCCDA and enriched blood agar should be equivalent to a $P_R \geq 0.50$. This rate is calculated by the formula: $P_R = N_S/N_O$, where N_S is the number of CFUs in the assessed medium and N_O is the number of CFUs in the reference medium.⁹ The result for the mCCDA was equal to $P_R = 0.90$ compared to $P_R = 0.83$ for enriched blood agar, thereby yielding a satisfactory result for the assessed media. The identified CFUs were confirmed by the morphology of the colonies, which are grayish and exhibit a metallic luster in mCCDA, and cream-colored or grayish in blood agar. In the microscopic analysis, the colonies showed thin, gram-negative, S-shaped rods with a gull-wing shape, usually forming small zigzag chains, whose motility is characterized by back-and-forth or corkscrew-like motion.

The productivity of culture media, whether selective or not, depends on intrinsic factors (nutrients, redox potential, pH, water activity, type and activity of antimicrobials and/or their

formation during colony growth), extrinsic factors (incubation temperature and its oscillations, O₂ and atmospheric CO₂ pressure) and implicit factors (nutritional dependence of the microorganism, and antagonistic and synergistic phenomena between the microbiota and sample components).¹² According to the results, the tested culture media were approved for use.

The selectivity test showed inhibited growth of interfering microorganisms in selective media for *Campylobacter*. Culture media for foodborne pathogenic agents rely on the relationship between selectivity and inhibition of interfering organisms and on the recovery and growth of the target microorganism. The selectivity of culture media is given by the presence of inhibitory agents in their composition that can, at the same time, suppress, albeit partially, the competing microbiota and promote the growth of the desired microorganism. In this respect, the tested culture media proved to be appropriate for use, as they demonstrated growth of *Campylobacter* and inhibition of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

The test results for artificially contaminated samples showed good performance of the culture media. The several levels of contamination of the target and interfering microorganisms were tested, and growth of the target microorganism and inhibition of interfering organisms were observed in all dilutions.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, Programa Pesquisador Gaúcho - PqG – Edital FAPERGS nº 004/2012).

REFERENCES

1. Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food Surveillance: The isolation of *Campylobacter* spp. from food and environmental samples. In: Advises the Food Standards Agency on the Microbiological Safety of Food, 2010. Annual Reports - Discussion paper, ACMSF, 2010.
2. Bolton FJ, Coates D, Hinchliffe PM, Robertson L. Comparison of selective media for isolation of *Campylobacter jejuni/coli*. *Journal of Clinical Pathology*. 1983 Jan; 36:78–83.
3. European Food Safety Authority (EFSA). 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. <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/1503.pdf>.
4. European Food Safety Authority (EFSA). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and foodborne outbreaks in 2009. *European Food Safety Authority (EFSA)*, v.9, n.3, 2011. p. 1-378.
5. European Food Safety Authority (EFSA). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Foodborne Outbreaks in 2012. *The EFSA Journal*. 2013; (12):1-314.

6. Hunt, J. M.; Abeyta, C. & Tran, T. *Campylobacter*. In: U.S. Food and Drug Administration (FDA), Bacteriological Analytical Manual Online, available at: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm072616.htm>>, accessed on 04/16/2015. Chapter 7, revised March 2001.
7. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Manual de Procedimientos *Campylobacter*. Buenos Aires, Argentina; 2001.p. 29. Acesso em: 17.04.2015.http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/gss/publications/documents/Argentina/LevelI/ManualProcedimientos_Campylobacter.pdf
8. ISO 10272-1 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. 2006.
9. ISO 11133:2014 Microbiology of food, animal feed and water – Preparation, production, storage and performance testing of culture media.
10. Shui-lian Bi&Lei Shi&He Yan&He-cheng Meng. Comparison of various culture methods (Skirrow medium, a blood-free medium and a filtration system enriched in Bolton and Preston broths) for isolation of *Campylobacter* spp. from raw meat samples. Ann Microbiol (2013) 63:179–185.
11. Silva, N.; Junqueira, V.C.A.; Silveira, N.F.A.; Taniwaki, M.H.; Santos, R.F.S; Gomes, R.A.R. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos, 4ª ed. São Paulo: Varela, p.223-233, 2010.
12. Gelli, D. S.; Ristori, C. A. e Buzzo, A. A. - Controle de qualidade em laboratório de microbiologia de alimentos e avaliação de desempenho de meios de cultura no isolamento de *Salmonella* spp. Rev. Inst. Adolfo Lutz. 2003; 62(3):159 – 164.

5. CAPÍTULO 2

***Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* em carcaças de frango resfriadas e congeladas coletadas em abatedouros avícolas**

Campylobacter jejuni and *Campylobacter coli* in chilled and frozen carcasses collected in poultry slaughterhouses

Isabel Cristina Cisco¹, Denise Tedesco², Gustavo Perdoncini³, Mariana Paravisi⁴, Laura Beatriz Rodrigues⁵ & Luciana Ruschel dos Santos⁵

(Artigo a ser submetido para a Revista Ciência Rural)

¹Mestranda no Programa de Pós Graduação em Bioexperimentação da Universidade de Passo Fundo.

²Graduanda no Curso de Engenharia de Alimentos da Universidade de Passo Fundo. Bolsista PIBIC CNPq

³Médico Veterinário. Doutor em Ciências Veterinárias

⁴Mestranda no Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

⁵Docentes no Programa de Pós Graduação em Bioexperimentação da Universidade de Passo Fundo.

*Autor para correspondência: isacisco21@gmail.com

RESUMO

As espécies de *Campylobacter* termotolerantes são agentes de surtos de campilobacteriose, e as aves e produtos derivados são considerados importantes fontes de infecção para humanos. Neste estudo foram identificadas espécies termotolerantes de *Campylobacter* em carcaças de frango resfriadas e congeladas, coletadas em três abatedouros no Rio Grande do Sul, entre 2014 e 2015. A detecção de *Campylobacter* spp. foi realizada por microbiologia convencional e a identificação das colônias compatíveis para *Campylobacter* por *multiplex*-PCR, capaz de diferenciar *C. jejuni* e *C. coli*. Das 36 amostras de carcaças resfriadas e congeladas verificou-se positividade para *Campylobacter* termotolerantes em 23 carcaças (63,8%), sendo 72,2% (13/18) em carcaças resfriadas e 55,5% (10/18) em carcaças congeladas. Dentre estas amostras, 83,3% (15/18) foram identificadas como *C. jejuni*, 66,6% (12/18) como *C. coli* e 50% (9/18) foram positivas para ambas espécies. Estes resultados contribuem para a proposição de que carcaças de frangos de corte prontas para consumo podem ser uma importante fonte de transmissão destes patógenos para humanos.

Palavras chave: Campilobacteriose, carne de frango, abatedouros avícolas

ABSTRACT

The species of thermophilic *Campylobacter* are agent of outbreaks of campylobacteriosis and birds and products derivate were considered important sources of infection for humans. In this study were identified thermotolerant species of *Campylobacter* in chilled and frozen broiler carcasses, collected in three slaughterhouses in Rio Grande do Sul, between 2014 and 2015. Detection of *Campylobacter* spp. was conducted by conventional microbiology and identification of *Campylobacter* by multiplex-PCR, able to differentiate *C. jejuni* and *C. coli*. Of the 36 samples of cooled and frozen carcasses *Campylobacter* was found in 23 (63.8%) carcasses, which 72.2% (13/18) in cooled substrates and 55.5% (10/18) in frozen carcasses. Among these samples 83.3% (15/18) were identified as *C. jejuni*, 66.6% (12/18) as *C. coli* and 50% (9/18) were positive for both species. These results contribute to the proposition that carcasses of broilers ready for consumption can be an important source of transmission of these pathogens for humans.

Key words: Campylobacteriosis, broiler carcasses, slaughterhouses.

1. INTRODUÇÃO

A campilobacteriose é uma zoonose emergente de origem alimentar com envolvimento principal das cepas termofílicas *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari* e *C. upsaliensis*. Esta doença é reconhecida como problema de saúde pública com cerca de 76 milhões de ocorrências nos Estados Unidos e com a caracterização das espécies *C. jejuni* e *C. coli* dentre as envolvidas em surtos (Marinou et al., 2012; EFSA 2013).

Foi estimado pela EFSA (2013) que entre 50 e 80% das infecções em humanos teria origem avícola, sendo as aves e produtos derivados considerados fontes primárias de campilobacteriose (HUMPHREY et al., 2007). Apesar de serem termofílicas em seus requisitos de crescimento, *C. jejuni* e *C. coli* não resistem a altas temperaturas e, conseqüentemente, não sobrevivem em alimentos pasteurizados ou adequadamente cozidos (PARK, 2002), além de serem sensíveis à dessecação (FORSYTE, 2012). Entretanto, as superfícies das carcaças de aves e miúdos permanecem úmidas durante a comercialização, protegendo as bactérias da dessecação durante a estocagem, tornando estes produtos possíveis veículos de transmissão de *Campylobacter* spp. ao homem (HOBBS & ROBERTS, 1999).

As infecções em humanos ocorrem com a ingestão de um número relativamente baixo de células bacterianas (entre 500 e 800 UFC) e as manifestações clínicas geralmente são gastrointestinais, com cerca de sete dias e melhora espontânea do quadro clínico. Os sintomas clássicos da infecção incluem diarreia, frequentemente hemorrágica, dor abdominal, febre, mialgia e raramente vômitos (HUMPHREY et al., 2007, BORSOI et al. 2011, CDC, 2014).

A carência de relatos de casos e notificações de campilobacteriose são um problema na maioria dos países e as taxas de ocorrência correspondem apenas aos casos confirmados em laboratório. Como consequência, estima-se que a real taxa de infecção seja entre 7,6 a 100 vezes superior à relatada (FAO, 2014). No Brasil, assim como nos demais países em desenvolvimento, não existem programas nacionais de vigilância que investiguem a campilobacteriose ou padrões microbiológicos para alimentos vigentes para esta bactéria

Diante do exposto, este trabalho mostra a identificação de espécies termotolerantes de *Campylobacter*, associadas a surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs), em carcaças resfriadas e congeladas, destinadas ao consumo humano.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem e locais de coleta

O trabalho foi realizado em três abatedouros de frangos de corte no norte do estado do Rio Grande do Sul, sendo dois sob Serviço de Inspeção Federal (SIF) e um sob Inspeção Estadual (CISPOA). As coletas foram realizadas entre novembro de 2014 a abril de 2015, com duas visitas em cada abatedouro, e as carcaças coletadas após resfriamento em *chiller*, resfriadas a 4°C e congeladas a -12°C, em triplicata, totalizando 54 carcaças. Estas foram acondicionadas em sacos plásticos individuais, identificadas com lacres oficiais e encaminhadas ao laboratório, onde foram rinsadas com 400 mL de água peptonada tamponada (APT, Oxoid®) e homogeneizados por 30 segundos.

As análises de microbiologia convencional foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Centro de Pesquisa em Alimentação da Universidade de Passo Fundo (CEPA-UPF), e os ensaios de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para identificação das colônias compatíveis com *Campylobacter* no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CDPA-UFRGS).

2.2. Microbiologia convencional para identificação de *Campylobacter* spp.

Para a detecção de *Campylobacter* spp. foi utilizada a metodologia adaptada da ISO 10272-1 (2006), utilizando-se como controle positivo *Campylobacter coli* ATCC 33559 e controles negativos *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Proteus mirabilis* ATCC 35659. Para o enriquecimento, 1 mL de cada uma das amostras foi transferido para tubos contendo 9 mL do caldo Bolton. Os tubos foram incubados em atmosfera microaerófila (Microaerobac Probac®) a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 4 horas e posteriormente transferidos para $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ por $44 \pm 4\text{h}$.

Após, de cada cultura do caldo Bolton inoculou-se uma alçada de 10 µL sobre a superfície dos ágaros Charcoal Cefopezarona Desoxicolato Modificado (mCCDA) (CM739, Oxoid®, UK) e Columbia sangue (CBA) (CM331B, Oxoid®, UK) com suplemento seletivo contendo Cefoperazona 32mg/L e Amfotericina B 10mg/L (SR155, Oxoid®, UK), sendo as placas incubadas a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ por $44 \pm 4\text{h}$, em microaerofilia (Microaerobac, Probac®).

As colônias compatíveis com *Campylobacter* spp. foram selecionadas e estriadas por esgotamento em Ágar Columbia Sangue (CBA) e incubadas a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 a 48 horas, em microaerofilia. Após, foram realizados os testes de coloração de Gram, motilidade,

oxidase e catalase para identificação de *Campylobacter*. Estas colônias foram armazenadas em Caldo Brucella (CM0169, Oxoid) com glicerol e congeladas a - 20°C até os ensaios de PCR.

2.3.Extração de DNA e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

A extração de DNA das amostras e a análise por *multiplex*-PCR foram realizadas conforme Borsoi et al. (2009). Brevemente, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado. O *pellet* obtido foi suspenso em 800 µL de água ultrapura, homogeneizado e novamente centrifugado a 12.000 rpm por cinco minutos. Este procedimento foi realizado quatro vezes e o material ressuspenso em 200 µL de água ultrapura. Em seguida, as amostras foram colocadas em bloco térmico entre 96°C e 98°C por 10 minutos, centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante armazenado para as análises por *multiplex*-PCR.

Utilizou-se o *multiplex*-PCR proposto por Denis et al. (1999) adaptado por Perdoncini et al. (2015) para diferenciar *C. jejuni* e *C. coli*, com três pares de *primers* para cada reação, baseados na sequência para região 16rRNA comum entre as espécies, como segue: MD16S1 (5'-ATC TAA TGG CTT AAC CAT TAA AC - 3') e MD16S2 (5' -GGA CGG TAA CTA GTT TAG TAT T - 3'), com 857pb. A identificação das espécies *C. jejuni* e *C. coli* foram baseadas no gene *mapA* e *ceuE*, respectivamente, com a sequência de *primers* MD*mapA*1 (5' -CTA TTT TAT TTT TGA GTG CTT GTG - 3') e MD*mapA*2 (5'-GCT TTA TTT GCC ATT TGT TTT ATT A - 3') para o gene *mapA* e COL3 (5' -AAT TGA AAA TTG CTC CAA CTA TG - 3') e MDCOL2 (5' -TGA TTT TAT TAT TTG TAG CAG CG-3') para o gene *ceuE*.

As reações ocorreram em termociclador (*Biocycler-Peltier Thermal Cycler*) com desnaturação inicial de 95 °C por 10 minutos; 35 ciclos a 95 °C por 30 segundos; anelamento a 59 °C por 1 minuto e 30 segundos; extensão a 72 °C por 1 minuto e extensão final a 72 °C por 10 minutos. A eletroforese dos amplicons foi realizada em gel de agarose a 1,5% (Invitrogen), corado com brometo de etídio e visualizado em sistema de foto documentação com transluminador ultravioleta (UV) (ATTO®).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 36 amostras de carcaças resfriadas e congeladas foi verificada positividade para *Campylobacter jejuni* e/ou *C. coli* em 23 carcaças (63,8%).

Tabela 1. Ocorrência de *Campylobacter jejuni* e/ou *C. coli* em carcaças de frango resfriadas e congeladas coletadas em abatedouros avícolas.

Abatedouro	Carcaças	Carcaças	Total (%)
	Resfriadas (%)	Congeladas (%)	
A	33,3%	0%	16,66%
B	100%	66,6%	83,33%
C	83,3%	100%	91,7%
TOTAL	72,2%	55,5%	63,8%

Neste trabalho, a ocorrência de *Campylobacter* termotolerantes em carcaças resfriadas foi 72% e para carcaças congeladas 55%. Os resultados deste trabalho são superiores aos citados por Mulinari et al. (2014), que identificou *Campylobacter* em 43,2% carcaças de frangos e em 7,7% dos miúdos e cortes avaliados.

Concordando com este estudo, Franco et al. (2004) citam que *C. jejuni* sobrevive em ambientes e alimentos refrigerados melhor do que em temperatura ambiente, contrariando as características tradicionais de outras bactérias. Neste sentido, Maziero e Oliveira (2010), ao analisar carne de frango após a embalagem no frigorífico, 4 dias a 4°C e 28 dias a 20°C negativos, citam que houve diferença significativa em UFC/g de *Campylobacter* spp. entre amostras frescas e armazenadas sob refrigeração ou congelamento, indicando que a bactéria pode sobreviver bem ao período de comercialização de carnes resfriadas.

Estes resultados estão em concordância também com Bhaduri e Cottrell (2004) que, ao avaliarem a sobrevivência de *C. jejuni* a 4°C e -20°C em carne de frango, artificialmente contaminadas e irradiadas, concluíram que a refrigeração reduziu as contagens da bactéria após 3 e 7 dias, mas células viáveis ainda podiam ser detectadas após 14 dias de estocagem.

Dados do FDA (2011) revelam uma variação entre 30 e 100% das aves que carregam este microrganismo e de 20 a 100% de contaminação nos produtos do varejo. Esta variação é confirmada por Medeiros et al. (2012), que ao avaliar 30 carcaças de frango resfriadas identificaram *Campylobacter* spp. em 21 amostras (70%), sendo 28,6% em abatedouros, 38,1% em supermercados e 7, 33% em feiras livres.

A sobrevivência de *Campylobacter* em amostras resfriadas é citada por Azeredo et al. (2010), que avaliou carcaças de frango após o resfriamento e constatou que *Campylobacter* spp. manteve-se viável a 4°C; Badaró (2013), ao citar 44 % de positividade em carcaças de frango provenientes de abatedouros do Estado de Minas Gerais; Oliveira e Oliveira (2013) com 20% de positividade em carcaças na saída do *chiller* e Maziero (2007), com a detecção de *Campylobacter* termotolerantes em 53,3% em amostras de carne de frango resfriadas e 36,67% em amostras congeladas.

Já a sobrevivência de *Campylobacter* em amostras congeladas é relatada por Lee et al., (1998), que citam que *Campylobacter* pode ser inativado em temperaturas a partir de 15°C negativos. Entretanto, para os autores o congelamento não eliminaria o patógeno em alimentos previamente contaminados.

Além da ocorrência de *Campylobacter* nas carcaças de frango avaliadas no presente estudo destaca-se a identificação de espécies termotolerantes associadas as DTAs, com 44,4% (16/36) de *C. jejuni*, 36% (13/36) de *C. coli* e 16,7% (6/36) para ambas. A prevalência destas espécies é citada também por Perdoncini et al., (2015), que identificaram *Campylobacter jejuni* e/ou *C. coli* em 37,1% de 105 carcaças resfriadas. As carcaças avaliadas eram oriundas de cinco matadouros-frigoríficos do estado do Rio Grande do Sul, com ocorrência entre zero e 71,4%

Sierra Argüello et al. (2015) citam a presença de *Campylobacter jejuni* em 140 amostras (99,2%) e *Campylobacter coli* em uma amostra (0,7%) ao avaliar fezes (n=8), água do *chiller* (n=18), carcaças de frango (n=26) e carne de frango pronta para o consumo (n=89) oriundas de abatedouros de aves também neste Estado. Já Hue et al. (2011) demonstraram 57,1% de *C. jejuni* e 42,5% de *C. coli* em 532 carcaças de frango avaliadas.

A contaminação cruzada devido à manipulação inadequada de alimentos no ambiente doméstico é considerada uma fonte importante de infecção (MATTICK et al., 2003). A positividade encontrada nesse estudo e os resultados demonstrados por outros autores, evidenciando a contaminação por *Campylobacter* nos produtos avícolas é preocupante, visto que a dose infectante para *Campylobacter* é baixa. Além disto, as espécies identificadas são termotolerantes, e conseqüentemente passíveis de causar DTAs. Por tratar-se de um produto resfriado e/ou congelado, onde microrganismos deste gênero podem sobreviver às condições de armazenamento, deve-se induzir a prevenção das infecções por *Campylobacter* com instruções adequadas ao consumidor final, bem como a aplicação das Boas Práticas de Fabricação e a indicação de cozimento adequado a estes produtos.

4. CONCLUSÃO

Verificou-se a presença de cepas termotolerantes de *Campylobacter* em 63,8% das carcaças de aves congeladas e resfriadas avaliadas, indicando estes produtos finais como prováveis fontes de transmissão de *Campylobacter* para humanos.

AGRADECIMENTO

Ao apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, Programa Pesquisador Gaúcho - PqG – Edital FAPERGS nº 004/2012).

REFERÊNCIAS

AZEREDO L.I.; LUCHESE R.H.; LAURIA-FILGUEIRAS A.L. *Campylobacter* spp. em carne de ave crua: avaliação da etapa de resfriamento. Revista Instituto Adolfo Lutz. p.518-524, 2010.

BADARÓ, A. C. L. Qualidade de carcaças de frango de abatedouros do estado de minas gerais: ocorrência de *Campylobacter jejuni* e perfil de resistência a antimicrobianos. 2013. 174f. Tese de doutorado – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa.

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

BORSOI, A. et al. An inoculation of newly hatched broiler chicks with two Brazilian isolates of *Salmonella* Heidelberg strains with different virulence gene profiles, antimicrobial resistance and pulsed field gel electrophoresis patterns to intestinal changes evaluation. Poultry Science, v. 88, p. 750-758, 2009

BORSOI, A.; NASCIMENTO, V.P. 2011. In: *Campylobacter* em produtos avícolas e sua importância na saúde pública. Disponível em: <http://pt.engormix.com/MA-avicultura/>

administracao/artigos/campylobacter-produtos-avicolas-sua-t777/124-p0.htm. Acesso em: 03 de abril de 2013.

BRASIL. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Dispõe sobre os princípios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2001. Disponível em: <http://www.abic.com.br/arquivos/leg_resolucao12_01_anvisa.pdf>. Acesso em: 20.07.2015.

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

EFSA Journal. Trends summary report on zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks 2013 <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3991.pdf> 2015.

FDA. US Food and Drug Administration. Center For food Safety and Applied Nutrition. 2011. Disponível em <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5125a2.htm>>. Acesso em 12 de maio de 2014.

FAO. Risk Assessment of thermophilic *Campylobacter* spp. in broiler chickens. <http://www.fao.org/docrep/008/y8145e/y8145e07.htm>. Acesso em 01 de julho de 2015.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. 2004. Microbiologia dos Alimentos. São Paulo. Ed. Atheneu, 182p.

FORSYTHE, S.J. Microbiologia da segurança alimentar. Rio Grande do Sul: Artmed, 2012, p. 208-212

HOBBS, B.C.; ROBERTS, D. Toxinfecções e controle higiênico-sanitário de alimentos. 2ª Ed, São Paulo: Varela, 1999. p.123-124.

Hue O *et al.* *Campylobacter* contamination of broiler caeca and carcasses at the slaughterhouse and correlation with *Salmonella* contamination. Food Microbiology. p.862-868, 2011. doi:10.1016/j.fm.2010.11.003

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

ISO 10272-1:2006. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Campylobacter* spp. Part 1: Detection method. *Internacional Standard -ISO*. Geneva 20, Switzerland; p. 1–16, 2006.

LEE, A.; SMITH, S.C.; COLOE, P.J. Survival and growth of *Campylobacter jejuni* after artificial inoculation onto chicken skin as a function of temperature and packaging 60 conditions. *Journal of Food Protection*, v.61, 1998. p. 1609-1614.

MARINOU, I.; BERSIMIS, S.; IOANNIDIS, A.; NICOLAOU, C.; MITROUSSIAZIOUVA, A.; LEGAKIS, J.L.; CHATZIPANAGIOTOU, S. Identification and antimicrobial resistance of *Campylobacter* species isolated from animal sources. *Frontiers in Microbiology*. V.3 p.1-6, 2012.

MATTICK, K.; DURHMAN, K.; DOMINIGUE, G.; JORGENSEN, F.; SEN, M.; SCHAFFNER, D. W.; HUMPHREY, T. The survival of foodborne pathogens during domestic washing up and subsequent transfer onto washing-up sponges, kitchen surfaces, and food. *International Journal of Food Microbiology*, v. 85, p. 213-226, 2003.

MAZIERO, M. T. Contaminação de carcaças de frango por *Campylobacter jejuni* antes e após o armazenamento sob resfriamento ou congelamento. 2007. 56f. Dissertação de mestrado - Curso de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina.

MAZIERO, M. T.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Effect of refrigeration and frozen storage on the *Campylobacter jejuni* recovery from naturally contaminated broiler carcasses. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v. 41, p. 501-505, 2010.

MEDEIROS, V.M.; BRICIO, S.M.L.; FILGUEIRAS, A.L.L.; CLEMENTINO, M.B.M. Utilização de caldo Bolton no enriquecimento seletivo em comparação ao plaqueamento

direto na pesquisa de *Campylobacter* spp. em carcaças resfriadas de frango. Revista do Instituto Adolfo Lutz, v.71, p. 456-461. 2012.

MULINARI, E. L.; SALVATORI, R. U.; MAJOLO, C. Enumeração de *Campylobacter* em carcaças, cortes e miúdos de frango produzidos no Rio Grande do Sul. Caderno Pedagógico, v.11, p. 91-98, 2014.

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

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

PERDONCINI, G.; SIERRA-ARGUELLO, Y. M.; LIMA, L. M.; TRINDADE, M. M.; GOMES, M. J. P.; SANTOS, L. R.; SCHMIDT, V.; NASCIMENTO, V. P. Occurrence of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* on broiler carcasses after chilling in southern Brazil. Pesquisa Veterinária Brasileira. Vol. 35, p.349-352, 2015.

SIERRA ARGÜELLO Y. M. PERDONCINI, G.; GOMES, M. J. P e NASCIMENTO, V. P. Detecção de fatores de virulência e resistência antimicrobiana em estirpes de *Campylobacter* spp. em isolados de matadouros-frigoríficos de aves na região sul do brasil. 2015. 118f. Tese de doutorado - Programa de Pós-Graduação Em Ciências Veterinárias. Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul

6. CONCLUSÕES

O número crescente e a gravidade de doenças transmitidas por alimentos em todo o mundo têm aumentado consideravelmente. Bactérias do gênero *Campylobacter* spp. são reconhecidas como importantes patógenos de origem alimentar e agentes de enterites em humanos, com as espécies termofílicas *Campylobacter jejuni* e *C. coli* especialmente notificadas nos surtos de campilobacteriose em humanos e as aves consideradas dentre as principais fontes de infecção. Conforme os resultados deste estudo concluiu-se que:

- a) *Campylobacter* spp. foi identificado em todos os pontos de coleta nos abatedouros de frangos de corte avaliados, mantendo-se viável até os produtos finais e com maior ocorrência em carcaças resfriadas e congeladas;
- b) *Campylobacter* spp. foi isolado nas gaiolas de transporte das aves mesmo após a higienização das mesmas, evidenciando a ineficiência do procedimento utilizado nos abatedouros avaliados;
- c) As espécies termofílicas *Campylobacter jejuni* e *C. coli* foram identificadas em carcaças resfriadas e congeladas, evidenciando a capacidade de sobrevivência destes agentes a estas condições de armazenagem.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Doenças transmitidas por alimentos (DTAs) constituem uma preocupação mundial em saúde pública, sendo que nas últimas décadas o aumento de sua ocorrência pode ser observado em várias partes do mundo. *Campylobacter* spp. vem se destacando dentre as principais causas bacterianas de DTAs em diversos países, que associam a maioria dos surtos ao consumo ou manuseio incorreto de carne de frango contaminada. No Brasil há poucas informações oficiais sobre a ocorrência de campilobacteriose de origem alimentar ou dados de prevalência de *Campylobacter* spp. em abatedouros de frangos de corte.

Neste contexto, um dos objetivos deste estudo, que era avaliar a contaminação por *Campylobacter* spp. em diferentes pontos da tecnologia de abate de frangos de corte por microbiologia convencional, foi plenamente alcançado. No transcorrer do projeto também foi possível identificar as espécies termotolerantes *Campylobacter jejuni* e *C. coli* por *Multiplex* – PCR, caracterizando as amostras de carcaças resfriadas e congeladas como potencialmente capazes de causar DTAs.

A quantificação de *Campylobacter* spp. nos diferentes elos da cadeia produtiva de aves e no monitoramento dos riscos microbiológicos desde as granjas até as carcaças resfriadas ou congeladas pode ser uma ferramenta útil para direcionar ações que resultem na redução deste patógeno nos produtos avícolas e conseqüentemente nos riscos para o consumidor final. Neste cenário, a quantificação por PCR em tempo real será realizada assim que possível e os dados gerados publicados em revistas da área de estudo.

E ainda, considerando o alto consumo da carne de frango, será realizado um novo estudo, visando a detecção e quantificação deste agente em amostras de varejo, como cortes congelados e resfriados, a fim de fornecer dados sobre a contaminação por *Campylobacter* spp. e termofílicos em produtos prontos para o consumo humano. Mesmo que estes produtos não sejam consumidos crus, existe uma preocupação visto que a contaminação cruzada contribui para o surgimento das DTAs.

Por fim, em função destes produtos serem destinados diariamente a milhões de consumidores, ressalta-se a importância do estabelecimento de programas nacionais de vigilância e de padrões microbiológicos em alimentos que contemplem *Campylobacter* spp.

8. REFERÊNCIAS

1. Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual 2015. Produção e exportação Brasileira de carne de Frango em 2013. Disponível em <http://abpabr.com.br/files/publicacoes/8ca705e70f0cb110ae3aed67d29c8842.pdf> Acesso em 20.05.2015.
2. Food and Agriculture Organization. Risk Assessment of thermophilic *Campylobacter* spp. in broiler chickens. <http://www.fao.org/docrep/008/y8145e/y8145e07.htm>. Acesso em 01 de julho de 2015.
3. Butzler J-P. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. Clin Microbiol Infect [Internet]. 2004 Oct;10(10):868–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15373879>
4. 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. 2014; (12):1-314
5. 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. Morb. Mortal. Wkly Rep. 2014; (63):328-332.
6. Humphrey T, O'Brien S, Madsen M. *Campylobacters* as zoonotic pathogens: a food production perspective. Int J Food Microbiol. 2007 Jul 15;117(3):237–57
7. Kovalenko K, Roasto M, Liepins E, Maessar M, Horman A. High occurrence of *Campylobacter* spp. in Latvian broiler chicken production. Food Control. 2013 Jan; 29(1):188-191
8. Corry JE, Post DE, Colin P, Laisney MJ. Culture media for the isolation of *Campylobacters*. Int J Food Microbiol. 1995 Jun 26;(1):43-76.
9. Mayr AM, 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 of Food Protection 2010; (73):241-250
10. Bonjoch X, Calvó L, Soler M, Ruiz-Rueda O, Garcia-Gil LJ. A new multiplexed real-time PCR assay to detect *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, and *C. upsaliensis*. Food Analytical Methods. 2010; (3):40-46
11. Ahmed W, Sawant S, Huygens F, Goonetilleke a, Gardner T. Prevalence and occurrence of zoonotic bacterial pathogens in surface waters determined by quantitative PCR. Water Res [Internet]. 2009 Nov;43(19):4918–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19631959>

12. 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*. 2011; (28):1353-1358
13. *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*. Genus *Campylobacter*. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/campylobacter.html>> acesso em 30/05/2014
14. Food and Drug Administration. *Bad Bug Book Handbook of Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Introduction*. second. Food and Drug Administration; 2012. 292 p.
15. Portner DC, Leuschner RGK, Murray BS. Optimising the viability during storage of freeze-dried cell preparations of *Campylobacter jejuni*. *Cryobiology*, 1995; (54):265-270
16. Forsythe SJ. *Microbiologia da segurança alimentar*. Rio Grande do Sul: Artmed, 2012, p. 208-212
17. Jang K Il, Kim MG, Ha S Do, Kim KS, Lee KH, Chung DH, et al. Morphology and adhesion of *Campylobacter jejuni* to chicken skin under varying conditions. *J Microbiol Biotechnol*. 2007; 7(2):202–6
18. Germano PML, Germano MIS. *Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos*., Ed. 2. São Paulo: Varela, p. 629, 2003.
19. Wassenaar TM, Newell DG. The genus *Campylobacter*. In: DWORKIN, M. (Ed.). *The prokaryotes a handbook on the biology of bacteria*. V.7: Proteobacteria: delta and epsilon subclasses. *Deeply Rooting Bacteria*. New York: Springer Science. 2006; 119-138.
20. Levin R. *Campylobacter jejuni*: A Review of its Characteristics, Pathogenicity, Ecology, Distribution, Subspecies Characterization and Molecular Methods of Detection. *Food Biotech.*, 2007 (21):271–347
21. Biase SR, Macedo REF, Malaquias MAS, Franchin PR. Prevalence, strain identification and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. isolated from slaughtered pig carcasses in Brazil. *Food Control*. 2011; (22):702-707
22. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA, Taniwaki MH, Santos RFS, Gomes RAR. *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos*, 4^a ed. São Paulo: Varela, p.223-233, 2010
23. Wingstrand A. *et al.* Fresh chicken as a main risk factor campilobacteriosis, Denmark. *Emerging Infectious Diseases*. 2006; (12):280-284
24. World Health Organization. Food safety and foodborne illness. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/en/>> acesso em 31.03.2014.

25. Santos JFA. Caracterização de isolados de *Campylobacter jejuni* de origem animal e humana quanto a seus fatores genéticos de virulência. 2011. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
26. 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*, 2006, (110):240-245
27. New Zealand Public Health Surveillance Report. March 2014: Covering October to December 2013. Volume 12 Issue 1 ISSN 1176-2888 (Print) ISSN 1178-8313 (Online)
28. Vaz CSL. Anais / I Workshop de Diagnóstico Microbiológico de *Campylobacter* Aplicado à Avicultura. Editora - Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2012.
29. Organização Internacional das Epizootias. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for terrestrial Animals., p.1185-1191, 2008. Disponível em:<http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.09.03_CAMPYLO.pdf>. Acesso em: 20.05.2015.
30. Berrang ME, Hofacre CL, Meinersmann RJ. Forced hot air to dry feces and kill bacteria on transport cage flooring. *J Appl Poult Res*. 2011b;20(4):567-72
31. Mead G, Hudson WR, Hinton MH. Effect of changes in processing to improve hygiene control on contamination of poultry carcasses with *Campylobacter*. *Methods*. 1995, 495-500
32. Peyrat MB, Soumet C, Maris P, Sanders P. Recovery of *Campylobacter jejuni* from surfaces of poultry slaughterhouses after cleaning and disinfection procedures: Analysis of a potential source of carcass contamination. *International Journal of Food Microbiology*, 2008; (124):188-194
33. Hue O, Bouquin SL, Laisney MJ, Allain V, Lalande F, Petetin I, Rouxel S, Quesne S, Gloaguen PY, Picherot M, Santolini J, Bougeard S, Salvat G, Chemaly M. Prevalence of and risk factors for *Campylobacter* spp. Contamination of broiler chicken carcasses at the slaughterhouse. *Food Microbiology*. 2010; (27): 992-999
34. Hansson I, Ederoth M, Andersson L, Vagsholm I, Olsson EE. Transmission of *Campylobacter* spp. to chickens during transport to slaughter. *Journal of Applied Microbiology*. 2005; (99):1149-1157
35. Klein G, Reich F, Beckmann L, Atanassova V. Quantification of thermophilic *Campylobacter* spp. in broilers during meat processing. *Antonie Van Leeuwenhoek* [Internet]. 2007 Oct [cited 2014 Mar 21];92(3):267-73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17372846>
36. Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food (ACMSF). Surveillance: The isolation of *Campylobacter* spp. from food and environmental samples.

- In:Advises the Food Standards Agency on the Microbiological Safety of Food, 2010. Anual Reports – Discussion paper, 2010.
37. Hunt A.J.M.; Abeyta C.; Tran T. BAM : *Campylobacter*. 2015;(17):1–30
 38. Bolton FJ, Robertson L. A selective medium for isolating *Campylobacter jejuni/coli*. J Clin Pathol. 1982;35(4):462–7
 39. Bi S, Shi L, Yan H, Meng H. Comparison of various culture methods (Skirrow medium, a blood-free medium and a filtration system enriched in Bolton and Preston broths) for isolation of *Campylobacter* spp. from raw meat samples. Ann Microbiol [Internet]. 2012 Apr 20 [cited 2014 Mar 21];63(1):179–85. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13213-012-0459-y>
 40. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Manual de Procedimientos *Campylobacter* [Internet]. Buenos Aires, Argentina; 2001. p. 29. Available from: http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/gss/publications/documents/Argentina-LevelII/ManualProcedimientos_Campylobacter.pdf. Acesso em março de 2015.
 41. Medeiros, V.M., Bricio S.M.L., Filgueiras, A.L.L., Cleimentino, B.M. Use of Bolton for selective enrichment and comparative analysis of its performance with direct plating methodology for isolating *Campylobacter* spp from chilled chicken carcasses. Revista Adolfo Lutz, 2012 (71):456-461
 42. United States Department of Agriculture. US. Isolation and Identification of *Campylobacter jejuni / coli / lari* from Poultry Rinse , Sponge and Raw Product Samples Effective MLG 41.03. Disponível em: <http://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/science/laboratories-and-procedures/guidebooks-and-methods/microbiology-laboratoryguidebook/microbiology-laboratory-guidebook>. Acesso em abril de 2015.
 43. ISO 10272-1:2006. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Campylobacter* spp. Part 1: Detection method. Internacional Standard -ISO. Geneva 20, Switzerland; 1–16
 44. Koneman EW et al. Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 5ªed.
 45. Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. Microbiologia de Brock. 12 ed., Porto Alegre: Artmed, 2010, 1054p.
 46. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. Biotechniques [Internet]. 2005 Jul;39(1):75–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16060372>
 47. Marcelino FC. Avaliação de Resíduos transgênicos em alimentos no Brasil e desenvolvimento de metodologias de análise, 2006, p 132 – Tese de Doutorado – Universidade Federal de Viçosa.

48. Hong J, Jung WK, Kim JM, Kim SH, Koo HC, Ser J, et al. Quantification and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in raw chicken meats using a real-time PCR method. *J Food Prot.* 2007; 70(9):2015–22.
49. Leblanc-Maridor M, Beaudeau F, Seegers 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. *BMC Microbiol* [Internet]. BioMed Central Ltd; 2011 Jan [cited 2014 Mar 23];11(1):113. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3123193&tool=pmcentrez&rerenderty=abstract>
50. Borsoi A et al.. An inoculation of newly hatched broiler chicks with two Brazilian isolates of *Salmonella* Heidelberg strains with different virulence gene profiles, antimicrobial resistance and pulsed field gel electrophoresis patterns to intestinal changes evaluation. *Poultry Science.* 2009; (88):750-758.
51. 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.* 1990; (29):406-410.
52. Perdoncini G, Sierra-Arguello Y.M, Lima LM, Trindade MM, Gomes MJP, Santos L R, Schmidt V, Nascimento VP. Occurrence of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* on broiler carcasses after chilling in southern Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira.* 2015; (35):349-352
53. Qiagen. *mericon Pathogen Detection Handbook*, 2012, July. Number Report: 1070706. Disponível em: <file:///C:/Users/user/Downloads/EN-mericon-Pathogen-Detection-Handbook.pdf>. Acesso em maio de 2015.