

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL**

**AVALIAÇÃO DO NÍVEL DE CONTAMINAÇÃO DE CAMPYLOBACTER SPP. EM  
CORTES DE PERU PRODUZIDOS EM UM ABATEDOURO DO RIO GRANDE DO  
SUL**

**CARLOS ALBERTO FÜHR**

**PORTO ALEGRE**

**2023**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL**

**AVALIAÇÃO DO NÍVEL DE CONTAMINAÇÃO DE CAMPYLOBACTER SPP. EM  
CORTES DE PERU PRODUZIDOS EM UM ABATEDOURO DO RIO GRANDE DO  
SUL**

**Autor: Carlos Alberto Führ**

**Dissertação apresentada à Faculdade de  
Veterinária como requisito parcial para  
obtenção do grau de Mestre Profissional do  
Programa de Pós-Graduação em Alimentos  
de Origem Animal**

**Orientador: Liris Kindlein  
Coorientador: Guiomar Pedro Bergmann**

**PORTO ALEGRE**

**2023**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

#### CIP - Catalogação na Publicação

Führ, Carlos Alberto  
Avaliação do nível de contaminação de *Campylobacter* spp. em cortes de peru produzidos em um abatedouro do Rio Grande do Sul / Carlos Alberto Führ. -- 2023.  
111 f.  
Orientadora: Liris Kindlein.

Coorientador: Guiomar Pedro Bergmann.

Dissertação (Mestrado Profissional) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Alimentos de Origem Animal, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. *Campylobacter*. 2. carne de peru. 3. ISO 10272. 4. PCR tempo real. 5. TEMPO CAM. I. Kindlein, Liris, orient. II. Bergmann, Guiomar Pedro, coorient. III. Título.

Carlos Alberto Führ

AVALIAÇÃO DO NÍVEL DE CONTAMINAÇÃO DE *CAMPYLOBACTER* SPP. EM  
CORTES DE PERU PRODUZIDOS EM UM ABATEDOURO DO RS

Aprovado em 29 NOV 2023

APROVADO POR:

---

Prof. Dra. Liris Kindlein

Orientadora e Presidente da Comissão

---

Prof. Dra. Susana Cardoso

Membro da Comissão

---

Dr. Audecir Giombelli

Membro da Comissão

---

Dr. Heitor Daguer

Membro da Comissão

*Dedico este trabalho à minha esposa Gesele  
e à minha filha Barbara*

## AGRADECIMENTOS

A conquista de um sonho é possível quando o esforço e a dedicação estão presentes a cada instante de nossa vida. Acreditar, lutar e ter metas faz com que muitas portas se abram. A nova caminhada que iniciei em 2021 na UFRGS através da Faculdade de Veterinária, concedeu-me a possibilidade de conhecer pessoas incríveis e adquirir novos conhecimentos que ficarão em minha memória eternamente. Este trabalho é resultado de um grupo de trabalho, porque sozinho, não seria possível chegar tão longe.

Serei eternamente grato à professora e orientadora Liris Kindlein que me motivou a participar da seleção do PPGAOA. Mesmo não estando certo do que estaria por vir, resolvi encarar mais este desafio especialmente por não ter formação na área da veterinária. Graças à sua orientação, atenção e todo suporte consegui chegar até este momento. Meu muito obrigado a você! Admiro muito seu trabalho e dedicação em prol do ensino e do conhecimento.

Ao professor Guiomar Pedro Bergmann, que além de co-orientador, também esteve presente desde o início da minha jornada no PPGAOA. Muito obrigado!

À empresa Seara Alimentos Ltda, por ter confiado a mim esta oportunidade no direcionamento desta pesquisa e aperfeiçoamento profissional, pelo incentivo e apoio financeiro para execução deste trabalho.

Aos colegas de trabalho do Laboratório de Alimentos, meu agradecimento mais que especial para Bruna, Mariane, Paula, Monica, Giorgia, Jennifer e Cristiane que trabalharam incessantemente para garantir que esta pesquisa fosse realizada de acordo com o cronograma estabelecido sem quaisquer interrupções. A preocupação com a organização e com a execução dos ensaios esteve presente do início ao fim do trabalho, os requisitos técnicos e a confiança sobre cada resultado de ensaio foram fundamentais para o bom andamento deste trabalho. Vocês são 10! Muito obrigado!

À minha família que sempre acreditou em mim, em especial minha esposa Gesele, que além de incentivar e dar apoio desde o início, teve paciência, tolerância e compreensão durante os momentos em que estive ausente para poder dedicar-me aos estudos e ao projeto.

À todas as outras pessoas, que não foram poucas e nem menos importantes que ajudaram e colaboraram de alguma forma na realização desta pesquisa.

À Deus, pelo dom da vida e por permitir que eu concluísse mais esta importantíssima etapa de minha vida.

“Educação gera conhecimento, conhecimento gera sabedoria,  
E só um sábio pode mudar seu destino”  
*(Samuel Lima)*

## RESUMO

*Campylobacter* spp. é considerado um dos principais microrganismos associados a doenças gastrointestinais em seres humanos, estando entre os microrganismos patogênicos que representam grande ameaça à saúde humana, principalmente devido ao consumo de carne de aves. No Brasil, por existir apenas um programa de monitoramento em carne de frango e por não existirem dados disponíveis para carne de peru, é fundamental que sejam avaliados os índices de contaminação por *Campylobacter* spp. da carne de peru brasileira. Este estudo está subdividido em dois artigos que abordam o índice de contaminação e métodos alternativos para quantificação de *Campylobacter* spp. em carne de peru. No primeiro artigo, foram analisados semanalmente através da metodologia de referência ISO 10272-2:2017, quatro cortes resfriados e quatro cortes congelados de carne de peru durante um período de 12 meses, totalizando 416 amostras, que apresentaram quantificação do microrganismo em 12 amostras (2,88%). Ao serem comparados a condição da carne de peru resfriada e congelada, foi constatada diferença significativa ( $P < 0,05$ ), sendo que das 12 amostras quantificadas, 11 eram cortes resfriados e apenas uma amostra era congelada, levando a considerar que o congelamento possui ação mitigatória da contaminação pelo agente. Os resultados para influência da sazonalidade climática não apresentaram diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre as estações do ano, resultados que não apresentaram influência na contaminação por *Campylobacter* spp. No segundo artigo, foram avaliados os métodos alternativos TEMPO<sup>®</sup> CAM e PCR em tempo real (rtPCR) Bioteccon<sup>®</sup> em comparação à metodologia de referência ISO 10272-2:2017. Foram analisadas 416 amostras durante o período de 12 meses. A metodologia TEMPO<sup>®</sup> com o uso do kit TEMPO<sup>®</sup> CAM ao ser comparada com a metodologia de referência através dos testes de Kruskal-Wallis e Bland-Altman não apresentou resultados satisfatórios em nenhuma das avaliações, no entanto, na comparação do rtPCR Bioteccon<sup>®</sup> o desempenho foi satisfatório, porém apresentando uma condição limitada de quantificação na faixa de 100 UFC/g. A partir deste estudo foi possível concluir que os níveis de contaminação por *Campylobacter* spp. da carne de peru resfriada e congelada foram baixos. O congelamento foi favorável para redução do microrganismo e o efeito da sazonalidade climática não foi conclusivo. Não foi possível recomendar o uso da metodologia alternativa TEMPO<sup>®</sup> com o uso do kit TEMPO<sup>®</sup> CAM em matriz carne de peru, no entanto, para metodologia rtPCR Bioteccon<sup>®</sup> o desempenho foi satisfatório e seu uso é recomendado para matriz de carne de peru.

**Palavras-chave:** *Campylobacter*. Carne de peru. ISO 10272-2. PCR tempo real. TEMPO CAM.

## ABSTRACT

*Campylobacter* spp. is considered one of the main microorganisms associated with gastrointestinal diseases in humans, being among the pathogenic microorganisms that pose a significant threat to human health, mainly due to poultry consumption. In Brazil, because there is only one monitoring program for chicken meat and the lack of available data for turkey meat, it is crucial to evaluate the contamination rates of *Campylobacter* spp. in Brazilian turkey meat. This study is divided into two articles that address the contamination rate and alternative methods for quantifying *Campylobacter* spp. in turkey meat. In the first article, four chilled cuts and four frozen cuts of turkey meat were analyzed weekly over a period of 12 months using the ISO 10272-2:2017 reference methodology, totaling 416 samples, presenting quantification of the microorganism in 12 samples (2.88%). When comparing the condition of chilled and frozen turkey meat, a significant difference ( $P < 0.05$ ) was found, where of the 12 quantified samples, 11 were chilled cuts and only one sample was frozen, suggesting that freezing mitigates contamination by the agent. Results regarding the influence of climatic seasonality did not show a significant difference ( $P > 0.05$ ) between seasons, indicating no influence on *Campylobacter* spp. contamination. In the second article, alternative methods TEMPO<sup>®</sup> CAM and real-time PCR (rtPCR) Biotecon<sup>®</sup> were evaluated in comparison to the ISO 10272-2:2017 reference methodology. 416 samples were analyzed over 12 months. The TEMPO<sup>®</sup> methodology using the TEMPO<sup>®</sup> CAM kit did not yield satisfactory results in any of the evaluations when compared to the reference methodology through Kruskal-Wallis and Bland-Altman tests, however, when compared to rtPCR Biotecon<sup>®</sup>, the performance was satisfactory, albeit with a limited quantification condition in the range of 100 CFU/g. From this study, it was possible to conclude that contamination levels of *Campylobacter* spp. in chilled and frozen turkey meat were low. Freezing was favorable in reducing the microorganism, and the effect of climatic seasonality was inconclusive. The use of the alternative methodology TEMPO<sup>®</sup> with the TEMPO<sup>®</sup> CAM kit in turkey meat matrix couldn't be recommended, nevertheless, for the rtPCR Biotecon<sup>®</sup> methodology the performance was satisfactory, and its use is recommended for the turkey meat matrix.

**Keywords:** *Campylobacter*. ISO 10272-2. real time PCR. TEMPO CAM. turkey meat.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Ciclo e fontes de transmissão da infecção por *Campylobacter* spp..... 19
- Figura 2** - Passos da patogênese de *Campylobacter* spp. em células danificadas ..... 22

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
APHA	American Public Health Association
APPCC	Análise de perigos e pontos críticos de controle
APT	Água peptonada tamponada
ATCC	American Type Culture Collection
BPF	Boas práticas de fabricação
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CDT	Toxinas distensoras citoletais
<i>CdtA</i>	Citotoxina proteica termolábil A
<i>CdtB</i>	Citotoxina proteica termolábil B
<i>CdtC</i>	Citotoxina proteica termolábil C
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EFSA	European Food Safety Authority
FDA	Food and Drug Administration
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
ISO	International Standard Organization
LQ	Limite de Quantificação
mCCD	Ágar Modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate
MRC	Material de Referência Certificado
NMP	Número mais provável
PCR	Reação da Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
RDC	Resolução da diretoria colegiada
rtPCR	PCR em tempo real
STEC	<i>Escherichia coli</i> produtora de toxina shiga
UE	União Europeia
UFC/g	Unidade Formadora de Colônia por grama
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
VMNC	Viáveis mas não cultiváveis
WHO	World Health Organization

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>Doenças veiculadas por alimentos (DTA)</b> .....	<b>15</b>
<b>2.2</b>	<b>Principais doenças veiculadas por alimentos</b> .....	<b>17</b>
<b>2.3</b>	<b>Gênero <i>Campylobacter</i></b> .....	<b>18</b>
<b>2.4</b>	<b>Campilobacteriose</b> .....	<b>20</b>
<b>2.5</b>	<b>Mecanismos de virulência</b> .....	<b>21</b>
<b>2.6</b>	<b>Prevalência de <i>Campylobacter</i> spp. em carne de aves</b> .....	<b>23</b>
<b>2.7</b>	<b>Efeitos da sazonalidade climática para incidência de <i>Campylobacter</i> spp.</b> .....	<b>24</b>
<b>2.8</b>	<b>Processos tecnológicos que mitigam <i>Campylobacter</i> spp.</b> .....	<b>25</b>
<b>2.9</b>	<b>Métodos de ensaio para quantificação de <i>Campylobacter</i> spp. e suas variáveis</b> .....	<b>26</b>
2.9.1	Metodologia de referência para quantificação de <i>Campylobacter</i> spp. ....	28
2.9.2	Método automatizado TEMPO® .....	29
2.9.3	Método PCR em tempo real (rtPCR) .....	30
<b>3</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO I</b> .....	<b>33</b>
	<b>Avaliação do nível de contaminação de <i>Campylobacter</i> spp. em cortes de peru produzidos na região nordeste do estado do Rio Grande do Sul, Brasil</b> .....	<b>33</b>
<b>4</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO II</b> .....	<b>57</b>
	<b>Quantificação de <i>Campylobacter</i> spp. usando metodologia de referência, metodologia alternativa TEMPO® e PCR em tempo real em cortes de peru resfriados e congelados produzidos no Brasil</b> .....	<b>57</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>91</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>92</b>
	<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>93</b>
	<b>APÊNDICE A</b> .....	<b>109</b>
	<b>Avaliação do limite de quantificação e da precisão das metodologias utilizadas</b> .....	<b>109</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Durante o ano de 2022, a produção brasileira de carne de peru foi de 162 mil toneladas. Deste montante, 63,5% foram destinados ao mercado interno e 36,5% foram destinados ao mercado externo. Nas exportações, os cortes de carne de peru representam 95,9% do volume seguido pelas aves inteiras que representam apenas 0,2% e os industrializados com 3,9% do volume. Neste cenário, o estado do Rio Grande do Sul manteve a primeira colocação entre os três estados brasileiros em exportação de carne de peru, sendo responsável por uma parcela de 46,4% das exportações (ABPA, 2023).

O mercado de carne de peru do Brasil continua demonstrando seu potencial de crescimento, com um desempenho sólido em exportações e diversificação de destinos. Com o aumento da demanda internacional, o crescimento da cadeia avícola também está em constante expansão com objetivo de produzir alimentos cada vez mais seguros. Com a qualidade reconhecida da carne de peru brasileira, o setor está posicionado para continuar seu crescimento nos próximos anos. Atualmente um dos grandes desafios é o controle de bactérias do gênero *Campylobacter*, que estão entre as mais notificadas em relatos de gastroenterites bacterianas nos Estados Unidos e o principal agente causador de gastroenterite relatado na União Europeia nos últimos anos, tendo as aves como fonte principal.

A inocuidade dos alimentos de origem animal destinados ao consumo humano transformou-se em um elemento essencial dos debates sobre saúde pública tanto nacional como internacional (Oliveira *et al.*, 2008). Perante a enorme responsabilidade de produzir alimentos em grandes quantidades e com qualidade, esse trabalho foi elaborado para gerar dados e informações que venham a disponibilizar referências sobre a contaminação de *Campylobacter* spp. em cortes de peru. Este microrganismo, além de ser um dos principais agentes de infecções alimentares associadas a produtos de origem avícola, já está sendo amplamente discutido em fóruns internacionais que abordam segurança alimentar, sob os aspectos de inocuidade alimentar e comércio internacional.

A ocorrência de *Campylobacter* spp. faz parte da microbiota das aves e, portanto, poderia ser interpretado como um agente natural, sem risco à saúde. A incidência e a quantidade desse microrganismo nas aves variam conforme as condições de manejo durante a criação e com os cuidados higiênico-sanitários nas operações de abate e posterior manipulação. Para os controles biológicos são tomadas medidas mitigatórias para o controle bacteriano desde as primeiras fases do ciclo de produção das aves, passando pelo transporte, abate, processamento, embalagem, armazenagem e distribuição.

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

Com o expressivo aumento dos casos de doenças veiculadas por alimentos (DTA) em humanos devido a presença de *Campylobacter* spp., este agente passou a ser considerado para o controle em um nível de importância equivalente ao da *Salmonella* spp. No Brasil, por existir apenas o Memorando N° 06/2018 (Brasil, 2018), que é um programa de monitoramento de *Campylobacter* spp. em carne de frango apenas para plantas habilitadas para Europa em atendimento ao Regulamento (UE) 2017/1495 (Comissão Europeia, 2017) e por não existirem dados disponíveis para carne de peru, é fundamental que sejam avaliados os índices de contaminação por *Campylobacter* spp. da carne de peru brasileira.

De acordo com o Ministério da Saúde (Brasil, 2020), no Brasil, *Campylobacter* spp. tem sido apontado em carne de frango e outros alimentos de origem animal, no entanto, apenas oito surtos de doença de alimentos envolvendo *Campylobacter* spp. foram notificados ao Ministério da Saúde entre os cerca de 14.000 surtos que ocorreram no período de 2000 a 2019. A campilobacteriose pode fazer parte das doenças de origem alimentar sub-reportadas no Brasil, tal como são raramente identificadas (Brasil, 2020). Durante a presente pesquisa não foram encontrados artigos científicos ou literatura nacional que descreva de forma precisa algum surto por *Campylobacter* spp. em humanos ocasionado por consumo de carne de aves.

Para manutenção da qualidade dos produtos e atendimento às exigências dos mercados internacionais, o Brasil dispõe de legislações, onde se destacam o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA (Brasil, 2017), padrões microbiológicos para alimentos através da Instrução Normativa 161/2022 (BRASIL, 2022) e, mais especificamente para aves, o Programa de Redução de Patógenos através da Instrução Normativa 20/2016 (Brasil, 2016). Estas normas são as publicações mais atuais que estão em vigor e tem por objetivo assegurar a qualidade sanitária da carne de aves que são constituídas de uma série de medidas que visam diminuir a contaminação bacteriana durante o processamento de abate.

Perante o exposto, a quantificação de *Campylobacter* spp. é fundamental para estimar a extensão da carga do agente para a carne de peru. Estas avaliações servem de subsídio para a avaliação do nível de segurança alimentar apresentado pela carne de peru. Este trabalho científico tem como objetivo principal avaliar o nível de contaminação entre os cortes resfriados

e os possíveis efeitos do congelamento e da sazonalidade climática sobre os índices encontrados em UFC/g de *Campylobacter* spp. em cortes de peru resfriados através do uso de metodologia de referência ISO 10272-2:2017. Os demais propósitos deste trabalho científico estão em avaliar dois métodos alternativos pareados à metodologia de referência através da avaliação do nível de contaminação em UFC/g de *Campylobacter* spp. em cortes de carne de peru resfriados e congelados.

Os materiais e métodos, resultados e discussão deste estudo serão apresentados em forma de artigo científico. O Artigo Científico I intitulado: “Avaliação do nível de contaminação de *Campylobacter* spp. em cortes de peru produzidos na região nordeste do estado do Rio Grande do Sul, Brasil”, descreve o estudo sobre avaliação do nível de contaminação entre os cortes resfriados e os possíveis efeitos do congelamento e da sazonalidade climática sobre os índices encontrados em UFC/g de *Campylobacter* spp. em cortes de peru resfriados e congelados. O Artigo Científico II intitulado: “Quantificação de *Campylobacter* spp. usando metodologia de referência, metodologia alternativa TEMPO® e PCR em tempo real em cortes de peru resfriados e congelados produzidos no Brasil”, descreve o estudo sobre a avaliação de dois métodos alternativos pareados ao método de referência através da quantificação em UFC/g de *Campylobacter* spp. em cortes de carne de peru resfriados e congelados.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão de literatura está estruturada abordando o tema referente aos principais riscos envolvidos nas doenças veiculadas por alimentos, dando ênfase ao patógeno *Campylobacter* spp. e seus efeitos sobre a saúde humana, os principais veículos de transmissão e metodologias aplicáveis para a quantificação do agente nos alimentos, em especial a carne de peru.

Perante a necessidade de monitorar *Campylobacter* spp. na avicultura e o peru sendo uma ave que no Brasil ainda não possui um controle específico, a ausência de um programa de monitoramento, nem tão pouco existem dados mais completos para avaliação do nível de risco desta ave, é fundamental avaliar e quantificar *Campylobacter* spp., favorecendo o conhecimento da extensão da contaminação e contribuindo para melhorar a qualidade dos produtos de carne de peru comercializados, para garantir futuros mercados. Por outro lado, é importante buscar metodologias alternativas que possam ser utilizadas em substituição à metodologia de referência, possibilitando dar maior fluidez na execução dos ensaios com resultados mais rápidos que podem auxiliar de maneira mais efetiva na tomada de ações de melhoria para os casos em que o agente possa colocar em risco a segurança alimentar.

### 2.1 Doenças veiculadas por alimentos (DTA)

Não é conhecido exatamente na história da humanidade, a era em que o homem tomou conhecimento da existência de microrganismos e da sua importância para os alimentos. Após um período no qual o ser humano tinha a sua alimentação baseada apenas nos abundantes recursos da natureza, o homem passou a plantar, criar animais e produzir seu próprio alimento. Com o surgimento de alimentos preparados, começaram a ocorrer os problemas relacionados com as doenças veiculadas pelos alimentos e com a rápida deterioração devido principalmente à conservação inadequada dos alimentos (Franco; Landgraf; Destro, 2008, p. 1).

Por milhares de anos, todos os agentes patogênicos de origem alimentar desenvolveram-se de forma eficiente com estratégias eficazes, que exploram no todo ou em parte, os alimentos como um veículo para transferir de um hospedeiro humano para outro, ou de um animal para um humano (Newell *et al.*, 2010). Os mecanismos envolvidos são complexos e variados, mas todos são capazes de sobreviver aos períodos de intervenção no ambiente, e depois evitar as defesas intestinais humanas inatas para colonizar e multiplicar-se rapidamente antes de permitir uma dispersão eficaz, frequentemente através de fezes líquidas, de volta ao ambiente para progredir novamente ao longo do ciclo (Newell *et al.*, 2010). É bem reconhecido que os agentes

patogênicos bacterianos de origem alimentar estão evoluindo em resposta aos desafios ambientais e, ao fazê-lo podem exibir novas propriedades de virulência e ocupar novos nichos (Newell *et al.*, 2010).

Bhunja (2008, p. 4) define que um agente patogênico é um organismo capaz de causar danos celulares ao estabelecer-se em tecidos, o que resulta em sinais clínicos com um resultado de morbidade (definido pelo sofrimento geral) ou mortalidade. Mais especificamente, um agente patogênico é caracterizado pela sua capacidade de replicar-se num hospedeiro, pela sua persistência contínua de quebrar (ou destruir) barreiras celulares ou humorais que normalmente restringem e expressam determinantes de virulência específicos para permitir a um micro-organismo estabelecer-se dentro de um hospedeiro para transmissão a um novo hospedeiro susceptível (Bhunja, 2008, p. 4).

Os progressos realizados no sentido de se compreender a natureza das doenças veiculadas por alimentos foram sempre bastante lentos (Franco; Landgraf; Destro, 2008, p. 1). A maioria das doenças de origem alimentar causa distúrbios gastrointestinais agudos (Behraves, 2011). O sintoma mais comum nas doenças de origem alimentar é a diarreia. Dependendo da patogenicidade do microrganismo envolvido no processo e das condições gerais do indivíduo afetado, a doença pode ser aguda e, neste caso, normalmente autolimitada, como também pode se tornar crônica e oferecer um risco maior (Franco; Landgraf; Destro, 2008, p. 34). A maioria das pessoas recuperam-se relativamente depressa, sem cuidados médicos. As mortes por doenças agudas de origem alimentar ocorrem sobretudo, entre os mais jovens incluindo fetos, os idosos e as pessoas com sistemas imunológicos comprometidos (Behraves, 2011).

Consumir certos tipos de alimentos pode causar doenças veiculadas pelos mesmos e até levar à morte em indivíduos, além de sintomas como diarreia, dor de cabeça, vômitos, náuseas e cólicas abdominais (RKI, 2011). Recentemente, surtos de origem alimentar se tornaram mais graves devido à globalização e ao comércio ativo de alimentos entre os países (RKI, 2011). Os produtos fabricados a partir de proteínas animais são considerados a principal causa de doenças bacterianas veiculadas por alimentos (Heredia; García, 2018).

A obtenção de estimativas precisas da incidência real de doenças de origem alimentar é muito importante para a gestão da segurança alimentar (Kim *et al.*, 2015). À medida que ocorrem surtos de doenças de origem alimentar em todo o mundo e afetam muitos indivíduos, são consideradas uma doença de saúde pública que preocupa globalmente (Newell *et al.*, 2010) e representam mundialmente elevados custos à saúde pública e à cadeia produtiva de alimentos (Perlin *et al.*, 2016).

Alimentos inseguros para o consumo humano causam 600 milhões de casos de doenças veiculadas por alimentos, resultando em cerca de 420.000 mortes a cada ano, de um total de 56 milhões de pessoas que morrem anualmente (Lee; Yoon, 2021). As 420.000 mortes são quase equivalentes a 31,1% das mortes anuais causadas por acidentes de trânsito (1,35 milhões) em todo o mundo (WHO, 2020).

## 2.2 Principais doenças veiculadas por alimentos

Globalmente, as doenças veiculadas por alimentos causados por bactérias foram mais comuns do que as causadas por vírus e parasitas (WHO, 2015). Nos Estados Unidos, dos 25.479 casos de infecções relatadas durante o ano de 2022, 9.751 casos foram relacionados ao gênero *Campylobacter*, conseqüentemente a incidência de infecção foi maior para *Campylobacter* spp. (19,2 casos por 100.000 habitantes. Em comparação com as incidências anuais médias específicas do patógeno durante o período de 2016 a 2018, as incidências de infecção por *Campylobacter* spp. foi estável. No entanto, quando limitada a infecções adquiridas internamente no país, a incidência de *Campylobacter* spp. foi maior durante 2022 (Delahoy *et al.*, 2023).

Em 2020 na Europa, a primeira e a segunda zoonoses mais relatadas em humanos foram campilobacteriose e salmonelose, respectivamente. A tendência da União Europeia (UE) para casos humanos confirmados dessas duas doenças foi estável de 2016 a 2020 (EFSA, 2021). A yersiniose foi a terceira zoonose mais relatada em humanos, com dez vezes menos casos relatados de salmonelose, seguida pelas infecções por *Escherichia coli* (STEC) e *Listeria monocytogenes* (EFSA, 2021)

Com mais de 246.000 casos ocorridos em humanos anualmente, a campilobacteriose é a doença veiculada por alimentos mais frequentemente relatada na UE. No entanto, acredita-se que o número real de casos seja mais próximo de nove milhões a cada ano. O custo da campilobacteriose para o sistema público de saúde e para a perda de produtividade na União Europeia é estimado pela EFSA em cerca de 2,4 bilhões de euros por ano (EFSA, 2021).

Nos países em desenvolvimento, as informações sobre doenças veiculadas por alimentos são escassas devido aos dados inadequados fornecidos pelos sistemas de vigilância sanitária. Além disso, as informações sobre surtos são frequentemente infundadas porque as autoridades de saúde não possuem recursos para detecção de doenças que causam diarreia (Zaidi *et al.*, 2008), e a carne de peru possui potencial de transmissão e, segundo literatura, já apresentou envolvimento com surtos alimentares (Silva; Vidal; Junior, 2017). Cada país tem seus

regulamentos de segurança alimentar e controle de doenças veiculadas por alimentos, embora o nível de controle varie de acordo com as condições econômicas (Lee; Yoon, 2021).

Embora as estatísticas brasileiras sejam precárias, acredita-se que a incidência de doenças microbianas de origem alimentar em nosso país seja bastante elevada. Mesmo em países desenvolvidos, nos quais o abastecimento de gêneros alimentícios é considerado seguro do ponto de vista de higiene e saúde pública, a ocorrência de doenças desta natureza é significativa e vem aumentando, apesar dos avanços tecnológicos nas áreas de produção e controle de alimentos (Franco; Landgraf; Destro, 2008, p. 33).

De 2009 a 2018, foram reportadas no Brasil 6903 surtos de doenças de origem alimentar, sendo *Escherichia coli* (24%), *Salmonella* spp. (11,2%) e *Staphylococcus aureus* (9,5%) os microrganismos mais frequentemente identificados (Brasil, 2019). Não há relatos de *Campylobacter* spp. neste período. No Brasil, *Campylobacter* spp. têm sido notificado em carne de frango e outros alimentos de origem animal, no entanto, apenas oito surtos de doença de alimentos envolvendo *Campylobacter* spp. foram notificados ao Ministério da Saúde entre os cerca de 14.000 surtos que ocorreram no período de 2000 a 2019 (Brasil, 2020). Supõem-se que a campilobacteriose possa fazer parte das doenças de origem alimentar sub-reportadas no Brasil, tal como são raramente identificados.

### 2.3 Gênero *Campylobacter*

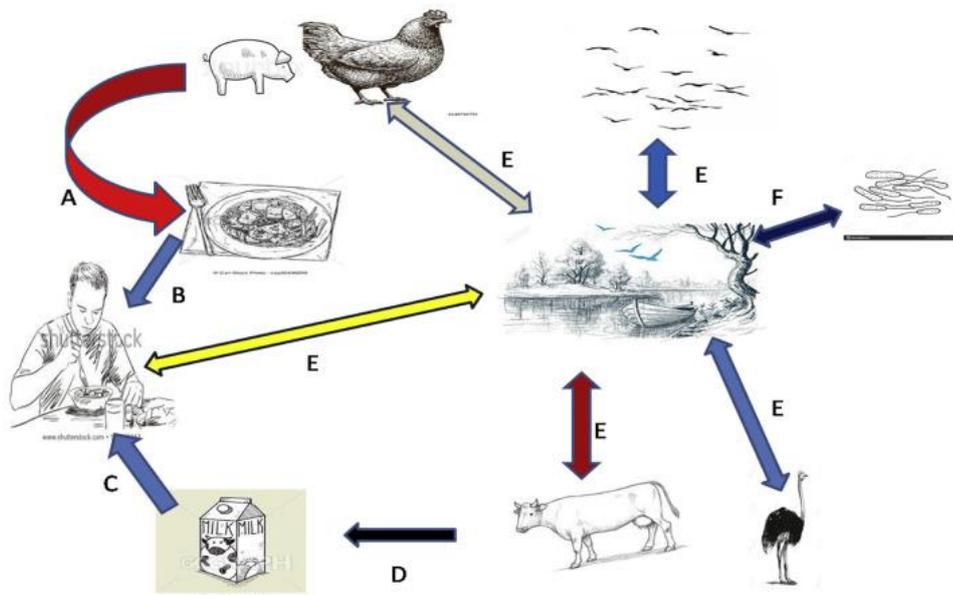
*Campylobacter* spp. é amplamente distribuído no meio ambiente e coloniza o trato gastrointestinal de animais selvagens e domésticos. As aves, especialmente as aves de criação industrial, são consideradas reservatórios naturais dessas bactérias em seus intestinos, muitas vezes não apresentando nenhum sintoma da doença (CDC, 2013).

A Figura 1 representa os possíveis reservatórios de *Campylobacter* spp. e que as aves de criação tais como frangos e perus podem infectar-se. As aves silvestres, insetos roedores e animais de produção podem contaminar-se pela ingestão de água ou alimentação contaminada ou através do contato direto entre os animais. Fontes de água com a presença de biofilmes formados por *Campylobacter* spp. ou a sua associação com protozoários permitem a manutenção da contaminação. Após as aves de criação serem contaminadas, tornam-se a principal fonte de contaminação para humanos (Okoh, 2019).

*Campylobacter* spp. são considerados microrganismos oxidase positiva e microaerófilos (Igwaran; Okoh, 2019), gram-negativos, não esporulados formando uma curva em forma de espiral, que coloniza as superfícies mucosas dos tratos intestinais, cavidades orais ou tratos

urogenitais da maioria dos animais de sangue quente (Humphrey; O' Brien; Madsen, 2007). A maioria das espécies de *Campylobacter* spp. é móvel causada por um flagelo polar presente em uma ou ambas as extremidades da célula (Facciolá *et al.*, 2017). A presença desse único flagelo confere movimentação à bactéria em forma de “saca rolha” ou “vai e vem” (Humphrey; O' Brien; Madsen, 2007).

Figura 1 - Ciclo e fontes de transmissão da infecção por *Campylobacter* spp.



Fonte: Igwaran; Okoh, 2019

O microrganismo pode ser cultivado em pH que varia de 6,5 a 7,5 e temperatura entre 37°C e 42°C (Silva, *et al.*, 2011), desta forma *Campylobacter* spp. são considerados microrganismos termófilos e as aves têm sido amplamente consideradas como hospedeiros naturais desses microrganismos. Eles são incapazes de crescer em temperaturas acima de 55°C ou abaixo de 30°C (Facciolá *et al.*, 2017). As espécies patogênicas para os seres humanos possuem melhor crescimento a 42° C e são denominadas termófilos ou termotolerantes (Humphrey; O' Brien; Madsen, 2007). Possuem um bom crescimento em atividade de água de 0,997 e não crescem em atividade de água inferior a 0,987 (Silva *et al.*, 2011). Adicionalmente, não crescem em meios com concentração acima de 3,5% de cloreto de sódio ou a 25°C, além disso são microaerófilos, o que faz com que necessitem de pequenas quantidades de oxigênio

(3 a 6%) e concentração de 2 a 10% de dióxido de carbono para seu desenvolvimento (Humphrey; O' Brien; Madsen, 2007).

A carne de aves cruas parece ser uma fonte de contaminação de *Campylobacter* spp., uma vez que a bactéria pode viver nos intestinos de aves saudáveis, sendo também encontrado em suínos e bovinos. O consumo de carne de frango cozida de forma inadequada ou alimentos prontos para consumo que estiveram em contato com a carne de frango crua (contaminação cruzada), é a fonte mais comum de infecção (EFSA, 2021). Em suas avaliações, a EFSA (2021) considera que frangos e carne de frango podem responder diretamente por 20 a 30% dos casos humanos. *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* são responsáveis em cerca de 90% de todas as campilobacterioses diagnosticadas em humanos na União Europeia (Bolton, 2015), sendo uma das mais comuns gastroenterites bacterianas humanas no mundo desenvolvido e são responsáveis por mais de 95% da campilobacteriose humana (García-Sánchez *et al.*, 2017).

*Campylobacter* spp. está entre os "patógenos prioritários" que representam a maior ameaça à saúde humana, para os quais novos antibióticos são urgentemente necessários (EFSA/ECDC, 2018). A patogênese da infecção por *Campylobacter* spp. é complexa e mal compreendida (Koolman *et al.*, 2015) sendo a principal causa de gastroenterite em todo o mundo e é um dos agentes causadores mais difundidos de doenças infecciosas do século passado (Karki. Wells; Fakhr, 2019).

## 2.4 Campilobacteriose

Globalmente, *Campylobacter* spp. é a principal causa de gastroenterite bacteriana (Alaboudi *et al.*, 2020). A campilobacteriose humana é uma gastroenterite autolimitante que dura aproximadamente cinco a sete dias e é caracterizada por diarreia aquática e às vezes sangrenta, febre, cólicas abdominais e vômitos (Skarp; Hanninen; Rautelin, 2016). Complicações graves pós-infecção podem ocorrer, tais como artrite reativa, bacteremia e síndrome de Guillain-Barré (Theoret *et al.*, 2012). Embora a maioria dos casos de campilobacteriose seja autolimitante com a dose infecciosa tão baixa quanto 500 a 800 bactérias, ela representa uma causa significativa de saúde pública (Huang *et al.*, 2015).

Considerada a infecção gastrointestinal mais comumente relatada em humanos na União Europeia, e assim tem sido desde 2005. Em 2019, o número de casos confirmados de campilobacteriose humana foi de 220.682, correspondente a uma taxa de notificação de 59,7 por 100.000 habitantes, o que é uma diminuição em 6,9% em comparação com a taxa em 2018 que foi de 64,1 por 100.000 habitantes (EFSA, 2021). Ao contrário dos países europeus, os

relatos sobre campilobacteriose humana em países asiáticos, incluindo a Coreia do Sul, são limitados, possivelmente devido à baixa prevalência de doenças ou à natureza esporádica das infecções (Kim *et al.*, 2019). Apesar da alta incidência de *Campylobacter* spp. em todo o mundo, os fatores microbianos que levam à colonização intestinal e à patogênese desta espécie não foram completamente caracterizados até o momento (Gao *et al.*, 2017).

Embora o Brasil permaneça sendo o maior exportador de carne de aves do mundo (ABPA, 2023) a campilobacteriose é uma doença negligenciada e não há dados suficientes para estimar a incidência desse patógeno no país (Biasi *et al.*, 2011). No Brasil, como na maioria dos países em desenvolvimento, são escassos os estudos e os dados epidemiológicos sobre campilobacteriose. Provavelmente isso ocorra porque os programas nacionais de vigilância alimentar não incluem a análise de *Campylobacter* spp., sendo difícil estimar a extensão da doença (Silva *et al.*, 2018). A partir do Memorando N° 06/2018 (Brasil, 2018), o Brasil passou a exercer um controle de *Campylobacter* spp. em carne de frango apenas para abatedouros que exportam para Europa, na qual necessitam cumprir ciclos de controle de *Campylobacter* spp. que contemplem o Regulamento (UE) 2017/1495 (Comissão Europeia, 2017).

A maioria dos esforços para reduzir os casos de campilobacteriose está focada no controle de *Campylobacter* spp. na cadeia de produção de carne de frango, uma vez que o risco de campilobacteriose humana está associado à carne de frango altamente contaminada (Calloicot *et al.*, 2008). Aves de criação industrial são o principal contribuinte para a campilobacteriose humana e ainda é uma das doenças pandêmicas mais infecciosas e uma ameaça previsível para os consumidores nos próximos anos (Myintzaw; Jaiswal; Jaiswal, 2021).

## 2.5 Mecanismos de virulência

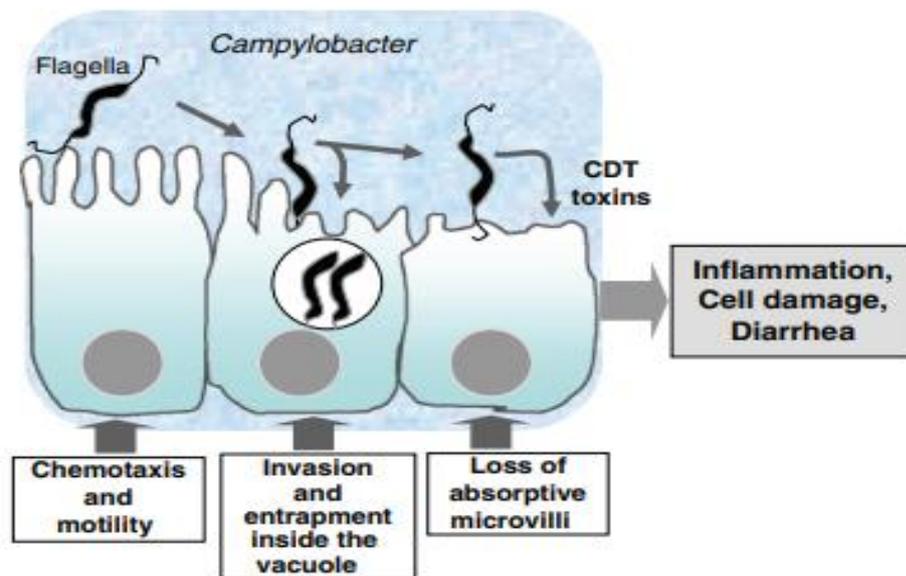
O esforço para reduzir as infecções por *Campylobacter* spp. em humanos está diretamente ligado a uma melhor compreensão dos mecanismos de virulência deste patógeno (Dasti *et al.*, 2010). No entanto, pouco se sabe sobre os fatores de virulência de *Campylobacter* spp. (Wafaa; Mekky; Enany, 2019), embora alguns genes tenham sido reconhecidos como responsáveis pela expressão da patogenicidade (Oliveira *et al.*, 2019).

*Campylobacter* spp. tem um mecanismo complexo e não completamente conhecido de sobrevivência para conquistar as barreiras do hospedeiro e causar doenças em humanos (Silva *et al.*, 2018) e são reconhecidos como principais fatores de virulência a adesão e invasão de células epiteliais do hospedeiro e a produção de toxinas (Ferrero; Lee, 1988). A adesão às

células epiteliais é a etapa inicial para que ocorra a infecção. Elementos estruturais como o flagelo, algumas proteínas da membrana externa e lipossacarídeos permitem a travessia do muco intestinal e adesão da bactéria à célula epitelial por meio de adesinas presentes nesses elementos (Fernandez, 2008).

*Campylobacter* spp. abriga diversos genes relacionados à virulência responsáveis por sua motilidade, aderência celular, colonização, invasão, absorção de ferro, produção de citotoxinas, secreção e expressão da síndrome de Guillain-Barré (Koolman *et al.*, 2015). Após ingestão, *Campylobacter* spp. atinge a parte inferior do trato gastrointestinal e invade as células epiteliais no íleo distal e no cólon, resultando em danos celulares e inflamação grave. Os passos na patogênese (Figura 2) incluem primeiro a quimiotaxia e motilidade, posteriormente a aderência, invasão e crescimento dentro do vacúolo, e no final, produção de toxinas citoletais (CDT). Como resultado, os danos celulares e a inflamação levam à perda de fluidos e diarreia (Bhunja 2008, p. 220).

Figura 2 - Passos da patogênese do *Campylobacter* spp. em células danificadas.



(Fonte: Bhunia 2008, p. 220)

Semelhante a outras bactérias gram-negativas, *Campylobacter* spp. tem a capacidade de produzir uma variedade de toxinas, como as toxinas distensoras citoletais (CDT) pertencentes a múltiplas subunidades de uma família de citotoxinas proteicas termolábeis (*CdtA*, *CdtB* e *CdtC*) (Ghorbanalizadgan *et al.*, 2019); no entanto, a extensão de sua contribuição para a patogênese e virulência de *Campylobacter* spp. não é totalmente compreendida. O *CdtB* é a subunidade ativa, mas para que a toxina esteja funcionalmente ativa, todos os três produtos

genéticos (*CdtA*, *CdtB* e *CdtC*) são necessários (Koolman *et al.*, 2016). Sabe-se que a CDT perturba a maturação de células criptográficas em células epiteliais funcionais de vilosidades, cessando assim temporariamente a função de absorção para induzir à diarreia (Bhunja 2008, p. 221).

A resistência antimicrobiana em cepas de *Campylobacter* spp. provenientes de alimentos de origem animal tornou-se uma grande preocupação de saúde pública, e há uma clara correlação entre o uso de antimicrobianos na produção animal e cepas resistentes isoladas em humanos (Wieczorek; Osek, 2013). Um número crescente de isolados de *Campylobacter* spp. tem desenvolvido resistência às fluoroquinolonas nos últimos anos limitando seu uso para o tratamento de campilobacteriose (Shen *et al.*, 2018). Isso é preocupante, uma vez que as fluoroquinolonas incluem os antimicrobianos mais usados para tratamento de diarreia bacteriana aguda (Lovine, 2013).

## **2.6 Prevalência de *Campylobacter* spp. em carne de aves**

Muitas espécies de aves domésticas tais como galinhas, perus, patos, gansos e aves selvagens estão frequentemente infectadas com *Campylobacter* spp. termófilos, principalmente *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* (Sahin *et al.*, 2015). Os patógenos têm sido extensivamente estudados em galinhas, mas pouca informação está disponível para perus (Crespo *et al.*, 2016). Apesar do aumento da produção e do consumo de carne de peru nos últimos anos e das altas prevalências de *Campylobacter* spp. (65,3 %) detectadas em carne de perus comerciais na Europa (EFSA & ECDC, 2017), a maioria das pesquisas sobre epidemiologia de *Campylobacter* spp. tem focado principalmente na produção de frangos de corte (Skarp; Hanninen; Rautelin, 2016) e as fontes de contaminação de carcaças de peru são semelhantes às de frango, entretanto, os relatos sobre o envolvimento da carne de peru em doenças veiculadas por alimentos e seu risco a saúde pública são escassos (Silva; Vidal; Junior, 2017).

Szosland-Fattyn *et al.* (2018) avaliaram a prevalência de *Campylobacter* spp. na carne de aves polonesa, onde foi isolado de 64% da carne de aves avaliada. Dentro dos tipos de carne testada, a maior prevalência de *Campylobacter* spp. foi encontrada em carne de pato (80%), seguido por frango (70%), ganso (60%) e peru (38%).

Nos Estados Unidos, através do Food Safety and Inspection Service (EUA, 2021) possui um programa de monitoramento de *Campylobacter* spp. em aves que contempla frangos e perus. Na Europa não foram encontrados programas que monitorem *Campylobacter* spp em

carne de peru, apenas carne de frango através do Regulamento (UE) 2017/1495 (Comissão Europeia, 2017). No Brasil também não existe programa nacional para controle de *Campylobacter* em aves, porém é exigido o atendimento ao Regulamento (UE) 2017/1495 (Comissão Europeia, 2017) para os abatedouros frigoríficos de frango que estão habilitados a exportarem para Europa.

## **2.7 Efeitos da sazonalidade climática para incidência de *Campylobacter* spp.**

De acordo com Smith *et al.* (2019), a literatura recente sugere que o clima pode desempenhar um papel na prevalência dos patógenos *E. coli*, *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. ao longo da cadeia alimentar. A sazonalidade parece desempenhar um papel significativo na contaminação de *Campylobacter* spp. e há uma associação estatística com a temperatura em uma variedade de escalas entre as configurações de produtos (Smith *et al.*, 2019).

*Campylobacter* spp. é sensível às condições secas, a alta umidade relativa e/ou precipitação contribui para a sobrevivência de *Campylobacter* spp. no ambiente (Patrick, 2004). Segundo Semenza, *et al.* (2012), tendências sazonais também foram identificadas para doenças atribuídas para *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp., que têm sido mostradas elevações de pico durante os meses de verão em países de clima temperado ao redor do mundo. A colonização de lotes de frangos de corte com *Campylobacter* spp. aumenta rapidamente com o aumento das temperaturas. O risco de campilobacteriose está positivamente associado a temperaturas sazonais médias, embora a força da associação não seja consistente em todos os estudos (ECDC, 2022).

Em pesquisa realizada por Smith *et al.* (2019), a relação sazonal mais forte entre os patógenos investigados e o clima foi observada para *Campylobacter* spp. Esse achado foi observado entre amostras de carne de frango e de suínos em ambientes de varejo e abatedouros frigoríficos. Ishihara *et al.* (2017), concluíram em sua pesquisa que a alta temperatura e a umidade do ar promovem a colonização de *Campylobacter* spp. em frangos de corte no Japão. Em frangos criados durante períodos de temperatura crescente, a alta temperatura do ar aumentou a colonização de *Campylobacter* spp. independentemente da idade das aves.

Estudo realizado por Kalupahana *et al.* (2018) em Sri Lanka demonstrou que os níveis de contaminação de *Campylobacter* spp. de frangos de corte no abate apresentaram correlações significativas com variáveis meteorológicas como temperatura, chuva e umidade relativa, com alguns limiares para efeitos diferenciais (lineares e não lineares) dessas variáveis

meteorológicas, sugerindo que eles podem influenciar o potencial de *Campylobacter* spp. para colonizar seu hospedeiro preferido e/ou sobreviver no ambiente.

## **2.8 Processos tecnológicos que mitigam *Campylobacter* spp.**

Perus e outros animais são reservatórios para *Campylobacter* spp. por infecção assintomática no trato gastrointestinal. As fontes de contaminação fecal nas carcaças do peru são semelhantes às descritas para aves de criação industrial durante o processamento, principalmente na etapa de escaldagem e evisceração (Pacholewicz *et al.*, 2016). As rotas de transmissão de *Campylobacter* spp. em granjas de peru permanecem amplamente desconhecidas. Consequentemente, estratégias eficazes de prevenção e controle ainda não estão disponíveis. Por isso é necessária uma melhor compreensão das fontes e rotas de transmissão de *Campylobacter* spp. em granjas de criações comerciais de peru (Piccirillo *et al.*, 2018).

Os processos de congelamento e refrigeração são os métodos comuns utilizados para proteger os alimentos, diminuindo o crescimento dos microrganismos que causam doenças veiculadas por alimentos (Albrecht *et al.*, 2019; Hammad *et al.*, 2019), sendo os métodos mais utilizados para conservar a carne. Manter carcaças de aves em um estado congelado é conhecido por reduzir a contagem de *Campylobacter* spp. (Burffot *et al.*, 2016). O relatório da EFSA (EFSA, 2011), descreve que o armazenamento congelado diminui o número de *Campylobacter* spp. em  $1 \log_{10}$  depois de alguns dias e por aproximadamente  $2 \log_{10}$  depois de 3 semanas.

Segundo Gouvêa *et al.* (2016), a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos é um dos indicadores mais importantes para avaliar o frescor da carne. As bactérias geralmente precisam de tempo e condições ideais, como fonte de energia, oxigênio, umidade relativa e temperatura adequada para sobreviverem e se reproduzirem. O crescimento dos microrganismos desacelera em temperatura de refrigeração. Da mesma forma, o congelamento também interrompe o crescimento do microrganismo até certo ponto, mas a eliminação completa de microrganismos não é possível especialmente para bactérias formadoras de esporos (Gouvêa *et al.*, 2016).

Em estudo realizado por Alter *et al.* (2005), durante o processo de congelamento diversos fatores incluindo a formação do gelo e a desidratação levam à injúria do microrganismo, além do estresse oxidativo, que pode levar à morte da célula, reduzindo significativamente sua sobrevivência no alimento. Microrganismos termófilos e alguns mesófilos têm seu crescimento diminuído a partir da redução da temperatura do ambiente. A

imobilização da água na forma de gelo e o aumento na concentração de solutos reduzem a atividade de água diminuindo a possibilidade de crescimento microbiano (Bhaduri; Cottrell 2004).

Coombs *et al.* (2017) em seu estudo, indica que o número de bactérias diminuiu no congelamento de carnes com o aumento do período de armazenamento. Embora a queda de temperatura tenha efetivamente reduzido a população da maioria dos microrganismos, a presença de bactérias resistentes ao frio ativas a baixa temperatura pode causar deterioração nos alimentos, resultando em perdas econômicas e ameaçando a saúde dos consumidores (Stahl *et al.*, 2015). O congelamento de carcaças de aves positivas para *Campylobacter* spp. sugere proporcionar benefícios para a redução do patógeno (Georgsson *et al.*, 2006).

## **2.9 Métodos de ensaio para quantificação de *Campylobacter* spp. e suas variáveis**

A quantificação de *Campylobacter* spp. é desafiadora e uma das principais razões é o fato de que esse agente perde a viabilidade de cultivo bacteriano devido ao estresse pelo frio ou de oxigênio durante o armazenamento da carne no varejo (Pacholewicz *et al.*, 2018). Embora a metodologia de cultura convencional continue sendo um pilar para a detecção e quantificação de *Campylobacter* spp., a consistência e a confiabilidade em várias matrizes de produção de aves são problemáticas. Devido à variabilidade nos fenótipos e genótipos das espécies de *Campylobacter* spp., caracterizações mais informativas são necessárias para fornecer uma avaliação mais completa do potencial de risco (Ricke *et al.*, 2019).

Embora demorado, o método de enumeração em placas é o padrão de referência para enumeração de *Campylobacter* spp. em pele de frango. No entanto, nem todas as células podem ser recuperadas por técnicas de cultivo convencionais devido a requisitos especiais de crescimento (Papic *et al.*, 2017). O isolamento de *Campylobacter* spp. deve ser mais preciso do que para os outros patógenos transportados por alimentos devido à sua alta sensibilidade ao oxigênio e aos radicais oxidantes, à atividade da água, às mudanças de temperatura e à presença de formas viáveis, mas não cultiváveis (Silva *et al.*, 2011).

A eficiência da quantificação dependente do cultivo é influenciada pelas condições de crescimento e pelo estado fisiológico das bactérias que impactam sua capacidade de crescer em uma placa como Unidades Formadoras de Colônias - UFC (Krüger *et al.*, 2014). Recentemente algumas publicações tem demonstrado que a ausência de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em determinadas condições laboratoriais não reflete necessariamente a ausência de capacidade de crescimento ou potencial infeccioso (Baffone *et al.*, 2006; Chaisowwong *et al.*,

2012; Wulsten; Galeu; Stingl, 2020). No entanto, o uso de métodos de detecção e quantificação validados é absolutamente necessário para o cumprimento harmonizado e legal (Stingl *et al.*, 2021).

Outra limitação importante da quantificação de patógenos em amostras naturalmente contaminadas, como pele de pescoço de frango, é a baixa concentração de organismos alvo que podem impedir a detecção e quantificação confiáveis (Papic *et al.*, 2017), no entanto os métodos moleculares de identificação e detecção de patógenos veiculados por alimentos tornaram-se mais sensíveis à medida que dados genômicos abrangentes continuam a ser gerados a partir de patógenos veiculados por alimentos (Baker *et al.*, 2016).

Segundo Eberle e Kiess (2012), os métodos tradicionais de cultura microbiológica evoluíram ao longo do tempo para incluir o uso de meios seletivos, a otimização das condições de crescimento e do apoio de antibióticos para reduzir espécies de microrganismos acompanhantes. As diretrizes de uso de meios exigem a temperatura elevada de incubação (42°C) e uma atmosfera de microaerofilia para favorecer o crescimento do *Campylobacter* spp. termófilo. Além disso, podem ser empregados vários antibióticos que reprimem o crescimento de espécies que não são do gênero *Campylobacter*, ao mesmo tempo em que apoiam o crescimento de isolados de *Campylobacter* spp. naturalmente resistentes a antibióticos (Eberle; Kiess, 2012).

Novas tecnologias de testes bacteriológicos com maior rendimento foram recentemente introduzidas, entre outras, pelas indústrias alimentícias e cosméticas como forma de intervir mais rapidamente em sua cadeia produtiva através de métodos com resultados mais rápidos (Yossa *et al.*, 2019). Os resultados dos métodos de referência para enumeração do número mais provável (NMP) nos alimentos são geralmente considerados precisos em comparação com os resultados obtidos com métodos de referência padrão em baixos níveis de contaminação. O sistema TEMPO<sup>®</sup> elimina as desvantagens da metodologia do número mais provável (NMP) e, ao mesmo tempo, permite resultados precisos em UFC/g (Torlak; Akan; Gökmen, 2008).

Comparáveis às técnicas tradicionais de microbiologia e enriquecimento, os métodos moleculares têm o potencial de ter maior sensibilidade e especificidade, bem como a velocidade de obtenção de dados (Ricke *et al.*, 2019). O PCR em tempo real foi descrito como um dos métodos mais sensíveis para a detecção de *Campylobacter* spp. (Reis *et al.*, 2018).

### 2.9.1 Metodologia de referência para quantificação de *Campylobacter* spp.

O método de referência para detecção de *Campylobacter* spp. é geralmente projetado com plaqueamento em ágar específico após etapa de enriquecimento seletivo, apesar das opções refinadas para o isolamento do microrganismo, permanecem desafios que reduzem a eficiência dessas metodologias (Al *et al.*, 2019). Ao contrário de outros patógenos veiculados por alimentos como *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. exibe características fisiológicas e metabólicas dinâmicas e maleáveis que podem interferir ativamente na sensibilidade e especificidade dos métodos dependentes da cultura (Al *et al.*, 2019).

O crescimento excessivo da microbiota competitiva em placas de ágar Modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate (mCCD) após o enriquecimento pode causar uma confirmação falso-negativa de uma amostra positiva. Portanto, no caso de amostras contendo um alto nível de microbiota de fundo, como produtos de carne de frango, é recomendado o uso de um método de enriquecimento e plaqueamento direto em paralelo para obter a melhor estimativa da prevalência de *Campylobacter* spp. (Repérant *et al.*, 2016). A atmosfera microaeróbica para incubação de *Campylobacter* spp. é descrita como tendo um teor de oxigênio de  $5\% \pm 2\%$ , dióxido de carbono  $10\% \pm 3\%$ , hidrogênio opcional  $\leq 10\%$ , com o equilíbrio de nitrogênio (Biesta-Peters *et al.*, 2019). Estudo colaborativo realizado por Biesta-Peters *et al.* (2019) fornece dados sobre a aceitabilidade do protocolo, conforme descrito na metodologia de referência ISO 10272-2:2017, para a enumeração de *Campylobacter* spp. em diferentes matrizes.

Embora demorado, o método de enumeração em placas é o padrão de referência para contagem de *Campylobacter* spp. em pele de frango. No entanto, nem todas as células podem ser recuperadas por técnicas de cultivo convencionais devido a requisitos especiais de crescimento e estado de células viáveis, mas não cultiváveis (VMNC). Outra limitação importante do método de contagem de placas é a incapacidade de distinguir entre diferentes espécies do microrganismo alvo, sem aplicação de etapas adicionais de identificação (Papic *et al.*, 2017).

No âmbito da legislação de higiene alimentar, a União Europeia (UE) faz a recomendação de métodos validados padronizados que são referidos na legislação, a fim de apoiar a política alimentar da UE. O Regulamento (CE) 2073/2005 (Comissão Europeia, 2005), sobre critérios microbiológicos para alimentos contém disposições que requerem o uso de métodos analíticos padrão na cadeia alimentar. Em 2017 este regulamento foi alterado pelo Regulamento (UE) 2017/1495 (Comissão Europeia, 2017) no qual recomenda que para o ensaio

de *Campylobacter* spp. seja utilizada a metodologia de referência ISO 10272-2, que tem por objetivo quantificar *Campylobacter* spp. termotolerantes relevantes para a saúde humana.

O método ISO 10272-2:2017 consiste inicialmente com a pesagem de uma alíquota de amostra para que possa ser diluída na proporção de 1:10 para diluição inicial em água peptonada tamponada a 1%. Uma porção de 1mL da amostra é inoculada sobre ágar mCCD e incubada a 41,5°C em ambiente de microaerofilia por 48 horas. Após incubação as colônias suspeitas são repicadas em ágar sangue e submetidas ao teste de oxidase. Sendo oxidase positivo é dada continuidade das confirmações através dos testes de motilidade, morfologia e de aerobiose ou, com confirmações diretas das colônias via PCR.

### 2.9.2 Método automatizado TEMPO®

Novas tecnologias para testes bacteriológicos com maior rendimento foram recentemente introduzidas, entre outras, pelas indústrias alimentícias e cosméticas como forma de intervir mais rapidamente em sua cadeia produtiva (Yossa *et al.*, 2019). Os resultados dos métodos tradicionais de enumeração do número mais provável (NMP) nos alimentos são geralmente considerados precisos em comparação com os resultados obtidos com métodos de referência em baixos níveis de contaminação. O sistema TEMPO® elimina as desvantagens da metodologia do NMP tradicional e, ao mesmo tempo, permite resultados precisos em UFC/g. O número de tubos miniaturizados nos cartões TEMPO® aumenta as faixas de enumeração e a precisão dos resultados em comparação com uma metodologia tradicional de NMP. Assim, o sistema TEMPO® pode fornecer resultados ao longo de uma ampla faixa de enumeração (Torlak; Akan; Gökmen, 2008).

Baseado na técnica de NMP, o sistema TEMPO® é composto por um cartão, um frasco contendo meio de cultura e um indicador fluorescente. As amostras são adicionadas a frascos de meio desidratado e introduzidas nos cartões em uma câmara de vácuo automatizada (TEMPO® Filler) onde o meio inoculado é transferido automaticamente para o cartão contendo 48 poços de três volumes diferentes (16 x 225µL, 16 x 22,5µL e 16 x 2,25µL). Os cartões são então removidos da câmara de vácuo e incubados conforme apropriado para cada microrganismo. Durante a incubação o microrganismo hidrolisa o substrato presente no meio de cultura, produzindo assim um sinal fluorescente que é detectado pelo TEMPO® Reader que calcula o número de poços positivos e expressa os resultados em UFC/g (Torlak; Akan; Gökmen, 2008; Owen; Willis; Lamph, 2010).

O sistema TEMPO<sup>®</sup> é um equipamento fácil de usar com minimização e simplificação das etapas subsequentes de análise. A separação da estação de preparação e da estação de leitura garante as operações de segurança enquanto trabalha com material potencialmente contaminado (Kunicha, 2007). Estudo direcionado por Yoruk (2018), descreve que a vantagem mais importante do método TEMPO<sup>®</sup> em comparação com as metodologias de referência é o fornecimento de resultados em um tempo menor. Além disso, o tempo gasto para o processamento das amostras pela equipe é significativamente menor se comparado ao método NMP.

Estudo realizado por Owen, Willis e Lamph (2010), relatam que o TEMPO<sup>®</sup> EB é um método adequado para a análise de *Enterobacteriaceae* em alimentos de rotina, laticínios e amostras ambientais. O sistema TEMPO<sup>®</sup> é cada vez mais utilizado na indústria alimentícia, que aproveita seu processo semiautomatizado, com scanner de amostras embutido para fins de rastreabilidade e sua velocidade em alcançar a contagem bacteriológica e identificação sem testes adicionais de identificação (Tallent; Hait; Ferguson, 2018).

O cartão TEMPO<sup>®</sup> CAM é uma das opções para ensaio de quantificação de *Campylobacter* spp. e tem por objetivo quantificar *Campylobacter* spp. termófilos. O cartão é composto por um frasco de meio de cultura para a contagem do microrganismo teste. Uma alíquota da amostra é adicionada ao meio de cultura e a mistura é transferida para o cartão que contém 48 poços equivalentes a 3 diluições que correspondem aos volumes de 2,25, 22,5 e 225 µL. O cartão é selado automaticamente e posteriormente incubado em ambiente de microaerofilia. No decorrer da incubação, os microrganismos presentes na amostra degradam o substrato do meio de cultura permitindo o aparecimento de um sinal fluorescente detectado pelo sistema TEMPO<sup>®</sup> Reader. De acordo com o número de poços positivos, o sistema TEMPO<sup>®</sup> quantifica em UFC/g o número de microrganismos presente inicialmente na amostra através de um cálculo do software do sistema TEMPO<sup>®</sup>, não havendo necessidade de confirmações adicionais.

### 2.9.3 Método PCR em tempo real (rtPCR)

Comparáveis às técnicas tradicionais de microbiologia e enriquecimento, os métodos moleculares têm o potencial de ter maior sensibilidade e especificidade, bem como a velocidade de obtenção de dados (Ricke *et al.*, 2019). Dentre as técnicas baseadas em biologia molecular, a PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) trouxe enormes benefícios e desenvolvimentos científicos, demonstrando ser um excelente caminho para a rápida detecção de patógenos, até

mesmo aqueles de difícil cultivo (Valones *et al.*, 2009). A PCR é um processo de replicação de DNA que permite a amplificação exponencial do DNA alvo na presença de primers de oligonucleotídeos sintéticos e uma polimerase de DNA termoestável (Wang; Lai-King; Farber, 2001).

Ensaio de reação em cadeia de polimerase têm sido rotineiramente utilizados para detecção rápida, identificação e diferenciação de patógenos veiculados por alimentos. Eles têm sido utilizados em áreas como clonagem de DNA, diagnóstico de doenças hereditárias e infecciosas, identificação de impressões genéticas e detecção e diagnóstico de doenças infecciosas. A técnica de PCR desempenha um papel importante na identificação de cepas bacterianas típicas que existem em formas cocoides viáveis, mas não cultiváveis (por exemplo, *Campylobacter* spp.) que muitas vezes são perdidas pelo método de referencia (Magistrado; Garcia; Raymundo, 2001).

O uso de PCR também evita situações em que características fenotípicas são ambíguas e interpretadas erroneamente, como por exemplo, a ocorrência de cepas *Campylobacter jejuni* negativas (Adzitey; Corry, 2011). A introdução e o desenvolvimento de métodos moleculares como a PCR aumentaram as capacidades diagnósticas da indústria alimentícia para identificar a presença de patógenos veiculados por alimentos durante a produção de aves (Ricke *et al.*, 2019).

A técnica de PCR tornou-se muito difundida e bastante utilizada para o diagnóstico laboratorial de *Campylobacter* spp., principalmente pelas vantagens da alta sensibilidade e especificidade, além da facilidade de sua execução. Nesta técnica, sequências pré-determinadas de DNA podem ser amplificadas em milhões de cópias pelo uso de dois fragmentos específicos e complementares de DNA denominados iniciadores ou primers (Butzler, 2004), no entanto, a incapacidade de diferenciar entre células viáveis e mortas, dificulta seu uso na indústria alimentícia (Ricke *et al.*, 2019).

Derivado da PCR convencional, a rtPCR demonstra-se como uma inovação tecnológica e vem conquistando espaço nos diagnósticos clínicos e nos laboratórios de pesquisa por apresentar a capacidade de gerar, além de resultados qualitativos e quantitativos, uma opção mais rápida e precisa (Valones *et al.*, 2009).

PCR em tempo real é um processo de reação em cadeia de polimerase no qual o DNA alvo é amplificado e quantificado simultaneamente dentro de uma reação. A rtPCR emprega conjunto de primer específico, uma ou duas sondas e/ou corante fluorescente para melhorar os sinais de detecção (Dhanasekaran; Doherty; Kenneth, 2010; Shi; Long; Suo, 2010). O DNA amplificado é detectado em tempo real à medida que a reação progride em vez de ser no final

da reação. A rtPCR reduz o tempo de detecção em comparação com o PCR padrão e pode determinar o número absoluto ou relativo de bactérias em várias amostras (Shi; Long; Suo, 2010). Além disso, não há processamento de produtos após PCR, leva a alto rendimento e reduz o risco de contaminação de amplicons nos ambientes laboratoriais (Wong; Medrano, 2005; Shi; Long; Suo, 2010).

Segundo Pacholewicz *et al.* (2018), a rtPCR apresenta sensibilidade suficiente para ser aplicado à quantificação de 20 a 40 células viáveis/ml em água de lavagem de frango. A rtPCR foi descrito como um dos métodos mais sensíveis para a detecção de *Campylobacter* spp. (Reis *et al.*, 2018), no entanto, o uso rotineiro da metodologia é particularmente difícil nos países em desenvolvimento, onde representa um custo importante que não pode ser suportado por todos os laboratórios.

Perdoncine *et al.* (2022), indicam que na microbiologia convencional, o NMP e a rtPCR apresentam resultados semelhantes e podem ser utilizados para monitorar a presença de *Campylobacter* spp. em abatedouros frigoríficos. Independentemente do método escolhido pela indústria avícola, os métodos e protocolos específicos precisam ser escolhidos com base em matrizes alimentares, conveniência, tempo e custo (Ricke *et al.*, 2019).

O método rtPCR da Bioteccon<sup>®</sup> consiste inicialmente com a pesagem de uma alíquota de amostra na proporção de 1:10 para diluição inicial em água peptonada onde é retirada uma alíquota para extração do DNA. A amostra extraída é adicionada ao primer específico e levada ao termociclador para amplificação juntamente com os padrões de quantificação Foodproof Bioteccon<sup>®</sup> que irão gerar a curva padrão. O resultado da amostra é plotado sobre a curva padrão para que o software possa quantificar qualquer espécie de *Campylobacter* presente na amostra. Simultaneamente durante o processo de quantificação do microrganismo, o mesmo kit detecta a presença de espécies de *Campylobacter* termotolerantes de maior relevância para saúde pública, possibilitando a detecção de *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari*, *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter upsaliensis*.

#### 4 CONCLUSÃO

Em resposta aos objetivos do presente estudo, a partir do artigo I é possível concluir que os níveis de contaminação por *Campylobacter* spp. da carne de peru resfriada e congelada foram baixos. A avaliação da temperatura de armazenamento da carne de peru permitiu concluir que o congelamento favoreceu para redução do microrganismo em decorrência da utilização de amostras pareadas. O efeito da sazonalidade climática não foi conclusivo porque durante o período do verão o microrganismo não foi quantificado e nas demais estações por terem apresentado baixa frequência de contaminação, sendo necessária uma avaliação por um período maior. A partir do artigo II foi possível concluir que a metodologia TEMPO<sup>®</sup> com o uso do kit TEMPO<sup>®</sup> CAM ao ser comparada com a metodologia de referência através dos testes de Kruskal-Wallis e Bland-Altman não apresentou resultados satisfatórios em nenhuma das avaliações e por isso não é recomendada para uso em matriz de carne de peru. Na comparação do rtPCR Bioteccon<sup>®</sup> o desempenho foi satisfatório já que ocorreu uma boa correlação de dados especialmente aos que não obtiveram quantificação e seu uso é recomendado para matriz de carne de peru, porém por ter apresentado uma condição limitada de quantificação na faixa exponencial de 10<sup>2</sup> UFC/g, é um fator limitante que necessita ser avaliado pelo usuário antes da implantação. Como medida de segurança e confiabilidade, é sugerido que amostras com quantificação de *Campylobacter* spp. no rtPCR sejam confirmadas posteriormente pela metodologia de referência.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo fornece dados primordiais sobre os níveis de contaminação de *Campylobacter* spp. em cortes de carne de peru resfriados e congelados. Os dados e as informações apresentadas poderão ser úteis para o gerenciamento de risco na indústria avícola (perus de corte criados em sistema intensivo), dando ênfase à carne de peru que ainda é pouco estudada, e para órgãos regulamentadores que fiscalizam e aplicam a legislação vigente de higiene alimentar em nível nacional. Para o Ministério da Agricultura e Pecuária que já possui o programa de monitoramento de *Campylobacter* spp. em carne de frango, ao pretender expandir um controle futuro em outras cadeias de produção, poderá utilizar este estudo como uma base de dados para a definição de diretrizes do respectivo controle.

Apesar do baixo índice de quantificação de *Campylobacter* spp. encontrados nos cortes de peru estudados, a presença do patógeno não pode ser subestimada. Por fornecer risco aos consumidores, principalmente por contaminação cruzada com alimentos que serão consumidos crus, é recomendável que seja realizada uma avaliação mais abrangente de toda cadeia produtiva de perus para um mapeamento dos pontos mais críticos que possam ameaçar as atuais condições higiênicas sanitárias que a indústria vem mantendo. Também é importante avaliar os níveis de contaminação nas carcaças de peru antes e após o período de resfriamento em câmara fria por ser uma das possíveis etapas com influência positiva para redução do microrganismo antes da carcaça de peru ser cortada e embalada.

Os próximos passos para a continuidade dos estudos estão na busca por mais metodologias alternativas que possam ser fidedignas à metodologia de referência, por serem fundamentais para celeridade dos resultados, facilitam e aumentam a capacidade analítica permitindo que ações no processo fabril possam ser planejadas com maior antecedência em casos de resultados insatisfatórios, além de contribuírem diretamente com as operações logísticas da indústria. As metodologias alternativas principalmente o rtPCR são uma tendência que vem crescendo a cada ano e para isso é necessário continuar buscando alternativas que possam estar atendendo os limites de quantificação mais próximos das metodologias de referência para garantir uma equivalência mais adequada.

Também é necessária uma avaliação mais heterogênea na matriz amostral a partir da carne de outras espécies de animais e que estejam possivelmente contaminadas naturalmente como uma alternativa de aumentar a probabilidade de quantificação. É importante que matrizes cárneas de outras espécies animais sejam avaliadas, principalmente a carne de frango por possuir um histórico favorável para contaminação de *Campylobacter* spp.

## REFERENCIAS

ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual 2023**. Disponível em: <http://abpa-br.org/mercados/#relatorios>. Acesso em: 26 ago. 2023.

ADZITEY, F.; CORRY, J.A. Comparison between hippurate hydrolysis and multiplex PCR for differentiating *C. coli* and *C. jejuni*. **Life Science Research**. v. 22, n.1, p.91–98, 2011. Disponível em: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3819090/pdf/tlsr\\_22-1-8-91.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3819090/pdf/tlsr_22-1-8-91.pdf). Acesso em: 22 mar. 2023.

ALABOUDI, A. R. *et al.* Prevalence, antibiotic resistance and genotypes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from chickens in Irbid governorate, Jordan. **International Journal of Food Microbiology**. v. 327, art.108656, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1285275>. Acesso em: 12 nov. 2023

Al, S. *et al.* Development and evaluation of a novel *Campylobacter* spp. enrichment medium. **Journal of Microbiological Methods**. v. 157, p. 177-122, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.01.004>. Acesso em: 12 nov.2023

ALBRECHT, A. *et al.* Influence of Different Production Systems on the Quality and Shelf Life of Poultry Meat: A Case Study in the German Sector. **Journal of Food Quality**. v. 2019. Art. ID 3718057, 11 p., 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2019/3718057>. Acesso em: 12 nov. 2023.

ALTER, T. *et al.* Distribution of *Campylobacter jejuni* strains at different stages of a turkey slaughter line. **Food Microbiology**. v. 22, p. 345-351, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.08.008>. Acesso em: 13 nov. 2023.

ATANASSOVA, V. *et al.* Prevalence of *Campylobacter* spp. in turkey meat from a slaughterhouse and in turkey meat retail products. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v. 49, n. 1, p. 141-145, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2006.00180.x>. Acesso em: 13 nov. 2023.

BAFFONE, W. *et al.* *Campylobacter jejuni* loss of culturability in aqueous microcosms and ability to resuscitate in a mouse model. **International Journal of Food Microbiology**. v. 107, n. 1, p. 83-91, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.08.015>. Acesso em 13 nov. 2023.

BAKER, C.A. *et al.* Formalin-fixed cells as an internal standard approach for the detection and quantitative assessment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). **Food Control**. v. 63, p. 76-82, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.11.014>. Acesso em: 13 nov. 2023.

BAALI, M. *et al.* Prevalence, seasonality, and antimicrobial resistance of thermotolerant *Campylobacter* isolated from broiler farms and slaughterhouses in east Algeria. **Veterinary World**. v. 13, n. 6, p. 1221-1228, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.1221-1228>. Acessado em: 23 set. 2023.

- BEHRAVESH, C. B. *et al.* Deaths Associated With Bacterial Pathogens Transmitted Commonly Through Food: Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet), 1996–2005. **Journal of Infectious Diseases**. v. 204, ed. 2, p. 263-267, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/infdis/jir263>. Acesso em: 13 nov. 2023.
- BHADURI, S.; COTTRELL, B. Survival of cold-stressed *Campylobacter jejuni* on ground chickens and chicken skin during frozen storage. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 70, p. 7103-7109, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.70.12.7103-7109.2004>. Acesso em: 13 nov. 2023.
- BIASI, R. S. *et al.* Prevalence, strain identification and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. isolated from slaughtered pig carcasses in Brazil. **Food Control**. v. 22, ed. 5, p. 702-707, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.10.005>. Acesso em: 13 nov. 2023.
- BIESTA-PETERS, E.G. *et al.* Validation by interlaboratory trials of EN ISO 10272 - Microbiology of the food chain - Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. - Part 1: Detection method. **International Journal of Food Microbiology**. v. 288, n. 2, p. 39-46, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.007>. Acesso em: 13 nov. 2023.
- BLODGET, R. J.; GARTHRIGHT, W. E. Several MPN models for serial dilutions with suppressed growth at low dilutions. **Food Microbiology**. v. 15, n. 1, p. 91-99, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/fmic.1997.0144>. Acesso em: 14 nov. 2023.
- BOLTON, D. J. *Campylobacter* virulence and survival factors. **Food Microbiology**. v. 48, p. 99-108, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.017>. Acesso em: 13 nov. 2023.
- BORIN, I. C.; MARTINS, V.; TAKETANI, N. F. The implementation of rapid microbiological methods in the pharmaceutical industry. **Revista Ensaios Pioneiros**. v. 5, n. 2, p. 20-34, 2021. <https://doi.org/10.24933/rep.v5i2.234>. Acessado em 28 de outubro de 2023.
- BORTOLI, W.S.B. *et al.* Ocorrência de *Campylobacter* spp. em carcaças resfriadas de frangos abatidos na região oeste de Santa Catarina. **Acta Scientiae Veterinariae**. p. 1-6, 2017. Disponível em: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=289053641014>. Acesso em: 12 fev. 2022.
- BOVILL, R. A.; MACKEY, B. M. Resuscitation of 'non-culturable' cells from aged cultures of *Campylobacter jejuni*. **Microbiology-UK**. v. 143, p. 1575-1581, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/00221287-143-5-1575>. Acesso em: 07 ago. 2023.
- BOYSEN, L.; VIGRE, H.; ROSENQUIST, H. Seasonal influence on the prevalence of thermotolerant *Campylobacter* in retail broiler meat in Denmark. **Food Microbiology**. v.28, n. 5, p. 1028-1032, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.02.010>. Acesso em: 10 set. 2023.
- BHUNIA, A. K. General Mechanism of Pathogenesis for Foodborne Pathogens. **Foodborne Microbial Pathogens**. v. 1, p. 93-112, 2008. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-0-387-74537-4\\_4](https://doi.org/10.1007/978-0-387-74537-4_4). Acesso em: 17 set. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. Manual Integrado de Vigilância, Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas por Alimentos. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_integrado\\_vigilancia\\_doencas\\_alimentos.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado_vigilancia_doencas_alimentos.pdf). Acesso em: 14 out. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Boletim Epidemiológico. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2020. v. 51, n. 32. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/publicacoes>. Acesso em: 14 out. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa Nº 126, de 6 de julho de 2022. Estabelece os padrões microbiológicos dos Alimentos. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-727-de-1-de-julho-de-2022-413249279>. Acessado em: 02 dez. 2023.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 727, de 1 de julho de 2022. Rotulagem dos Alimentos Embalados. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2022. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-727-de-1-de-julho-de-2022-413249279>. Acessado em 16 dez. 2023.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria da Defesa Agropecuária. Instrução Normativa Nº 20, de 21 de outubro de 2016. Controles de *Salmonella* spp. nos estabelecimentos de abate de aves registrados no SIF. Brasília: Editora do Ministério da Agricultura e Pecuária, 2016. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/pnsa/legislacoes>. Acesso em 02 nov. 2023.

BRASIL. Decreto nº 9.013 de 29 de março de 2017. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA. Diário Oficial da União, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF, 2017. Disponível em: [https://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2015-2018/2017/decreto/d9013.htm](https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2017/decreto/d9013.htm)

BURFOOT, D. *et al.* Effect of rapid surface cooling on *Campylobacter* numbers on poultry carcasses. **Food Control**. v. 70, p. 293-301, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.05.041>. Acesso em: 13 nov. 2023.

BUTZLER, J.P. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. **Clinical Microbiology and Infection**. v.10, n. 10, p. 868-876, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.00983.x>. Acesso em 13 nov. 2023

CAKMAK, O.; EROL, I. Prevalence of thermophilic *Campylobacter* spp. in turkey meat and antibiotic resistance of *C. jejuni* isolates. **Journal of Food Safety**. v. 32, n. 4, p. 452-458, 2012. Disponível em: <https://doi-org.ez45.periodicos.capes.gov.br/10.1111/jfs.12004>. Acesso em: 13 nov. 2023.

CALLICOT, K.A. *et al.* Broiler *Campylobacter* contamination and human campylobacteriosis in Iceland. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 74, n. 21, p. 6483-6494, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.01129-08>. Acesso em: 13 nov. 2023.

CANNON, R.M. Sense and sensitivity – designing surveys based on an imperfect test. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 49, n 3-4, p. 141-163, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(01\)00184-2](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(01)00184-2). Acesso em: 13 nov. 2023.

CASTAÑEDA-GULLA, K.; SATTLEGGGER, E.; MUTUKUMIRA, A. N. Persistent contamination on *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus* at a broiler farm in New Zealand. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 66, n. 3, p. 171-185, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1139/cjm-2019-0280>. Acesso em: 13 nov. 2023.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks – United States, 2009–2010. Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR), v. 62, n. 3, p. 41-47, 2013. Disponível em <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6203a1.htm>. Acesso em: 03 nov. 2023.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Preliminary Food Net data on the incident of infection with pathogens transmitted commonly through food, United States, 2017. Question and answers, p. 1-3, 2019. Disponível em: <http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/campylobacter>. Acesso em: 20 jun. 2022.

CHAIOWWONG, W. *et al.* Physiological Characterization of *Campylobacter jejuni* under Cold Stresses Conditions: Its Potential for Public Threat. **Journal of Veterinary Medical Science**. v. 74, n. 1, p. 43-50, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1292/jvms.11-0305>. Acesso em: 13 nov.2023.

CIROLINI, A. *et al.* Evaluation of the Petrifilm™ and TEMPO® systems and the conventional method for counting microorganisms in pasteurized milk. **Food Science and Technology**. v. 33, n. 4, p. 784-789, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612013000400026>. Acesso em: 22 out. 2023.

COMISSÃO EUROPEIA. Regulamento (CE) n° 2073/2005 da Comissão de 15 de novembro de 2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos gêneros alimentícios. **Jornal Oficial da União Europeia**. Disponível em: <http://data.europa.eu/eli/reg/2005/2073/oj>. Acesso em 10 jan. 2022.

COMISSÃO EUROPEIA. Regulamento (UE) 2017/1495 da Comissão de 23 de agosto de 2017 que altera o Regulamento (CE) n° 2073/2005 no que diz respeito à *Campylobacter* em carcaças de frangos de carne. **Jornal Oficial da União Europeia**. Disponível em: <http://data.europa.eu/eli/reg/2017/1495/oj>. Acesso em: 10 jan. 2022.

COOMBS, C. E. O. *et al.* Long- term red meat preservation using chilled and frozen storage combinations: A review. **Meat Science**. v. 125, p. 84-94, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.11.025>. Acesso em: 13 nov. 2023

CRESPO, M.D. *et al.* Routes of transmission of *Salmonella* and *Campylobacter* in breeder turkeys. **Journal of Applied Poultry Research**. v. 35, n. 4, p. 591-609, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3382/japr/pfw035>. Acesso em: 13 nov. 2023.

CROWLEY, E. S. *et al.*. TEMPO® TVC for the enumeration of aerobic mesophilic flora in foods: collaborative study. **Journal of AOAC International**. v.92, n. 1, p. 165-174, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jaoac/92.1.165>. Acesso em: 04 mar. 2023.

CROWLEY, E. *et al.*. TEMPO® EC for the enumeration of *Escherichia coli* in foods: collaborative study. **Journal of AOAC International**. v. 93, n. 2, p. 576-586. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jaoac/93.2.576>. Acesso em: 04 mar. 2023.

DASTI, J. *et al.* *Campylobacter jejuni*: A brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. **International Journal of Medical Microbiology**. v. 300, n. 4, p. 205-211, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2009.07.002>. Acesso em 13 nov. 2023.

DELAHOY, M. J. *et al.* Preliminary incidence and trends of infections by pathogens transmitted commonly through food – Foodborne diseases active surveillance network, 10 U.S. sites, 2022. **National Library of Medicine**. v. 72, n. 26, p. 701-706, 2023. Disponível em <http://doi.org/10.15585/mmwr.mm7226a1>. Acesso em: 13 set. 2023.

DHANASEKARAN, S.; DOHERTY, T.M.; KENNETH, J. Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification. **Journal of Immunological Methods**. v. 354, n. 1-2, p. 34-39, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jim.2010.01.004>. Acesso em: 13 set. 2023

EBERLE, K. N.; KIESS, A. S. Phenotypic and genotypic methods for typing *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in poultry. **Poultry Science**. v. 91, p. 255-264, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.3382/ps.2011-01414>. Acesso em: 14 nov. 2023.

ECDC. European Centre for Disease Prevention and Control. Food-borne disease. Assessing the potential impacts of climate change on food and waterborne diseases in Europe. p. 1-26, apr. 2012, Stockholm. **ECDC**. Disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu/en/climate-change/climate-change-europe/food-borne-diseases>. Acesso em: 14 set. 2022.

EFSA. European Food Safety Authority. Scientific opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. **EFSA Journal**. v. 9, n. 6, p. 1-35, jun. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2246>. Acesso em: 10 set. 2022.

EFSA. European Food Safety Authority; ECDC. European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. **EFSA Journal**. v. 13, n.12, p. 1-190, dec. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4329>. Acesso em: 10 set. 2022.

EFSA - European Food Safety Authority. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. **EFSA Journal**. v. 12, n. 2, p. 1-314, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3457>. Acesso em: 10 set. 2022.

EFSA. European Food Safety Authority. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. **EFSA Journal**. v.

14, n. 12, p. 1-231, dec. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4634>. Acesso em: 10 set. 2022.

EFSA. European Food Safety Authority; ECDC. European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. **EFSA Journal**. v. 15, n. 12, p. 1-228, dec. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5077>. Acesso em: 05 set. 2022.

EFSA. European Food Safety Authority; ECDC. European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and foodborne outbreaks in 2017. **EFSA Journal**. v.16, n. 12, p. 1-262, dec. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5500>. Acesso em: 02 set. 2022.

EFSA. European Food Safety Authority; ECDC. European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union on Health 2018 Zoonoses Report. **EFSA Journal**, v.17, n. 12, p. 1-276, dec. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5926>. Acesso em: 10 set. 2022.

EFSA. European Food Safety Authority; ECDC. European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. **EFSA Journal**. v.19, n. 2, p. 1-286, feb. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6406>. Acesso em: 10 set. 2022.

EFSA. European Food Safety Authority; ECDC. European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. **EFSA Journal**. v. 19, n. 12, p. 1-324, dec. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6971>. Acesso em: 15 set. 2022.

FACCIOLÁ, A. *et al.* *Campylobacter*: from microbiology to prevention. **Journal of Preventive Medicine and hygiene**. v. 58, n. 2, p. E79-E92, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5584092/>. Acesso em: 13 nov. 2023.

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

FERRERO, R. L.; LEE, H. Motility of *Campylobacter jejuni* in a viscous environment: comparison with conventional rod-shaped bacteria. **Journal of General Microbiology**. v. 134, v. 1, p. 53-59, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/00221287-134-1-53>. Acesso em: 10 nov. 2023.

FDA. Food and Drug Administration. Bad Bug Book. Capítulo 1: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. **Food and Drug Administration**. n. 2, p. 1-292, 2012. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/foodborne-pathogens/bad-bug-book-second-edition>. Acesso em: 13 nov. 2022.

FSANZ. Food Standards Australia New Zealand. Compendium of microbiological criteria for food. p. 1-81, mar. 2022. Disponível em: <https://www.foodstandards.gov.au/publications/pages/compendium-of-microbiological-criteria-for-food.aspx>. Acesso em: 18 abr. 2023.

FSAI. Food Safety Authority of Ireland. Recommendations for a Practical Control

Programme for *Campylobacter* in the Poultry Production and Slaughter Chain. Report of the Scientific Committee of the Food Safety Authority of Ireland. **Food Safety Authority of Ireland**, Dublin, UK, 44 p., 2011. Disponível em: <https://www.fsai.ie/recommendationsforapracticalcontrolprogrammeforcampylobacterinthepoultryproductionandslaughterchain.html>. Acesso em: 13 nov. 2022.

FRANCHIN, P. R.; BATTISTELLA, P. M. D.; VIEIRA, C. R. Evaluation of multi-sequential interventions with water to reduce microbial loading as applied to chicken carcasses during slaughtering - a review. **World's Poultry Science Journal**. v. 66, n. 2, p. 203-214, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0043933910000267>. Acesso em 24 jul. 2023.

FRANCO, B. D. G. M; LANDGRAF, M.; DESTRO, M. T. **Microbiologia dos Alimentos**. 1. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2008. v. 1.

GAO, B. Metabolic and fitness determinants for in vitro growth and intestinal colonization of the bacterial pathogen *Campylobacter jejuni*. **Plos Biology**. v. 15, n. 5, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2001390>. Acesso em: 17 jul. 2023.

GARCIA-SÁNCHEZ, L. *Campylobacter jejuni* survival in a poultry processing plant environment. **Food Microbiology**. v.65, p. 185-192, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.02.00>. Acesso em: 18 jul. 2023.

GEORGSSON, F. *et al.* The influence of freezing and duration of storage on *Campylobacter* and indicator bacteria in broiler carcasses. **Food microbiology**. v. 23, n. 7, p. 677-683, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.10.003>. Acesso em 26 jun. 2023.

GHORBANALIZADGAN, M. *et al.* Pulsed-field gel electrophoresis fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated from clinical specimens, Iran. **International Microbiology**. v. 22, n. 3, p. 391-398, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10123-019-00062-8>. Acesso em 26 jun. 2023.

GOUVÊA, D. M. *et al.* Absorbent food pads containing bacteriophages for potential antimicrobial use in refrigerated food products. **LWT-Food Science and Technology**. v. 67, p. 159-166, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.11.043>. Acesso em: 12 ago. 2023.

HAMMAD H. H. M. *et al.* Effect of Freeze and Re-freeze on Chemical Composition of Beef and Poultry Meat at Storage Period 4.5 Months. **Journal of Food Processing Technology**. v.10, n.5, 2019. <https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000791>. Acesso em: 10 mai. 2023

HAMEDY, A. *et al.* Quantitative detection of *Campylobacter* spp on turkey carcasses and turkey meat. **Fleischwirtschaft**. v. 87, n. 10, p. 121-124, 2007. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/224944075>. Acesso em: 30 jun. 2023.

HEREDIA, N.; GARCÍA, S. Animals as sources of food-borne pathogens: A review. **Animal Nutrition**. v. 4, n. 3, p. 250-255, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.04.006>. Acesso em: 04 jul.2023.

HORROCKS, S. M. *et al.* Incidence and ecology of *Campylobacter jejuni* and *coli* in animals. **Anaerobe**. v. 15, n. 1-2, p. 18-25, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2008.09.001>. Acesso em: 13 nov. 2023.

HUANG, H. S. *et al.* *Campylobacter* species in animal, food and environmental sources and relevant testing programs in Canada. **Canadian Journal of Microbiology**. v.61, n. 10, p. 701-721, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1139/cjm-2014-0770>. Acesso em: 03 set. 2023.

HUEZO, R. *et al.* Effect of dry air or immersion chilling on recovery of bacteria from broiler carcasses. **Journal of Food Protection**. v. 70, n. 8, p. 1829-1834, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.8.1829>. Acesso em: 05 jul. 2023.

HUMPHREY, T. J.; O' BRIEN, S.; MADSEN, M. *Campylobacters* as zoonotic pathogens: A food production perspective. **International Journal of Food Microbiology**. v. 117, n. 3, p. 237-257, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.01.006>. Acesso em: 20 set. 2023.

HUMPHREY, S. *et al.* *Campylobacter jejuni* is not merely a commensal in commercial broiler chickens and affects bird welfare. **mBio**. v. 5, n. 4, p. 1-7, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mBio.01364-14>. Acesso em: 17 abr. 2023.

INMET. Instituto Nacional de Meteorologia. Tabela de dados das estações. Brasília – DF. Disponível em: <https://tempo.inmet.gov.br/TabelaEstacoes/A001>. Acesso em 23 abr. 2023.

IGWARAN, A., OKOH, A. I. Human campylobacteriosis: A public health concern of global importance. **Heliyon**. v. 5, n. 11, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02814>. Acesso em: 13 nov. 2023.

IRWIN, P. L.; NGUYEN, L. H. T.; CHEN, C.Y. The relationship between purely stochastic sampling error and the number of technical replicates used to estimate concentration at an extreme dilution. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v. 398, n. 2, p. 895-903, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3967-2>. Acesso em: 09 out. 2023.

ISHIHARA, K. *et al.* Effect of climatic elements on *Campylobacter* colonization in broiler flocks reared in southern Japan from 2008 to 2012. **Poultry Science**. v. 96, n.4, p. 931-937, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3382/ps/pew354>. Acesso em 05 jul. 2023.

ISO 6887-1. Microbiology of the food chain - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilution. **International Standard**. n. 2, p. 1-26, mar. 2017.

ISO 10272-2. Microbiology of the food chain - Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp – Part 2: Colony-count technique. **International Standard**. n. 2, p. 1-19, jun. 2017.

ISO 16140-2. Microbiology of the food chain – Method validation – Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method. **International Standard**. n. 1, p. 1-66, jun. 2016.

JASSON, V. *et al.* Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. **Food Microbiology**. v. 27, n. 6, p. 710-730, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.04.008>. Acesso em: 05 jul. 2023.

JOSEFSEN, M. H. *et al.* Rapid quantification of viable *Campylobacter* bacteria on chicken carcasses, using real-time PCR and propidium monoazide treatment, as a tool for quantitative risk assessment. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 76, n. 15, p. 5097–5104, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.00411-10>. Acesso em: 13 nov. 2023.

KALUPAHANA, R. S. *et al.* Weather correlates of *Campylobacter* prevalence in broilers at slaughter under tropical conditions in Sri Lanka. **Epidemiology and Infection**. v. 146, n. 8, p. 972-979, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0950268818000894>. Acesso em: 02 set. 2023.

KANAAN, M. H. G.; ABDULWAHID, M. T. Prevalence rate, antibiotic resistance and biotyping of thermotolerant *Campylobacter* isolated from poultry products vended in Wasit markets. v. 7, n. 3, p. 905-917, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.12944/CRNFSJ.7.3.29>. Acesso em: 10 jul. 2023.

KARKI, A. B.; WELLS, H.; FAKHR, M. K. Retail liver juices enhance the survivability of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* at low temperatures. **Scientific Reports**. v. 9, art. 2733, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35820-7>. Acesso em: 04 jul. 2023.

KIM, Y. S. *et al.* Investigation of the experience of foodborne illness and estimation of the incidence of foodborne disease in South Korea. **Food Control**. v. 47, p. 226-230, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.015>. Acesso em: 13 nov. 2023.

KIM, Y. S. *et al.* Analysis of microbiome in raw chicken meat from butcher shops and packaged products in South Korea to detect the potential risk of foodborne illness. **Food Research International**. v. 122, p. 517-527, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.05.032>. Acesso em 13 nov. 2023.

KOOLMAN, L. *et al.* Distribution of virulence-associated genes in a selection of *Campylobacter* isolates. **Foodborne Pathogens and Disiase**. v. 12, n. 5, p. 424-432, 2015. Disponível em: <https://doi-org.ez45.periodicos.capes.gov.br/10.1089/fpd.2014.1883>. Acesso em: 17 out. 2023

KOOLMAN, L. *et al.* Virulence gene expression, adhesion and invasion of *Campylobacter jejuni* exposed to oxidative stress (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). **International Journal of Food Microbiology**. v. 220, p. 33-38, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.002>. Acesso em: 14 nov. 2023.

KRÜGER, N. J. *et al.* “Limits of control” – Crucial parameters for a reliable quantification of viable *Campylobacter* by real-time PCR. **Plos One**. v. 9, ed. 2, p. 1-9, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088108>. Acesso em: 12 nov. 2023.

KUNICHA, A. Evaluation of the TEMPO system: An automated method for food microbiological quality control. **Journal of Biotechnology**. v. 131, n. 2, p.S69, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.07.119>. Acesso em: 13 nov. 2023.

LAZOU, T. P. *et al.* Method-dependent implications in foodborne pathogen quantification: the case of *Campylobacter coli* survival on meat as comparatively assessed by colony count and viability PCR. **Frontiers in Microbiology**. v. 12, p. 1-12, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.604933>. Acesso em: 27 jun. 2023.

LEE, H.; YOON, Y. Etiological Agents Implicated in Foodborne Illness World Wide. **Food Science of Animal Resources**. v. 41, ed. 1, p. 1-7, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.5851/kosfa.2020.e75>. Acesso em: 02 set. 2023.

LOPES, Paulo Afonso. Estatística aplicada à análise de resultados de ensaios de proficiência na avaliação de laboratórios. Anvisa, **Instituto Adolpho Lutz**, Rio de Janeiro. p. 1-20, 2003. Disponível em: <https://www.cliqueapostilas.com.br/>. Acesso em: 16 fev. 2023.

LOVINE, N. M. Resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni*. **Virulence**. v. 4, n. 3, p. 230-240, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/viru.23753>. Acesso em 13 nov. 2023.

MAGISTRADO, P. A.; GARCIA, M. M.; RAYMUNDO, A. K. Isolation and polymerase chain reaction-based detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from poultry in the Philippines. **International Journal of Food Microbiology**. v. 70, n. 1-2, p. 197-206, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00537-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00537-2). Acesso em 12 nov.2023.

MAZIERO, M. T.; DE 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**. v. 41, n. 2, p. 501-505, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000200034>.

MYINTZAW, P.; JAISWAL, A. K.; JAISWAL, S. A Review on *Campylobacteriosis* Associated with Poultry Meat Consumption. **Food Reviews International**. v. 39, n. 4, p. 2107–2121, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1942487>. Acesso em 13 nov. 2023.

NEWELL, M. G. *et al.* Food-borne diseases — The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. **International Journal of Food Microbiology**. v. 139, p. S3-S15, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.021>. Acesso em 07 out. 2023.

NF Validation. Validation of alternative analytical methods Certificate Number: BIO 12--/43-04/20. PP. 1-47. **Adria Food Expertise**. p. 1-47, 2020. Disponível em: [https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2020/06/Synt-BIO-12-43-04-20\\_en.pdf](https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2020/06/Synt-BIO-12-43-04-20_en.pdf). Acesso em: 21 mar. 2023.

OLIVEIRA, K. A. M. *et al.* Ocorrência de *Campylobacter* no ambiente de criação de frango de corte. **Revista Ceres**. v. 55, n. 6, p. 556-561, 2008. Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/bitstream/123456789/20564/1/artigo.pdf>. Acesso em: 26 dez. 2021.

OLIVEIRA, J. J. *et al.* *Campylobacter* spp. e sua ocorrência em abatedouros de aves. **Enciclopédia Biosfera**. v. 9, n. 16, 2013. Disponível em: <https://conhecer.org.br/ojs/index.php/biosfera/article/view/3380>. Acesso em: 18 jun. 2021.

OLIVEIRA, N. T.; CAMPOS, R. M. L. Utilização das ferramentas de gestão de qualidade em frigorífico de abate de bovinos para exportação. **Nutritime**. v. 12, n. 2, p. 4016-4029, 2015. Disponível em: <https://www.nutritime.com.br/wp-content/uploads/2020/02/Artigo-301.pdf>. Acesso em: 21 out. 2023.

OLIVEIRA, M. G. *et al.* Presence of genes associated with adhesion, invasion, and toxin production in *Campylobacter jejuni* isolates and effect of temperature on their expression. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 65, n. 4, p. 253-260, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0539>. Acesso em: 21 jan. 2022.

OOSTEROM, J. *et al.* Origin and prevalence of *Campylobacter jejuni* in poultry processing. **Journal of Food Protection**. v. 46, n. 4, p. 339-344, 1983. Disponível em: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-46.4.339>. Acesso em: 23 out. 2023.

OWEN, M.; WILLIS, C.; LAMPH, D. Evaluation of the TEMPO<sup>®</sup> most probable number technique for the enumeration of Enterobacteriaceae in food and dairy products. **Journal of Applied Microbiology**. v. 109, n. 5, p. 1810-1816, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04810.x>. Acesso em: 26 jan. 2022.

PACHOLEWICZ, E. *et al.* Explanatory Variables Associated with *Campylobacter* and *Escherichia coli* Concentrations on Broiler Chicken Carcasses during Processing in Two Slaughterhouse. **Journal of Food Protection**. v. 79, n. 12, p. 2038-2047, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-064>. Acesso em: 13 nov. 2023.

PACHOLEWICZ, E. *et al.* Internal Sample Process Control Improves Cultivation-Independent Quantification of Thermotolerant *Campylobacter*. **Food Microbiology**. v. 78, p. 53-61, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.09.017>. Acesso em: 23 out. 2023.

PAPIC, B. *et al.* New Approaches on Quantification of *Campylobacter jejuni* in Poultry Samples: The Use of Digital PCR and Real-time PCR against the ISO Standard Plate Count Method. **Frontiers in Microbiology**. v.8, p. 1-13, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00331>. Acesso em: 14 nov. 2023.

PATRICK, M. E. *et al.* Effects of Climate on Incidence of *Campylobacter* spp. in Humans and Prevalence in Broiler Flocks in Denmark. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 70, n.12, p. 7474-7480, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.70.12.7474-7480.2004>. Acesso em: 13 nov. 2023.

PERDONCINI, G. *et al.* Detection and Quantification of *Campylobacter* in Poultry Slaughterhouses Using Conventional Microbiological Technique, Most Probable Number, and Real-Time PCR. **Foodborne Pathogens and Disease**. v. 19, n. 2, p. 143-150, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/fpd.2021.0071>. Acesso em: 13 nov. 2023.

PERLIN, G. O.; PERLIN, C. M.; MARTINS, L. A. Epidemiological and Microbiological Aspects of Residential Outbreaks of Foodborne Illness in the Parana State, Brazil. **Ciências Agrárias, Londrina**. v. 37, n. 6, p. 4051-4062, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n6p4051>. Acesso em: 13 nov. 2023.

- PICCIRILLO, A. *et al.* Multilocus Sequence Typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* to Identify Potential Sources of Colonization in Commercial Turkey Farms. **Avian Pathology**. v. 47, n. 5, p. 455-466, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/03079457.2018.1487529>. Acesso em: 14 nov. 2023.
- RAHIMI, E.; MOMTAZ, H.; BONYADIAN, M. PCR detection of *Campylobacter* sp. from turkey carcasses during processing plant in Iran. **Food Control**. v. 21, n. 5, p. 692-694, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.10.009>. Acesso em: 14 nov. 2023.
- RAHIMI, E.; AMERI, M. Antimicrobial resistance patterns of *Campylobacter* spp. isolated from raw chicken, turkey, quail, partridge, and ostrich meat in Iran. **Food Control**. v. 22, n. 8, p. 1165-1170, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.01.010>. Acesso em: 14 nov. 2023.
- RASSCHAERT, G. *et al.* *Campylobacter* contamination of broilers: the role of transport and slaughterhouse. **International Journal of Food Microbiology**. v. 322, p. 1-11, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108564>. Acesso em: 10 out. 2023.
- REICHEL B. *et al.* Transmission pathways of *Campylobacter* spp at broiler farms and environment in Brandenburg, Germany. **Frontiers in Microbiology**. v. 13, p. 1-17, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.982693>. Acesso em: 24 out. 2022.
- REIS, L. P. *et al.* Detection of *Campylobacter* spp. in chilled and frozen broiler carcasses comparing immunoassay, PCR and real time PCR methods. **Ciencia Rural**. v. 48, n 2, p. 1-7, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20161034>. Acesso em 14 nov. 2023.
- REPÉRANT, E. *et al.* Influence of enrichment and isolation media on the detection of *Campylobacter* spp. in naturally contaminated chicken sample. **Journal of Microbiological Methods**. v. 128, p. 42-47, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.06.028>. Acesso em: 14 nov. 2023.
- RICKE, S. C. *et al.* Developments in Rapid Detection Methods for the Detection of Foodborne *Campylobacter* in the United States. **Frontiers in Microbiology**. v. 9, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03280>. Acesso em: 14 nov. 2023.
- RKI. Robert Koch Institute. Final presentation and evaluation of epidemiological findings in the EHEC O104:H4 outbreak, Germany 2011. **RKI. Berlin, Germany**. Disponível em [https://www.rki.de/EN/Content/infections/epidemiology/outbreaks/EHEC\\_O104/EHEC\\_final\\_report.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.rki.de/EN/Content/infections/epidemiology/outbreaks/EHEC_O104/EHEC_final_report.pdf?__blob=publicationFile). Acesso em: 14 set. 2022.
- SAHIN, O. *et al.* *Campylobacter* in Poultry: Ecology and Potential Interventions. **Avian Diseases**. v. 59, n. 2, p. 185-200, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1637/11072-032315-Review>. Acesso em: 14 jan. 2022.
- SANCHEZ, M. X. *et al.* Microbial profile and antibiotic susceptibility of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* spp. in broilers processed in air-chilled and immersion chilled environments. **Journal of Food Protection**. v. 65, n. 6, p. 948-956, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.6.948>. Acesso em: 16 set. 2023.

SANTOS, D. A. *et al.* The importance of hygienic and sanitary conditions in slaughterhouses: A literature review. **Research, Society and Development**. v. 10, n. 1, 2021. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/11455/10441>. Acesso em: 12 set. 2023.

SELIWIORSTOW, T. *et al.* Identification of risk factors for *Campylobacter* contamination levels on broiler carcasses during the slaughter process. **International Journal of Food microbiology**. v. 226, p. 26-32, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.03.010>. Acesso em 05 set. 2023.

SEMENZA, J. C. *et al.* Climate Change Impact Assessment of Food- and Waterborne Diseases. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**. v. 42, n. 8, p. 857-890, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10643389.2010.534706>. Acesso em: 14 nov. 2023

SHEN, Z. *et al.* Antimicrobial Resistance in *Campylobacter* spp. **Microbiology Spectrum**. v. 6, n. 2, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0013-2017>. Acesso em: 13 nov. 2023.

SHI, X.M.; LONG, F.; SUO, B. Molecular methods for the detection and characterization of foodborne pathogens. **Pure and Applied Chemistry**. v. 82, n.1, p. 69-79, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1351/PAC-CON-09-02-07>. Acesso em: 14/nov.2023.

SILVA, J. *et al.* *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: a review. **Frontiers in Microbiology**. v. 2, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00200>. Acesso em 10 out.2023.

SILVA, W. C. *et al.* *Campylobacter*: An Important Food Safety Issue. **Food Safety and Preservation**. p. 391-430, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814956-0.00013-5>. Acesso em: 27 mar. 2022.

SKARP, C.; HANNINEN, L.; RAUTELIN, H. *Campylobacterioses*: the role of poultry meat. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 22, n. 2, p. 103-109, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.11.019>. Acesso em: 30 mar. 2022.

SMITH, B.A. *et al.*, Seasonality and zoonotic foodborne pathogens in Canada: relationships between climate and *Campylobacter*, *E. coli* and *Salmonella* in meat products. **Epidemiology and Infection**. v. 147, art. e190, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0950268819000797>. Acesso em: 13 nov.2023.

STAHL, V. *et al.* Safety and quality assessment of ready-to-eat pork products in the cold chain. **Journal of Food Engineering**. v. 148, p. 43-52, 2015. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.09.040>. Acesso em: 01 out. 2023.

STELLA, S. *et al.* Evaluation of effect of chilling steps during slaughtering on the *Campylobacter* sp. counts on broiler carcasses. **Poultry Science**. v. 100, n. 3, p. 1-8, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.11.043>. Acesso em: 13 out. 2023.

STINGL, *et al.* Challenging the “gold standard” of colony-forming units - Validation of a multiplex real-time PCR for quantification of viable *Campylobacter* spp. in meat rinses. **International Journal of Food Microbiology**. v. 359, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109417>. Acesso em: 13 nov.2023.

SZOSLAND-FAŁTYN, A. *et al.* The Prevalence of *Campylobacter* spp. in Polish Poultry Meat. **Polish Journal of Microbiology**. v. 67, p. 117-120, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.5604/01.3001.0011.6152>. Acesso em: 13 nov. 2023.

TALLENT, S.M.; HAIT, J.M.; FERGUSON, M. Comparative study of Tempo BC automated MPN for the enumeration of *Bacillus cereus* group in food. **Journal of food safety**. v. 38, n.4, p. 1-6, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jfs.12472>. Acesso em: 24 out. 2023.

TAVOLARO, P. *et al.* Performance of two ready-to-use systems for enumeration of aerobic mesophilic microorganisms in frozen goat milk. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 36, n. 3, p. 295-300, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822005000300017>. Acesso em: 24 out. 2023.

TENHAGEN, B. A. *et al.* Comparison of antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter* isolates from conventional and organic turkey meat in Germany. **Foodborne Pathogens and Disease**. v.17, n. 12, p. 750-757, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/fpd.2020.2815>. Acesso em: 10 nov. 2023.

THEORET, J. R. *et al.* The *Campylobacter jejuni* Dps Homologue is Important for In Vitro Biofilm Formation, and Cecal Colonization of Poultry and may Serve as a Protective Antigen for Vaccination. **Clinical and vaccine Immunology**. v. 12, n. 9, p. 1426-1431, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CVI.00151-12>. Acesso em: 14 nov. 2023.

TORLAK, E.; AKAN, I. M.; GÖKMEN, M. Comparison of TEMPO® EC and TBX. Medium for the enumeration of *Escherichia coli* in cheese. **Letters in Applied Microbiology**. v. 47, n. 6, p. 566-570, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02467.x>. Acesso em: 14 nov. 2023.

USDA. Food Safety and Inspection Service. FSIS Directive 10,250.1. Sampling instructions: *Salmonella* and *Campylobacter* verification program for raw poultry products. Rev. 01, Washington, DC, 2021. Disponível em: [https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media\\_file/2021-03/10250.1\\_0.pdf](https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media_file/2021-03/10250.1_0.pdf). Acesso em: 28 dez. 2023.

VALONES, M. A. A. *et al.* Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.40, n. 1, p.1-11, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000100001>. Acesso em: 14 nov. 2023.

WARRISS, P. D. *et al.* Defaecation and weight of the gastrointestinal tract contents after feed and water withdrawal in broilers. **British Poultry Science**. v. 45, n. 1, p. 61-66, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/0007166041668879>. Acesso em: 24 out. 2023.

YORUK, N. G. Most probable number technique in *Escherichia coli* count using ISO 16649-3, ISO 7251, and rapid test enumeration device (TEMPO EC) methods in milk and dairy products. **Journal of Food Safety**. v. 38, n. 5, p. 1-7, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jfs.12502>. Acesso em 14 nov. 2023.

YOSSA, N. *et al.* Comparison of TEMPO® BC with Spiral Plating Methods for the Enumeration of *Bacillus cereus* in Cosmetic Products Either Naturally Preserved or Preserved

with Phenoxyethanol. **Journal of AOAC International**. v. 102, n. 4, p. 1080–1090, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.5740/jaoacint.18-0375>. Acesso em 13 nov. 2023.

WAFAA, M.M.H.; MEKKY, A.A.A.; ENANY, M. E. Review on Some Virulence Factors Associated with *Campylobacter* Colonization and Infection in Poultry and Human. **American Journal of Biomedical Science & Research**. v. 3, p. 460-463, 2019. Disponível em: <https://biomedgrid.com/pdf/AJBSR.MS.ID.000717.pdf>. Acesso em: 25 nov. 2021.

WANG, H.; NG, LAI-KING.; FARBER, J. Detection of *Campylobacter jejuni* and thermophilic *Campylobacter* spp. from foods by polymerase chain reaction. **Methods in biotechnology, food microbiology protocols**. v. 14, p. 95–106, 2001. <https://doi.org/10.138511-59259-029-2:95>. Acesso em: 12 fev. 2022.

WHO. World Health Organization. Global health observatory data repository-Road traffic deaths data by country. **World Health Organization**. 2020. Disponível em: [https://www.who.int/gho/road\\_safety/mortality/traffic\\_deaths\\_number/en/](https://www.who.int/gho/road_safety/mortality/traffic_deaths_number/en/). Acesso em: 10 jun. 2022.

WHO. World Health Organization. Water-related diseases. **World Health Organization**. 2015. Disponível em: [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/diseases/campylobacteriosis/en/](http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/campylobacteriosis/en/). Acesso em: 18 jun. 2021.

WHO - World Health Organization. Estimates of the global burden of foodborne diseases. **World Health Organization**. 2015. Disponível em: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165\\_eng.pdf?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165_eng.pdf?sequence=1). Acesso em: 18 jun. 2022.

WHYTE, P. *et al.* A Comparative Study of Thermophilic *Campylobacter* Isolates of Clinical, Food and Pet Origin. **Saffod**. p. 1-40, 2006. Disponível em: <https://www.safefood.net/research-reports/comparative-study-campylobacter>. Acesso em: 20 nov. 2022.

WIECZOREK, K.; OSEK, J. Antimicrobial Resistance Mechanisms among *Campylobacter*. **BioMed Research International**. v. 2013, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2013/340605>. Acesso em: 13 nov.2023.

WONG, M.L.; MEDRANO, J.F. Real-time PCR for mRNA quantitation. **Biotechniques**. v. 39, n. 1, p. 75-85, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.2144/05391RV01>. Acesso em 14 nov. 2023.

WULSTEN, I. F.; GALEEV, A.; STINGL, A. Underestimated survival of *Campylobacter* in raw milk highlighted by viability real-time PCR and growth recovery. **Frontiers in Microbiology**. v. 11, p. 1-9, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01107>. Acesso em: 13 nov. 2023.

ZAIDI, M. B. *et al.* Integrated Food Chain Surveillance System for *Salmonella* spp. in Mexico. **Emerging Infectious Diseases**. v.14, n. 3, p. 429-435, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.3201/eid1403.071057>. Acesso em: 14 nov. 2023.

ZHUANG, H. *et al.* Effects of broiler carcass scalding and chilling methods on quality of early deboned breast fillets. **Poultry Science**. v. 92, n. 5, p. 1393-1399, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02814>. Acesso em: 24 out. 2023.

ZITS, U. W. *et al.* Evaluation of three applications of a semi-automated most-probable-number method for the assessment of microbiological parameters in dairy products. **Accreditation and Quality Assurance**. v. 16, n. 6, p. 299-309, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00769-011-0772-3>. Acesso em: 12 nov. 2023.

## APÊNDICE A

### **Avaliação do limite de quantificação e da precisão das metodologias utilizadas**

Para a avaliação do limite de quantificação (LQ) dos métodos que corresponde a menor quantidade de analito que pode ser quantificada com exatidão e precisão, foi utilizada amostra fortificada com material de referência certificado (MRC) da espécie *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* (Microbiologics®), lote número 111-60, número de referência ATCC 33560, com 1 passagem de referência e validade até 31/05/2023. Para ambos os LQ foram utilizados as menores diluições possíveis a partir de uma cultura de trabalho estacionária com concentração conhecida. Foram realizadas diluições sucessivas para obtenção de concentrações mais próximas de 1,0 até 3,0 log<sub>10</sub>. Os resultados foram satisfatórios para as concentrações aplicadas, sendo que os métodos ISO e TEMPO® apresentaram LQ na faixa de 1,0 log<sub>10</sub> UFC, porém o método de PCR apresentou o LQ mais adequado na faixa de 2,0 log<sub>10</sub> UFC.

Na avaliação da precisão dos métodos alternativos foi aplicado o teste de Cochran comparando o método ISO versus Método TEMPO® e método ISO versus Método PCR. O teste foi aplicado a partir do uso de cultura de trabalho do MRC com as respectivas diluições definidas. Os resultados obtidos a partir do teste de Cochran possibilitaram avaliar a homogeneidade das variâncias dos métodos TEMPO® e PCR perante os valores especificados na tabela de valores críticos para teste de Cochran (Lopes, 2003).

Foram realizados ensaios com 12 amostras de MRC diluído em concentrações conhecidas dentro da faixa de trabalho e do nível de contaminação esperados. As concentrações variaram de 1,48 log<sub>10</sub> a 3,18 log<sub>10</sub> UFC/g. Em todas as diluições os valores calculados foram menores que o valor tabelado, tornando conclusivo que os valores calculados para os métodos de ensaios TEMPO® e PCR foram menos variáveis, comprovando que foram precisos e que nenhuma das variâncias encontradas deveria ser descartada, resultados que corroboraram para que ambos os métodos fossem aprovados para serem utilizados para o estudo. Os valores e os resultados obtidos para interpretação e aprovação estão descritos na Tabela 1 e Tabela 2.

Tabela 1 - Valores do teste de Cochran calculados para o método ISO 10272-2 versus método TEMPO® CAM a partir dos resultados de contagem de *Campylobacter* spp. obtidos com MRC da espécie *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* diluído em concentrações conhecidas dentro da faixa de trabalho e do nível de contaminação esperados

Amostra	Método ISO	Método TEMPO®	Diferença	Variância (S <sup>2</sup> )	Cochran Tabelado	Cochran Calculado
	Resultado log <sub>10</sub>	Resultado log <sub>10</sub>				
MRC 1	3,18	3,96	-0,7800	0,3042	-	-
MRC 2	3,08	3,65	-0,5700	0,1625	-	-
MRC 3	2,69	2,75	-0,0600	0,0018	0,967	0,649
MRC 4	2,69	2,92	-0,2300	0,0265	0,906	0,053
MRC 5	2,48	2,76	-0,2800	0,0392	0,841	0,073
MRC 6	2,72	2,64	0,0800	0,0032	0,781	0,006
MRC 7	1,70	1,65	0,0500	0,0013	0,727	0,002
MRC 8	1,60	1,65	-0,0500	0,0012	0,680	0,002
MRC 9	1,48	1,32	0,1600	0,0128	0,638	0,023
MRC 10	1,78	1,86	-0,0800	0,0032	0,602	0,006
MRC 11	1,00	1,00	-1,0000	0,5000	0,570	0,474
MRC 12	0,00	1,00	-1,0000	0,5000	0,541	0,321

Fonte: o próprio autor

Legenda: - MRC *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni*, marca Microbiologics®, lote número 111-60, número de referência ATCC 33560, com concentrações variadas; - Valor crítico através do teste de Cochran para a comparação de dois métodos a partir do terceiro resultado, a um nível de significância de 95%.

Tabela 2 - Valores do teste de Cochran calculados para o método ISO 10272-2 versus método rtPCR a partir dos resultados de contagem de *Campylobacter* spp. obtidos com MRC da espécie *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* diluído em concentrações conhecidas dentro da faixa de trabalho e do nível de contaminação esperados

(continua)

Amostra <sup>1</sup>	Método ISO	Método rtPCR	Diferença	Variância (S <sup>2</sup> )	Cochran Tabelado <sup>2</sup>	Cochran Calculado
	Resultado log <sub>10</sub>	Resultado log <sub>10</sub>				
MRC 1	3,18	3,54	-0,3600	0,0648	-	-
MRC 2	3,08	3,91	-0,8300	0,3445	-	-
MRC 3	2,69	2,92	-0,2300	0,0265	0,967	0,791
MRC 4	2,69	2,73	-0,0400	0,0008	0,906	0,002
MRC 5	2,48	1,94	0,5400	0,1458	0,841	0,250
MRC 6	2,72	2,30	0,4200	0,0882	0,781	0,132

Tabela 2 - Valores do teste de Cochran calculados para o método ISO 10272-2 versus método rtPCR a partir dos resultados de contagem de *Campylobacter* spp. obtidos com MRC diluído em concentrações conhecidas dentro da faixa de trabalho e do nível de contaminação esperados

(conclusão)

Amostra <sup>1</sup>	Método ISO	Método rtPCR	Diferença	Variância (S <sup>2</sup> )	Cochran Tabelado <sup>2</sup>	Cochran Calculado
	Resultado log <sub>10</sub>	Resultado log <sub>10</sub>				
MRC 7	1,70	3,41	-1,7100	1,4621	0,727	0,686
MRC 8	1,60	3,45	-1,8500	1,7113	0,680	0,445
MRC 9	1,48	3,38	-1,9000	1,8050	0,638	0,320
MRC 10	1,78	3,30	-1,5200	1,1552	0,602	0,170
MRC 11	1,00	1,00	0,0000	0,0000	0,570	0,000
MRC 12	0,00	2,79	-2,7900	3,8921	0,541	0,364

Fonte: o próprio autor

Legenda: - MRC *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* Microbiologics<sup>®</sup>, lote número 111-60, número de referência ATCC 33560, com concentrações variadas; - Valor crítico através do teste de Cochran para a comparação de dois métodos a partir do terceiro resultado, a um nível de significância de 95%.