

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
ESPECIALIZAÇÃO EM PRODUÇÃO, TECNOLOGIA E HIGIENE DE
PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL

Prevalência de *Campylobacter jejuni* e *C. coli* em carcaças de aves após o pré-resfriamento por imersão.

Autor: Gustavo Perdoncini

PORTO ALEGRE

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
ESPECIALIZAÇÃO EM PRODUÇÃO, TECNOLOGIA E HIGIENE DE
PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL

Prevalência de *Campylobacter jejuni* e *C. coli* em carcaças de aves após o pré-resfriamento por imersão.

Autor: Gustavo Perdoncini

Monografia apresentado à Faculdade de Veterinária como requisito parcial para obtenção de título de Especialista em Produção, Tecnologia e Higiene de Produtos de Origem Animal.

Orientadora: Verônica Schmidt

Co-orientador: Vladimir Pinheiro do Nascimento

PORTO ALEGRE

2012

DEDICATÓRIA

*Este trabalho só foi
possível devido
à confiança que meus pais
depositaram em mim.
Dedico-o a vocês, Lauri e
Elda Perdoncini*

AGRADECIMENTO

Ao longo desta jornada conheci muitas pessoas que auxiliaram a traçar meu caminho. Hoje, quero agradecer, em especial, à professora Verônica Schmidt e ao professor Vladimir Pinheiro do Nascimento por compartilhar conhecimentos e aprendizados, tornando este trabalho possível de ser realizado.

Antes de começar a trabalhar com *Campylobacter* spp. muitas pessoas diziam que estas bactérias eram terríveis para isolar; mas, com ajuda de pessoas como o professor Marcos Gomes, Yuli Mellisa e Leonardo Lima, foi possível aprender e adquirir experiência e acrescentar uma bagagem positiva ao longo da realização deste projeto. A eles meu agradecimento.

Chegando na reta final do trabalho, a ajuda dos meus colegas do CDPA foi de grande importância. Em especial meu muito obrigado ao colega Thiago Tejkowski pela cooperação, serei sempre grato!

Aos colegas do MAPA que auxiliaram o desenvolvimento deste trabalho, especialmente Leonardo Isolan.

Quero agradecer a minha família que eu amo, única e fundamental para eu estar aqui estudando e formando a base do meu futuro. Muito obrigado!

"Os passos para o sucesso são simples:

Decida o que você quer.

Verifique o preço.

Pague o preço".

(autor desconhecido)

RESUMO

Campylobacter é o agente de uma zoonose que representa um importante problema de saúde pública e hoje é reconhecido como um patógeno emergente transmitido por alimentos, o qual é amplamente distribuído na indústria avícola. O objetivo deste trabalho foi avaliar a frequência e o nível de contaminação por *Campylobacter* spp. em carcaças de frango. A amostragem foi realizada por conveniência durante os primeiros 6 meses do ano de 2012. Foram coletadas 57 carcaças após refrigeração por imersão em abatedouros frigoríficos com inspeção federal. Cada amostra foi analisada através da incubação a 41,5°C por 48 horas de 1 mL da água de rinsagem em 9 mL de caldo Bolton e plaqueado em ágar mCCDA, seguido de incubação por 48 horas a uma temperatura de 41,5°C. Amostras suspeitas de *Campylobacter* spp. foram confirmadas a partir da reação de cadeia da polimerase. Isolou-se *Campylobacter* spp. de 40 (70,2%) carcaças, sendo a espécie prevalente *C. jejuni* (82%), seguido de *C. coli* (8%). Em 10% das amostras identificou-se *C. jejuni* e *C. coli* concomitantemente. A alta prevalência de carcaças com *Campylobacter* spp., especialmente a espécie *C. jejuni*, enfatiza a importância do monitoramento de patógenos transmitidos por alimentos e a necessidade constante de melhorar a cadeia produtiva avícola.

Palavras chaves: contaminação, frangos, saúde pública, zoonose.

ABSTRACT

Campylobacter is a zoonosis agent that represents an important public health problem and nowadays it is recognized as an emerging foodborne pathogen, which is widely distributed in the poultry industry around the world. The aim of this work was to evaluate the frequency and level of contamination by *Campylobacter* spp. in poultry carcasses. Sampling was done for convenience during the first 6 months of 2012. Fifty-four post-chiller poultry carcasses were collected in a slaughterhouse with federal inspection. For each sample 1 ml of water rinse was transferred to 9 mL of Bolton broth, incubated at 41,5°C for 48 hours and streaked on mCCDA agar followed by incubation for 48h at 41,5°C. Samples suspicious of *Campylobacter* spp. were confirmed by the polymerase chain reaction. *Campylobacter* spp. was isolated in 40 (70,2%) carcasses. The species most prevalent was *C. jejuni* (82%), followed by *C. coli* (8%). It was identified in 10% of the samples *C. jejuni* and *C. coli* concomitantly. The high prevalence of *Campylobacter* spp., isolated from carcasses, especially *C. jejuni*, emphasizes the importance of monitoring the foodborne and the need to constantly improve the production chain.

Keywords: contamination, broilers, public health, zoonosis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência dos primers utilizados para identificar as espécies de *C. jejuni* e *C.*

coli21

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Lâmina com coloração de Gram de <i>Campylobacter</i> sp.	13
Figura 2 - Rinsagem de carcaça de frango em sacos estéreis de polietileno contendo 400 mL de Água Peptonada Tamponada.	19
Figura 3 - Coleta do material rinsado para inocular em meio de cultura para cultivo de <i>Campylobacter</i> spp.	19
Figura 4 - Filtração de 100µL da suspensão do caldo bolton em membrana de acetato com poro de 0,65µm sobre ágar mCCDA.	20
Figura 5 - Frequência de espécies de <i>Campylobacter</i> spp. isolados de carcaças após o pré-resfriamento por imersão.	23

LISTA DE ABREVIATURAS

UBABEF	União Brasileira de Avicultura
DTA	Toxinfecções Alimentares
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
CDC	<i>Centers for disease control</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
OMS	Organização Mundial da Saúde
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
EUA	Estado Unidos da América
RIISPOA	Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
LABCVET	Laboratório de Bacteriologia Veterinária da UFRGS
APT	Água Peptonada Tamponada
GBS	Síndrome de Guillain Barré

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA	13
2.1 Características do gênero <i>Campylobacter</i>	13
2.2 <i>Campylobacter</i> em produtos avícolas	14
3 MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Amostras	18
3.2 Métodos Microbiológicos e de Identificação	18
3.2.1 Processamento das carcaças para isolamento de <i>Campylobacter</i>	18
3.2.2 Identificação de <i>Campylobacter</i>	20
3.2.3 Condições para o ensaio duplex PCR e eletroforese	21
3.2.4 Armazenamento das amostras confirmadas	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5 CONCLUSÃO	27
BIBLIOGRAFIA	28

1 INTRODUÇÃO

O Brasil, nos últimos anos, vem assumindo papel de destaque na produção e exportação de frango, consolidando-se como um importante setor na produção de proteína animal com baixo custo e ainda com grande potencial de expansão. No ano de 2010, as exportações brasileiras somaram 3,819 milhões de toneladas, o que representou um aumento de 5,1% em relação a 2009. No Brasil, o consumo de produtos avícolas vem ganhando cada vez mais espaço na mesa, representando 44,09 Kg *per capita* no ano de 2010, um aumento de 5,6 Kg em relação ao ano anterior (UBABEF, 2011).

Considerando o bom desenvolvimento da avicultura e a necessidade de produzir alimentos seguros e com qualidade, a adoção de medidas para o controle sanitário das granjas e indústrias é fundamental para evitar surtos de toxinfecções alimentares -DTA transmitidas por produtos avícolas. Atualmente, o gênero *Campylobacter*, responsáveis pela campylobacteriose, é o agente prevalente em relatos de gastroenterite na União Européia (EFSA, 2009) e o segundo agente mais isolado em doenças de origem alimentar nos Estados Unidos (CDC, 2009), tornando necessário estudos em outras regiões.

A campylobacteriose é uma doença de origem alimentar emergente que representa um importante problema para saúde pública. A alta incidência de enfermidades relacionadas a este microrganismo em seres humanos dá-se, principalmente, através do consumo de carne de frango, que é a principal fonte de infecção (DICKINS, 2002). A positividade para *Campylobacter* spp. em lotes de frangos é bastante variável, apresentando taxas de positividade variadas de entre lotes abatidos (CARVALHO, 2006) e pontos ao longo da linha de abate como, por exemplo, a depenadeira e o tanque de resfriamento, que atuam como importante local de contaminação de lotes previamente negativos para este agente (KUANA, 2008).

O conhecimento da situação sanitária de carcaças de frangos constitui um parâmetro importante para a determinação da qualidade microbiológica e da inocuidade dos alimentos (HALD *et al.*, 2000). O emprego da avaliação microbiológica e bioquímica (HODGE *et al.*, 1990), geralmente utilizado para identificar e diferenciar *Campylobacter jejuni* e *C. coli*, necessitam de um segundo ensaio que possibilite a melhor discriminação do isolado como, por exemplo, o emprego da Reação em Cadeia da Polimerase – PCR (DENNIS, 1999).

A ocorrência de *Campylobacter* em carne de aves poderia até ser encarada com naturalidade, uma vez que este faz parte da flora das aves. Entretanto, devido à crescente

importância deste microrganismo, este trabalho teve como objetivo verificar a ocorrência de *C. jejuni* e *C. coli* em carcaças de frango após o resfriamento por imersão em frigoríficos com inspeção federal no estado do Rio Grande do Sul.

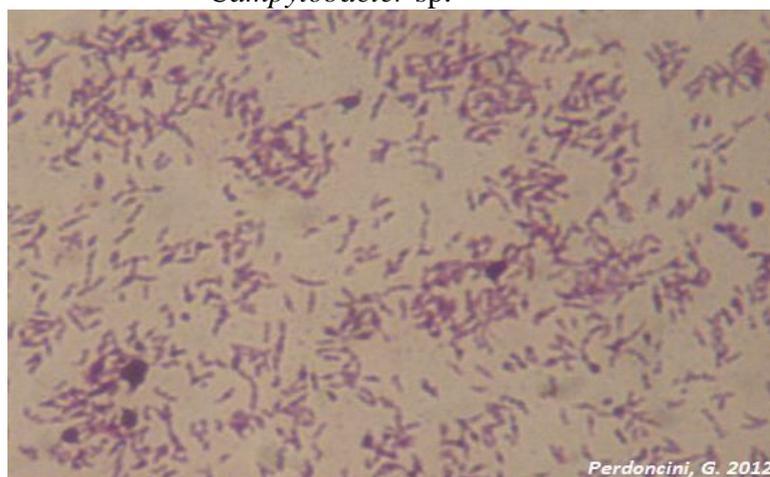
2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1 Características do gênero *Campylobacter*

Campylobacter spp. são bactérias responsáveis pela campylobacteriose (BUTZLER, 2004), doença responsável por infecções entéricas com caráter zoonótico (WHO, 2000). Os membros do gênero *Campylobacter* são associados a doenças humanas (VUCIC, 2009), principalmente devido o consumo de carne de aves (BUTZLER, 2004). Das espécies deste gênero, *C. jejuni* e *C. coli* são isoladas com maior frequência em produtos de origem avícolas (FERNANDEZ; PISÓN, 1996; FREITAS 2007; GRITTI *et al.*, 2011), entretanto, estes microrganismos também são isolados de outros produtos de origem animal, como por exemplo do leite e produtos cárneos de bovinos (FERNÁNDEZ; HITSCHFELD, 2009).

Esses patógenos entéricos são adquiridos, geralmente, de origem alimentar e apresentam formato de pequenos bastonetes Gram negativos, curvos ou espiralados também conhecido como asa de gaviota (Figura 1), são oxidase positiva, não esporulados e com tamanho de 0,2µm a 0,9 µm de largura e 0,2 µm a 0,5µm de comprimento (BUTZLER, 2004; JOES, 2010;). Melhor avaliação da morfologia e características de motilidade pode ser observada através do auxílio de um microscópio de contraste de fase.

Figura 1 - Lâmina com coloração de Gram de *Campylobacter* sp.



Fonte: O autor

Bactérias patogênicas podem crescer em ambiente com temperatura de 37°C, próxima a dos seres humanos (QUINN *et al.* 2005), entretanto bactérias do gênero *Campylobacter*, em especial *C. jejuni* e *C. coli*, por terem características termófilicas e com cultivo fastidioso (JOES, 2010), crescem melhor na temperatura de 41,5°C (BOLTON *et al.*

1984; ISO, 2006). Estes microrganismos requerem técnicas eficientes para a produção de um ambiente adequado para seu crescimento, geralmente com atmosfera de 5 a 7% de oxigênio, 10% de gás carbônico e 85% de nitrogênio (SNELLING, 2005; JOES, 2010; HUMPHREY, 2007).

Campylobacteriose é uma das principais causas de doenças bacterianas intestinais em humanos causada, principalmente, pelo *C. jejuni* e *C. coli*, que representam 80% e 10% respectivamente das espécies isoladas de produtos avícolas (OIE, 2008). Cada espécie possui um reservatório favorito; no caso do *C. jejuni*, a mesma está envolvida na colonização preferencialmente do intestino das aves, que possuem uma temperatura que favorece seu crescimento.

2.2 *Campylobacter* em produtos avícolas

Relatos do aumento da incidência da campylobacteriose em diversos países do mundo tem demonstrado paralelamente preocupação com este patógeno emergente, especialmente após 1990, devido ao aumento de casos de morbidade e mortalidade em crianças e pessoas com imunodeficiência (WHO, 2000). A alta incidência dessas infecções relatadas em seres humanos dá-se, principalmente, através do consumo de carne de frango, principal fonte de infecção (DICKINS, 2002). Entretanto, a colonização de lotes de frangos por *Campylobacter* spp. é bastante variável, apresentando taxas de positividade encontradas entre 0 a 100% (CARVALHO, 2006).

Duas diferentes abordagens podem ser empregadas para redução e/ou eliminação deste microrganismo. Por um lado, há a necessidade de adoção de medidas específicas de controle a nível primário, visando à redução de granjas positivas e, no mesmo sentido, porém na indústria, faz-se necessário a implantação de medidas que minimizem a contaminação das carcaças (HALD *et al.*, 2000).

Autoridades de gestão em segurança alimentar, como por exemplo, a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a comissão do Codex Alimentarius, internacionalmente, e o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA, no Brasil, trabalham de forma a desenvolver normas que atendam as exigências mínimas para produção e consumo de alimentos saudáveis. Para manter a qualidade dos produtos produzidos e atender as exigências dos mercados internacionais, o Brasil dispõe de uma ampla legislação, onde se

destacam o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA (BRASIL, 1950); Programas de autocontrole, através das Circulares nº 175 e nº 176 do MAPA (BRASIL, 2005); o estabelecimento de Padrões Microbiológicos para Alimentos, através da RDC nº 12 – ANVISA (BRASIL, 2001) e, mais especificamente para aves, o Plano Nacional de Sanidade Avícola – PNSA (BRASIL, 1995), o Programa de Redução de Patógenos através da Instrução Normativa nº 70 – MAPA (BRASIL, 2003) e o Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carnes de Aves através da Portaria nº 210 – MAPA (BRASIL, 1998).

A OMS (WHO, 2000), narra o crescente aumento de casos relacionado à campylobacteriose, porém apesar de haver dados publicados em relação à incidência desta enfermidade nos Estados Unidos da América e na União Européia, a incidência é incerta devido aos vários casos diagnosticados, porém não declarados. A OMS ainda relata que a mortalidade por esta doença 30 dias após a infecção, possui uma proporção de 4 casos a cada 1000 infecções. Casos de pessoas infectadas pelo Vírus da Imunodeficiência Humana contribuem para o aumento da mortalidade após quadros de campylobacteriose.

A conta a ser paga referente a este problema de saúde pública é alto. Na Holanda, estima-se 80.000 casos de campylobacteriose por ano, gerando um custo anual de 21 milhões de Euros e destes, $\frac{3}{4}$ dos custos são referentes a problemas gastrointestinais (HAVELAAR, 2005).

Relatório publicado pelo CDC exhibe dados da tendência e incidência de *Campylobacter* spp. desde 1996 nos Estados Unidos da América - EUA. Quando comparados os dados da vigilância de 2009 com os três primeiros anos do relatório (CDC, 2010), observa-se redução da incidência de infecções causadas por *Campylobacter*, além de outros patógenos como *Salmonella*, *Listeria*, *Shigella* e *Yersinia*.

Estimativas, avaliadas por SCALLAN *et al.* (2011), enfocam que doenças transmitidas por alimentos podem ser utilizadas como intervenções políticas de medidas de segurança alimentar, possibilitando concentrar esforços em determinados microrganismos, reduzindo, desta forma, o alto custo causado por determinadas enfermidades. Informações oriundas da vigilância ativa e passiva e de outras fontes dos EUA mostram que a cada ano ocorrem 9,4 milhões de casos de toxinfecções alimentares, com 55.961 hospitalizações e 1.351 mortes. Desse total, 11% dos casos têm como agente *Salmonella* spp. e 9% *Campylobacter* spp. Do total de casos relacionados à Campylobacteriose, 15% das pessoas são conduzidas para hospitalização.

Produtos avícolas possuem uma relação positiva com casos relatados em seres humanos, desta forma estudos realizados em 26 países da União Européia (EU) e mais dois não pertencentes ao grupo, trabalharam a identificação e quantificação de *Campylobacter* spp. em lotes e carcaças de frangos de corte, durante o ano de 2008. De um total de 10.132 lotes amostrados em 561 abatedouros frigoríficos, obteve-se uma prevalência de 71,2% de positividade para os lotes e de 75,8% para as carcaças. Houve uma grande variação entre países, sendo que o agente foi identificado em 2% a 100% e 4,9% a 100% de cecos e carcaças, respectivamente (EFSA, 2010). Das amostras isoladas, 2/3 foram identificadas como *Campylobacter jejuni* e 1/3 como *Campylobacter coli*.

Na Alemanha, ATANASSORA *et al.* (2007) avaliaram 144 perus retirados diretamente de frigorífico e 100 amostras de peru coletadas no varejo. Das amostras coletas no frigorífico, 29,2% foram positivas para *Campylobacter* spp., observando uma variação de 8,3% a 91,7% entre lotes. No varejo, as carcaças de perus apresentaram uma prevalência de 34%. A contaminação de animais e seres humanos por esta bactéria dá-se por quantidades não superiores a 500 células viáveis. Ainda ao analisar resultados quantitativos com as mesmas amostras de perus, revelaram uma média logarítmica de 1,9 a 2,5 UFC.g⁻¹ em amostradas oriundas do matadouro frigorífico, enquanto que carcaças oriundas do varejo obtiveram um valor logarítmico de 2,1 UFC.g⁻¹.

Estudos têm demonstrado que a presença de *Campylobacter* spp. nos alimentos é oriunda da contaminação por fezes durante o processo de abate (CORNELIUS *et al.*, 2005; KUANA *et al.*, 2008). GHRAFIR *et al.* (2007), ao avaliarem carcaças de frango de frigoríficos, sala de corte e/ou estabelecimentos varejistas, no período de 2000 a 2003, na Bélgica, observaram prevalência média de *Campylobacter* spp. de 30,9% para carcaças e 18,7% para filés de frangos. Quando comparados os dois pontos estudados, observa-se que a baixa proporção de *Campylobacter* spp. em produtos do varejo pode ser atribuído a sensibilidade do microrganismo a dissecação (DUFFY *et al.*, 2001; SAMPERS *et al.*, 2007), atmosfera inadequada (DUFFY *et al.*, 2001) e a baixa temperatura e/ou congelamento de produtos avícolas (SAUMYA *et al.*, 2004; GEORGSSON *et al.*, 2006; SAMPERS *et al.*, 2007). Mais de 80% dos isolados foram caracterizados como *Campylobacter jejuni*, da mesma forma que foi descrito por outros trabalhos onde se relata a maior incidência em produtos avícolas, quando comparado a outras espécies (SON *et al.*, REICH *et al.*, 2008; HUE *et al.*, 2011).

A introdução de *Campylobacter* nos lotes (NEWELL *et al.* 2003; HALD *et al.* 2004) e a posterior contaminação de frigoríficos, através contaminação oriunda do trato

gastrointestinal (HERMAN *et al.*, 2003), é considerado um importante fator para a contaminação das carcaças finais (REICH *et al.*, 2008). REICH *et al.* (2008) avaliou 18 lotes ao longo de 18 meses consecutivos quanto à contaminação de *Campylobacter* spp. em diversos pontos da linha de abate e comparou com a contaminação cecal do lote estudado. Do total avaliado, 70% dos lotes foram positivos, com uma maior incidência no verão e outono. Lotes negativos, que não apresentavam *Campylobacter* spp. no ceco, apresentaram contaminação de carcaça após o processamento. Desta forma, lotes previamente positivos apresentaram contaminação final das carcaças mais significativo do que lotes negativos.

REICH *et al.* (2008) ressaltam que o ponto com maior contaminação das carcaças foi após a escaldagem e a depenagem e com posterior decréscimo ao passar pelo processo de resfriamento. Embora *Campylobacter* spp. sobreviva ao armazenamento em baixas temperaturas e ao congelamento, GEORGSSON *et al.* (2006) e SAMPERS *et al.* (2010) salientam que o congelamento de carcaças positivas auxilia na redução da contaminação, com uma redução de 1 log₁₀ na contagem, principalmente, logo após 24 horas do congelamento.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras

Para a realização do trabalho, foram coletadas 57 carcaças de frangos após resfriamento por imersão (*chiller*) em matadouro-frigorífico com Inspeção Federal no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

A amostragem foi realizada por conveniência (THRUSFIELD, 2004), a qual envolveu uma epidemiologia descritiva horizontal através da observação da presença ou ausência de *Campylobacter* spp.

As amostras coletadas foram acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo e transportadas para processamento bacteriológico no Laboratório de Bacteriologia – LABACVET da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS.

3.2 Métodos Microbiológicos e de Identificação

3.2.1 Processamento das carcaças para isolamento de *Campylobacter*

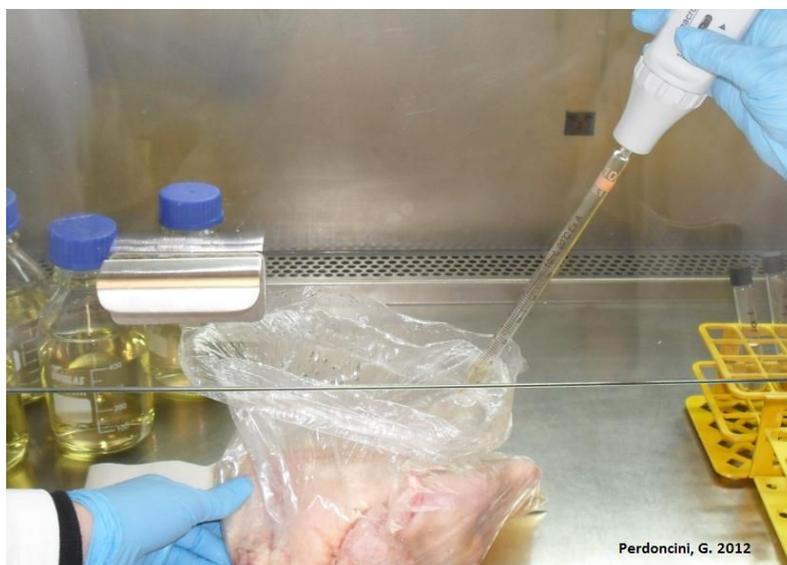
As carcaças resfriadas foram rinsadas em sacos estéreis de polietileno contendo 400 mL de Água Peptonada Tamponada – APT 1% (Figura 2). A partir do líquido da rinsagem, uma alíquota de 1mL de cada amostra foi retirada (Figura 3) e homogeneizado em 9mL de caldo Bolton(1:9), suplementado com antimicrobianos e incubado em microaerofilia (5% O₂, 10% CO₂ e 85% N₂), por 48hs a uma temperatura de 41,5°C.

Figura 2 - Rinsagem de carcaça de frango em sacos estéreis de polietileno contendo 400 mL de Água Peptonada Tamponada.



Fonte: o autor.

Figura 3 - Coleta do material rinsado para inocular em meio de cultura para cultivo de *Campylobacter* spp.

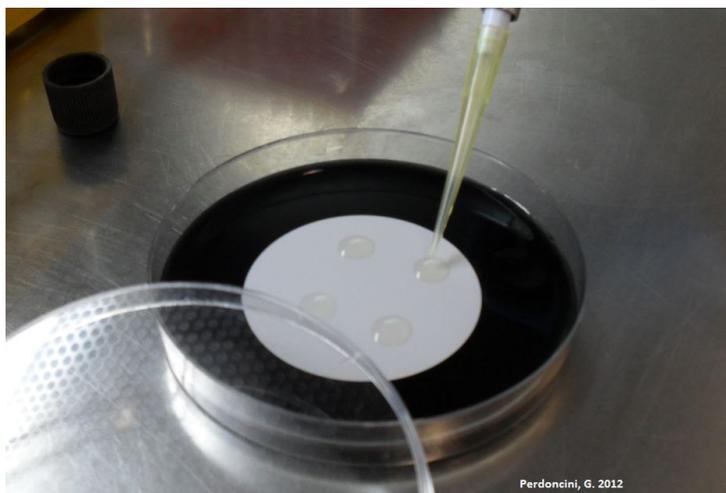


Fonte: o autor.

Após incubação em caldo Bolton por 48 horas, 100µl da suspensão do caldo foi filtrado em uma membrana de acetato com poro de 0,65µm (SKIRROW, 1977; BOLTON, 1982) acrescentado sobre o ágar mCCDA modificado (CM739, Oxoid®), por 30 minutos (Figura 4). Este ágar foi chamado de modificado em função da substituição da cefazolina no

suplemento seletivo (SR155, Oxoid[®]), o qual também será modificado por cefoperazona e adicionado de anfotericina (KUANA *et al.*, 2008; ISO, 2006).

Figura 4 - Filtração de 100µL da suspensão do caldo bolton em membrana de acetato com poro de 0,65µm sobre ágar mCCDA.



Fonte: o autor.

3.2.2 Identificação de *Campylobacter*

Colônias suspeitas foram repicadas em ágar sangue de ovino a 7% e avaliadas em microscopia em contraste de fase, seguidas da coloração de Gram, testes de oxidase, catalase e motilidade.

Para a identificação final das amostras suspeitas utilizou-se a técnica de multiplex-PCR (DENIS *et al.*, 1999). As colônias foram coletadas e ressuspendidas em 1mL de água ultra pura, transferidas para microtubos e congeladas a uma temperatura de -20°C até a extração do DNA. O protocolo multiplex-PCR visa identificar e diferenciar amostras de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*, bem como identificar uma região de DNA comum entre as duas espécies.

3.2.3 Condições para o ensaio multiplex PCR e eletroforese

Os DNAs avaliados foram extraídos através do ensaio realizado e adaptado por Borsoi *et al.* (2009). Um mL do caldo a ser analisado foi centrifugado a 12.000 x g, por 2 minutos (5415C Microcentrifuge, Eppendorf, Hamburg, Germany), e descartado o sobrenadante. O *pellet* foi ressuspensionado com 800µl de água ultra pura, homogeneizado e novamente centrifugado a 12.000 x g, por 2 minutos. Este procedimento foi realizado duas vezes, sendo que na última etapa o material foi ressuspensionado com 200µl de água ultra pura. As amostras foram aquecidas em banho-maria a 95°C, por 10 minutos centrifugadas e o sobrenadante coletado para ser utilizado no ensaio de PCR.

Para o multiplex-PCR foram utilizados três pares de *primers* distintos, em cada reação. O ensaio proposto para a identificação do *C. jejuni* e *C. coli*, amplifica um fragmento genômico de 589 pb e 462 pb, respectivamente, além de um fragmento de 857 pb para região em comum entre *C. jejuni* e *C. coli* (Tabela 1).

Tabela 1 - Sequência dos primers utilizados para identificar as espécies de *C. jejuni* e *C. coli*

Gene	Sequência de <i>primer</i>		Amplificação
16S rRNA	16S1	5' ATCTAATGGCTTAACCATTAAAC 3'	857 bp para região em comum para <i>Campylobacter jejuni</i> e <i>C. coli</i> .
	16S2	5' GGACGGTAACTAGTTTAGTATT 3'	
<i>MapA</i>	MAPA1	5'CTATTTTATTTTGGAGTGCTTGTG 3'	589 bp para a espécie <i>C. jejuni</i>
	MAPA2	5'GCTTTATTTGCCATTTGTTTATTA 3'	
<i>CeuE</i>	col3	5' AATTGAAAATTGCTCCAACATG 3'	462 para espécie <i>C. coli</i>
	col2	5' TGATTTTATTATTGTAGCAGCG 3'	

Fonte: Denis *et al.*, 1999

A amplificação das reações foi realizada em volume total da reação de 25µL. As reações de amplificação do multiplex-PCR foram submetidas as seguintes condições: 10 minutos a 95 °C, 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto e 30 segundos por 59 °C e 1 minuto a 72 °C seguido por uma extensão final por 10 minutos a 72 °C.

Todas as reações de amplificação foram realizadas em Termociclador (Biocycler – Peltier Thermal Cycler MJ96+ / MJ96G). A eletroforese dos produtos amplificados foi feita em gel de agarose à 1,5%, corado com brometo de etídio e para visualização foi utilizado o sistema de fotodocumentação através de transluminador *Ultra-Violeta* (UV).

3.2.4 Armazenamento das amostras confirmadas

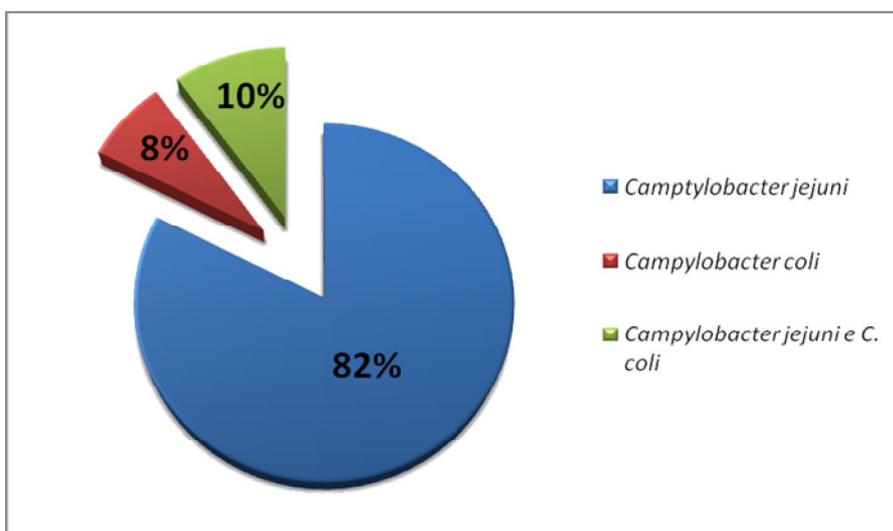
Uma colônia foi repicada em ágar sangue para formação de massa bacteriana, posterior armazenamento em caldo Brucela com 20% de glicerol e estocados a -80°C. Com isso, atualmente estas amostras fazem parte da coleção de culturas do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária/CDPA-UFRGS.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Bactérias do gênero *Campylobacter*, principalmente as espécies *C. Jejuni* e *C. coli*, começaram a chamar atenção das autoridades nas últimas décadas devido ao aumento da frequência de isolamento destes agentes de humanos, águas e produtos de origem animal (BUTZLER *et al.*, 2004). Grande parte das contaminações por *Campylobacter* se dá a partir da ingestão de produtos de origem animal contaminada ou através da contaminação cruzada no momento de preparação dos alimentos (DICKINS, 2002; FORSYTHE, 2002; ADZITEY *et al.*, 2011).

Das 57 carcaças analisadas, 40 (70,2%) foram positivas para *Campylobacter*. Destas, *C. jejuni* foi a espécie prevalente (82%), seguida por *C. coli* (8%). Em quatro (10%) carcaças foram identificadas ambas as espécies (Figura 5).

Figura 5 - Frequência de espécies de *Campylobacter* spp. isolados de carcaças após o pré-resfriamento por imersão.



Em estudo similar realizado no estado do Rio de Janeiro - Brasil, Medeiros (2011) analisou 30 carcaças refrigeradas, detectando a presença de *Campylobacter* spp. em 21 (70%). Destas, seis (28,57%) foram provenientes de abatedouros, oito (38,10%) de supermercados e sete (33,33%) de feiras livres. Dos 21 isolados, dois (9,52%) foram identificados como *C. coli* e 18 (85,71%) como *C. jejuni*. Em outra pesquisa realizada por Medeiros (2009), também no município do Rio de Janeiro, ao analisar dez amostras de sobrecoxas de frango, identificou 7 (70%), como positivas *Campylobacter* spp.

A avaliação operacional dos abatedouros bem como a biossegurança de todo o segmento avícola são pontos de extrema importância para garantir a ausência de *Campylobacter* spp. no produto final. Habib *et al.* (2012), ao investigarem contaminações de carcaças de frango relacionando características de cada frigorífico, gestão da qualidade e o padrão de higiene operacional mínimo das operações ao longo do abate, evidenciaram que deficiências nestes aspectos estão relacionadas diretamente com a contaminação das carcaças de frangos.

Outros fatores são, também, importantes no que tange a contaminação final das carcaças, como por exemplo, lotes positivos que influenciam a qualidade microbiológica do produto final (MALHER *et al.*, 2011; SMITH *et al.*, 2007). Neste sentido, Kuana *et al.* (2008) ao avaliar 22 lotes na região Sul do Brasil, verificou que apenas 4 lotes não estavam positivos para *Campylobacter* spp. antes de serem abatidos. No entanto, após estes lotes passarem pela depenadeira, ponto importante de contaminação cruzada, verificaram contaminação das carcaças de todos os lotes.

Son *et al.* (2007) verificaram a prevalência de *Campylobacter* spp. em três distintos pontos de processamento de carcaças de frangos em plantas nos EUA: pré-escalda, pré-chiller e após o chiller. *Campylobacter* spp. foi isolado de 92% das carcaças antes da escaldagem, em 100% das carcaças antes do pré-chiller e em 52% das carcaças após o chiller. Do total das amostras identificadas, 87,6% foram caracterizada como *C. jejuni*, seguida por *C. coli* (12,4%).

Apesar das espécies *C. jejuni* e *C. coli* serem as espécies mais isoladas, Kuana *et al.* (2009), em trabalho realizado no Brasil, identificaram outras espécies a partir de pontos de abate de frangos e também de carcaças, além de *C. jejuni* e *C. coli*. De 546 amostras analisadas, provenientes de 22 lotes de frangos de corte, em 68,8% das amostras foram identificadas *C. jejuni* subsp *jejuni*, seguido de 8,3% de *Campylobacter coli*, 6,3% de *Campylobacter jejuni* subsp *doylei*, 4,2% de *Campylobacter upsaliensis* e 2,1% de *Campylobacter fetus* subsp *fetus*.

Em diversos trabalhos realizados (HALD *et al.* 2000; SON *et al.*, 2007; REICH *et al.*, 2008; KUANA *et al.*, 2009; MÜLLNER *et al.*, 2010), *Campylobacter jejuni* foi a espécie com a maior frequência de isolamento, resultado não diferente do encontrado no presente estudo.

O isolamento do *Campylobacter jejuni* chama a atenção por se tratar de um agente envolvido na síndrome de Guillain Barré (GBS). Esta síndrome é uma doença neuromuscular aguda que foi descrita pela primeira vez, em 1916, em soldados, pelos

neurologistas Franceses Georges Guillain, Jean-Alexandre Barré e Andre Strohl (VICIC *et al.*, 2009; POROPATICH *et al.*, 2010). A incidência global anual de GBS varia entre 0,4 a 4,0 (média 1,3) casos para cada 100.000 pessoas (HADDEN *et al.*, 2001; POROPATICH *et al.*, 2010). Entretanto, além da GBS, outras enfermidades como enterites, bacteremia e a Síndrome de Reiter podem ser causadas por campylobacteriose.

Atualmente, bactérias do gênero *Campylobacter* são as mais notificadas em relatos de gastroenterite na União Européia (EFSA, 2009) e o segundo agente mais isolado em doenças de origem alimentar nos Estados Unidos (CDC, 2009), o que torna necessário ampliar o conhecimento sobre a transmissão e patogenia deste microrganismo.

O esboço de programas com medidas de controle de *Campylobacter* spp., bem como o conhecimento da sua prevalência e seu comportamento quantitativo durante as diversas etapas de processamento dos frangos de corte auxiliam de modo a adaptar as plantas de abate e reduzir as contaminações. Kuana *et al.* (2008), ao verificar a ocorrência de *Campylobacter* em lotes de frango de corte durante a produção e nas carcaças correspondentes após o abate, observaram variação nos níveis médios de colonização dos lotes. Lotes positivos apresentaram um quantidade média de $7 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$ de conteúdo cecal, $5,15 \log_{10} \text{ UFC.carcaça}^{-1}$ após a depenadeira e $4,24 \log_{10} \text{ UFC.carcaça}^{-1}$ após o último *chiller*. No trabalho realizado por Kuana *et al.* (2008), houve uma redução da contaminação das carcaças após a passagem pelo *chiller*, mostrando que quanto maior for o nível de contaminação por *Campylobacter* após a depenadeira, maior será o nível de contaminação após o último *chiller*. Estes resultados expõem a necessidade de boa implantação da análise de perigos e pontos críticos de controle e os procedimentos padrões de higiene operacional para auxiliar na redução da contaminação de produto final.

Da mesma forma, Klein *et al.* (2007) avaliaram a prevalência e o comportamento de *Campylobacter* spp. em três lotes (33 amostras por lote), em diversos pontos de abate e posterior processamento dos frangos. Das 99 amostras avaliadas, 51 (51,5%) foram positivas para *Campylobacter* spp. e a prevalência de amostras positivas encontradas por ponto apresentaram-se na seguinte distribuição: *Swab* de cloaca 73,3%, água de escaldagem 77,8%, carcaças após a escaldagem e depenagem 53,3%, carcaças depois da evisceração 66,7%, carcaças refrigeradas 40,0%, em peito com pele 33,3% e filés 26,7%. Ao longo do processo houve redução gradativa da média de contagem, com uma redução de $5,4 \log_{10} \text{ UFC.amostra}^{-1}$ em 40% das amostras. A identificação de amostras positivas nos 3 lotes examinados foi de 45,5%, 84,8% e 24,2%, respectivamente. Klein *et al.* (2007) identificaram as espécies *C. jejuni* (92,2%) e *C. coli* (7,8%) nos isolados.

Assim como Klein *et al.* (2007), Oosterom (1983), Sanchez *et al.* (2002) e Kuana *et al.* (2008) encontraram redução na contagem de *Campylobacter* spp. após o *chiller*.

Além da refrigeração, o congelamento também auxilia na redução do número de microrganismos. O efeito desta intervenção no crescimento dos *Campylobacter* ainda não está clara. Maziero *et al.* (2010) avaliaram o efeito da temperatura na sobrevivência de *C. jejuni* em carcaças de frangos estocadas por 7 dias, a 4°C, e 28 dias, a -20°C; entretanto, não encontraram diferença significativa em relação a reativação desta bactéria. No mesmo sentido, Sampers *et al.* (2010) não observaram redução quantitativa significativa ao manter carne de frango resfriada por 14 dias. Porém houve redução de 1 log₁₀ UFC.g⁻¹ no primeiro dia de congelamento (-20°C) de amostras de carne de frangos, quando as amostras foram congeladas por 14 dias.

Georgsson *et al.* (2006) ao abordarem a sobrevivência de *Campylobacter* sp. em carcaças de frangos submetidas a -20°C por um período de 31, 73, 122 e 220 dias, intervalos maiores do que os período avaliados por Maziero *et al.* (2010) e Sampers *et al.* (2010) ao constatarem que a contagem apresentou redução média em log variando 0,65-2,87 após congelamento e 31 dias de armazenamento, permanecendo constante até 220 dias.

Embora haja necessidade de uma melhor avaliação do sistema de produção e abate de aves para obter produto com menor quantidade de microrganismos transmitidos por alimentos, cuidados com a manipulação dos alimentos no momento do preparo tornam-se importantes para evitar contaminações cruzadas.

5 CONCLUSÃO

Produtos avícolas são conhecidos como potenciais transmissores de alguns patógenos, dentre eles *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp.. Considerando a alta prevalência de carcaças com *Campylobacter*, especialmente a espécie *C. jejuni* identificado neste trabalho, enfatiza-se a importância do monitoramento de patógenos transmitidos por alimentos e a necessidade constante de melhorar a cadeia produtiva avícola.

Desta forma, novos trabalhos que foquem a redução da contaminação do produto final, possibilitará agregar valor ao produto final e produzir alimentos mais seguros para serem consumidos.

BIBLIOGRAFIA

ADZITEY, F.; HUDA, N. Campylobacteriose in poultry: incidences and possible control measures. **Research Journal of Microbiology**, v. 6, n. 2, p. 182-192. 2011

ATANASSOVA, V. *et al.* Prevalence of *Campylobacter* spp. in turkeymeat from a slaughterhouse and in turkeymeat retail products, **FEMS Immunology Medical Microbiology**, v. 49, p. 141-145, 2007.

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

BOLTON, F.J.; HUTCHINSON, D.N.; COATES, D. Blood-free selective medium for isolation of *Campylobacter jejuni* from feces. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 19, n. 2, p. 169-171, 1984.

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

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto Nº 30691, 29 de março de 1952. Aprova o novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 07 de jul. 1952, p. 10785.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria Ministerial nº 193 de 19 de setembro de 1994. Institui o Programa Nacional de Sanidade Avícola no âmbito SDA e cria o Comitê Consultivo do Programa de Sanidade Avícola.. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 de set. 1994, secção 1, p. 14309.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 de jan. 2001.

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

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

CARVALHO, A.C.F.B.; CORTEZ, A.L.L. Campylobacteriose Aviária, IN: ANDREATTI FILHO, R.L. **Saúde Aviária e Doenças**, São Paulo: ROCA, ed.1, 2006, p. 144-146.

CDC. Preliminary FoodNet Data on the Incidence of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food - 10 States, 2009. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.19, n.14, 2010, p. 418-422. Disponível em:
<http://www.cdc.gov/mmwr/pdf/wk/mm5914.pdf> Acessado em Agosto de 2011.

CORNELIUS, AL.J; NOCOL, C.; HUDSON, J.A. *Campylobacter* spp. in New Zealand raw sheep liver and human campylobacteriosis cases. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, n. 1, p. 99-105, 2005.

DICKINS, M.A. *et al.* Diversity of *Campylobacter* isolates from retail poultry carcasses and from humans demonstrated by pulse-field gel electrophoresis. **Journal of Food Protection**, v.65, n.6, p.957-962, 2002.

KLEIN, G. *et al.* Quantification of thermophilic *Campylobacter* spp. In broilers during meat processing. **Atonie van Leeuwenhoek**, v. 92, n.3, 2007, p.267-273.

DENIS, M. *et al.* Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, 406-410, 1999.

DUFFY, EA. *et al.* Extent of microbial contamination in United States pork retail products. **Journal of Food Protection**, v. 64, 172–178, 2001.

EFSA - European Food Safety Authority. Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007. **The EFSA Journal**, 2009, 310p.

EFSA - European Food Safety Authority. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses in the EU, 2008, Part A: *Campylobacter* and *Salmonella* prevalence estimates. **The EFSA Journal**, v. 8, n.3, 2010, 99p.

FERNANDEZ, H.; PISÓN, V. Isolation of Thermotolerant species of *Campylobacter* from commercial chickens livers. **International Journal of Food Microbiology**, v.29, n. 01, p 75-80, 1996.

FERNÁNDEZ, H.; HITSCHFELD, M. Occurrence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* and their biotypes in beef and dairy cattle from the south of Chile. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 450-454, 2009.

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

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Rio Grande do Sul: Artmed, 2002, p. 159-163, 2002.

GRITTI, D. *et al.* Thermophilic *Campylobacter* Survey in Chilled and Frozen Poultry Meat at Retail in Concórdia, Santa Catarina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 3, p. 1-5, 2011.

GHAFFIR, Y. *et al.* A seven-year survey of *Campylobacter* contamination meat at different production stages in Belgium. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, p. 111 – 120, 2007.

HABIB, I. *et al.* *Campylobacter* contamination in broiler carcasses and correlation with slaughterhouses operational hygiene inspection. **Food Microbiology**, v. 29, p.105-112, 2012.

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

HALD, B.; WEDDERKOPP, A.; MADSEN, M. Thermophilic *Campylobacter* spp. in Danish broiler production: A cross-sectional survey and a retrospective analysis of risk factors for occurrence in broiler flocks, **Avian Pathology**, v. 29, n. 2, p.123-131, 2000.

HAVELAAR, A.H.; *et al.* Costs and benefits of controlling, *Campylobacter* in the Netherlands: Integrating risk analysis, epidemiology and economics, **RIVM**, 2005, 53 p.

HODGE, D.S.; BORCZYK, A.; WAT, L. Evaluation of the Indoxyl Acetate Hydrolysis Test for the Differentiation of *Campylobacters*. **Journal Of Clinical Microbiology**, V. 28, n.6, p. 1482-1483, 1990.

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

HUE, O. *et al.* *Campylobacter* contamination of broiler caeca and carcasses at the slaughterhouse and correlation with *Salmonella* contamination, **Food Microbiology**, v. 28, p. 862-868, 2011.

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

GEORGSSON, F. *et al.* The influence of freezing and duration of storage on *Campylobacter* and indicator bacteria in broiler carcasses. **Food Microbiology Journal**, n. 23, p. 677-683, 2006.

JOES, L. A.; HAESEBROUCK, F.; PASMANS, F. *Campylobacter* and *Helicobacter*, In: GYLES, C. L. *et al.* **Pathogenesis of bacterial Infections in animals**. Iowa:Blackwell Publishing, 4 ed, 2010, p. 484-501.

KUANA, S.L. *et al.* Occurrence and Characterization of *Campylobacter* in the Brazilian Production and Processing of Broilers. **Avian Disease**, v.88, p. 680-684, 2008.

KUANA, S.L. *et al.* Sistema Api Campy para Caracterização de Amostras de *Campylobacter* Isoladas de Descarga Cecal, Fezes, Swabs Cloacais e Carcaças de Frangos de Corte. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.76, n.2, p.273-277, 2009.

MALHER, X. Factors associated with carcass contamination by *Campylobacter* at slaughterhouse in cecal-carrier broilers. **International Journal of Food Microbiology**, n. 150, p; 8-13, 2011.

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

MEDEIROS, V.M. Isolamento e identificação fenotípica e molecular das espécies termofílicas de *Campylobacter* a partir de frango resfriado. **Mestrado Profissional - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde Fundação Oswaldo Cruz**, 2011.

MEDEIROS, V. M., Implantação de Metodologia de Pesquisa de *Campylobacter* spp. No Setor de Alimentos do Departamento de Microbiologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS. 2009. 28 f. **Monografia** (Especialização em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2009

MÜLLER, P.; COLLINS-EMERSON, J.M. MIDWINTER, A.C. Molecular Epidemiology of *Campylobacter jejuni* in a Geographically Isolated Country with a Uniquely Structured Poultry Industry. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 7, p. 2145–2154, 2010.

NEWELL, D.G.; SHREEVE, J.E.; TOSZEGHY, M. Changes in the Carriage of *Campylobacter* Strains by Poultry Carcasses during Processing in Abattoirs, **American Society for Microbiology**, v.67, n.6, p.2636-2640, 2001.

OIE - World Organisation for Animal Health. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. IN: **OIE-Terrestrial Manual**. 2008, p. 1185 – 1191.

OOSTEROM, J. *et al.* Origin and prevalence of *Campylobacter jejuni* in poultry processing. **Journal of Food Protection**, v. 46, p.339–344, 1983.

POROPATICH, K.; WALKER, L.F.; BLACK, R.E. Quantifying the Association between *Campylobacter* Infection and Guillain-Barré Syndrome: A Systematic Review **Journal of Health, Population and Nutrition**, v.28, n.6, p.545-552, 2010.

|

QUINN, P.J. *et al.* Microbiologia Veterinária e Doenças infecciosas. In_____ Cultivo, preservação e inativação de bactérias. Editora ArtMed, Porto Alegre 2005, cap. 3, p. 26-30.

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

SAMPERS, A. *et al.* Survival of *Campylobacter* spp. in poultry meat preparations subjected to freezing, refrigeration, minor salt concentration, and heat treatment. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, 147–153, 2010.

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, p.948–956, 2002.

SCALLAN, E. *et al.* Foodborne illness acquired in the united States - major pathogens. **Emerging Infectious Diseases journal**, v.17, n.1, p. 1-9, 2011.

SNELLING, W.J. Under the microscope *Campylobacter jejuni*. **Applied Microbiology**, v.41, p.297-302, 2005.

SMITH, D.P. Effect of external or internal fecal contamination on numbers of bacteria on pre-chilled broiler carcasses. **Poultry Science**, n. 86, p.1241-1244, 2007.

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

SON, I. Prevalence of *Arcobacter* and *Campylobacter* on broiler carcasses during processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, n.1, p. 16-22, 2006.

THRUSFIELD, M.. **Epidemiologia Veterinária**. São Paulo: ROCA, 2004, 556p.

UBABEF – União Brasileira de Avicultura. **Relatório Anual. 2010 -2011**. Disponível em: <http://www.abef.com.br/ubabef/publicacoes_relatoriosanuais.php>. Acesso em: 13 ago. 2012.

VUCIC, S.; KIERMAN, M.; COMBLATH, D.R. Guillain-Barré syndrome: An update. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 16, p. 733–741, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Campylobacter. 2000. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/en/print.html>>. Acesso em: agosto de 2012.