



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

MAIKE TAÍS MAZIERO

**CONTAMINAÇÃO DE CARÇAÇAS DE FRANGO POR  
*CAMPYLOBACTER JEJUNI* ANTES E APÓS  
ARMAZENAMENTO SOB RESFRIAMENTO OU  
CONGELAMENTO**

---

Londrina  
2007

**MAIKE TAÍS MAZIERO**

**CONTAMINAÇÃO DE CARÇAÇAS DE FRANGO POR  
*CAMPYLOBACTER JEJUNI* ANTES E APÓS  
ARMAZENAMENTO SOB RESFRIAMENTO OU  
CONGELAMENTO**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Tereza Cristina R. Moreira Oliveira

Londrina  
2007

## FICHA CATALOGRÁFICA

### Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M476c Maziero, Maíke Taís.

Contaminação de carcaças de frango por *Campylobacter jejuni* antes e após armazenamento sob resfriamento ou congelamento / Maíke Taís Maziero. - Londrina, 2007. 56f.

Orientadora: Tereza Cristina Rocha Moreira Oliveira  
Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) –  
Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.  
Bibliografia: f.45-51.

1. *Campylobacter* - Teses. 2. Microaerófila – Teses. 3. Termotolerante – Teses. 4. Carne de frango – Teses. I. Oliveira, Tereza Cristina Rocha Moreira. II. Universidade Estadual de Londrina. III. Título.

CDU 641:579

**MAIKE TAÍS MAZIERO**

**CONTAMINAÇÃO DE CARÇAÇAS DE FRANGO POR  
*CAMPYLOBACTER JEJUNI* ANTES E APÓS  
ARMAZENAMENTO SOB RESFRIAMENTO OU  
CONGELAMENTO**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Tereza Cristina R. Moreira Oliveira  
Universidade Estadual de Londrina

---

Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot  
Universidade Federal do Paraná

---

Prof. Dr. Ernst Muller  
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 26 de março de 2007.

## **AGRADECIMENTOS**

À Profa. Doutora Tereza Cristina Moreira Oliveira por sua orientação, paciência e atenção.

A todos os professores do Departamento de Ciência e Tecnologia em Alimentos pelo conhecimento compartilhado durante esses 2 anos de convívio.

À empresa Perdigão Agroindustrial Ltda. pela oportunidade de acompanhar as análises de *Campylobacter* em seu Centro de Tecnologia, principalmente ao senhor Paulo Rogério Franchin por sua disposição em ajudar.

A todas minhas colegas de mestrado, por sua amizade e companheirismo.

À Universidade Estadual de Londrina, por promover conhecimento e oportunidades aos seus alunos.

Ao CNPQ por prover apoio financeiro.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Meu agradecimento especial a Roberto Montanhini Neto, pelo carinho, apoio e compreensão durante essa jornada.

Enfim, meu eterno agradecimento a Deus, sempre presente em minha vida.

**Muito Obrigada!**

MAZIERO, M.T. **Contaminação de carcaças de frango por *Campylobacter jejuni* antes e após armazenamento sob resfriamento ou congelamento.** 2007. 56f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2007.

## RESUMO

*Campylobacter* é a causa mais freqüente de gastroenterite bacteriana em vários países, sendo o frango e seus derivados o principal veículo transmissor ao homem. O Brasil, apesar de ser o maior exportador mundial de carne de frango, possui poucas informações sobre a incidência deste microrganismo em sua cadeia de produção. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do armazenamento no isolamento de *Campylobacter* em 30 amostras de carne de frango conservadas por 7 dias a 4 °C e por 28 dias a -20 °C, bem como do enriquecimento seletivo no resultado da análise. As amostras frescas apresentaram 93,3% de positividade para *Campylobacter* spp. termotolerante, com contagem média de 3,08 Log<sub>10</sub> UFC/g no plaqueamento direto. Após a refrigeração, a percentagem de positividade passou para 53,3%, com contagem média de 1,19 Log<sub>10</sub> UFC/g. Amostras congeladas apresentaram 36,6% de positividade, com contagem média de 0,71 Log<sub>10</sub> UFC/g. Após o enriquecimento a taxa de positividade para *C. jejuni* nas amostras frescas, refrigeradas e congeladas foi de 50%, 36,7% e 33,3%, respectivamente. Após o enriquecimento seletivo, não houve diferença significativa na incidência de *C. jejuni* nas amostras frescas e nas conservadas a baixas temperaturas, indicando que este microrganismo é capaz de sobreviver nas condições de armazenamento testadas.

**Palavras-chave:** *Campylobacter*. Microaerófila. Termotolerante. Carne de Frango.

MAZIERO, M.T. *Campylobacter jejuni* contamination of broiler carcass before and after refrigerated or frozen storage. 2007. 56f. Master (Food Science) – State University in Londrina. Londrina, 2007.

### ABSTRACT

*Campylobacter jejuni* is the most common cause of bacterial gastroenteritis in many countries and broiler and its by-products are the main source of human disease. Although Brazil is the world's 1<sup>st</sup> largest chicken exporter, a little information is available about the prevalence of *Campylobacter* in chicken production chain. The aim of this study was to evaluate the effect of the storage temperature on *Campylobacter* detection of chicken meat stored for seven days at 4°C and for twenty-eight days at -20°C. The effect of the selective enrichment on the detection of *Campylobacter* was also evaluated. Thirty fresh chicken meat samples were analyzed and 93.3% was contaminated with thermotolerant *Campylobacter* spp. with average counting of 3.08 Log<sub>10</sub> CFU/g on the direct plating. After refrigeration, 53.3% of the analyzed samples tested positive for *Campylobacter* and the average counting was 1.19 Log<sub>10</sub> CFU/g. Of samples stored at -20°C, 36.6% tested positive with average counting of 0.71 Log<sub>10</sub> CFU/g. After enrichment, *C. jejuni* was detected in 50%, 36.7% and 33.3% of the fresh, refrigerated and frozen meat samples analyzed, respectively. After selective enrichment, there was no difference between the fresh or low temperature storage, showing that microorganism can survive at the tested storage conditions.

**Keywords:** *Campylobacter*. Microaerophilic. Thermotolerant. Broiler Meat.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Resultados das análises de Contagem de *Campylobacter* spp. termotolerantes por plaqueamento direto e Pesquisa de *C. jejuni* após o enriquecimento seletivo em carne de frango fresca (analisada 1 h após a embalagem), refrigerada a 4 °C por 7 dias e congelada a – 20 °C por 28 dias .....38
- Tabela 2** – Valores médios da contagem de *Campylobacter* spp. termotolerante por grama de carne de frango após plaqueamento direto .....39
- Tabela 3** – Número de amostras de carne de frango positivas para *C. jejuni* após o enriquecimento seletivo .....42

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	08
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	10
2.1 CARACTERÍSTICAS DO MICRORGANISMO .....	10
2.2 EPIDEMIOLOGIA DA CAMPILOBACTERIOSE HUMANA .....	14
2.3 CONTAMINAÇÃO DE FRANGO POR <i>CAMPYLOBACTER</i> .....	18
2.4 TRANSMISSÃO DE <i>CAMPYLOBACTER</i> NA CADEIA DE PRODUÇÃO DE FRANGO .....	20
2.5 EFEITO DO RESFRIAMENTO E CONGELAMENTO NA SOBREVIVÊNCIA DE <i>CAMPYLOBACTER</i> .....	24
2.6 DETECÇÃO DE <i>CAMPYLOBACTER</i> .....	27
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	31
3.1 OBJETIVO GERAL .....	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	31
<b>4 MATERIAIS E MÉTODO</b> .....	32
4.1 COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS .....	32
4.2 CONTAGEM DE <i>CAMPYLOBACTER</i> SPP. TERMOTOLERANTE ANTES DO PRÉ- ENRIQUECIMENTO E ENRIQUECIMENTO SELETIVO (PLAQUEAMENTO DIRETO .....	33
4.3 PESQUISA DE <i>C. JEJUNI</i> APÓS O ENRIQUECIMENTO SELETIVO .....	33
4.4 IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA .....	34
4.4.1 Hidrólise do Hipurato .....	34
4.4.2 Teste da Catalase .....	35
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	35
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	37
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	44
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	45
<b>ANEXO</b> .....	52
<b>ANEXO 01</b> – Esquema método de análise de <i>Campylobacter</i> spp. (plaqueamento direto) e <i>C. jejuni</i> (enriquecimento seletivo .....	53

## 1 INTRODUÇÃO

A produção brasileira de frangos de corte tem protagonizado um dos maiores sucessos no competitivo setor do agronegócio nestas últimas décadas, colocando o país no topo do comércio internacional de carne de frango. O Brasil iniciou sua produção intensiva de aves na década de sessenta e atualmente, é o segundo produtor e o primeiro exportador mundial de carne de frango, segundo dados da União Brasileira de Avicultura (UBA, 2006). O Paraná é o maior estado produtor e exportador de carne de frango do Brasil. Estas posições são decorrentes de investimentos visando à alta qualidade dos produtos, atualmente consumidos em mais de 100 países em todo o mundo. Na última década, a produção de frangos cresceu 142% e as exportações de carne de frango aumentaram 300% (SILVA, 2004).

Em 2005, a produção foi de aproximadamente 9.297 milhões de toneladas, com cerca de 30% deste total exportado. O consumo per capita passou de 2,3 kg, em 1971, para 35,5 kg, em 2005, tornando o Brasil o quarto maior consumidor de carne de frango do mundo (UBA, 2006).

A carne de frango e seus derivados são considerados o principal veículo transmissor de *Campylobacter* para o homem (BUTZLER, 2004). Esta bactéria é considerada a mais freqüente causa de gastroenterite bacteriana em alguns países desenvolvidos. Nos Estados Unidos, mais de dez mil casos de campilobacteriose são reportados anualmente ao *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), que estima uma ocorrência de mais de dois milhões de casos anuais, o que corresponde a 1% da população americana. Segundo o CDC, a estimativa é de 500 óbitos por ano, embora, na maioria dos casos, a doença não necessite de tratamento médico. Além disso, artrite ou Síndrome de Guillain-Barré podem ocorrer como consequência da campilobacteriose. Esta Síndrome é uma doença auto-imune que aparece semanas após o término dos sintomas da gastroenterite e afeta os nervos periféricos, levando à paralisia, e, freqüentemente, à necessidade de terapia intensiva por várias semanas. Nos Estados Unidos, mais de 40% dos casos de Guillain-Barré ocorrem após a infecção intestinal por *Campylobacter* e estima-se que 0,1% dos pacientes com campilobacteriose

desenvolvam a síndrome (CDC, 2006). No Brasil, a ocorrência de campilobacteriose é desconhecida.

O controle de *Campylobacter* na cadeia de produção de alimentos é atualmente o objetivo primário da indústria de alimentos. No entanto, as estratégias de desenvolvimento e implementação requerem um maior conhecimento a respeito da extensão do problema (NEWEL, 2004), uma vez que o monitoramento desta bactéria é muito importante para o controle da doença humana.

O efeito do resfriamento e do congelamento na sobrevivência de *C. jejuni* ainda não foi bem elucidado. Alguns estudos confirmam uma redução significativa na porcentagem de carcaças positivas para *C. jejuni* após o congelamento (ALTER *et al.*, 2005, STERN *et al.*, 1984). O congelamento pode reduzir significativamente a sobrevivência de *Campylobacter*, uma vez que, diversos fatores, incluindo a nucleação do gelo e a desidratação, levam à injúria do microrganismo, além do estresse oxidativo que pode induzir a morte da célula (PARK, 2002).

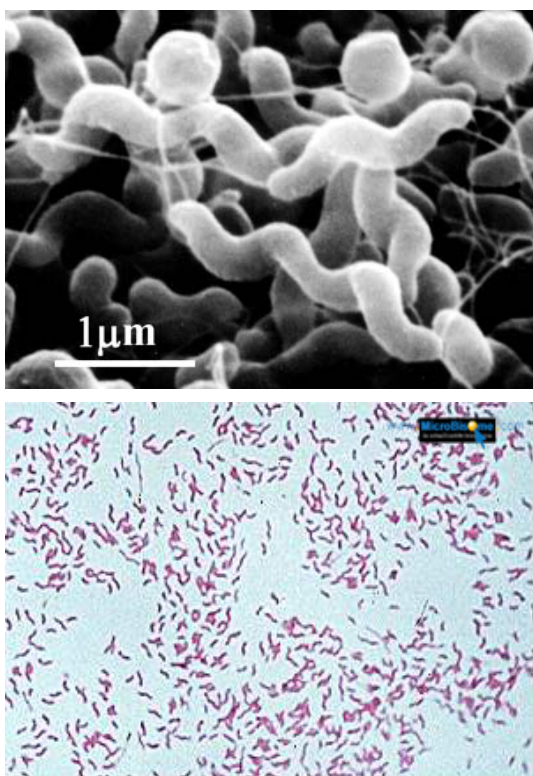
No entanto, um número significativo de *C. jejuni* pode sobreviver ao resfriamento e congelamento, alertando que estes tratamentos sozinhos não garantem a segurança do alimento, com respeito a este microrganismo (BHADURI & COTTRELL, 2004; ROSENQUIST *et al.*, 2006; GEORGSSON *et al.*, 2006).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a contaminação de carcaças de frango por *Campylobacter* antes e após o armazenamento por resfriamento e congelamento, bem como a influência do enriquecimento seletivo no resultado da análise.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CARACTERÍSTICAS DO MICRORGANISMO

O gênero *Campylobacter* (do grego *capilo*=curvo e *bacter*=bastão) é constituído por 18 espécies de bacilos Gram-negativos, curvos ou espiralados. As espécies deste gênero são microaerófilas, termofílicas e não-formadoras de esporos, podendo adquirir morfologia cocóide, correspondente às formas não cultiváveis. Apresentam um único flagelo polar, duas a três vezes maior que o tamanho da célula, responsável por seu movimento em saca-rolha ou vai-vém (FRANCO & LANDGRAF, 1996). Apresentam arranjo típico em forma de “S” ou asa de gaviota, quando as células formam pequenas cadeias (SILVA *et al.*, 1997).



Fonte: <http://www.pref.aichi.jp/eiseiken/67f/microbiol.html> e [http://www.microbisome.com/imagenes/iconos\\_nuevos/microbisome\\_Campylobacter\\_jejuni.jpg](http://www.microbisome.com/imagenes/iconos_nuevos/microbisome_Campylobacter_jejuni.jpg)

**Figura 01** – Morfologia de *Campylobacter* por microscopia eletrônica e por coloração de Gram (aumento 1000 x).

As células são pequenas, variam de 0,5 a 0,8  $\mu\text{m}$  de comprimento e 0,2 a 0,5  $\mu\text{m}$  de largura. O metabolismo é estritamente respiratório, não fermentam nem oxidam carboidratos, usam aminoácidos e componentes intermediários do ciclo do ácido tricarbóxico como principais fontes de energia. São oxidase-positivas e podem ser separadas em dois grupos: (1) *Campylobacter* catalase-positiva, no qual estão incluídos *C. jejuni*, *C. fetus*, *C. faecalis* e *C. coli*, espécies mais importantes do ponto de vista patogênico; (2) *Campylobacter* catalase-negativa, onde estão incluídos *C. sputorum* e *C. concisus*. *Campylobacter* catalase-negativa são mais sensíveis ao oxigênio e requerem baixos níveis para uma ótima multiplicação. Somente o grupo catalase negativo reduz nitrato a nitrito (BUTZLER, 1984).

Outra divisão importante dentro do gênero *Campylobacter* se refere à capacidade de multiplicação acima da temperatura de 37 °C. Algumas espécies se multiplicam bem entre 25 e 37 °C, mas não a 42 °C, e há espécies que não apresentam multiplicação a 25 °C, se multiplicam a 37 °C, porém apresentam multiplicação preferencial a 42 °C. Este último grupo é denominado termofílico ou termotolerante e inclui as principais espécies responsáveis por infecções gastrointestinais (ALLOS & TAYLOR, 1998, *apud* THOMÉ, 2006).

As condições de multiplicação requeridas por *Campylobacter* são incomuns, quando comparada a outras bactérias patogênicas (PARK, 2002). A multiplicação é inibida quando a concentração de oxigênio no ambiente é inferior a 3% e superior a 15%, sendo 5% a atmosfera ideal. Além disso, são capnofílicas, ou seja, requerem cerca de 10% de CO<sub>2</sub> para sua multiplicação. São rapidamente destruídas pelo calor, não sobrevivendo aos processos térmicos utilizados no preparo de alimentos. Não sobrevivem ao processo de pasteurização ( $D_{55^{\circ}\text{C}} = 0,7$  a 1 min), nem ao aquecimento a 60 °C por 10 minutos (FRANCO & LANDGRAF, 1996; FORSYTHE, 2002).

*C. jejuni* cresce em temperaturas que variam de 30 a 47 °C, sendo a sua temperatura ótima de multiplicação é em torno de 42 °C. Apesar de ser incapaz de se multiplicar em temperaturas normais de refrigeração dos alimentos, é metabolicamente ativo a temperaturas inferiores ao seu ótimo de multiplicação (PARK, 2002). Diversos fatores influenciam a taxa de inativação de *C. jejuni* durante a desidratação e armazenamento em condições de baixa umidade, entre eles, o serovar e a temperatura (BUTZLER, 1984). *C. jejuni* é relativamente sensível à

radiação gama e raios ultravioleta, além de ter sua multiplicação inibida em concentrações superiores a 2% de cloreto de sódio (MEAD, 2004).

A subtipagem é essencial tanto para traçar as fontes de contaminação por *Campylobacter* em frangos quanto para entender a transmissão deste microrganismo para o homem (HÖÖKS *et al.*, 2005). Segundo a classificação de Lior (1984), *C. jejuni* apresenta 4 biotipos que podem ser identificados através dos seguintes testes bioquímicos: hidrólise do indol-acetato, resistência ao ácido nalidíxico e cefalotina, hidrólise do hipurato e teste de DNase (PEZZOTTI *et al.*, 2003).

Os antígenos somáticos, capsular e flagelar, contribuem para a existência de inúmeros sorotipos (STROHL *et al.*, 2004). Dois processos de sorotipagem são utilizados: o de Penner e o de Hennessy, para antígenos termicamente estáveis (lipopolissacarídeos), com mais de 60 sorotipos de *C. jejuni* e *C. coli*, e o de Lior para antígenos termossensíveis (flagelos), com mais de 100 sorotipos de *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari*. A fagotipagem pode diferenciar linhagens de um sorotipo e é uma técnica simples para ser aplicada em um grande número de linhagens simultaneamente (FORSYTHE, 2002)

No Quadro 01 estão apresentadas características bioquímicas e de crescimento das espécies do gênero *Campylobacter*.

Espécie	Catalase	Nitrato	H <sub>2</sub> S	Hipurato	Urease	Crescimento		
						25 °C	37 °C	42 °C
<i>C. coli</i>	+	+	-	-	-	-	+	+
<i>C. jejuni</i> ssp. <i>jejuni</i>	+	+	-	+	-	-	+	+
<i>C. jejuni</i> ssp. <i>doylei</i>	+	-	-	+	-	-	+	+
<i>C. fetus</i> ssp. <i>fetus</i>	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>C. hyointestinalis</i>	+	+	+	-	-	+	+	+
<i>C. lari</i>	+	+	-	-	-	-	+	+
<i>C. upsaliensis</i>	-	+	-	-	-	-	+	+
<i>C. sputorum</i> ssp. <i>faecalis</i>	+	+	+	-	-	-	+	+
<i>C. sputorum</i> ssp. <i>bubulus</i>	-	+	+	-	-	-	+	+
<i>C. mucosalis</i>	-	+	+	-	-	-	+	+
<i>C. concisus</i>	-	+	+	-	-	-	+	+

Adaptado: Manual Oxoid, 2000

**Quadro 01** – Características bioquímicas e de multiplicação das espécies de *Campylobacter*

## 2.2 EPIDEMIOLOGIA DA CAMPILOBACTERIOSE HUMANA

*Campylobacter* spp. tem sido foco de crescente interesse nos últimos 30 anos, devido ao aumento na freqüência de seu isolamento em humanos, animais, alimentos e água (BUTZLER, 2004).

*C. jejuni* e *C. coli* são responsáveis por 95% dos casos de campilobacteriose em humanos. São comensais do trato gastrointestinal de uma grande variedade de animais domésticos e silvestres (bovinos, suínos, gatos, cães, roedores e, principalmente, de aves). Os pombos, gaivotas, pardais, patos, perus e, especialmente, o frango, são considerados reservatórios primários de *C. jejuni* (PARK, 2002; FORSYTHE, 2002). Sabe-se que nas aves a colonização é geralmente assintomática, podendo ser encontrados níveis de  $10^9$  UFC/g de fezes sem sintomas clínicos de doença (KEENER, 2004). A alta incidência de *C. jejuni* em frangos pode ser reflexo da sua temperatura ótima de multiplicação, uma vez que o trato intestinal das aves tem uma temperatura superior à dos mamíferos, ou seja, cerca de 42 °C (PARK, 2002).

A maioria dos casos de campilobacteriose são esporádicos, e os surtos são incomuns. A infecção pode ocorrer pela ingestão de menos de 500 UFC (BLACK *et al.*, 1998, *apud* KEENER, 2004 e PARK, 2002). O maior número de casos esporádicos ocorre, usualmente, por contaminação cruzada durante a manipulação de carne de frango crua ou pelo consumo da carne mal cozida (KEENER, 2004).

Pezzotti *et al.* (2003) verificaram a ocorrência de *C. jejuni* biotipo 1 entre as 177 linhagens de *Campylobacter* isoladas de pacientes de hospitais de Pádua, Verona e Pordenone, no nordeste da Itália. Esse mesmo biotipo havia sido isolado em 50% das 155 amostras de carne de frango analisadas na mesma região, o que reforça a hipótese de que a carne de frango é um importante veículo de transmissão deste patógeno aos humanos.

*C. jejuni* pode ser encontrado em bovinos, sendo a taxa de positividade nas fezes maior no verão. Embora, as carcaças possam ser contaminadas com conteúdo intestinal, isto não é comum e, quando ocorre, o nível de contaminação é baixo (BUTZLER, 1984). A maioria dos surtos já descritos foi associada ao consumo de leite cru, visto que *Campylobacter* não resiste à pasteurização. A mastite por *Campylobacter* spp. pode ser a causa da

contaminação, porém, é mais comum a contaminação do leite por fezes, durante a ordenha dos animais em condições precárias de higiene (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

A água contaminada, apesar de pouco comum, pode ser considerada como fonte direta ou indireta de contaminação, e está associada a surtos (BUTZLER, 1984). A contaminação cruzada de alimentos, especialmente saladas, é usual.

Os manipuladores de alimentos também podem ser fontes de contaminação. Um estudo realizado em Florianópolis, Brasil, constatou que 6,2% dos manipuladores assintomáticos analisados apresentavam o intestino colonizado com *Campylobacter*, sendo que as espécies isoladas foram *C. jejuni* e *C. coli* (TOSIN & MACHADO, 1995).

*Campylobacter* pode também ser transmitido aos humanos pelo contato com animais contaminados, sendo esse tipo de transmissão mais comum em crianças após o contato com filhotes infectados (BUTZLER, 1984).

O mecanismo pelo qual *C. jejuni* causa a doença ainda não está suficientemente esclarecido. Resultados obtidos até o presente momento indicam que sua patogenicidade é multifatorial. A adesão à mucosa intestinal é indispensável e já foi comprovado que algumas cepas são capazes de produzir toxinas. Entre as toxinas produzidas por *C. jejuni* destaca-se uma toxina termolábil, semelhante à toxina colérica, e citotoxinas. Muitos pacientes apresentam sangue e muco nas fezes, o que sugere um mecanismo invasivo do cólon. Em alguns casos, *C. jejuni* penetra na mucosa intestinal, multiplicando-se na lâmina própria, tal como ocorre com a *Salmonella* spp. e *Yersinia enterocolitica* (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

*Campylobacter jejuni* coloniza a porção distal do íleo e do cólon do trato intestinal humano. Após a colonização da mucosa e a aderência à superfície das células intestinais, o microrganismo altera a capacidade absorptiva normal dos enterócitos do intestino, prejudicando a função das células epiteliais. A sobrevivência dentro da célula hospedeira pode ser auxiliada pela produção de catalase que protege contra o estresse oxidativo causado pelos lisossomos (FORSYTHE, 2002).

Thomé (2006) constatou que *C. jejuni* é capaz de produzir três citotoxinas diferentes, testadas em células Vero (rim de macaco africano): CDT (Toxina de Distensão Citoletal), que provoca o alongamento da célula levando à morte celular em até 120 horas de ensaio, CLRT (Toxina Citoletal de

Arredondamento), que provoca arredondamento, levando à morte celular em até 120 horas de ensaio, e uma citotoxina de 70-kDa, que provoca arredondamento levando à morte celular em no máximo 48 horas de ensaio.

Em comparação a *Salmonella*, *Campylobacter* coloniza de maneira mais persistente o trato gastrointestinal com tendência a colonizar o ceco com altas contagens. A morfologia espiralada da célula e os flagelos polares facilitam a penetração no muco. Além disso, as células são quimicamente atraídas pela mucina, o principal componente do muco, apresentando, ainda, quimiotaxismo para a L-fucose. Estes componentes podem ser utilizados como fonte de energia para a multiplicação celular da bactéria (MEAD, 2004).

A infecção por *C. jejuni* ou *C. coli* pode causar vários sintomas clínicos, e a susceptibilidade à doença depende do hospedeiro e da virulência do serovar (FRANCO & LANDGRAF, 1996). *C. jejuni* tem sido reconhecido como agente causador da diarreia dos viajantes (BUTZLER, 1984). A incidência de infecção é maior em crianças com menos de 2 anos, sendo causa significativa de desnutrição, morbidade e mortalidade (MEAD, 2004).

A infecção pode manifestar-se de várias formas, sendo a enterocolite a mais comum. O período de incubação varia de 2 a 5 dias, podendo estender por até 10 dias. A sintomatologia é clinicamente semelhante à causada por diversos patógenos entéricos, ocorrendo diarreia acompanhada de febre baixa e dores abdominais. Muitos episódios de diarreia são de curta duração e não complicados, não requerendo tratamento específico (BUTZLER, 2004). Em alguns casos, a febre pode ser alta e as fezes podem conter sangue, leucócitos e muco. Vômitos são raros. A fase aguda da diarreia dura dois a três dias, mas as dores abdominais podem persistir por até três semanas (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Em países em desenvolvimento a infecção tende a resultar em diarreia aquosa e em países desenvolvidos normalmente ocorre enterite inflamatória aguda (PARK, 2002).

Nos Estados Unidos, foram estimados 2,4 milhões de casos de infecção por *Campylobacter* spp. por ano, afetando aproximadamente 1% da população, que resulta em aproximadamente 13.000 hospitalizações e 124 mortes (MEAD, 2004). O custo anual devido à infecção é estimado em 1,3 a 6,2 bilhões de dólares (FORSYTHE, 2002).

A campilobacteriose também é a doença de origem alimentar mais comum na Dinamarca, onde, foram registrados, em 2003, 3.542 casos, com 90% das infecções sendo causadas por *C. jejuni* (MPG, 2005).

Apesar de a sintomatologia predominante ser diarreia, a campilobacteriose pode resultar em seqüelas graves, tais como, Síndrome de Guillain-Barré (GBS) e artrite reativa ou septicemia em indivíduos imunossuprimidos (MEAD, 2004).

A GBS afeta cerca de 2 a cada 100.000 pessoas e é, atualmente, a causa mais comum de paralisia neuromuscular aguda no mundo. Em um estudo realizado no Japão, 22 dos 159 pacientes (14%) com GBS haviam tido infecção por *C. jejuni* (HUGHES, 2004). De um número estimado de 2.628 a 9.575 casos anuais de GBS nos Estados Unidos, 526 a 3.830 estão associados a infecções prévias por *Campylobacter* (FORSYTHE, 2002). Em outro estudo feito na França, 58 de 264 pacientes (22%) com GBS tiveram a doença após infecção por *C. jejuni* (SIVADON *et al.*, 2005).

O sorotipo O:19 é considerado o principal responsável por esta enfermidade auto-imune, devido a um mecanismo chamado mimicria molecular, no qual o sistema imunológico destrói a cobertura de mielina que envolve os nervos longos. O sintoma mais freqüente é fraqueza precedida ou acompanhada por sensação de formigamento. Pode progredir para a completa paralisia das pernas, braços e músculos da respiração (YUKI, 1997). Os casos de GBS devido à campilobacteriose podem requerer tratamento hospitalar intensivo e o paciente pode ficar debilitado por um longo período (MEAD, 2004).

Em geral, as penicilinas são moderadamente ativas contra *Campylobacter*. *C. jejuni* é resistente à cloxaciclina e a flucloxaciclina apresenta pouca atividade, assim como, as cefalosporinas. A ampicilina é a mais ativa das penicilinas e, juntamente com a amoxicilina, apresenta boa atividade bactericida contra *C. jejuni*. Os aminoglicosídeos são os antibióticos mais ativos, sendo a gentamicina o mais potente. As tetraciclinas são geralmente eficientes e a maioria dos serovares são inibidos por menos de 1 µg de tetraciclina por ml. Porém, a resistência à tetraciclina é relativamente alta na América do Norte e na Europa. Em geral, a eritromicina é o medicamento mais efetivo e usualmente recomendado no tratamento de enterites humanas causadas por *C. jejuni*. No entanto, em alguns países a ocorrência de serovares resistentes a este antibiótico pode variar. Por

exemplo, no Canadá a resistência de *C. jejuni* à eritromicina é de aproximadamente 1%; já na Suíça a percentagem sobe para 10% (BUTZLER, 1984).

Órgãos de saúde pública associam o aumento da incidência de serovares resistentes de *Campylobacter* aos antimicrobianos usados na medicina veterinária. A emergência de resistência é particularmente marcante em relação ao grupo das fluoroquinolonas. O uso de antibióticos na produção de animais pode promover a seleção de serovares resistentes que podem infectar o homem através da cadeia alimentar. Além da significância deste fato para a saúde pública, a rápida emergência de linhagens resistentes é um indicador da capacidade de adaptação de *Campylobacter* a condições adversas (MEAD, 2004).

Atualmente, tem-se discutido o uso de fluoroquinolonas em animais de produção e o aumento da resistência bacteriana a esse grupo de antibióticos, também utilizado no tratamento de doenças humanas. Neste sentido, o FDA conduziu um processo de análise de risco, concluindo que o uso veterinário de enrofloxacin e sarafloxacin deveria ser suspenso. O uso da eritromicina é indicado como a primeira escolha para o tratamento de infecções causadas por *C. jejuni* em animais de produção (SPINOSA *et al.*, 2002).

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

### **2.3 CONTAMINAÇÃO DE FRANGO POR *CAMPYLOBACTER***

As percentagens de lotes de frango colonizados com *Campylobacter* variam muito entre países e esta variação pode ser devido às diferentes técnicas de

amostragem e isolamento (JORGENSEN *et al.*, 2000; MEAD, 2003; NEWELL, 2004).

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

Nierop *et al.* (2005) na África do Sul avaliaram 99 amostras de frango frescas e congeladas, e encontraram 32,3% contaminadas com *Campylobacter*.

Estudo feito no nordeste da Itália, durante os anos de 2000 e 2001, detectou *Campylobacter* spp. em 81,3% das 155 amostras de carne de frango, 1,3% das 151 amostras de carne bovina e 10,3% das 175 amostras de carne suína analisadas (PEZZOTTI *et al.*, 2003).

Paulsen *et al.* (2005) analisaram 461 amostras de carne de aves, suína e bovina e seus derivados adquiridas em supermercados e lojas de conveniências na Áustria, e isolaram *Campylobacter* spp. em 18,44% do total das amostras analisadas, porém não isolaram *Campylobacter* spp. em produtos de frango processados termicamente.

A ocorrência de espécies termotolerante de *Campylobacter* em 200 amostras de frango foi de 44,5% em um estudo realizado no Perú, sendo *C. jejuni* a espécie mais isolada, correspondendo a 21,5% das amostras, seguida da *C. coli* (14%) e *C. lari* (9%) (TRESIERRA-AYALA *et al.*, 1995). Em um trabalho realizado no sul do Chile 25,7% das 300 amostras analisadas estavam contaminadas com *Campylobacter*, sendo que 76,6% corresponderam a *C. jejuni* e 23,4% a *C. coli* (FERNANDEZ & TORRES, 2000).

Um estudo feito no Brasil avaliou a presença de *C. jejuni* em 48 amostras de diversos produtos derivados de carne bovina, suína, frango, pato, ovos e leite obtidos em estabelecimentos comerciais da região de São Gonçalo, Rio de Janeiro. Foi isolado *C. jejuni* em 64,8% do total das amostras analisadas, sendo que 100% das amostras de coxa e fígado resfriadas de frango estavam contaminadas. Não houve isolamento nas amostras de carne suína congelada, fígado bovino resfriado, leite de cabra e queijo frescal (GONÇALVES & FRANCO, 2002). Outro estudo feito na região de São Paulo, Brasil, detectou 47% das amostras de frango resfriadas contaminadas por *Campylobacter* (MODOLO *et al.*, 2005). Franchin *et al.* (2005) detectaram *Campylobacter* termofílico em 91,7% dos lotes de frango

avaliados na região sul do Brasil, sendo que as principais fontes de contaminação foram as penas (79,2%) e a cloaca (75%).

#### **2.4 TRANSMISSÃO DE *CAMPYLOBACTER* NA CADEIA DE PRODUÇÃO DE FRANGO**

Muitos esforços têm sido feitos no sentido de diminuir a presença de *Campylobacter* na carne de frango, porém, o resultado obtido tem sido limitado, pois são poucas as informações conclusivas de como esse microrganismo contamina os lotes comerciais de frango (COX *et al.*, 2002). Além disso, ainda não existem métodos efetivos de controle de *Campylobacter* nas granjas (KENNER, 2004).

Segundo NEWEL & FEARNLEY (2003), algumas das estratégias utilizadas para o controle da contaminação por *Salmonella* não tiveram efeito sob *C. jejuni*. Isto pode ser considerado como um reflexo das diferenças na fisiologia, epidemiologia e ecologia desses microrganismos.

A transmissão vertical de *Campylobacter* nos lotes de frango através do ovo contaminado gera muitas controvérsias. Algumas pesquisas demonstraram que *Campylobacter* pode passar da matriz para o ovo fértil através da colonização do oviduto ou pela contaminação da casca do ovo com fezes. Esta transferência pode ser considerada uma fonte significativa de contaminação dos lotes de frango de corte (COX *et al.*, 2002).

A colonização por *Campylobacter* está associada a muitos fatores, entre eles, a idade do frango. O frango comercial normalmente é colonizado entre 2 e 4 semanas de idade. Na Europa, *Campylobacter* não é detectado nos lotes até 10 dias de idade. No entanto, uma vez colonizado, a transmissão de ave para ave dentro do lote ocorre rapidamente, e a maioria das aves será colonizada em poucos dias (EVANS & SAYERS, 2000). A localização geográfica e as condições climáticas têm forte influência nos índices de colonização, sendo, geralmente, mais altos no verão do que no inverno (NEWELL & FEARNLEY, 2003).

A transmissão horizontal (ambiental) é a rota mais comum de contaminação (MEAD, 2004) e muitas estratégias de intervenção em granjas têm sido propostas. Em geral, o objetivo é modificar as condições ambientais, prevenindo e/ou reduzindo a extensão da colonização. Outras estratégias incluem vacinação,

tratamento com probióticos e resistência genética (NEWELL, 2004). O uso de prebióticos estimula a multiplicação de bactérias benéficas presentes no trato intestinal, especialmente no cólon. A associação de frutoligossacarídeos e mananoligossacarídeos com produtos de exclusão competitiva oferece maior proteção contra a colonização por *Campylobacter* spp. (SPINOSA *et al.*, 2002).

Fontes potenciais de contaminação das aves são os roedores, aves silvestres e insetos que tenham acesso à granja, além de visitantes. *Campylobacter* spp. é eliminado pelos processos normais de tratamento de água, porém, quando se utiliza água não tratada esta pode ser um potencial veículo de contaminação. *C. jejuni* pode permanecer viável em água de mina mantida a 4 °C por até 4 semanas e pode ser isolada nos biofilmes que se formam no sistema de distribuição de água das granjas (MEAD, 2004). A ração não tem sido considerada um veículo de contaminação, pois a baixa umidade é uma condição desfavorável para a sobrevivência de *Campylobacter* (BRYAN & DOYLE, 1995).

As práticas de manejo têm forte influência no índice de contaminação dos lotes de frango. Muitos fatores de risco já foram identificados e os procedimentos de biossegurança devem ser cumpridos para manter a negatividade do lote. Os cuidados na granja incluem a manutenção dos galpões (para evitar a entrada de roedores), limpeza, desinfecção e período de carência entre lotes. Além disso, é importante evitar a construção de granjas muito próximas umas das outras e utilizar barreiras sanitárias, como lavar as mãos, desinfetar os calçados e trocar as roupas para entrar nas granjas (NEWELL & FAERNLEY, 2003).

As aves podem excretar *Campylobacter* spp. durante o apanhe e transporte, devido ao estresse (KEENER, 2004). As gaiolas de transporte podem ser fontes de contaminação cruzada entre os lotes. Franchin *et al.* (2005) encontraram 50% das gaiolas de transporte e 25% das amostras de água de lavagem destas gaiolas contaminadas por *Campylobacter*.

Quando lotes negativos são transportados em caixas previamente utilizadas no transporte de lotes positivos para *Campylobacter*, a contaminação de aves não colonizadas pode aumentar em mais de 50%, o que demonstra que as fezes excretadas durante o transporte resultam em importante fonte de contaminação cruzada entre as aves (BERRANG *et al.*, 2003). Uma vez que as carcaças são contaminadas, *Campylobacter* dificilmente será eliminado durante o processo de abate (KENNER, 2004).

O controle de microrganismos que contaminam a carne fresca inicia-se com medidas básicas de higiene, iniciando-se nos cuidados *ante mortem* dos animais. Estes devem estar descansados, submetidos à dieta hídrica e em condições de mínimo estresse (PARDI *et al.*, 1995).

As operações de abate incluem a sangria, escaldagem a 60 °C por 90 segundos, depenagem, remoção dos pés, evisceração e resfriamento em água tratada (MIWA *et al.*, 2003).

A contaminação durante o abate ocorre diretamente, via conteúdo intestinal ou, indiretamente, de ave para ave, via contato com equipamentos ou água. A bactéria adere à superfície da pele, formando um biofilme, que dificulta sua remoção (ALTER *et al.* 2005).

Um estudo feito em um matadouro de aves no Japão avaliou a contaminação entre diferentes lotes de frango durante a depenagem e evisceração. Foi observado o isolamento de *Campylobacter* em todas as aves abatidas após o processamento de um lote contaminado, o que sugere a fácil disseminação de *Campylobacter* entre lotes (MIWA *et al.*, 2003).

O nível de contaminação por *Campylobacter* em carcaças normalmente diminui na escaldagem, mas aumenta significativamente (cerca de 3,7 Log<sub>10</sub>) após a depenagem (BERRANG & DICKENS, 2000). Se o intestino for rompido durante a evisceração a contaminação da pele pode chegar a 10<sup>6</sup> UFC/g (KEENER, 2004).

Um estudo feito em uma linha de abate de perus na Alemanha mostrou que o nível de amostras positivas para *C. jejuni* no início do abate era de 76,7%. Este nível diminuiu significativamente para 37,2% após a escaldagem, porém, o nível de amostras positivas durante a depenagem subiu para 58,1% e na evisceração para 72,1%, indicando uma recontaminação das carcaças (ALTER *et al.*, 2005).

O aumento na contaminação superficial das carcaças após a evisceração se deve à ruptura das vísceras e exposição do conteúdo fecal. A ruptura das vísceras durante a evisceração não é incomum, uma vez que a maioria das plantas processadoras utiliza a evisceração mecânica, que não é ajustada para os diferentes tamanhos de carcaça (ROSENQUIST *et al.*, 2006).

Durante a depenagem ocorre a exposição dos folículos penosos, e *Campylobacter* pode penetrar nestas aberturas, que promovem um microambiente

protetor contra a dessecação, oxigênio e outras formas de estresse (DUFRENNE *et al.*, 2001, BHADURI & COTTRELL, 2004). A escaldagem, depenagem e evisceração são as operações que levam à maior disseminação de microrganismos entre as carcaças durante o processo de abate (BRYAN & DOYLE, 1995).

Uma vez que a pele do frango pode promover um microambiente protetor, *Campylobacter* pode se multiplicar nesta quando as condições são favoráveis, como a exposição da carcaça à temperatura ambiente, tornando-se um potencial problema de saúde pública (LEE *et al.*, 1998).

O método de resfriamento por imersão em água gelada (*chiller*) é muito utilizado por permitir uma redução rápida da temperatura das carcaças. Porém, o resfriamento da carcaça por imersão em água tratada pode ser uma etapa potencial de contaminação cruzada, dependendo do pH da água, da renovação de água e do teor de cloro livre. O resfriamento por ar possibilita uma menor disseminação de *Campylobacter* entre as carcaças do que o resfriamento em água, no entanto, este método é pouco utilizado devido à desidratação da superfície da carcaça (KEENER, 2004).

Rosenquist *et al.* (2006) detectaram uma redução significativa nas contagens de *Campylobacter* após o resfriamento, tanto no resfriamento por imersão quanto no resfriamento por ar (0,83 e 0,97 Log<sub>10</sub> UFC/g respectivamente).

Vários métodos têm sido avaliados para reduzir a carga microbiana e, conseqüentemente, a contaminação cruzada entre as carcaças, entre eles, enxágüe das carcaças antes da entrada no *chiller*, adição contínua de água limpa no *chiller* em contra-corrente com as carcaças, adição e renovação de cloro ou outros agentes antimicrobianos na água do *chiller* (SMITH *et al.*, 2005).

A água do *chiller* deve conter até 5 ppm de cloro residual de acordo com a Portaria nº 210 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento do Brasil (1998) para as aves comercializadas no mercado interno; a temperatura das carcaças na saída deve ser de, no máximo, 7 °C. Segundo Arrit *et al.* (2002) o aumento do cloro na água de enxágüe para redução de *Salmonella* e *Escherichia coli* levou a um pequeno efeito na redução da contaminação por *Campylobacter*. A água clorada só é efetiva na redução da contaminação em pH 6 a 8 e quando a matéria orgânica presente é mínima (KENNER, 2004).

A eficácia de outros agentes antimicrobianos contra *C. jejuni* tem sido testada. Estudos comprovaram que a solução de cloreto de cetilperidina a 0,5%,

bem como a solução de fosfato trissódico (10%) com cloreto de sódio acidificado (0,1%), aspergidas sobre a carcaça do frango, foram efetivas para inativação de *C. jejuni* (ARRIT *et al.*, 2002). Porém, como na Europa a descontaminação química foi proibida a partir de 2006, haverá a necessidade de implantação de um monitoramento efetivo sem o uso de substâncias antimicrobianas em todas as etapas da cadeia de produção (MEAD, 2004).

Algumas linhagens de *C. jejuni* variam quanto à habilidade de resistir ao estresse ambiental que ocorre durante o abate, como as temperaturas utilizadas na escaldagem e no resfriamento. Alter *et al.* (2005) isolaram em aves uma grande variedade de genótipos de *C. jejuni* no início do abate. Porém, somente alguns subtipos estáveis geneticamente foram isolados após a escaldagem e alguns grupos identificados após 24 horas de refrigeração. Estes resultados sugerem que o processo de escaldagem e resfriamento selecionam uma população de *C. jejuni* resistente ao estresse que pode sobreviver e permanecer na cadeia do alimento.

Práticas inadequadas de higiene e processamento por pessoas inabilitadas na linha de produção podem provocar contaminação cruzada. Considerando-se que uma grande percentagem das pessoas envolvidas na manipulação de alimentos carece de conhecimentos relativos aos cuidados higiênico-sanitários que devem ser seguidos antes e depois da manipulação dos alimentos, a manipulação inadequada pode ser considerada um risco em potencial à saúde pública (TOSIN & MACHADO, 1995).

A implantação do sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) em plantas processadoras de frango monitora os pontos críticos de contaminação por agentes microbianos não detectáveis pelos procedimentos convencionais de inspeção da carne (Mead, 2004).

## **2.5 EFEITO DO RESFRIAMENTO E CONGELAMENTO NA SOBREVIVÊNCIA DE *Campylobacter***

A redução da temperatura prolonga a vida útil dos alimentos, devido ao aumento no tempo de geração, retardando a multiplicação microbiana. A refrigeração evita a multiplicação dos microrganismos termófilos, e de muitos mesófilos. A diminuição da temperatura de um alimento abaixo do seu ponto de

congelamento faz com que parte da água que o alimento contém mude de estado, formando cristais de gelo. A imobilização da água na forma de gelo e o aumento na concentração de solutos reduzem a atividade de água (FELLOWS, 1994).

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

O efeito do resfriamento e do congelamento na sobrevivência de *C. jejuni* ainda não foi bem elucidado. *C. jejuni* apresenta uma temperatura ótima de multiplicação entre 37 a 42 °C e não cresce a temperaturas inferiores a 30 °C, porém apresenta atividade biológica a 4 °C, e pode sobreviver na água por diversas semanas a esta temperatura (BHADURI & COTTRELL, 2004; BAM, 2001).

Alguns estudos confirmam uma redução significativa na porcentagem de carcaças positivas para *C. jejuni* após o congelamento (ALTER *et al.*, 2005, STERN *et al.*, 1984). Diversos fatores, incluindo a nucleação do gelo e a desidratação, levam à injúria do microrganismo, além do estresse oxidativo, que pode levar a morte da célula, reduzindo significativamente a sobrevivência de *Campylobacter* ao congelamento (PARK, 2002).

Georgsson *et al.* (2006) avaliaram a influência do congelamento e do tempo de estocagem na incidência de *Campylobacter* em carne de frango. Esses autores analisaram 90 carcaças provenientes de lotes positivos para *Campylobacter* e armazenadas a -20 °C por 31, 73, 122 e 220 dias. Após 31 dias houve uma redução significativa ( $p \leq 0,05$ ) na contagem em comparação com a amostra analisada logo após o abate. Após 73 dias esta contagem estabilizou, não havendo redução significativa até o período final (220 dias).

Bhaduri & Cottrell (2004) avaliaram a sobrevivência de *C. jejuni* durante o resfriamento a 4 °C e congelamento a -20 °C em amostras de frango irradiadas e artificialmente contaminadas. A refrigeração causou um pequeno decréscimo nas contagens somente após 3 e 7 dias, indicando que esta bactéria pode sobreviver ao período de estocagem utilizado durante a comercialização de carnes resfriadas. As amostras congeladas apresentaram um declínio significativo na contagem de *C. jejuni*, porém, células viáveis foram detectadas após 14 dias de estocagem.

Estudo feito no País de Gales, entre março e dezembro de 2003, mostrou que o congelamento não prejudicou a recuperação de *Campylobacter* nas amostras de carne de frango analisadas. Neste estudo 73,5% das 544 amostras de carne de frango fresca e 71,9% das 192 amostras congeladas analisadas estavam contaminadas com *Campylobacter* (MELDRUM, 2005).

Em 2000, a Islândia decidiu empregar o congelamento da carne de frango como uma estratégia para reduzir a exposição humana a *Campylobacter*. Em 2001, a Noruega adotou a mesma estratégia (GEORGSSON *et al.*, 2006). No entanto, recentes estudos mostraram que não existe diferença significativa na taxa de positividade em amostras de carne de frango frescas e congeladas (MELDRUM *et al.*, 2005; NIEROP *et al.*, 2005), indicando que uma porção significativa de *C. jejuni* sobrevive ao resfriamento, congelamento e armazenagem combinada de resfriamento e congelamento. Esses resultados alertam que estes tratamentos sozinhos não garantem a segurança do alimento, com respeito a este microrganismo (BHADURI & COTTRELL, 2004).

Muitos produtos alimentícios são acondicionados em embalagens com atmosferas modificadas e armazenados em baixas temperaturas para reduzir ou prevenir a multiplicação de microrganismos deteriorantes e estender a vida útil do produto. A sobrevivência de *C. jejuni* em amostras de pele de frango artificialmente contaminadas embaladas em atmosfera de dióxido de carbono foi maior em amostras congeladas a -70 °C do que a -20 °C (LEE *et al.*, 1998).

Dykes & Moorhead (2001) avaliaram a influência da embalagem a vácuo e em atmosfera modificada (100% CO<sub>2</sub>) na sobrevivência de *C. jejuni* em amostras de carne bovina artificialmente contaminadas, armazenadas por 41 dias a -1,5 °C. Verificaram que não houve redução significativa na incidência de *C. jejuni*

nas amostras, indicando a habilidade deste microrganismo em sobreviver às diferentes condições de ambiente.

## **2.6 DETECÇÃO DE *CAMPYLOBACTER***

A dificuldade de isolamento de *Campylobacter* diminuiu após a publicação do método de cultivo padronizado por Butzler e colaboradores, em 1973. A maior facilidade de isolamento mostrou a alta ocorrência de *Campylobacter* como causa de diarreias humanas. O trabalho de Skirrow, publicado em 1977, foi de grande contribuição para tornar a infecção por *Campylobacter* mundialmente conhecida (THOMÉ, 2006).

A detecção rápida de *Campylobacter* é comprometida pela baixa velocidade de multiplicação e pela dificuldade de identificação das espécies. Os métodos convencionais para isolamento de *Campylobacter* em alimentos requerem 4 dias para fornecer um resultado negativo e de 6 a 7 dias para confirmar um resultado positivo (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Não existe um consenso quanto ao melhor método de isolamento. Diferentes métodos são usados, sendo importante avaliar se a técnica a ser utilizada é adequada ao tipo de alimento a ser examinado (MOORE, 2001). O sucesso da detecção de *Campylobacter* em alimentos, geralmente depende do enriquecimento seletivo em condições microaerófilas à temperatura de 42 °C (BOLTON & ROBERTSON, 1982).

Os resultados das análises microbiológicas feitas em frango variam consideravelmente, devido ao número de aves avaliadas por lote (variação estatística); diferentes procedimentos de amostragem (25g de carne com ou sem pele, enxágüe de carcaça, etc.) e pelos diferentes métodos analíticos utilizados (pré-enriquecimento, enriquecimento, variações no tempo e temperatura de incubação, etc.) (BRYAN & DOYLE, 1995).

Todo o meio de cultura disponível para pesquisa de *Campylobacter* contém peptonas e antibióticos, alguns contêm sangue, e outros incluem agentes quelantes dos derivados tóxicos do oxigênio (peróxido de hidrogênio e superóxidos) (DONNISON, 2003).

A detecção de *Campylobacter* em alimentos deve levar em consideração que a população presente pode ser baixa, devido ao fato de *Campylobacter* ser sensível a concentração de oxigênio do ar (21%) e não crescer a temperaturas abaixo de 30°C, utilizadas normalmente na conservação dos alimentos. O sucesso da detecção, geralmente, depende da análise de um grande número de amostras, concentração de células presentes e enriquecimento seletivo em condições microaerófilas à temperatura de 42 °C. A manutenção de condições seletivas, tanto no enriquecimento quanto no plaqueamento subsequente, é garantida pela utilização de meios nutritivos suplementados com sangue de cavalo ou carneiro e diferentes antibióticos, tais como, vancomicina, polimixina, cicloheximida, trimetoprim, rifampicina, cefoperazona, anfotericina, cefalotina, colistina, cefazolina, novobiocina e bacitracina. A utilização de meios adicionados de carvão ativado em substituição ao sangue é comum, além da adição de agentes redutores, como o sulfato ferroso, metabissulfito de sódio e piruvato de sódio, na concentração de 0,025% cada (SILVA *et al.*, 1997).

Os antibióticos mais utilizados no isolamento de *Campylobacter* são: vancomicina (inibe cocos Gram-positivos); polimixina B (inibe *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas* spp.); trimetoprim (inibe *Proteus* spp. e cocos Gram-positivos) e cefalosporinas (inibem *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, alguns *Proteus* spp., *Yersinia enterocolitica*) (DONNISON, 2003).

Line (2001) avaliou diferentes formulações de antibióticos para a recuperação de *Campylobacter*, os melhores resultados foram obtidos com a combinação de cefoperazona, cicloheximida, vancomicina, trimetoprim e polimixina B. Esse mesmo autor também comprovou que a adição de 200 mg/l de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) facilita a visualização e contagem das colônias.

O pré-enriquecimento com incubação a 37°C por 4 horas permite a recuperação das células de *Campylobacter* injuriadas pela desidratação, aquecimento, falta de nutrientes, congelamento ou exposição a radicais de oxigênio. Portanto, a incubação a 37 °C por 4 horas é recomendada antes da incubação a 42°C por mais 24 a 44 h. Ultrapassar 4 h de pré-enriquecimento pode favorecer a multiplicação da microbiota contaminante (DONNISON, 2003).

Vários métodos têm sido reportados na literatura para a análise de *Campylobacter*. Os meios de enriquecimento descritos com maior frequência são: caldo Preston, caldo Exeter, caldo Bolton, caldo CEB e caldo Park & Sanders. Os

ágaros seletivos mais comumente utilizados são: Skirrow, Campy-Cefex, Butzler, Preston e Exeter (todos com inclusão de sangue), mCCDA (*modified charcoal cefoperazone, deoxycholate agar*) e Karmali (sem inclusão de sangue) (DONNISON, 2003). O caldo Preston, seletivo para isolamento de *C. jejuni* e *C. coli*, proposto por Bolton e Robertson em 1982, têm sido muito utilizado por ser mais seletivo que o meio de Skirrow no isolamento de *Campylobacter* de diferentes origens.

Um dos meios de enriquecimento mais utilizados é o caldo Bolton, que pode ser usado com sucesso sem sangue, e contém sulfato ferroso, metabissulfito de sódio e piruvato de sódio (PAULSEN *et al.*, 2005). Estes compostos suplementares aumentam a tolerância do *Campylobacter* ao oxigênio extinguindo ânions superóxidos e peróxido de hidrogênio que ocorrem espontaneamente no meio de cultura. O sulfato ferroso, piruvato de sódio e o metabissulfito de sódio agem destruindo o radical superóxido (GONÇALVES & FRANCO, 2002)

O caldo Bolton é recomendado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) dos Estados Unidos no BAM (*Bacteriological Analytical Manual*, 2001) para recuperar *Campylobacter* em diferentes tipos de alimentos, associado ao pré-enriquecimento por 4 h a 37 °C e ao enriquecimento seletivo a 42 °C por 20 - 44 h em condições microaerófilas, seguido de estriamento em ágar seletivo.

Paulsen *et al.* (2005) compararam o caldo Preston e o caldo Bolton e verificaram que o enriquecimento em caldo Bolton foi mais sensível e apresentou uma percentagem de isolamento de *Campylobacter* significativamente maior que a obtida após o enriquecimento em caldo Preston.

As colônias de *Campylobacter* nos diversos meios de plaqueamento (CampyBap, CCDA, Skirrow ou Butzler) são semelhantes, podendo apresentar-se lisas, convexas e brilhantes, com bordas perfeitas, ou planas, translúcidas e lustrosas, com bordas irregulares e espalhadas. Geralmente são incolores, levemente cremes ou acinzentadas, com dimensão variando de pontual a 4 a 5 mm. Nos meios com sangue (Ágar de Blaser, Skirrow ou Butzler), não apresentam hemólise (SILVA *et al.*, 1997). *Campylobacter* reduz o cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) formando um complexo insolúvel magenta quando cresce em meios de cultura contendo este sal (LUECHTEFELD & WANG, 1982; LINE, 2001).

Em amostras com uma elevada carga de microbiota competitiva os agentes seletivos do meio de enriquecimento podem ser insuficientes para inibir a multiplicação desta e comprometer a detecção de *Campylobacter* (DUFRENNE *et al.*, 2001). As colônias de microrganismos contaminantes geralmente são maiores e

apresentam-se úmidas, com aparência cerosa. O técnico precisa ser experiente para distinguir as colônias de *Campylobacter* das contaminantes (LINE, 2001).

Um estudo feito por Jorgensen *et al.* (2002) mostrou não haver diferença significativa entre os métodos de preparo de amostra utilizando-se 25 g de pele, 25 ml da solução de lavagem de pele ou combinando 17 ml da solução de lavagem com 8 g de pele em 225 ml de água peptonada tamponada seguida de agitação por 60 segundos em *Stomacher*. Este mesmo estudo demonstrou que *Campylobacter* spp. foi isolado de 38% das 145 amostras analisadas por plaqueamento direto (sem enriquecimento), porém o limite mínimo de detecção deste método foi de 500 UFC/g.

O BAM (2001) sugere que as colônias características de *Campylobacter* sejam identificadas empregando a coloração de Gram, motilidade em contraste de fase e confirmação pelas prova da catalase e oxidase. Somente *C. jejuni* apresenta atividade hipuricase e hidrolisa o hipurato de sódio em ácido benzóico e glicina. A ninidrina é usada como indicador da presença de glicina (LUECHTEFELD & WANG, 1982).

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

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

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Avaliar a contaminação por *Campylobacter* spp. em carcaças de frango obtidas em um matadouro no interior do Paraná e verificar a ocorrência de *C. jejuni* após o armazenamento sob refrigeração e congelamento. Este procedimento teve a finalidade de avaliar a carne nas condições de venda ao consumidor, como também, se o processo de conservação afeta a viabilidade das células.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a eficiência da técnica de contagem de unidades formadoras de colônias de *Campylobacter* spp. por plaqueamento direto em amostras frescas, refrigeradas e congeladas.
- Verificar se o enriquecimento seletivo é capaz de recuperar as células de *C. jejuni* injuriadas durante o armazenamento.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS

As carcaças de frango analisadas neste trabalho foram obtidas em um matadouro de aves da região de Londrina, no interior do Paraná – Brasil, com capacidade média de abate de 50.000 aves/dia. As aves abatidas são das linhagens Cobb e Ross de ambos os sexos com idade média de 46 dias.

As coletas foram feitas no período de setembro a novembro de 2006, sempre no turno matutino (8 às 11 h). As carcaças foram coletadas imediatamente após a embalagem e analisadas em seguida (o tempo máximo entre as coletas das amostras e início da análise foi de, aproximadamente, 1 hora).

De cada carcaça foram retiradas, assepticamente, 3 amostras de 25 g compostas por porções de pele de diferentes partes (cloaca, pescoço, peito e coxa). As amostras foram acondicionadas em sacos estéreis para *Stomacher*, sendo uma porção analisada imediatamente, a segunda, mantida por 7 dias a temperatura de refrigeração (4 °C) e, a terceira, armazenada por 28 dias em temperatura de congelamento (-20 °C). Foram avaliadas 30 carcaças, totalizando 90 amostras.

Foram adicionados às amostras 225 ml de água peptonada tamponada (Himedia Laboratories Put. Ltd. Mumbai, India) e agitadas em *Stomacher* 400 (Lab System Ltd., USA) por 60 segundos em velocidade média (esquema do método de análise de *Campylobacter* no anexo 01).

Como medida de controle do procedimento, a cada coleta, uma amostra de 25 g foi artificialmente contaminada com *C. jejuni* ATCC 33291 (Lote 03/04 – Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil), com a finalidade de avaliar se a metodologia estava adequada para a recuperação de *Campylobacter*.

Para o preparo da suspensão, a cepa padrão de *C. jejuni* congelada a -80 °C em caldo BHI com 15% de glicerol foi ressuspensa em caldo Bolton (Merck, Darmstadt, Germany) e incubada por 24 h a 42 °C em microaerofilia. A partir dessa suspensão foram realizadas diluições decimais até 10<sup>-6</sup>. Alíquotas de 0,1 ml desta diluição, que corresponde a aproximadamente 100 UFC/ml, foram inoculadas em 25 g de amostra.

#### **4.2 CONTAGEM DE *CAMPYLOBACTER* SPP. TERMOTOLERANTE ANTES DO ENRIQUECIMENTO SELETIVO (PLAQUEAMENTO DIRETO)**

As amostras analisadas por plaqueamento direto foram inoculadas em ágar Bolton modificado segundo Franchin *et al.* (2005), preparado a partir de caldo Bolton (Merck) adicionado de 1,5% de ágar-ágar (Himedia Laboratories Put. Ltd., Mumbai, India), 0,5g/litro de sulfato ferroso (J. T. Baker, Germany), 200 ppm de solução de 2,3,5 cloreto trifeniltetrazolium (TTC) (Sigma, USA) e Suplemento SR183E (Oxoid Ltd., Hampshire, England) (cefoperazone, 10mg/500 ml; vancomicina, 10 mg/500 ml; trimetropim, 10mg/500 ml e anfotericina B, 5mg/500 ml). Para tanto, inoculou-se 0,2 ml da amostra diluída em água peptonada tamponada na superfície do Ágar Bolton Modificado.

O período de incubação foi de quatro horas a 37 °C em estufa bacteriológica (Fanem Ltda., São Paulo, Brasil) seguido de 44 horas a 42 °C em estufa BOD (*Biologic Oxygen Demand*) (Tecnal Equipamentos para Laboratórios Ltda., São Paulo, Brasil), sob condições de microaerofilia (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> e 85% N<sub>2</sub>) empregando sistema Microaerobac (Probac do Brasil). Foram utilizadas jarras para anaerobiose de 3,5L (Permutation, Paraná, Brasil).

As colônias características (cor magenta, pequenas, lisas, convexas e brilhantes, com bordas perfeitas) crescidas no plaqueamento direto em ágar Bolton modificado e confirmadas pela identificação bioquímica foram contadas. O número de unidades formadoras de colônias por grama foi calculado multiplicando o número de colônias pelo inverso da diluição e pelo volume inoculado (0,2 ml). O resultado final representa a contaminação por *Campylobacter* spp. termotolerante / g.

#### **4.3 PESQUISA DE *C. JEJUNI* APÓS O ENRIQUECIMENTO SELETIVO**

Alíquotas de 5 ml da amostra homogeneizada em água peptonada tamponada foram enriquecidas em 45 ml de caldo Bolton (Merck) e suplemento SR183E Oxoid (cefoperazone, 10mg/500 ml; vancomicina, 10 mg/500 ml; trimetropim, 10mg/500 ml e anfotericina B, 5mg/500 ml). O período de pré-

enriquecimento foi de quatro horas a 37 °C seguido do enriquecimento de 44 horas a 42 °C, sob condições de microaerofilia (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> e 85% N<sub>2</sub>) empregando sistema Microaerobac (Probac do Brasil).

Após o enriquecimento seletivo as amostras foram estriadas com alça bacteriológica em ágar Bolton modificado. As placas foram incubadas a 42 °C por 24 horas sob condições microaerófilas (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> e 85% N<sub>2</sub>).

As colônias características obtidas após enriquecimento seletivo seguida do plaqueamento diferencial em ágar Bolton modificado e confirmadas pela prova de hidrólise do hipurato foram consideradas positivas para *C. jejuni* em 0,5 g (enriquecimento de 5 ml da diluição 10<sup>-1</sup>).

#### 4.4 IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA

Colônias características de *Campylobacter* (cor magenta, lisas, convexas e brilhantes, com bordas perfeitas, ou planas, translúcidas e lustrosas, com bordas irregulares e espalhadas) foram confirmadas pela morfologia ao Gram (Microscópio Olympus Optical CO. Ltd. CH2, Japan), movimento característico em microscópio biológico binocular com contraste de fase (Bioval, Model L2000A) (aumento de 1000 x) e pelo teste de catalase.

A identificação de *C. jejuni* nas colônias características isoladas após o enriquecimento foi confirmada empregando-se a hidrólise do hipurato. Para tanto, as colônias características foram repicadas em Columbia ágar base (Himedia Laboratories Put. Ltd., Mumbai, India) com 7% de sangue de carneiro e incubadas por 24 h a 42 °C em microaerofilia, a fim de aumentar o inóculo da colônia.

##### 4.4.1 Hidrólise do Hipurato

Solução de hipurato de sódio (1%) foi esterilizada em membrana com 0,2 µm de porosidade (Millipore Products Division, Bedford, USA). Dois mililitros

foram transferidos para tubos de ensaio (12 x 100 mm) e estocados sob congelamento a -20 °C. No momento do uso, descongelou-se a solução de hipurato de sódio e transferiu-se uma alçada com inóculo pesado das colônias suspeitas repicadas em ágar sangue, homogeneizando bem. Após a inoculação os tubos foram incubados em estufa (Fanem Ltda.) a 37 °C por 2 h. Em seguida, adicionou-se cuidadosamente 0,2 ml de solução ninidrina (3,5% ninidrina em solução 1:1 butanol-acetona). Os tubos foram mantidos sem agitação por 10 min a 37 °C. O desenvolvimento de uma coloração violeta escura indica resultado positivo para *C. jejuni*; caso a suspensão permaneça incolor ou ligeiramente púrpura indica teste negativo. As cepas de *C. jejuni* hidrolisam o hipurato, enquanto *C. coli* e *C. lari* não hidrolisam (SILVA *et al.*, 1997).

#### 4.4.2 Teste da Catalase

Para a realização do teste, transferiu-se uma alçada de colônias do meio de agar Bolton para uma gota de peróxido de hidrogênio 3%, em uma lâmina de microscopia e observou-se a formação de um borbulhamento imediato (teste positivo).

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos para contagem de unidades formadoras de colônias (variável dependente) de *Campylobacter* spp. termotolerante para as diferentes condições de armazenamento – amostra fresca, refrigerada e congelada – foram transformados logaritmicamente na base 10, somando-se 1 (um) para que fosse possível a avaliação de valores de contagem zero, obtendo-se a seguinte expressão:  $\text{Log}_{10} (n+1)$ . Posteriormente foi aplicado o Teste de Shapiro-Wilk (Programa Statistica, versão 6) sobre o grupo de valores transformados, objetivando a verificação de adequação à normalidade (SHAPIRO, 1968).

Como as distribuições de frequência não se adequaram à curva normal de Gauss, utilizou-se para a comparação, os Testes Não-Paramétricos Kolmogorov-Smirnov (KOLMOGOROV, 1941; SMIRNOV, 1939 e 1948) e de Mann-Whitney (MANN e WHITNEY, 1947).

Os resultados de ocorrência de *C. jejuni* nos diferentes pontos foram comparados entre si pelo teste epidemiológico de Caso-Controle por Qui-Quadrado (FISCHER, 1934), com 95% de confiabilidade.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises de contagem de *Campylobacter* spp. termotolerantes por plaqueamento direto e pesquisa de *C. jejuni* após o enriquecimento seletivo nas amostras de carne de frango fresca (analisada 1 h após a embalagem), refrigerada a 4 °C por 7 dias e congelada a – 20 °C por 28 dias estão apresentados na tabela 01.

As amostras 5 e 6 apresentaram contagem de *Campylobacter* spp. por plaqueamento direto somente nas amostras frescas, porém, após o enriquecimento foi confirmada a presença de *C. jejuni* tanto nas amostras frescas quanto nas refrigeradas e nas congeladas. Fato semelhante aconteceu nas amostras 9 e 12 refrigeradas e nas amostras 15 e 28 congeladas, onde a presença de *C. jejuni* só foi detectada após o enriquecimento.

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

As amostras contaminadas artificialmente (identificadas na tabela como C.A.) foram utilizadas como medida de controle do procedimento. A cepa foi recuperada após todas as etapas, indicando que as condições da análise foram adequadas para recuperação de *Campylobacter*.

**Tabela 01** – Resultados das análises de contagem de *Campylobacter* spp. termotolerantes por plaqueamento direto e pesquisa de *C. jejuni* após o enriquecimento seletivo em amostras de carne de frango fresca (analisada 1 h após a embalagem), refrigerada a 4 °C por 7 dias e congelada a – 20 °C por 28 dias.

Amostra	Amostras Frescas		Amostras Refrigeradas		Amostras Congeladas	
	<i>Campylobacter</i> spp. (Log <sub>10</sub> UFC/g)	Pesquisa <i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter</i> spp. (Log <sub>10</sub> UFC/g)	Pesquisa <i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter</i> spp. (Log <sub>10</sub> UFC/g)	Pesquisa <i>C. jejuni</i>
1	0,00	Negativo	0,00	Negativo	0,00	Negativo
2	3,50	Positivo	0,00	Negativo	0,00	Positivo
3	0,00	Negativo	0,00	Negativo	0,00	Negativo
4	3,40	Negativo	0,00	Negativo	0,00	Negativo
5	3,30	Positivo	0,00	Positivo	0,00	Positivo
6	3,00	Positivo	0,00	Positivo	0,00	Positivo
7	2,30	Positivo	0,00	Negativo	1,71	Negativo
8	2,90	Negativo	0,00	Negativo	0,00	Negativo
9	2,80	Negativo	0,00	Positivo	1,71	Positivo
10	2,80	Positivo	0,00	Negativo	0,00	Negativo
11	3,10	Positivo	0,00	Negativo	0,00	Negativo
12	3,90	Positivo	0,00	Positivo	0,00	Negativo
13	3,60	Positivo	2,00	Positivo	2,18	Positivo
14	3,00	Positivo	1,71	Positivo	0,00	Negativo
15	3,10	Positivo	1,71	Positivo	0,00	Positivo
16	3,50	Positivo	2,55	Positivo	2,30	Positivo
17	3,00	Negativo	2,18	Negativo	0,00	Negativo
18	3,10	Negativo	2,40	Negativo	0,00	Negativo
19	3,20	Negativo	2,30	Negativo	2,00	Negativo
20	4,40	Negativo	0,00	Negativo	0,00	Negativo
21	4,00	Positivo	2,70	Positivo	1,71	Positivo
22	4,20	Negativo	1,71	Negativo	0,00	Negativo
23	3,70	Negativo	1,71	Negativo	0,00	Negativo
24	3,80	Negativo	0,00	Negativo	2,00	Negativo
25	3,20	Negativo	2,81	Negativo	1,71	Negativo
26	2,60	Positivo	1,71	Positivo	1,71	Positivo
27	3,50	Negativo	2,55	Negativo	2,18	Negativo
28	2,70	Positivo	2,30	Positivo	0,00	Positivo
29	3,30	Negativo	2,60	Negativo	0,00	Negativo
30	3,70	Positivo	2,65	Negativo	2,18	Negativo
C.A.	4,65	Positivo	2,54	Positivo	2,60	Positivo
C.A.	4,00	Positivo	3,38	Positivo	3,04	Positivo
C.A.	4,62	Positivo	3,50	Positivo	3,08	Positivo

C.A: Contaminação Artificial

A contagem média de *Campylobacter* spp. termotolerante em unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g), encontrada nas amostras de frango analisadas após o plaqueamento direto, estão apresentadas na Tabela 02.

**Tabela 02** – Valores médios da contagem de *Campylobacter* spp. termotolerante por grama de carne de frango após plaqueamento direto

Amostra	Número de amostras positivas / número de amostras avaliadas	Média Contagem Log <sub>10</sub> UFC/g	Contagem mínima e máxima
Carne de Frango Fresca <sup>(1)</sup>	28/30 <sup>a</sup>	3,08 <sup>a</sup>	2,30 – 4,37
Carne de Frango Refrigerada <sup>(2)</sup>	16/30 <sup>b</sup>	1,19 <sup>b</sup>	1,71 – 2,81
Carne de Frango Congelada <sup>(3)</sup>	11/30 <sup>b</sup>	0,71 <sup>b</sup>	1,71 – 2,30

Fonte: Londrina, 2006

Letras diferentes na mesma coluna indicam que houve diferença significativa entre as amostras ao nível de 95% de confiabilidade (P < 0,05)

<sup>(1)</sup> Amostras analisadas 1 h após a embalagem da carcaça de frango

<sup>(2)</sup> Amostras refrigeradas a 4 °C por 7 dias

<sup>(3)</sup> Amostras congeladas a -20 °C por 28 dias

No presente trabalho, houve diferença significativa ao nível de 95% de confiabilidade entre os resultados das contagens de UFC/g de *Campylobacter* spp. termotolerante obtidas nas amostras frescas, quando comparadas com as refrigeradas e congeladas. Esta redução pode ser explicada pela injúria que a mudança de temperatura causa à célula, levando *Campylobacter* a assumir a forma VNC (viável, mas não cultivável), a qual não pode ser recuperada pelos métodos usuais (PARK, 2002).

*Campylobacter* spp. termotolerante foi detectado em 28 (93,3%) das 30 amostras frescas, em 16 (53,3%) das 30 amostras refrigeradas e em 11 das 30 (36,67%) amostras congeladas analisadas no presente trabalho pela técnica de plaqueamento direto.

A média da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Campylobacter* spp. termotolerante por grama nas amostras refrigeradas foi de 3,08 Log<sub>10</sub>, sendo a contagem mínima de 2,30 Log<sub>10</sub> UFC/g e a máxima de 4,37 Log<sub>10</sub> UFC/g.

A média da contagem nas amostras refrigeradas foi de 1,19 Log<sub>10</sub> UFC/g, sendo a contagem mínima de 1,71 Log<sub>10</sub> UFC/g e a máxima de 2,81 Log<sub>10</sub> UFC/g. Resultado semelhante foi obtido por Rosenquist *et al.* (2006), que ao analisarem amostras de diferentes lotes de frango refrigerado encontraram médias de contagens variando de 1,49 a 2,13 Log<sub>10</sub> UFC/g.

Contagens mais altas utilizando também o método de plaqueamento direto foram encontradas por Jorgensen *et al.* (2002). Esses autores obtiveram contagens de *Campylobacter* variando entre 3,77 a 5,63 Log<sub>10</sub> UFC / frango em 40% das 75 amostras de frango refrigeradas.

A redução na contagem por plaqueamento direto nas amostras refrigeradas foi de aproximadamente 3,07 Log<sub>10</sub> UFC/g quando comparada com a contagem obtida nas amostras frescas. Bhaduri & Cottrell (2004) encontraram, utilizando a mesma técnica, uma redução de 0,63 Log<sub>10</sub> UFC/g em amostras de pele de frango artificialmente contaminadas com *Campylobacter* e refrigeradas a 4 °C por 7 dias.

A contagem média das amostras congeladas foi de 0,71 Log<sub>10</sub> UFC/g, sendo a contagem mínima obtida de 1,71 Log<sub>10</sub> UFC/g e a máxima de 2,30 Log<sub>10</sub> UFC/g. As contagens foram significativamente menores que as obtidas nas amostras frescas. Este resultado foi inferior ao obtido por Rosenquist *et al.* (2006) que encontraram 45 amostras positivas das 60 carcaças de frango analisadas (75%) após o congelamento a -20 °C, com contagens médias variando entre 1,10 e 1,96 Log<sub>10</sub> UFC/g.

A redução nas contagens das amostras congeladas quando comparadas com as frescas foi de 3,08 Log<sub>10</sub> UFC/g. Este resultado foi superior ao de Bhaduri & Cottrell (2002), que encontraram uma redução de 1,38 a 2,26 Log<sub>10</sub> UFC/g de *Campylobacter* em amostras de pele de frango artificialmente congeladas e armazenadas por 14 dias a -20 °C. Stern *et al.*, (1984) encontraram uma incidência de *C. jejuni* cinco vezes menor em amostras congeladas (2,3%) do que nas amostras frescas (12,1%).

Jorgensen *et al.* (2002) isolaram, por plaqueamento direto, *Campylobacter* spp. em 4 das 26 amostras da água de lavagem das carcaças congeladas, com contagens variando de 2,80 a 4,40 Log<sub>10</sub> UFC / frango, sendo que o limite de detecção foi de 500 UFC.

No estudo feito por Georgsson *et al.* (2006) utilizando a técnica de plaqueamento direto, a redução nas contagens de *Campylobacter* foi de 0,65 a 2,87 Log<sub>10</sub> UFC/g após 31 dias de estocagem a -20 °C, indicando uma redução significativa quando comparada aos resultados obtidos nas amostras frescas. No entanto, apesar da redução significativa nas contagens, o índice de contaminação após este período permaneceu na faixa de 3,13 a 4,01 Log<sub>10</sub> UFC/g.

Lee *et al.* (1998) comprovaram que *C. jejuni* é hábil em sobreviver por longo período (56 dias) armazenado a -20 °C, temperatura da maioria dos freezers domésticos. Apesar da redução de aproximadamente 5 Log<sub>10</sub> nas contagens de UFC/g por plaqueamento direto, no entanto, *C. jejuni* permaneceu viável, mesmo em baixas contagens. Assim sendo, considerando que a dose mínima infecciosa é de 500 células, o congelamento dos alimentos não pode ser considerado como um procedimento que garante a segurança do produto.

Bolton & Robertson (1982) afirmaram que a técnica de plaqueamento direto pode ser utilizada em laboratórios de diagnóstico clínico, onde as contagens de *Campylobacter* presentes nas fezes são altas, porém, em se tratando de estudos envolvendo baixas contagens, o método com enriquecimento é o mais indicado.

Apesar de prática e rápida, a técnica de contagem de *Campylobacter* spp. termotolerante por plaqueamento direto, subestima a contaminação real de amostras submetidas a baixas temperaturas, uma vez que não recupera as células injuriadas. Além disso, em 4 amostras refrigeradas e 4 amostras congeladas analisadas neste trabalho (tabela 01), *Campylobacter* foi isolado somente após o enriquecimento. Portanto, o plaqueamento direto é mais recomendado para amostras frescas, durante o monitoramento dos pontos críticos de controle no processo de abate antes do resfriamento.

Os resultados do isolamento de *C. jejuni* de amostras de carne de frango fresca, refrigerada e congelada obtidos após o enriquecimento seletivo estão apresentados na tabela 03.

**Tabela 03** – Número de amostras de carne de frango positivas para *C. jejuni* após o enriquecimento seletivo

<i>Amostra</i>	<i>Taxa de Positividade</i>
Carne de frango Fresca <sup>(1)</sup>	15/30 <sup>a</sup>
Carne de frango Refrigerada <sup>(2)</sup>	11/30 <sup>a</sup>
Carne de frango Congelada <sup>(3)</sup>	10/30 <sup>a</sup>

Fonte: Londrina, 2006

Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa entre as amostras ao nível de 95% de confiabilidade ( $P > 0,05$ ).

<sup>(1)</sup> Amostras analisadas 1 h após a embalagem da carcaça de frango

<sup>(2)</sup> Amostras refrigeradas a 4 °C por 7 dias

<sup>(3)</sup> Amostras congeladas a -20 °C por 28 dias

O número de amostras positivas para *C. jejuni* das amostras frescas após o enriquecimento seletivo foi de 15 em 30 amostras analisadas (50%). No método de plaqueamento direto 28 das 30 amostras frescas (93,3%) estavam contaminadas com *Campylobacter* spp. termotolerante. A identificação bioquímica de *C. jejuni* foi realizada somente após o enriquecimento seletivo. Assim sendo, esta percentagem maior no isolamento de *Campylobacter* spp. antes do enriquecimento seletivo sugere a presença de outras espécies de *Campylobacter* spp. termotolerantes que não puderam ser identificadas, tais como: *C. coli*, *C. lari* e *C. upsaliensis*.

Onze das 30 amostras refrigeradas analisadas (36,7%) foram positivas para *C. jejuni*. Esta percentagem de positividade é semelhante a encontrada por Paulsen *et al.* (2005) que avaliaram 190 amostras de carne de frango refrigerada obtidas em lojas de conveniências, supermercados e açougues, e detectaram 39% das amostras analisadas positivas para *Campylobacter* spp. após o enriquecimento.

As carcaças congeladas apresentaram 33,3% amostras positivas para *C. jejuni*. Este resultado foi inferior ao encontrado por Meldrum *et al.* (2005) que encontraram 71,9% das amostras de frango congelado positivas para *Campylobacter*, porém os autores não pesquisaram a presença de *C. jejuni*.

Não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) na taxa de positividade de *C. jejuni* entre as amostras frescas e as submetidas a baixas temperaturas. Resultado semelhante ao encontrado por Meldrum *et al.* (2005). Contudo, Alter *et al.*

(2005) avaliaram 43 amostras de peru e verificaram uma redução significativa na taxa de positividade (de 67,4 para 25,6%) nas amostras avaliadas após o resfriamento entre 0 e 3 °C por 24 h. Estas diferenças podem ser explicadas pelas diferentes técnicas de enriquecimento e preparo das amostras empregadas.

Fernández & Pisón (1996) avaliaram 126 amostras de fígado de frango usando o método de enriquecimento e encontraram 117 (92,9%) amostras positivas para *Campylobacter* spp., destas 92 amostras (73%) foram identificadas como *C. coli*, e 25 (19,8%) como *C. jejuni*. Os autores sugerem que *C. coli* é mais resistente a injúria que ocorre durante a exposição a baixas temperaturas e às condições adversas do ambiente.

Em 2000, a Islândia decidiu empregar o congelamento da carne de frango como uma estratégia para reduzir a exposição humana a *Campylobacter*. Em 2001, a Noruega adotou a mesma estratégia (GEORGSSON *et al.*, 2006). No entanto, os resultados obtidos no presente trabalho indicam que não existe diferença significativa na taxa de positividade em amostras de carne de frango frescas, refrigeradas e congeladas indicando que uma porção significativa de *C. jejuni* sobrevive a tais condições. Esses resultados alertam que estes tratamentos sozinhos não garantem a segurança do alimento, com respeito a este microrganismo.

## 6 CONCLUSÃO

Frangos frescos abatidos no estado do Paraná apresentaram alta contagem de *Campylobacter* spp. termotolerante, mesmo depois de estocados a 4°C por sete dias e a -20°C por 28 dias.

A dificuldade de recuperação de células injuriadas pelo plaqueamento direto pode ser a explicação para o não isolamento de *Campylobacter* ou pela diminuição significativa das contagens obtidas com amostras de frango refrigeradas ou congeladas. Por outro lado, utilizando-se a técnica de enriquecimento seletivo, a recuperação de *C. jejuni* foi estatisticamente igual entre as amostras frescas e refrigeradas ou congeladas, indicando que este organismo pode sobreviver a tais condições de armazenamento.

## REFERÊNCIAS

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

ARRIT, F.M.; EIFERT, J.D.; PIERSON, M.D.; SUMNER, S.S. 2002. Efficacy of antimicrobials against *Campylobacter jejuni* on chicken breast skin. **J. Appl. Poult. Res.** Vol 11 pg. 358-366

BAM, **Bacteriological Analytical Manual**. 2001. U.S. Food and Drug Administration, disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-7.html> acessado em: 05/10/2006

BERRANG, M.E.; DICKENS, J.A. 2000. Presence and level of *Campylobacter* spp.. on broiler carcasses throughout the processing plant. **Applied Poultry Science**. Vol 9 pg 43-47

BERRANG, M.E.; NORTHCUTT, J.K; FLETCHER, D.L.; COX, N.A. 2003. Role of dump cage fecal contamination in the transfer of *Campylobacter* to carcasses of previously negative broilers. **Poultry Science Association**. Vol. 12 pg 190-195

BHADURI, S.; COTTRELL, B. 2004. Survival of cold-stressed *Campylobacter jejuni* on ground chickens and chicken skin during frozen storage. **Appl. Environ. Microbiol.** Vol. 70 (12) pg. 7103-7109

BOLTON, F.J.; ROBERTSON, L. 1982. A selective medium for isolating *Campylobacter jejuni* / *coli*. **Journal Clin. Pathol.** Vol. 35 pg 462-467

BRASIL, Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Portaria nº 210** Publicado no Diário da União de 26/11/98, seção 1, página 226

BRYAN, F.L.; DOYLE, M.P. 1995. Health risks and consequences of *Salmonella* and *Campylobacter jejuni* in raw poultry. **Journal of Food Protection**. Vol. 58, nº 3, pg 326-344

BUTZLER, J.-P. 1984. **Campylobacter infection in man and animals**. Boca Raton: CRC. 246p

BUTZLER, J-P., 2004. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. **Clin. Microbiol. Infect.** Vol. 10 pg 868-876

CDC, **Center for Diseases Control and Prevention**. Disponível em: [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)  
Acessado em 02/03/2006

COX, N.A.; STERN, N.J.; MUSGROVE, M.T.; BAILEY, J.S.; CRAVEN, S.E.; CRAY, P.F.; BUHR, R.J.; HIETT, K.L. 2002. Prevalence and level of *Campylobacter* in commercial broiler breeders (parents) and broilers. **Poultry Science Association**. Vol 11 pg 197-190

DONNISON, A. 2003. **Isolation of Termotolerant *Campylobacter* – Review and methods for New Zealand laboratories**. Prepared for the Ministry of Health of New Zeland Disponível em: [www.moh.govt.nz/moh.nsf](http://www.moh.govt.nz/moh.nsf) Acessado em 10/10/2006

DUFRENNE, J.; RITMEESTER, W.; ASH, E.D.; LEUDSEN, F.; JONGE, R. 2001. Quantification of the contamination of chicken products in the Netherlands with *Salmonella* and *Campylobabter*. **Journal of Food Protection**. Vol. 64, nº 4, pg 538-541

DYKES, G.A.; MOORHEAD, S.M. 2001. Survival of *Campylobacter jejuni* on vacuum or carbon dioxide packaged primal beef cuts stored at -1,5 °C. **Food Control**. Vol. 12 pg 553-557

EVANS, S.J.; SAYERS, A.R. 2000. A longitudinal study of *Campylobacter* infection of broiler flocks in Great Britain. **Preventive Veterinary Medicine**. Vol. 46 pg 203-223

FELLOWS, P. 1994. **Tecnología del procesado de los alimentos, principios y practices**. Zaragoza, España . Editorial Acribia S.A. 549p.

FERNANDÉZ, H.; PISÓN, V. 1996. Isolation of thermotolerant species of *Campylobacter* from commercial chicken livers. International **Journal of Food Microbiology**. Vol. 29 pg 75-80

FERNANDEZ, H.; TORRES, N. 2000. *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* en tres grupos de gallinas de diferente origen geográfico del sur de Chile. **Arch. med. vet.** Vol.32, nº 2, pg 241-244

FISCHER, R.A. 1934. **Statistical methods for research workers**. Oliver and Boyd, Londres, England.

FORSYTHE, S. 2002. **Microbiologia da segurança alimentar**. Artmed Editora

FRANCHIN, P.R.; AIDOO, K.E.; BATISTA, C.R.V. 2005. Sources of poultry meat contamination with thermophilic *Campylobacter* before slaughter. **Brazilian Journal of Microbiology**. Vol. 36 pg 157-162

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. 1996. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo. Ed. Atheneu, 182p.

GEORGSSON, F.; PORKESSON, A.; GEIRSDÓTTIR, M.; REIERSEN, J.; STERN, N.J. 2006. The influence of freezing and duration of storage on *Campylobacter* and indicator bacteria in broiler carcasses. **Food Microbiology**. Vol. 23 pg 677-683

GONÇALVES, P.M.R.; FRANCO, R.M. 2002. Avaliação de meios de enriquecimento para a pesquisa de *Campylobacter jejuni* em produtos de origem animal. **Higiene Alimentar**. Vol. 16, n° 98, pg 79-84

HÖÖKS, H.; FATTAH, M.A.; ERICSSON, H.; VAGSHOLM, I.; DANIELSSON-THAM, M.L. 2005. Genotype dynamics of *Campylobacter jejuni* in a broiler flock. **Veterinary Microbiology**. Vol. 106 pg 109-117

HUGHES, R. 2004, *Campylobacter jejuni* in Guillain-Barré syndrome. **The Lancet Neurology**. Vol 3.

JORGENSEN, F.; BAILEY, R.; WILLIAMS, S.; HENDERSON, P.; WAREING, D.R.A.; BOLTON, F.J.; FROST, J.A.; WARD, L.; HUMPHREY, T.J. 2002. Prevalence and numbers of *Salmonella* and *Campylobacter* spp.. on raw, whole chickens in relation to sampling methods. **International Journal of Food Microbiology**. Vol. 76 pg 151-164

KEENER, M.K. 2004. *Campylobacter* in Poultry Processing – a Continuing Challenge. Department of Food Science, North Carolina State University, Raleigh, NC, USA

KOLMOGOROV, A. 1941. Confidence limits for an unknown distribution function. *Annals of Mathematical Statistics*, 12, 461-463.

LEE, A.; SMITH, S.C.; COLOE, P.J. 1998. Survival and growth of *Campylobacter jejuni* after artificial inoculation onto chicken skin as function of temperature and packing conditions. **Journal of Food Protection**. Vol. 61, n° 12, pg 1609-1614

LINE, J.E. 2001. Development of a selective differential agar for isolation and enumeration of *Campylobacter* spp. **Journal of Food Protection**. Vol.64, n°11, pg 1711-1715

LUECHTEFELD, N.W.; WANG, W-L. 1982. Hippurate hydrolysis by and triphenyltetrazolium tolerance of *Campylobacter fetus*. **Journal of Clinical Microbiology**. Jan, pg 137-140

MANN, H.B.; WHITNEY, D.R. 1947. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. **Annals of Mathematical Statistics**, 18, 50-60.

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

MEAD, G.C. 2004. Microbiological quality of poultry meat: a review. **Brazilian Journal of poultry Science**. Vol. 6, n.3 pg 135-142

MELDRUM, R.J.; TUCKER, D.; SMITH, R.M.M.; EDWARDS, C. 2005. Survey of *Salmonella* and *Campylobacter* of whole, raw poultry on retail sale in Wales in 2003. **Journal of Food Protection**. Vol. 68. N° 7. pg 1447-1449

MIWA, N.; TAKEGAHARA, Y.; TERAJ, K.; KATO, H.; TAKEUCHI, T. 2003. *Campylobacter jejuni* contamination on broiler carcasses of *C. jejuni*-negative flocks during processing in a Japanese slaughterhouse. **International Journal of Food Microbiology**. Vol. 84 pg 105-109

MODOLO, J.R.; FILHO, O.A.; PINTO, J.P.A.N.; PADOVANI, C.R.; SIMÕES, L.B.; CARVALHO, J.L.B. 2005. *Campylobacter* em carcaças resfriadas de frangos: análise espacial do fator de risco para a saúde pública. **Higiene Alimentar**. Vol 19, n°135, pg 40-46

MOORE, J.E. 2001. An optimized recovery method for thermophilic *Campylobacter* from liver. **BMC Microbiology**. Vol. 1 pg 32

MPG, 2005. Finding a Solution to *Campylobacter*. **Meat Global Processing**. Maio / Junho

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

NEWELL, D.G.; FEARNLEY, C. 2003. Sources of *Campylobacter* Colonization in Broiler Chickens. **Applied an environmental Microbiology**. Vol 69 N° 8 pg 4343-4351

NIEROP, W.V.; DUSÉ, A.G.; MARAIS, E.; AITHMA, N.; THOTHOBOLO, N.; KASSEL, M.; STEWART, R.; POTGIETER, A.; FERNANDES, B.; GALPIN, J.S.; BLOOMFIELD, S.F. 2005. Contamination of chicken carcasses in Gauteng, South Africa, by *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, and *Campylobacter*. **International Journal of Food Microbiology**. Vol. 99 pg 1-6

OLIVEIRA, T.R.M.; BARBUT, S.; GRIFFITHS, M.W. 2005. Detection of *Campylobacter jejuni* in naturally contaminated chicken skin by melting peak analysis of amplicons in real-time PCR. **International Journal of Food Microbiology**. Vol. 104, Issue 1 pg 105-111

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

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

PAULSEN, P.; KANZLER, P.; HILBERT F.; MAYRHOFER S.; BAUMGARTNER S.; SMULDERS F.J.M. 2005. Comparasion of three methods for detecting *Capylobacter* spp.. In chilled or frozen meat. **International Journal of Food Microbiology**. Vol. 103 pg 229-233

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

ROSENQUIST, H.; SOMMER, H.M.; NIELSEN, N.L.; CHRISTENSEN, B.C. 2006. The effect of slaughter operations on the contamination of chicken carcasses with thermotolerant *Campylobacter*. **International Journal of Food Microbiology**. Vol. 108 pg 226-232

SHAPIRO, S.; WILK, M.; CHEN, H. 1968. A comparative study of various tests for normality. **Journal of the American Statistical Association**. Vol. 63 pg 1343-1372.

SILVA, E.N. 2004. Efeito das doenças infecciosas na qualidade da carne de frangos. **Conferência Apinco 2004 de Ciência e Tecnologia Avícolas**. Anais. Vol. 2 pg 193-200

SILVA, N.; JUNQUEIRA V.C.A.; SILVEIRA N.F.A. 1997. **Manual de métodos de análise microbiológica em alimentos**. Livraria Varela. São Paulo, SP.

SIVADON, V.; ORLIKOWSKI, D.; ROZENBERG, F.; QUINCAMPOIX, J.C., CLAUDIE, C.; DURAND, M.C.; FAUCHÈRE, J.L.; SHARSHAR, T.; RAPHAËL, J.C.; GAILLARD, J.L. 2005. Prévalence et caractéristiques des Syndromes de Guillain-Barré associé à *Campylobacter jejuni* et au cytomégalovirus en région parisienne. **Pathologie Biologie**. Vol. 53, Issues 8-9, pg 536-538.

SMIRNOV, N. V. 1939. Sur les écarts de la courbe de distribution empirique (Russian/French summary). **Matematicheskii Sbornik** N.S. 6, 3–26.

SMIRNOV, N. V. 1948. 'Table for estimating the goodness of fit of empirical distributions'. **Annals of Mathematical Statistics**. Vol. 19 pg 279–281.

SMITH, D.P.; CASON, J.A.; BERRANG, M.E. 2005. Effect of fecal contamination and cross-contamination on numbers of coliform, *Escherichia coli*, *Campylobacter*, and *Salmonella* on immersion-chilled broiler carcasses. **Journal of Food Protection**. Vol. 68, n° 7, pg 1340-1345

SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. 2002. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Terceira edição. Guanabara Koogan. 752 p.

STERN, N.J.; GREEN, S.S.; THAKER, N.; KROUT, D.J.; CHIU, J. 1984. Recovery of *Campylobacter jejuni* from fresh and frozen meat and poultry collected at slaughter. **Journal of Food Protection**. Vol. 47, n° 5, pg 372-374

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

THOMÉ, J.D.S. 2006. Citotoxinas e hemolisinas produzidas por *Campylobacter jejuni* isolados de diferentes origens. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas. São Paulo, Brasil

TOSIN, I.,; MACHADO, R.A. 1995. Ocorrência de *Campylobacter* spp. entre manipuladores de alimentos em cozinhas hospitalares de localidade urbana da região Sul do Brasil. **Revista Saúde Pública**. Vol. 29 pg 742-477

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

UBA, **União Brasileira de Avicultura**. Relatório Anual 2005/2006. disponível em: [www.uba.org.br](http://www.uba.org.br) acessado em 18/12/2006

YUKI, N. 1997. Molecular mimicry between gangliosides and lipopolysacharides of *Campylobacter jejuni* isolated from patients with Guillain-Barré Syndrome and Miller Fisher Syndrome. **The Journal of Infectious Diseases**. Vol. 176 pg 150-153.

**ANEXO**

## **Anexo 01**

**Esquema método de análise de *Campylobacter* spp. (plaqueamento direto) e *C. jejuni* (enriquecimento seletivo)**

**Anexo 01** – Esquema método de análise de *Campylobacter* spp. (plaqueamento direto) e *C. jejuni* (enriquecimento seletivo)

