

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

***Campylobacter jejuni* EM FRANGOS DE CORTE,
CARNE E VÍSCERAS DE FRANGO NO RIO GRANDE
DO SUL E EFEITO DO CONGELAMENTO SOBRE A
CONTAMINAÇÃO NOS CORTES**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Róger Boufleur

**Santa Maria, RS, Brasil.
2009**

***Campylobacter jejuni* EM FRANGOS DE CORTE, CARNE E
VÍSCERAS DE FRANGO NO RIO GRANDE DO SUL E EFEITO
DO CONGELAMENTO SOBRE A CONTAMINAÇÃO NOS
CORTES**

por

Róger Boufleur

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária.**

Orientador: Prof^a. Maristela Lovato Flôres

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

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

***Campylobacter jejuni* EM FRANGOS DE CORTE, CARNE E VÍSCERAS
DE FRANGO NO RIO GRANDE DO SUL E EFEITO DO
CONGELAMENTO SOBRE A CONTAMINAÇÃO NOS CORTES**

elaborada por
Róger Boufleur

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

Maristela Lovato Flores, Dra.
(Presidente/Orientador)

Agueda Castagna de Vargas, Dr^a (UFSM)

Neila Silvia Pereira dos Santos Richards, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 09 de março de 2009.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer a Deus, por ter determinado rumos em minha vida que culminaram com a consolidação deste trabalho.

Aos meus pais, Hilário e Elaine, que sempre me apoiaram em todas as situações, e sempre, incondicionalmente, incentivaram meus estudos. É por vocês que busco sempre dar um passo a mais.

Aos meus irmãos, Raquel, Aline, Charles e Simone e cunhados: obrigado pelo exemplo de força, determinação e incentivo ou simplesmente pela amizade que possuímos entre nós e que sempre nos fortalece.

À orientadora, professora e amiga Maristela Lovato Flôres, pela dedicação e paciência empregada, e pelo conhecimento transmitido.

À equipe de estagiários e colegas do LCDPA, que tornou possível a execução deste projeto, além de muitas conversas e risadas.

Ao Fábio, Fernanda, Flávio, Rafael e Renata agradeço muito ao tempo dedicado na execução deste e de outros projetos, abrindo mão das suas férias, mas em especial, agradeço por termos nos tornado verdadeiros amigos. Espero que nossos caminhos voltem a se cruzar.

Aos professores que se dispuseram a transmitir seu conhecimento nas aulas do mestrado, em especial à professora Agueda Castagna de Vargas pelo auxílio prestado durante a execução deste trabalho.

Aos colegas de curso pelo companheirismo e amizade criada nestes dois anos.

À Raquel, o grande amor da minha vida, pela paciência de suportar a distância quando nosso maior desejo era que estivéssemos juntos. Logo iremos colher nossos frutos. Te amo

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária pela oportunidade concedida.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária Preventiva
Universidade Federal de Santa Maria

***Campylobacter jejuni* EM FRANGOS DE CORTE, CARNE E VÍSCERAS DE FRANGO NO RIO GRANDE DO SUL E EFEITO DO CONGELAMENTO SOBRE A CONTAMINAÇÃO NOS CORTES**

AUTOR: Róger Boufleur
ORIENTADORA: Maristela Lovato Flôres
Santa Maria, 09 de março de 2009.

A campilobacteriose, atualmente, é reconhecida como sendo a causa mais freqüente de infecção de origem alimentar em seres humanos. Dentre as espécies responsáveis pela infecção, *Campylobacter jejuni* responde por cerca de 75% dos casos de campilobacteriose humana, sendo considerada a principal espécie envolvida nos casos registrados. Este trabalho é composto de dois experimentos. No primeiro avaliou-se a ocorrência de *C. jejuni* em granjas avícolas no estado do Rio Grande do Sul, correlacionando os índices de contaminação detectados com dados epidemiológicos obtidos através de entrevista com o responsável pela granja. Foram coletados 280 swabs cloacais oriundos de quatro granjas avícolas do Rio Grande do Sul. No segundo experimento, foram adquiridos em supermercados de Santa Maria, 9 amostras frescas de fígado, coração, moela e drumete, totalizando 36 amostras. Foi realizado o processamento de um fragmento de 25g de cada amostra fresca, sendo o restante congelado à -18°C durante sete dias, sendo as amostras, após este período novamente analisadas. No primeiro experimento, foram obtidas 147 amostras (52,5%) positivas para *C. jejuni* e 31 amostras (11,07%) identificadas como *Campylobacter* spp. A análise dos dados revelou existir influência dos índices de contaminação mais elevados com o número de aves alojadas ($p=0,05$), tempo de alojamento ($p=0,05$) e sexo ($p=0,05$), sendo as fêmeas mais acometidas que os machos. No segundo experimento, realizou-se o isolamento em 7 (77,7%) amostras frescas de coração, 8 (88,8%) de fígado, 4 (44,4%) de moela e 3 (33,3%) de drumete, correspondendo a 61,1% das amostras frescas analisadas. Após o congelamento, em apenas três amostras (8,3%) foi obtido o isolamento de *C. jejuni*, sendo duas amostras de fígado e uma de coração. Os dados obtidos permitem concluir que *C. jejuni* está amplamente difundido na avicultura industrial do Rio Grande do Sul, sendo necessário ampliar os esforços para redução deste patógeno nos plantéis avícolas. Os cortes de frango adquiridos em supermercados na cidade de Santa Maria apresentam índices de contaminação elevados por *C. jejuni*, contudo o congelamento por 7 dias é capaz de reduzir consideravelmente os índices de contaminação, porém, não eliminando completamente *C. jejuni* dos cortes congelados, assim, a manipulação adequada da carne de frango continua sendo essencial para assegurar a eliminação de *C. jejuni* dos alimentos contendo carne de frango em suas preparações.

Palavras-chave: *Campylobacter jejuni*; carne de frango; microbiologia alimentar;

ABSTRACT

Master's Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária Preventiva
Universidade Federal de Santa Maria

***Campylobacter jejuni* IN POULTRY, CHICKEN MEAT AND GIBLETS ON RIO GRANDE DO SUL STATE AND THE FREEZING EFFECT ON CUT'S CONTAMINATION**

AUTHOR: Róger Bouffleur
Advisor: Maristela Lovato Flôres
Santa Maria, march 09th, 2009

Campylobacteriosis, in the current days, is recognized as the major cause of foodborne illness in many developed and developing countries. Among the *Campylobacter* species responsible for the infections, *C. jejuni* is responsible for 75% of the cases of human campylobacteriosis, as for it, it's considered as the major species involved on the registered cases. In this work, two experiments were conducted. In the first, the presence of *C. jejuni* and *Campylobacter* spp. in poultry farms of Rio Grande do Sul State in Brazil was investigated. Epidemiological data was obtained with the person encharged by the farms, and the data obtained was corelated with the levels of contamination of each property. In the second experiment, we investigated the contamination of cicken meat and giblets adquired in supermarkets in Santa Maria city of *C. jejuni* as well as the freezing effect on the contamination levels in this samples. For the first trial, 280 cloacal swabs were collected from four poultry farms. In the second experiment, 9 samples of heart, liver, gizzard and drumette, totalizing 36 samples collected. A portion of each sample was processed freshly, while the rest was frozen (-18°C) for 7 days before it's processing. In the first trial, 147 samples (52,5%) were positive for *C. jejuni* and another 31 (11,07%) were identified as *Campylobacter* spp. The data analysis revealed correlacion between the number of birds kept in de farms ($p=0,05$), the age of the poultry ($p=0,05$) and the gender ($p=0,03$), as female was more infected than males. In the second experiment, isolation of *C. jejuni* was achieved in 7 heart (77,7%), 8 liver (88,8%), 4 gizzard (44,4%) and 3 drumette (33,3%) fresh samples, corresponding to 61,1% of total samples. After freezing storage, in only 3 samples (two liver and one heart) *C. jejuni* was isolated (8,3%). The data obtained allowed us to conclude that *C. jejuni* is widely spread in poultry farms os Rio Grande do Sul state, so, improve the control procedures for Compylobacter species on the poultry fars is needed. The chicken cuts obtained from supermarkets in Santa Maria city are also higly contaminated by *C. jejuni*, however, freezing storage for seven days can drastically reduce the contamination levels of chicken cuts, improoving food safety, althoght, this procedure do not eliminate completely *C. jejuni* from de cuts analized, and the correct manipullation is needed to eliminate the risk of infeccion from poultry meat sources .

Key words: *Campylobacter jejuni*; chicken meat; food microbiology

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Ocorrência de <i>Campylobacter jejuni</i> e <i>Campylobacter</i> spp em amostras de swabs cloacais provenientes de quatro propriedades do Rio Grande do Sul e aspectos epidemiológicos destas propriedades.....	36
TABELA 2 - Contaminação por <i>Campylobacter jejuni</i> em carne e miúdos de frango frescos e congelados à -18°C por 7 dias.....	37

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1 - Meio de cultura utilizado para o isolamento de <i>C. jejuni</i>	45
---------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE 1 - Diagrama do fluxo de procedimentos para isolamento e identificação de <i>Campylobacter jejuni</i> de amostras de swabs cloacais.....	47
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA	13
2.1 Histórico	13
2.2 Características gerais	14
2.3 A infecção nas aves	16
2.4 A infecção em humanos	17
3. CAPÍTULO 1	21
<i>Campylobacter jejuni</i> em frangos de corte, carne e vísceras de frango no Rio Grande do Sul e efeito do congelamento sobre a contaminação nos cortes.....	21
Resumo.....	22
Abstract.....	23
Introdução.....	24
Material e métodos.....	26
Resultados e discussão.....	29
Conclusão.....	32
Referências.....	32
4. CONCLUSÃO	38
5. REFERÊNCIAS	39
6. ANEXOS	44
7. APÊNDICES	46

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o gênero *Campylobacter* ultrapassou o gênero *Salmonella* como sendo o agente causador de zoonoses mais frequentemente reportado na União Européia, sendo sua ocorrência comum no mundo todo. *Campylobacter* também foi o segundo agente causador de surtos de infecção de origem alimentar em 2006 na União Européia, mesmo que a maioria dos casos relatados de campilobacteriose sejam considerados como casos esporádicos (BRONZWAER *et al.*, 2009).

Nos Estados Unidos, a partir da implementação de um amplo sistema de vigilância que envolve o diagnóstico dos casos de infecção de origem alimentar em dez estados, implementado desde 1996, se observou uma significativa redução nos casos de campilobacteriose nos últimos 8 anos. Isso representa um decréscimo de 40% nesses casos, porém, estima-se que ainda ocorram cerca de 2,5 milhões de casos anuais de campilobacteriose naquele país (FOODNET, 2008).

A campilobacteriose normalmente é uma doença com manifestações gastrintestinais, que, em cerca de sete dias, tende a manifestar uma melhora espontânea do quadro clínico do paciente (COCKER *et al.*, 2002). Todavia, em alguns casos, podem ocorrer graves seqüelas da infecção, como a Síndrome de Guillain-Barré, doença que afeta o sistema nervoso periférico, causando desmielinização de neurônios. Ainda a síndrome de Fisher, uma variante da Síndrome de Guillain-Barré; e a Síndrome de Reiter, responsável pela ocorrência de artrite reativa. Tais doenças aparentemente ocorrem devido a uma semelhança nos antígenos presentes em algumas cepas de *C. jejuni* com proteínas encontradas nos gangliosídeos neuronais de seres humanos (DORREL; WREN, 2007).

Por mais que existam diversas fontes de campilobacteres, a campilobacteriose está geralmente associada com o consumo de carne de frango, especialmente se esta não for congelada (NAUTA *et al.*, 2009). Em cerca de 70% dos casos, a infecção tem origem a partir da exposição à carne de frango crua ou mal cozida. Isto se deve ao fato de que os frangos são os principais reservatórios de *C. jejuni*. Perus, patos e outras aves também têm importante papel na manutenção do agente na natureza (SHANE;

STERN, 2003). As aves, geralmente, não apresentam manifestações ou lesões clínicas em decorrência da infecção, demonstrando alta adaptação ao hospedeiro (MEAD, 2002).

A transmissão de *C. jejuni* entre as aves ocorre principalmente por via horizontal, e, aparentemente, os frangos com menos de duas semanas de idade são mais resistentes à infecção (DHILLON, *et al.*, 2006). Contudo, existem indícios de que a transmissão vertical também possa ocorrer (COLE *et al.* 2004; COX *et al.*, 2006; FONSECA *et al.* 2007).

No Brasil, os dados obtidos sobre a prevalência de *Campylobacter* em frangos são variáveis. Kuana (2008), ao analisar 22 lotes de frangos de corte com idade entre 3 e 5 semanas, observou 81,8% das amostras de descarga cecais positivas para o isolamento de *Campylobacter* spp.. Ao analisar 96 carcaças no frigorífico, a contaminação observada foi de 99%. Gomes *et al* (2006) isolaram *C. jejuni* de apenas 5,2% das 404 amostras fecais de frangos provenientes de criações domésticas. Fonseca *et al* (2007) isolou *Campylobacter* spp. de 80% de amostras de pool de mecônio e 54,55% das amostras de pool de fezes de matrizes.

O controle da infecção depende do conhecimento da interação do agente com o meio ambiente, desde a granja até o consumidor final. Assim, estudos que esclareçam aspectos epidemiológicos associados a este agente se fazem necessários. Portanto, esse trabalho visa avaliar a ocorrência de *C. jejuni* em frangos de corte, bem como coletar dados epidemiológicos como idade das aves, tamanho do lote e sexo das aves a fim de auxiliar na tomada de decisões para o controle desta patógeno. Ainda, objetivou detectar a ocorrência do agente em carne e miúdos frescos comercializados na cidade de Santa Maria, e o efeito do congelamento por um período de 7 dias (-18°C) na taxa de contaminação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico

Os primeiros registros de uma possível infecção por *Campylobacter* ocorreram na Alemanha, em 1886, por Escherich, quando foram observados, em 35 de 72 crianças com diarreia, bactérias em forma de espiral. Porém, apenas em 1909 é que ocorreu a primeira identificação reconhecida, feita por McFadyen e Stockman, que observaram o microorganismo semelhante a um *Vibrio* em episódios de aborto em ovelhas. Em 1918, microorganismos similares foram identificados por Smith ao examinar fetos bovinos abortados e, em razão de sua morfologia similar, foram classificados como pertencentes ao gênero *Vibrio*, recebendo como primeira denominação, *Vibrio fetus*.

Em humanos a infecção não foi reconhecida até 1947, quando foi isolado do sangue de mulheres grávidas que apresentaram febre e abortos por *Vibrio fetus*. (BUTZLER, 2004) Em 1957, King reconheceu importantes diferenças bioquímicas e antigênicas entre *V. fetus* e o que denominou como “vibrios relacionados”, sendo reclassificados em 1963 por Sebald e Véron como pertencentes a um novo gênero denominado então como *Campylobacter*.

Entretanto, os avanços necessários para que a infecção viesse a ser reconhecida como uma doença de importância médica, em humanos, ocorreram a partir da década de 70, com o desenvolvimento de técnicas que permitiram o isolamento de *Campylobacter*. Em 1972, Dekeyzer *et al.* desenvolveram um método de filtração de amostras de fezes, seguido por inoculação em meios de cultura, que permitiu o isolamento de *Campylobacter* em laboratório pela primeira vez. Em 1977, Skirrow, utilizando meios de cultura contendo vancomicina, trimetoprim mais polimixina e incubando as amostras em microaerofilia conseguiu também cultivar o agente em laboratório. Desde então, várias modificações metodológicas foram feitas, resultando

em uma adoção universal desses dois métodos e de suas variações, que permitem um diagnóstico preciso das infecções (MOORE *et al*, 2005).

2.2 Características gerais

C. jejuni pertence à classe *épsilon* das proteobactérias, na ordem *Campylobacteriales*; esta ordem inclui dois outros gêneros, *Helicobacter* e *Wolinella*. Assim como *C. jejuni*, os membros desse gênero são capazes de estabelecer relações a longo prazo com seus hospedeiros, às vezes, com conseqüências patogênicas. O gênero *Helicobacter* inclui a espécie *Helicobacter pylori*, que causa úlceras gástricas e pode claramente ser definida como uma espécie patogênica, mas pode, também, infectar assintomaticamente humanos, por décadas. O gênero *Wolinella* possui uma única espécie, *Wolinella succinogenes*, que coloniza o trato digestivo do gado e estabelece com ele uma relação comensal, semelhante ao gênero *Campylobacter*. Assim, estes organismos aparentemente estão adaptados aos seus hospedeiros e podem estabelecer e manter seus nichos sem gerar uma resposta do hospedeiro capaz de impedir a colonização (YOUNG *et al.*, 2007).

A família *Campylobacteriaceae* compreende 18 espécies, seis subespécies e dois biovars. As características morfológicas celulares da família incluem pequenos bacilos Gram negativos curvos ou espiralados, em forma de “S” ou asa de gaivota. São essencialmente microaerófilos, obtém crescimento máximo em atmosfera contendo aproximadamente 10% de CO₂, 5% de O₂ e 85% de N₂ (HUMPHREY, 2007). As células medem aproximadamente 0,2-0,5µm de diâmetro e 0,5-5µm de comprimento, porém podem chegar até 8µm e ter uma ou mais voltas helicoidais. As culturas velhas, de formas espirais ou curvas, podem ser substituídas por formas cocóides, quando observadas ao microscópio (SHANE; HARRINGTON, 1998). Esses microorganismos não são fermentativos nem oxidativos em seu metabolismo, obtendo energia de aminoácidos e intermediários do ciclo de Krebs com 4 ou 5 carbonos (KONEMAN *et al.*, 1992).

As colônias de *Campylobacter* spp. usualmente são planas, com coloração acinzentada ou translúcidas e formato irregular, arredondadas ou convexas. Possuem tanto aspecto de secas como de úmidas. Podem apresentar brilho d'água ao refletir a luz ambiental. Existe uma tendência das colônias apresentarem crescimento confluyente ao longo da linha de semeadura nos meio sólidos. Reações hemolíticas não são observadas em ágar sangue (KONEMAN *et al.*, 1992).

As espécies termofílicas de campilobacter são aquelas capazes de apresentar crescimento a temperaturas elevadas de até 46°C (HUMPHREY *et al.* 2007). Os termotolerantes *C. jejuni*; *C.coli*; *C. lari* e *C. upsaliensis* são mais associados à doença gastrointestinal humana, especialmente *C. coli* e *C. jejuni* subsp. *jejuni*, os quais representam 95% dos isolados clínicos no Reino Unido (SNELLING *et al.*, 2005). Segundo Moore *et al* (2005), *Campylobacter jejuni* é responsável por 80-85% das infecções entéricas por campilobacter, seguido por *C.coli*, a que são atribuídos 10-15% dos casos diagnosticados.

Campilobacteres são extremamente suscetíveis ao estresse ambiental, sendo sensíveis à exposição ao ar, ressecamento, pH ácido e armazenamento prolongado. O uso de agentes quelantes de oxigênio, uma atmosfera adequada e utilização de antibióticos para suprimir a flora competitiva ampliam as chances de isolamento de *Campylobacter* spp. (SHANE; STERN, 2003).

Tendo em vista a característica fastidiosa da bactéria, a utilização de meios de transporte e de enriquecimento para o cultivo de *Campylobacter* se mostra necessário quando as amostras não forem processadas em um prazo de 24h, ou para amostras que contenham um pequeno número de bactérias viáveis, tais como amostras de água e urina. O meio de transporte utilizado deverá inibir o crescimento de outras bactérias, como *Escherichia coli*, sendo o mais comumente utilizado o de Cary-Blair (OIE, 2008). No caso de amostras de fezes, estas deverão ser enviadas ao laboratório para ser processadas o mais brevemente possível, minimizando a exposição dos microorganismos ao oxigênio (GOMES, et. al, 2006).

2.3 Infecção nas aves

Campilobacteres encontram-se distribuídos mundialmente, em especial nas regiões onde a criação comercial de frangos está estabelecida. Frangos e perus normalmente iniciam a eliminação fecal de *C. jejuni* com 2-3 semanas de idade. Cerca de 2-4 dias após o início da eliminação bacteriana 90-100% do lote torna-se infectado, devido à alta capacidade de transmissão horizontal do agente entre as aves (SHANE; STERN, 2003). As aves geralmente são portadoras assintomáticas da infecção, sem ocorrer qualquer manifestação capaz de indicar doença (MEAD, 2002). Entretanto, em infecções experimentais, algumas cepas de *C. jejuni*, a maioria das quais obtidas em casos humanos de campilobacteriose, causaram diarreia e mortalidade em pintinhos. Os sinais gastrintestinais observados freqüentemente são acompanhados de sinais de invasão sistêmica (CORRY; ATABAY, 2001).

A disseminação da doença entre o lote, em geral, pode ocorrer por via horizontal, principalmente pela rota fecal-oral, embora existam indícios de transmissão vertical. Cole *et al.* (2004) isolaram *Campylobacter* spp. de 57 entre 59 amostras de sêmen de perus, bem como de diferentes órgãos do trato reprodutivo de galinhas. Da mesma forma, indícios de transmissão vertical foram obtidas por Fonseca *et al.* (2007), ao isolar de mecônio de pintinhos recém-nascidos e de cloaca de matrizes com *Campylobacter* spp. O isolamento de *Campylobacter* spp. em folículos maduros e imaturos foi obtido por Cox *et al.* (2005). A partir destas observações, surgem precedentes para a intensificação do controle de *Campylobacter* spp. nas granjas de reprodutoras, principalmente devido ao potencial de disseminação e multiplicação envolvido nas propriedades.

Relatam Evans e Sayers (2000) que a infecção por *Campylobacter* spp. em aves depende da idade da ave e que sua freqüência aumenta com a idade. Quando a difusão começa, os organismos tendem a se alastrar rapidamente através do lote e a incidência é maior no final da criação do frango, persistindo a colonização até o abate (GREGORY *et al.*, 1997). Porém, nem todas as cepas de *C. jejuni* são capazes de colonizar o trato gastrointestinal das aves e, mesmo algumas cepas isoladas de

carcaças de frango não o foram capazes. Porém, nos casos em que ocorre a colonização, os locais principais são ceco, cólon e cloaca das aves, com nível de contaminação de até 10^9 UFC/g de fezes (MEAD, 2002).

Durante o processamento das carcaças, os organismos podem ser disseminados, tanto pela alta carga de bactérias presentes no trato intestinal, como pela carga bacteriana contida nas penas e pele das aves, como resultado de uma maior eliminação em função do stress causado pelo transporte (OLAH *et al.*, 2006). Durante o processamento das carcaças, nos frigoríficos, pode ocorrer contaminação cruzada por *C. jejuni* através dos funcionários, água e equipamentos do frigorífico (MEAD, 2004).

2.4 Infecção em humanos

Mesmo que o campilobacter seja reconhecido como a causa mais comum de enterite bacteriana na Europa, a real incidência da campilobacteriose é consideravelmente maior do que a relatada, já que a sub-notificação varia muito entre os países. Sistemas de monitoramento de saúde pública precisam ser aprimorados, com estudos focados nas ocorrências reais da doença. A colaboração entre médicos, pesquisadores e veterinários é fundamental para ampliar a coleta de dados e prover informações básicas para as intervenções, visando o controle efetivo da campilobacteriose (BRONZWAER *et al.*, 2009).

Os sintomas clássicos da infecção em humanos incluem diarreia, a qual freqüentemente pode ser hemorrágica, dor abdominal, febre, mialgia e, raramente, vômitos (HUMPHREY *et al.* 2007). Em comparação com as infecções causadas por *Salmonella* e *Shigella*, as infecções por *Campylobacter* normalmente são menos agudas, porém com maior tendência a recorrência, se nenhum tratamento for administrado, entretanto, as infecções são indistinguíveis clinicamente sem a realização de coprocultura e identificação do agente (MOORE *et al.*, 2005).

De acordo com Shane e Harrington (1998), projeções indicam que a campilobacteriose, nos Estados Unidos, é responsável por custos anuais capazes de

atingir 1 bilhão de dólares, oriundos de hospitalizações e despesas médicas, óbitos, redução na produtividade e despesas secundárias relacionadas à infecção.

Segundo Shane e Stern (2003), 50-70% dos casos de campilobacteriose humana têm origem alimentar e estão relacionados com o consumo ou manipulação de carne de frango crua contaminada. Outros fatores de risco relacionados com a campilobacteriose incluem a ingestão de água não tratada, consumo de leite cru ou não pasteurizado, contato prévio com animais de produção ou de estimação (WINGSTRAND *et al.*, 2006). *Campylobacter* spp. também possui uma dose infectante relativamente baixa, necessitando apenas de cerca de 500 células viáveis para causar a infecção. Por isso, se torna essencial que o risco de transferir *Campylobacter* spp. para humanos, através da carne de frango e seus produtos, seja minimizada (GÓMEZ *et al.*, 2009).

Humphrey *et al.* (2007) afirma existir uma ocorrência maior de casos de campilobacteriose em humanos especialmente nos meses de verão, podendo ser explicado por algumas hipóteses: temperatura ambiental elevada propícia à disseminação do microorganismo; aumento na contaminação dos plantéis avícolas e de outros animais de produção; época de migração de aves silvestres; maior presença de vetores biológicos, como moscas; e aquisição de novos animais de estimação que são adquiridos com maior frequência nesses meses.

Conforme Smith (2002) o período de incubação em humanos pode variar de um a cinco ou até sete dias, embora seja mais comum entre 24 a 48 horas. As reações inflamatórias da infecção precedem às disfunções intestinais que causam diarreia. Os sintomas que antecedem a doença em humanos são febre, dor de cabeça, tontura, mialgia e outros não específicos, semelhantes à gripe, que aparecem entre 12 a 24h antes do início da diarreia e representam 1/3 dos afetados. Ainda, Smith (2002) descreveu a ocorrência de febre (39,2°C) em metade dos pacientes. Relatou também que a náusea é comum, mas o vômito não é uma manifestação típica. A diarreia apresenta-se como o sintoma mais freqüente, existindo uma faixa de sinais clínicos que podem variar desde uma colonização intestinal assintomática, ou com poucos movimentos intestinais, a uma profusa e severa disenteria. A presença de sangue nas fezes ocorre em aproximadamente 14% dos afetados.

Em humanos, os exames microscópicos de biópsias revelam uma resposta inflamatória aguda no intestino, com infiltração de neutrófilos e células mononucleares no epitélio e na lâmina própria. Nas amostras de fezes, estão quase sempre presentes leucócitos e eritrócitos, mesmo quando a diarreia tem aspecto aquoso e não hemorrágico, o que confere ao *Campylobacter* a consideração de ser uma doença inflamatória, causando colite ou enterite. Contudo, a infecção é autolimitante, sugerindo que os microrganismos não são bem adaptados, impedindo uma resposta imune. Estudos recentes *in vitro* demonstraram a capacidade dos macrófagos em eliminar as amostras testadas com grande eficiência, conferindo a natureza autolimitante da infecção (WASSENAAR; BLASER, 1999).

De acordo com Biswas *et al* (2006) os mecanismos relacionados com a produção de doença em humanos são a motilidade do agente, translocação das células do hospedeiro, aderência, invasão celular e produção de citotoxinas. Após a ingestão, *C. jejuni* adere-se às células do intestino delgado, especialmente nos segmentos distais. O microorganismo multiplica-se e invade as células-alvo.

Os mecanismos precisos de ação das toxinas produzidas por *C. jejuni* permanecem obscuros. Sabe-se, entretanto, que toxinas termolábeis desregulam o sistema da adenilciclase do mesmo modo que *Escherichia coli*. Ao mesmo tempo, a citotoxina destrói a mucosa do epitélio. Normalmente, as células que ultrapassam a barreira endotelial e atingem a circulação são destruídas pelos mecanismos bactericidas do sangue (HIRSH, 1999).

Estudos *in vitro*, envolvendo a capacidade de adesão e citotoxicidade demonstraram que isolados provenientes de amostras de água são menos patogênicos que aqueles isolados de pacientes com doença clínica. Os isolados patogênicos podem desenvolver a habilidade de colonizar e produzir toxina após a passagem por um hospedeiro susceptível (NEWELL *et al*, 1985).

No final dos anos 80, epidemiologistas observaram relação entre a infecção por *Campylobacter jejuni* e desordens pós-recuperação de origem auto imune. Estas incluem a síndrome de Guillain-Barré (GBS, *Guillain-Barré Syndrome*); a síndrome de Fischer, uma variante da GBS; e a síndrome de Reiter, caracterizada pela ocorrência de artrite reativa não purulenta (SHANE; STERN, 2003).

A GBS é uma desordem desmielinizante que resulta em paralisia neuro-muscular aguda, sendo atualmente reconhecida como uma grave seqüela da campilobacteriose. O isolamento prévio de *C. jejuni* em episódio de diarreia, antes da ocorrência da GBS, foi observada em até 50% dos casos (MOORE, 2005). O mecanismo patogênico da síndrome recai sobre a similaridade entre oligossacarídeos dos lipopolissacarídeos de *C. jejuni* e o gangliosídeo GM1 da membrana dos neurônios periféricos, estimulando desta forma, a ocorrência de uma doença auto-imune (MOORE, 2005). Estima-se que ocorra 1 caso de GBS para cada 1.000 casos de campilobacteriose (ALTEKRUSE, 1999). Aproximadamente 20% dos casos de GBS ficam com alguma seqüela motora e 5% acabam morrendo geralmente devido a complicações de ordem respiratória. Os demais pacientes apresentam recuperação total ou parcial da doença (ALTEKRUSE, 1999). O impacto econômico da GBS nos EUA foi estimado entre US\$ 0,2 – US\$ 1,8 bilhões anuais, oriundos dos 500-3500 novos casos anuais iniciados pela infecção por *C. jejuni* (BUZBI *et al*, 1997).

3. CAPÍTULO 1

***Campylobacter jejuni* em frangos de corte, carne e vísceras de frango no Rio Grande do Sul e efeito do congelamento sobre a contaminação nos cortes**

***Campylobacter jejuni* in poultry, chicken meat and organs in Rio Grande do Sul state (Brazil) and the freezing effect on cuts contamination**

**Róger Bouffleur¹; Maristela Lovato Flores^{II}; Fábio Luis Gazoni^{II}; Fernanda Flores^{II};
Flávio Silveira^{II}; Rafael Bampi^{II}; Thiago Moreira Tejkowski^{II}**

(Artigo a ser submetido à Revista Ciência Rural)

¹ Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária-Universidade Federal de Santa Maria(UFSM), Santa Maria, RS, Brasil. João da Fontoura e Souza, 195 aptº.201 Bloco A. CEP: 97105-210. Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: roger-b@bol.com.br. Autor p/ correspondência.

^{II} Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Laboratório Central de Diagnóstico de Patologias Aviárias, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

RESUMO

A campilobacteriose, atualmente, é reconhecida como sendo a causa mais freqüente de infecção de origem alimentar em seres humanos. Dentre as espécies responsáveis pela infecção, *Campylobacter jejuni* responde por cerca de 75% dos casos de campilobacteriose humana, sendo considerada a principal espécie envolvida nos casos registrados. Este trabalho é composto de dois experimentos. No primeiro avaliou-se a ocorrência de *C. jejuni* em granjas avícolas no estado do Rio Grande do Sul, correlacionando os índices de contaminação detectados com dados epidemiológicos obtidos através de entrevista com o responsável pela granja. Foram coletados 280 swabs cloacais oriundos de quatro granjas avícolas do Rio Grande do Sul. No segundo experimento, foram adquiridos em supermercados de Santa Maria, 9 amostras frescas de fígado, coração, moela e drumete, totalizando 36 amostras. Foi realizado o processamento de um fragmento de 25g de cada amostra fresca sendo o restante congelado à -18°C durante sete dias, sendo as amostras, após este período novamente analisadas. No primeiro experimento, foram isoladas 147 amostras (52,5%) positivas para *C. jejuni* e 31 amostras (11,07%) identificadas como *Campylobacter* spp. A análise dos dados revelou existir influência dos índices de contaminação mais elevados com o número de aves alojadas ($p=0,05$), tempo de alojamento ($p=0,05$) e sexo ($p=0,5$), sendo as fêmeas mais acometidas que os machos. No segundo experimento, realizou-se o isolamento em 7 (77,7%) amostras frescas de coração, 8 (88,8%) de fígado, 4 (44,4%) de moela e 3 (33,3%) de drumete, correspondendo a 61,1% das amostras frescas analisadas. Após o congelamento, em apenas três amostras (8,3%) foi obtido o isolamento de *C. jejuni*, sendo duas amostras de fígado e uma de coração. Os dados obtidos permitem concluir que *C. jejuni* está amplamente difundido na avicultura industrial do Rio Grande do Sul, sendo necessário ampliar os esforços para redução deste patógeno nos plantéis avícolas. Os cortes de frango adquiridos em supermercados na cidade de Santa Maria apresentam índices de contaminação elevados por *C. jejuni*, contudo o congelamento por 7 dias é capaz de reduzir significativamente os índices de contaminação, porém, não eliminando completamente

C. jejuni dos cortes congelados, assim, a manipulação adequada da carne de frango continua sendo essencial para assegurar a eliminação de *C. jejuni* dos alimentos contendo carne de frango em suas preparações.

Palavras-chave: *Campylobacter jejuni*; carne de frango; microbiologia alimentar;

ABSTRACT

Campylobacteriosis, in the current days, is recognized as the major cause of foodborne illness in many developed and developing countries. Among the *Campylobacter* species responsible for the infections, *C. jejuni* is responsible for 75% of the cases of human campylobacteriosis, as for it, it's considered as the major species involved on the registered cases. In this work, two experiments were conducted. In the first, the presence of *C. jejuni* and *Campylobacter* spp. in poultry farms of Rio Grande do Sul State in Brazil was investigated. Epidemiological data was obtained with the person encharged by the farms, and the data obtained was corelated with the levels of contamination of each property. In the second experiment, we investigated the contamination of cicken meat and giblets adquired in supermarkets in Santa Maria city of *C. jejuni* as well as the freezing effect on the contamination levels in this samples. For the first trial, 280 cloacal swabs were collected from four poultry farms. In the second experiment, 9 samples of heart, liver, gizzard and drumette, tottaling 36 samples collected. A portion of each sample was processed freshly, while the rest was freezed (-18°C) for 7 days before it's processing. In the first trial, 147 samples (52,5%) were positive for *C. jejuni* and another 31 (11,07%) were identified as *Campylobacter* spp. The data analysis revealed correlation beetwen the number of birds kept in de farms ($p=0,05$), the age of the poultry ($p=0,05$) and the gender ($p=0,03$), as female was more infected than males. In the second experiment, isolation of *C. jejuni* was achieved in 7 heart (77,7%), 8 liver (88,8%), 4 gizzard (44,4%) and 3 drumette (33,3%) fresh samples, corresponding to

61,1% of total samples. After freezing storage, in only 3 samples (two liver and one heart) *C. jejuni* was isolated (8,3%). The data obtained allowed us to conclude that *C. jejuni* is widely spread in poultry farms os Rio Grande do Sul state, so, improve the control procedures for Compylobacter species on the poultry fars is needed. The chicken cuts obtained from supermarkets in Santa Maria city are also higly contaminated by *C. jejuni*, however, freezing storage for seven days can drastically reduce the contamination levels of chicken cuts, improving food safety, althoght, this procedure do not eliminate completely *C. jejuni* from de cuts analized, and the correct manipullation is needed to eliminate the risk of infeccion from poultry meat sources .

Key words: *Campylobacter* jejuni; chicken meat; food microbiology

INTRODUÇÃO

Somente a partir da década de 70, época em que foram desenvolvidas as técnicas básicas que tornaram possíveis o isolamento rotineiro de *Campylobacter* spp., é que a campilobacteriose passou a ser reconhecida como uma doença humana de importância médica (BUTZLER, 2004; HUMPHREY *et al.*, 2007). Atualmente, a campilobacteriose é considerada uma das causas mais freqüentes de infecção de origem alimentar, e estima-se que ocorram cerca de 2,5 milhões de casos anuais nos Estados Unidos (FOODNET, 2008).

De acordo com Shane & Harrington (1998), projeções indicam que a campilobacteriose, nos EUA, é responsável por custos anuais oriundos de hospitalizações e despesas médicas, óbitos, redução na produtividade e despesas secundárias relacionadas à infecção capazes de atingir 1 bilhão de dólares.

Campilobacteres são bastonetes curvos, em forma de espiral, “s” ou asa de gaivota. Existem 16 espécies e 6 subespécies descritas no gênero *Campylobacter*, das quais, as mais freqüentemente relatadas nos casos humanos são *C. jejuni* e *C. coli*. As espécies *C. lari* e *C. upsaliensis* também são reconhecidas como patógenos primários, porém são relatadas com uma freqüência bem menor nos casos de doença humana. (WHO, 2000).

A infecção pode ser adquirida através do consumo de leite não pasteurizado, água não tratada contaminada, ingestão de carnes cruas ou mal cozidas, e contato com animais portadores (MOORE *et al.*, 2005). De acordo com Shane e Stern (2003), 50-70% dos casos de campilobacteriose humana têm origem alimentar e estão relacionados com o consumo ou manipulação de carne de frango crua contaminada.

Ao contrário de outras bactérias, *Campylobacter* spp. é aparentemente incapaz de se multiplicar fora de seus hospedeiros. Os principais desafios que os campilobacteres encontram se localizam no ambiente, entre seu hospedeiro animal e humano. A exposição ao oxigênio, as oscilações de temperatura, a dessecação e outros fatores são extremamente deletérios ao desenvolvimento e sobrevivência do organismo (MURPHY *et al.*, 2006)

As aves são consideradas o reservatório natural de *C. jejuni* e infectam-se horizontalmente através da rota fecal-oral, pela ingestão de água e alimentos contaminados ou de matéria fecal de outras aves colonizadas, sendo que, normalmente a doença se dissemina pelo lote a partir de 15-20 dias de idade, podendo, em poucos dias, afetar 100% das aves alojadas (SHANE & HARRINGTON, 1998).

O objetivo deste trabalho é avaliar a ocorrência de *C. jejuni* em frangos de corte, bem como coletar dados epidemiológicos capazes de auxiliar na tomada de decisões.

Ainda, objetivou detectar a ocorrência do agente em carne e miúdos frescos comercializados na cidade de Santa Maria, e o efeito do congelamento por um período de 7 dias (-18°C) na viabilidade do agente.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi composto por dois experimentos. No primeiro, foi realizado um levantamento da ocorrência de *Campylobacter jejuni* em frangos de corte pertencentes à cadeia avícola industrial do estado do Rio Grande do Sul, bem como avaliou-se a ocorrência da infecção de acordo com aspectos epidemiológicos (idade, sexo, número de aves alojadas). No segundo experimento, foram adquiridas, em supermercados de Santa Maria, amostras de miúdos e carne de frango, as quais foram processadas e avaliadas quanto à contaminação por *C. jejuni*, sendo posteriormente submetidas a congelamento por 7 dias a -18°C para avaliar seu efeito nas taxas de contaminação.

No primeiro experimento, foram coletadas 280 amostras de *swabs* cloacais provenientes de quatro propriedades avícolas localizadas nos municípios de Garibaldi, Itaara, Encantado e Farroupilha, no estado do Rio Grande do Sul. No momento da coleta, foi realizado um questionário com o responsável pela granja, a fim de coletar os dados epidemiológicos avaliados.

Ao coletar as amostras, as aves foram contidas em círculos de proteção a fim de facilitar a apanha das mesmas. Utilizou-se *swabs* estéreis para a coleta das amostras, os quais foram inseridos na cloaca das aves e em seguida dispostos em tubos de vidro

com tampa de rosca contendo meio de transporte Cary-Blair. As amostras foram mantidas em caixas de isopor com gelo reciclável no seu interior sendo, em seguida, transportadas ao laboratório para serem processadas o mais brevemente possível.

As amostras foram processadas no Laboratório Central de Diagnóstico de Patologias Aviárias (LCDPA) da UFSM preferencialmente no dia da coleta. Quando não foi possível o processamento no mesmo dia da realização da coleta, as amostras foram armazenadas em geladeira para assegurar a preservação do material, porém, o tempo decorrido entre a coleta do material e o processamento não excedeu 48h.

No laboratório, o diagrama de isolamento de *Campylobacter jejuni* (Apêndice 1) teve início com a semeadura dos swabs nas placas de *Petry* contendo meio de cultura seletivo para *Campylobacter* (FILGUEIRAS & HOFER, 1989) (Anexo 1) composto por base para ágar Columbia enriquecido com carvão ativado (0,4g%), suplemento seletivo para *Campylobacter spp.* e suplemento FBP (GEORGE *et al.*, 1978).

Após a semeadura, as placas foram dispostas em jarra de microaerofilia com capacidade de 10L. A atmosfera necessária para o adequado desenvolvimento foi obtida através da modificação da técnica da passivação do cobre, descrita por Filgueiras e Hofer (1989). Foram utilizadas, para uma jarra de 10L, 3 pastilhas de carbonato de cálcio (Sonrisal®) trituradas, dispostas em um recipiente plástico, sobre a qual é disposto 30g de esponja de aço (Bombril®) embebida em solução acidulada de sulfato de cobre. A mistura foi inserida na jarra imediatamente, e esta vedada para que os níveis gasosos atinjam as proporções desejáveis no seu interior.

O conjunto foi incubado por um período de 48-72h a uma temperatura de 42°C. Após este período, a morfologia das colônias foi avaliada. As colônias suspeitas foram avaliadas quanto à motilidade e quanto à morfologia. Para a análise da motilidade, uma

amostra de crescimento bacteriano suspeito foi coletada com alça de platina, sendo após, disposta sobre uma lamínula. Sobre a colônia foram instiladas 2-3 gotas de solução salina e este conjunto disposto em uma lâmina escavada para microscopia. Em seguida, foi realizada a avaliação microscópica em 1000x a fim de avaliar a motilidade típica em espiral ou em forma de saca-rolhas.

Para a avaliação da morfologia, procedeu-se à técnica da coloração de Gram modificada (FILGUEIRAS & HOFER, 1989), utilizando-se como coloração de contraste a fucsina básica ao invés da safranina, devido a uma incapacidade das bactérias pertencentes ao gênero *Campylobacter* em corar-se por este último. As lâminas coradas foram observadas em microscópio óptico (1000x) a fim de se observar a presença de células com morfologia típica de *Campylobacter*. A presença de bacilos curvos, em forma de S ou asa de gaivota é compatível com a presença de *Campylobacter* spp na amostra.

A fim de realizar a confirmação bioquímica, as amostras morfologicamente positivas foram submetidas aos teste de catalase, oxidase e hidrólise do hipurato de sódio.

No segundo experimento, foram adquiridas três amostras, de aproximadamente 200g cada, de fígado, moela, coração e drumete (coxinha da asa) frescos, em três supermercados da cidade de Santa Maria, totalizando 36 amostras. As amostras foram transportadas na embalagem original até o laboratório a fim de serem processadas.

Foram pesadas 25g de cada amostra, e colocadas em 100mL de meio de enriquecimento seletivo para *Campylobacter* (TECRA®), sendo em seguida incubadas a 42°C por 18-24h. O material restante de cada amostra foi congelado (-18°C) por um período de 7 dias. Após este período, as amostras foram descongeladas à temperatura

ambiente sendo retirado um fragmento de 25g de cada uma, a qual foi submetida a enriquecimento conforme descrito anteriormente.

Para a avaliação das amostras de carne e miúdos, faz-se necessário realizar um pré-enriquecimento da amostra em meio apropriado, que visa elevar a detecção do agente em amostras com número pequeno de células viáveis. Consiste em incubar as amostras por um período de 24h antes de se proceder ao plaqueamento. Foram pesadas 25g de cada amostra, sendo então acrescentados 100ml de meio de enriquecimento (MALBRÁN, 2001).

Foi realizada a incubação das amostras, a 42°C por 24h, sendo realizado o plaqueamento no meio descrito anteriormente. As técnicas de isolamento e identificação aplicadas a partir do plaqueamento são idênticas àquelas utilizadas no primeiro experimento

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os lotes monitorados foram positivos para *C. jejuni*. Do total de 280 amostras analisadas, *C. jejuni* foi observado em 147 amostras (52,5%), sendo que ainda foram isolados de outras 31 aves *Campylobacter* spp. Assim, pode-se estimar uma contaminação por *Campylobacter* spp (*C. jejuni* + *Campylobacter* spp.) de 63,5% das amostras avaliadas. A taxa de contaminação por *C. jejuni* entre os lotes avaliados variou de 41,6% - 66%, sendo que para *Campylobacter* spp., esta variou entre 46 e 70% das amostras positivas. Os dados obtidos encontram-se apresentados na tabela 1.

Kuana (2008), ao monitorar 22 lotes de frango, observou presença de contaminação em 81,8% das descargas cecais analisadas, com *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* representando 68,8% das espécies identificadas, estando a contaminação presente em 81,8% dos lotes monitorados. Gomes *et al.* (2006), analisando aves domésticas no município de Pelotas-RS, observou índices de contaminação bem menores ao analisar 404 amostras de *swabs* cloacais, obtendo apenas 5,2% de amostras positivas distribuídas em sete propriedades positivas (26,9%).

No Brasil, Aquino *et al.* (2002) isolaram *C. jejuni* e *C. coli* de 60% das amostras de carcaça de frango analisadas, índice de contaminação menor do que o obtido por Kuana *et al.* (2008), ao observar em 99% das carcaças analisadas presença de contaminação por *Campylobacter* spp.. Franchi *et al.* (2007) ao analisar 335 amostras de carcaças, água e equipamentos coletados em diferentes pontos dentro da linha de abate nos frigoríficos, observou positividade para campilobacteres termofílicos em 71,3% das amostras.

A análise estatística revelou existir influência da idade do lote sobre a contaminação ($p < 0,05$). Mead (2002) observou que os índices de contaminação se elevam à medida em que a idade do lote evolui. Quanto ao sexo, a contaminação observada foi maior em lotes de fêmeas do que em lotes de machos ($p = 0,03$), contrariando Shane e Stern (2003), que atribuem ao fato de haver diferença entre o pH intestinal de machos e fêmeas. Ainda, o tamanho do lote também mostrou exercer influência sobre a contaminação, possivelmente devido a maior descarga fecal observada por unidade de área no aviário, especialmente naqueles em que se trabalha com densidade animal elevada.

No segundo experimento, de um total de 36 amostras analisadas frescas, 22 (61,1%) apresentaram contaminação, sendo que a contaminação no fígado (88,8%) e no coração (77,7%) revelaram diferença estatística em relação à contaminação na moela (44,4%) e drumetes (33,3%) analisados ainda frescos (tabela 2).

Após o congelamento, por sete dias, à uma temperatura de -18°C, o isolamento de *C. jejuni* nas amostras reduziu significativamente, sendo isolado em apenas 3 de 36 amostras analisadas, sendo duas amostras de fígado e uma amostra de coração, o que nos revela que o congelamento é capaz de servir como uma complementação nos esforços para controlar as infecções por *Campylobacter* spp. Entretanto, conforme salientado por Dimitraki e Velonakis (2007), o congelamento inibe o crescimento dos organismos, reduz seus números, mas não os elimina completamente das carnes congeladas, podendo a bactéria assumir a forma de viável mas não cultivável em situações de condições adversas (HUMPHREY *et al.*, 2007)

Sampers *et al* (2009) observou em estudo sobre infecções humanas, um menor risco de contaminação por *C. jejuni* em alimentos e subprodutos de frango processados quando estes utilizaram carne de frango congelada em suas preparações, tendo observado também um aumento no risco de contaminação quando da utilização de pele de frango nas receitas. Porém, Hänel e Atanassova (2007), conseguiram obter isolamento de *C. jejuni* em 68% das amostras inoculadas com o agente após 2 semanas e em 24% das amostras após 4 semanas de congelamento a -20°C.

Georgsson *et al* (2006), avaliando o efeito do congelamento sobre a população de *C. jejuni* em carcaças de frango observou uma redução de 2,37 logs na contagem do agente após 31 dias de congelamento, e de aproximadamente 1log logo após o congelamento das carcaças. Wieland *et al.* (2006), ao analisar genótipos de *C. jejuni*

provenientes de amostras frescas e congeladas, não observou diferenças genóticas entre as amostras, concluindo que a resistência ao congelamento das cepas independe do genótipo.

CONCLUSÕES

Os dados obtidos nos permitem concluir que *Campylobacter jejuni* encontra-se presente na avicultura industrial no Rio Grande do Sul.

O tempo de alojamento, o número de aves alojadas e o sexo do lote exerce influência sobre os índices de contaminação por *C. jejuni*.

As carnes e miúdos de frango frescos apresentam contaminação por *C. jejuni*, sendo observado contaminação significativamente maior no fígado e coração, quando comparados à contaminação observada na moela e drumete.

O congelamento por sete dias reduz significativamente a contaminação nos cortes avaliados, aumentando, assim, a segurança alimentar para o consumidor.

REFERÊNCIAS

AQUINO, M.H.C.; *et al.* Frequency of isolation and identification of termophilic *Campylobacters* from animals in Brazil. **The Veterinary Journal**. v.164, p. 159-161, 2002.

BUTZLER, J.P. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. **Clinical Microbiological Infections**. v.10, p. 868-876, 2004.

- DIMITRAKI, P.; VELONAKIS, E. The survival of pathogens in frozen food as a health risk. **Archives of Hellenic Medicine**. v.24, n.5, p. 432-439, 2007.
- FILGUEIRAS, A.L.L.; HOFER, E. Ocorrência de *Campylobacter* termofílico em diferentes pontos em uma estação de tratamento de esgotos na cidade do Rio de Janeiro, RJ. **Revista de Microbiologia**. v.20, p.303-308. 1989.
- FOODNET. Preliminary FoodNet Data on the Incidence of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food --- 10 States, 2007 **Morbidity and Mortality Weekly Report**. v. 14, n. 57 p.366-370, 2008.
- FRANCHI, P.R. *et al.* Frequency of thermophilic *Campylobacter* in broiler chickens during industrial processing in a Southern Brazil slaughterhouse. **British Poultry Science**. v.48, n.2, p. 127-132, 2007.
- GEORGE, H.A.; *et al.*; Improved media for growth and aerotolerance of *C. fetus*. **Clinical Journal of Microbiology**. v.8 p. 36-41, 1978.
- GEORGSSON, F. *et al.* The influence of freezing and duration of storage on *Campylobacter* and indicator bacteria in broiler carcasses. **Food Microbiology**. v.23, n.7, p.677-683, 2006.
- GOMES, F.R.; *et al.* *Campylobacter jejuni* occurrence in chicken fecal samples from small properties in Pelotas, southern of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.37, p. 375-378, 2006.
- HÄNEL, C.M.; ATANASSOVA, V. Impact of different storage factors on the survivability of *Campylobacter jejuni* in turkey meat. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v.49, n.1, p. 146-148, 2007.

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

KUANA,S.L.; *et al.* Occurrence and characterization of *Campylobacter* in the brazilian production and processing of broilers **Avian Diseases**. v. 9, n. 2, p. 480-486, 2008.

LIOR, H. New, Extended Biotyping Scheme for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and "*Campylobacter laridis*". **Journal of Clinical Microbiology**. v.20, n.4, p. 636-640,1984.

MALBRÁN, C.A.; **Manual de procedimientos *Campylobacter*** Ministério de Salud, Buenos Aires, Argentina, 29p. 2001.

MEAD, G.C. Factors affecting intestinal colonisation of poultry by *Campylobacter* and role of microflora in control . **World's Poultry Science Journal**. v. 58, p. 169-178, 2002.

MOORE, J.E.; CORCORAN, D.; DOOLEY, J.S.G. *Campylobacter*. **Veterinary Research**. v.36, p. 351-382, 2005.

MURPHY, C.; CARROL, C.; JORDAN, K.N.C. Enviromental survaival mechanisms of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. **Journal of Applied Microbiology**. v.100, p. 623-632, 2006.

SAMPERS, I. *et al.* Processing practices contributing to *Campylobacter* contamination in Belgian chicken meat preparations. **International Journal of Food Microbiology**. v.128, p. 297-303, 2009

SHANE, S.M.; HARRINGTON, K.S. *Campylobacteriosis*.In: SWAYNE, D.E. *et al.* **A Laboratoryoratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens**. 4^aed. Kennet Square: American Association of Avian Pathologists. Cap7, p.35-39, 1998.

SHANE, S.M.; STERN, N.J. *Campylobacter* Infection. In.:SAIF, Y.M. **Diseases of poultry**. 11^aed. Ames: Iowa State Press. 2003, Cap.17, p.615-625.

WHO. *Campylobacter*. **Fact sheet**. n. 255, nov 2000. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/en/>> Acesso em 01/02/2009.

WIELAND, B. *et al.* Genetic variability of *Campylobacter jejuni* isolated from fresh and frozen broiler carcasses. **Journal of Applied Microbiology**. v.101 n. 5, p.1027-1032, 2006.

Tabela 1: Ocorrência de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter* spp em amostras de swabs cloacais provenientes de quatro propriedades do Rio Grande do Sul e aspectos epidemiológicos destas propriedades

Local	Nº de amostras	<i>C. jejuni</i> n (%)	<i>Campylobacter</i> spp. n (%)	Sexo	Idade (dias)	Aves alojadas
1	100	56 (56,0)	12 (12,0)	Fêmea	52	17 mil
2	70	33(47,1)	14 (20,0)	Fêmea	27	28 mil
3	60	25 (41,6)	3 (5,0)	Macho	42	3 mil
4	50	33 (70,0)	2 (4,0)	Misto	40	5 mil
Total	280	147 (52,5)	31 (11,1)	-----	-----	-----

Tabela 2: Contaminação por *Campylobacter jejuni* em carne e miúdos de frango frescos e congelados à -18°C por 7 dias

<i>Amostra</i>	<i>Nº de amostras</i>	<i>Fresco</i>		<i>Congelado</i>	
		<i>C. jejuni</i>	<i>%</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>%</i>
Fígado	9	8 ^a	88,8 ^a	2	22,2
Coração	9	7 ^a	77,7 ^a	1	11,1
Moela	9	4 ^b	44,4 ^b	0	0,0
Drumete	9	3 ^b	33,3 ^b	0	0,0
Total	36	22	61,1	3	8,3

Dados seguidos de letras diferentes diferem estatisticamente entre si ao nível de 0,05

4 CONCLUSÃO

A realização deste trabalho nos permitiu concluir que a contaminação por *C. jejuni* afeta grande parte dos aviários localizados no estado do Rio Grande do Sul, e estes apresentam índices elevados de contaminação entre as aves alojadas.

Em relação aos aspectos epidemiológicos avaliados, de acordo com os dados obtidos, existe influência do tempo de alojamento das aves sobre o índice de contaminação.

Também o sexo das aves, e o número de aves alojadas, de acordo com os dados coletados exercem influência sobre os índices de contaminação.

Observou-se ainda elevada contaminação nos cortes de frango frescos adquiridos em supermercados de Santa Maria, sendo fígado e coração as amostras com maior contaminação.

O congelamento destes alimentos durante 7 dias à -18°C foi capaz de reduzir significativamente a contaminação nos cortes, contudo ressalta-se que este procedimento não elimina completamente *C. jejuni* do alimento, sendo necessário manter os cuidados de higiene e processamento para assegurar a saúde do manipulador e consumidor final.

5 REFERÊNCIAS

ALTEKRUSE, S. F.; *et al.* *Campylobacter jejuni* – an emerging foodborn pathogen. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 5, n. 1, p. 28-35, Jan./Feb. 1999.

BISWAS, D. *et al.* Effect of cytolethal distending toxin of *Campylobacter jejuni* on adhesion and internalisation in cultured cells and in colonization of the chicken gut. **Avian Diseases**, Kenneth Square, v. 50, n.4, p. 586-593, Oct./Dec. 2006.

BRONZWAER, S. *et al.* 12th Scientific Colloquium – assessing health benefits of controlling *Campylobacter* in the food chain, **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam. Aceito para publicação, 2009.

BUTZLER, J. P. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. **Clinical Microbiological Infections**. v. 10, p. 868-876, 2004.

BUZBI, J. C.; ALLOS, B. M.; ROBERTS, T. The economic burden of *Campylobacter* associated Guillain-Barré syndrome. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 176, p.192-197, 1997.

COCKER, A. O. *et al.* Human campylobacteriosis in developing countries **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 8, n. 3, p. 237-242, May/Jun. 2002.

COLE, K. *et al.* Isolation and prevalence of *Campylobacter* in the reproductive tracts and semen of commercial turkeys **Avian Diseases**, Kenneth Square, v. 48, n. 4, p. 625-630, Oct./Dec. 2004.

CORRY, J. E. L.; ATABAY, H. I. Poultry as a source of *Campylobacter* and related organisms. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 90, n. 1, p. 96-114, Jan. 2001.

COX, N. A.; BAILEY, J. S.; RICHARDSON, L. J. Presence of naturally occurring *Campylobacter* and *Salmonella* in the mature and immature ovarian follicles of late life broiler breeder hens. **Avian Diseases**. Kenneth Square, v. 49, n. 3, p. 285-287, Jul./Setp. 2005.

COX, N. A.; RICHARDSON, L. J.; BUHR, R. J. Natural Presence of *Campylobacter* spp. in various internal organs of commercial broiler breeder hens. **Avian Diseases**. Kenneth Square, v. 50, n. 4, p. 450-453, Oct./Dec. 2006.

DHILLON, A. S. *et al.* *Campylobacter jejuni* infection in broiler chickens, **Avian Diseases**, Kenneth Square, v. 50, n.1, p. 55-58, Jan./Mar. 2006.

DORREL, N.; WREN, B. W. The second century of *Campylobacter* research: recent advances, new opportunities and old problems. **Current Opinion in Infectious Diseases**, Philadelphia, v. 20, n.5, p. 514-518, Sept./Oct. 2007.

DEKEYSER, P. *et al.* Acute enteritis due to a related vibrio: first positive stool cultures. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.125, p. 390–392, 1972.

ESCHERICH, T. Beitrage zur Kenntniss der Darmbakterien. III. Ueber das Vorkommen von Vibrionen im Darmcanal und den Stuhlgangen der Sauglinge. (The knowledge of intestinal bacteria. III. On the existence of vibrios in the intestines and feces of babies.) **Münchener Med Wochenschrift**. v. 33 p. 815–817, 1886.

EVANS, S. J.; SAYERS, A. R. A longitudinal study of *Campylobacter* infection of broiler flocks in Great Britain. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 46, n. 3, p. 209-223, Aug. 2000.

FONSECA, B. B. *et al.* *Campylobacter* sp em mecônio de pintainhos e em cloaca de reprodutoras de corte. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 23, n. 3, p. 128-132, May/Jun. 2007.

FOODNET. Preliminary FoodNet Data on the Incidence of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food --- 10 States, 2007 **Morbidity and Mortality Weekly Report**. v. 14, n. 57 p.366-370, 2008.

GOMES, F. R.; *et al.* *Campylobacter jejuni* occurrence in chicken fecal samples from small properties in pelotas, southern of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n.3, p. Jul./Sept. 375-378, 2006.

GÓMEZ, L .I. C. *et al.* Potential of use of characterised hyper-colonising strain(s) of *Campylobacter jejuni* to reduce circulation of environmental strains in commercial poultry. **Veterinary Microbiology**. Amsterdam, v. 134, n., 3-4, p. 353-361, Mar. 2009.

GREGORY, E. *et al.* Epidemiological study of *Campylobacter* spp. In broilers: source, time of colonization, and prevalence. **Avian Diseases**, Kenneth Square, v. 41, n. 4, p. 890-898, Oct./Dec. 1997.

HIRSH, D. C. Spiral organisms I: *Campylobacter* – *Arcobacter* – *Lawsonia* (digestive tract). In: HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Veterinary Microbiology**. Malden: Blackwell Science, 1992. Cap.14, p. 89-92.

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

KING E. O. Human infections with *Vibrio fetus* and a closely related vibrio. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.1 01 p. 119–128, 1957.

KONEMAN, E. W. *et al.* **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. 4th ed. J.B. Lippincot Company. Philadelphia, 1992. 1154 p.

KUANA,S.L. *et al.* Occurrence and characterization of *Campylobacter* in the brazilian production and processing of broilers **Avian Diseases**, Kenneth Square, v. 9, n. 2, p. 480-486, Apr./Jun. 2008.

MEAD, G. C. Factors affecting intestinal colonisation of poultry by *Campylobacter* and role of microflora in control . **World's Poultry Science Journal**, Ithaca, v. 58, n. 2, p. 169-178, Apr./Jun. 2002.

MEAD, G. C. Microbiological quality of poutry meat: a review **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v. 6, n. 3, p. 135-142, Sept./Dec. 2004.

MCFADYEAN J.; STOCKMAN S. Report of the Departmental Committee appointed by the Board of Agriculture and Fisheries to inquire into Epizootic Abortion. III. **Abortion in Sheep**. London: HMSO, 1913.

MOORE, J. E.; CORCORAN, D.; DOOLEY, J. S. G. *Campylobacter*. **Veterinary Research**. Les Ulis, v. 36, p. 351-382, 2005.

NAUTA, M. *et al.* A comparision os risks assesments on *Campylobacter* in broiler meat. **International Journal of Food Microbilology**, Amsterdam, v. 129, p. 107-123, 2009.

NEWELL, C. G. *et al.* The virulence of clinical and environmental isolates of *Campylobacter jejuni* **Journal of Hygiene**, Cambridge, v. 94, p.45-54, 1985.

OIE, *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. In: OIE, **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. 6th ed. 2008. Cap. 2.9.3, p.1185-1191.

OLAH, P. A. *et al.* Prevalence of the *Campylobacter* multi-drug efflux pump (CmeABC) in *Campylobacter* spp. isolated from freshly processed turkeys. **Food Microbiology**, London, v. 23, n. 5, p 453-460, Aug. 2006.

SEBALD, M.; VÉRON, M. Teneur en bases de l'ADN et classification des vibrions. **Annales de L'Institut Pasteur**. v. 105, p. 897–910, 1963.

SHANE, S. M.; HARRINGTON, K. S. *Campylobacteriosis*. In: SWAYNE, D.E. *et al.* **A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens**. 4th ed. Kennet Square: American Association of Avian Pathologists. Cap7, p.35-39, 1998.

SHANE, S. M.; STERN, N. J. *Campylobacter* Infection. In.:SAIF, Y. M. **Diseases of poultry**. 11th .ed. Ames: Iowa State Press. Cap.17, p.615-625, 2003.

SKIRROW, M. B. *Campylobacter* enteritis: a 'new' disease. **British Medical Journal**. London, v. 2, n. 1, p. 9–11, Jan./Jun. 1977.

SMITH, J. L. *Campylobacter jejuni* infection during pregnancy: long-term consequences of associated bacteremia Guillain-Barré syndrome, and reactive arthritis. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 65, n. 4, p. 696-708, Apr. 2002.

SMITH, T. The etiological relation of *Spirilla* (*V. foetus*) to bovine abortion. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 30, p. 313–323, 1919.

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

YOUNG, K. T. *et al.* *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. **Nature Reviews**, London, v. 5, p. 665-678. 2007.

WASSENAAR, T. M. E.; BLASER, M. J. Pathophysiology of *Campylobacter jejuni* infections of humans. **Microbes and Infection**, Paris, v. 1, n. 12, p. 1023-1033, Oct.1999.

WINGSTRAND, A. *et al.* Fresh chicken as a main risk factor for *Campylobacteriosis*, Denmark. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 12, n. 2, p. 280-284, Mar./Apr. 2006.

6. ANEXOS

ANEXO 1 – Meio de cultura utilizado para o isolamento de *C. jejuni*

Meio seletivo (modificado de Filgueiras e Hofer, 1989)

a) Base:

Base para ágar Columbia (HiMedia).....	4,4g
Carvão ativo (Synth).....	0,4g
Água destilada.....	100mL
Ajustar o pH em 7,4-7,6. Esterilizar em autoclave a 121°C/15min.	

b) Suplemento FBP: (Georgson *et al.*, 1978)

Sulfato Ferroso, P.A. (Vetec).....	0,5g
Bissulfito de Sódio, P.A. (Vetec).....	0,5g
Piruvato de sódio, P.A. (Vetec).....	0,5g
Água destilada estéril.....	100mL
Esterilização por filtração em filtro Seitz ou Milipore. Manutenção em frasco âmbar, por 30 dias em geladeira. Adicionar 5mL/100mL de meio autoclavado resfriado à 50°C	

c) Mistura de Antibióticos (FD077 HiMedia®)

Rifampicina.....	25mg
Cefsoludina.....	6,25mg
Sulfato de Polimixina B.....	20.000 U.I.
Rehidratar com 10 mL de etanol 50%. Adicionar assepticamente à 1L de meio previamente autoclavado resfriado à 50°C	

7. APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Diagrama do fluxo de procedimentos para isolamento e identificação de *Campylobacter jejuni* de amostras de swabs cloacais

