

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO E SAÚDE

MARIA LUIZA REZENDE RIBEIRO

**QUALIDADE DAS CARCAÇAS DE FRANGO DE
ABATEDOUROS E PONTOS DE VENDA DE GOIÁS:
PESQUISA DE *Campylobacter* TERMOTOLERANTES**

Goiânia
2017

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

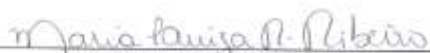
Nome completo do autor: Maria Luiza Rezende Ribeiro

Título do trabalho: QUALIDADE DAS CARCAÇAS DE FRANGO DE ABATEDOUROS E PONTOS DE VENDA DE GOIÁS: PESQUISA DE *Campylobacter* TERMOTOLERANTES

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ **SIM** ☐ **NÃO¹**

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor (a) ²

Data: 15/03/2017.

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

² A assinatura deve ser escaneada.

MARIA LUIZA REZENDE RIBEIRO

**QUALIDADE DAS CARCAÇAS DE FRANGO DE
ABATEDOUROS E PONTOS DE VENDA DE GOIÁS:
PESQUISA DE *Campylobacter* TERMOTOLERANTES**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Goiás, como exigência para obtenção do Título de Mestre em Nutrição e Saúde.

Orientador:

Prof^a Dr^a Maria Cláudia D. Porfirio Borges André

Co-orientador:

Prof^a Dr^a Liana Jayme Borges

Linha de Pesquisa:

Qualidade de alimentos e dietas

Financiamento:

Capes - Programa de Demanda Social

Goiânia
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Maria Luiza Rezende, RIBEIRO
QUALIDADE DAS CARCAÇAS DE FRANGO DE ABATEDOUROS
E PONTOS DE VENDA DE GOIÁS [manuscrito] : PESQUISA DE
Campylobacter TERMOTOLERANTES / RIBEIRO Maria Luiza
Rezende. - 2017.
LXVII, 67 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Maria Cláudia Dantas Porfirio Borges
André; co-orientadora Dra. Liana Jayme Borges.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás,
Faculdade de Nutrição (Fanut) , Programa de Pós-Graduação em Nutrição e
Saúde, Goiânia, 2017.
Bibliografia. Anexos. Apêndice.
Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de
figuras, lista de tabelas.

1. Campylobacter. 2. Produtos avícolas. 3. Inspeção de alimentos. 4.
Microbiologia de alimentos. 5. PCR. I. André, Maria Cláudia Dantas
Porfirio Borges, orient. II. Título.

CDU 612.39

Ata número cento e treze de defesa de dissertação do Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Goiás. Às quinze horas do dia quinze de fevereiro de dois mil e dezessete, reuniu-se no(a) Miniauditório Jatobá, a Comissão Julgadora infra nomeada para proceder ao julgamento da Defesa de Dissertação apresentado (a) pelo (a) Pós-Graduando (a) Maria Luiza Rezende Ribeiro intitulada: *Campylobacter Termotolerantes em Carcaça de Frango de Abatedouros e Seus Pontos de Venda*, apresentado para obtenção do Título de Mestre em Nutrição e Saúde, junto à Área de Concentração: Nutrição e Saúde, desta Universidade. O (A) Presidente da Comissão Julgadora Prof^{ra}. Dr^a. Maria Cláudia Dantas Porfírio Borges André, iniciando os trabalhos, concedeu a palavra ao (a) candidato (a) para exposição em trinta minutos do seu trabalho. A seguir, o (a) senhor (a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos Examinadores, os quais passaram a arguir o (a) candidato (a), durante o prazo máximo de trinta minutos, assegurando-se ao mesmo igual prazo para responder aos Senhores Examinadores. Ultimada a arguição, que se desenvolveu nos termos regimentais, a Comissão, em sessão secreta, expressou seu julgamento, considerando o (a) candidato (a) Aprovado [Aprovado (a) ou Reprovado (a)]. Em face do resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou o (a) candidato (a), habilitado [Habilitado (a) ou não Habilitado (a)]. Nada mais havendo a tratar, eu Secretário Douglas Antônio Rocha Prado lavrei a presente ata que, após lida e aprovada, foi por todos assinada em três vias de igual teor.

Goiânia, quinze de fevereiro de dois mil e dezessete.

Banca Examinadora	Assinaturas
PROF ^a . DR ^a . MARIA CLÁUDIA DANTAS PORFÍRIO BORGES ANDRÉ	<i>Maria Cláudia D. P. Borges André</i>
PROF ^a . DR ^a . JULIANA LAMARO CARDOSO	<i>Cardoso</i>
PROF ^a . DR ^a . MARIA RAQUEL HIDALGO CAMPOS	<i>Maria Raquel Hidalgo Campos</i>

A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da dissertação:

Qualidade das carcaças de frango de abatedouros
e pontos de venda de Goiás: pesquisa de Campylobacter
termotolerantes

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por toda compreensão, paciência e apoio.

Ao Frederico, por todo estímulo e companheirismo.

À minha orientadora, Maria Cláudia, por toda sua capacidade e conhecimento. Sua tranquilidade, atenção e carinho a tornaram um exemplo de pessoa e profissional para mim.

À professora Maria Raquel, por ter acompanhado e guiado toda minha vida acadêmica e por sempre acreditar em mim.

Às professoras Liana e Juliana por não medirem esforços para ajudar sempre.

À Camilla por todas as dicas desde o início da graduação.

À VISA e AGRODEFESA pela essencial parceria.

À Manuela por todos os momentos que passamos juntas durante a pesquisa.

Às alunas de iniciação científica Ana Paula e Nathália pela dedicação e trabalho.

À Jéssica, Lorrane, Luana e Cindy por me socorrerem sempre.

À Raquel Santiago e ao João Felipe por disponibilizarem equipamentos imprescindíveis à pesquisa.

À banca pelas preciosas contribuições.

À Capes pela concessão da bolsa de pós graduação.

RESUMO

A ingestão de alimentos contaminados por bactérias do gênero *Campylobacter* resultam em campilobacteriose em humanos. Esta é uma das causas mais comuns de diarreia nos Estados Unidos e União Europeia. Um dos maiores reservatórios deste micro-organismo são produtos avícolas, sendo sua carne, crua ou mal cozida, a principal fonte de contaminação para o homem. As espécies mais prevalentes envolvidas nas infecções são *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* e *Campylobacter lari* que podem contaminar as carcaças durante o abate e a manipulação de frangos. O objetivo desse estudo foi determinar a prevalência de *Campylobacter* termotolerantes em carcaças de frango refrigeradas e posteriormente congeladas comercializadas no município de Goiânia, Goiás. Com o apoio do Departamento de Vigilância Sanitária Municipal e Agência Goiana de Defesa Agropecuária, foram coletadas, entre os meses de maio e setembro de 2015, 40 amostras de carcaças refrigeradas e congeladas em abatedouros em Goiás e seus pontos de venda em Goiânia. A metodologia para isolamento e identificação obedeceu às normas da *International Organization for Standardization* 10272-1:2006. Para identificação molecular, foi realizada a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase para detecção dos genes *hipO* (*Campylobacter jejuni*) e *glyA* (*Campylobacter coli* e *Campylobacter lari*). Foi encontrada prevalência de 17,5 % (n=7) de contaminação de carcaças por *Campylobacter* spp.. Dentre as 24 amostras coletadas em abatedouros, 12,5 % (n=3) estavam contaminadas. Já entre as 16 coletadas em pontos de venda, 25,0 % (n=4) apresentaram positividade para a bactéria. Não foi detectado *Campylobacter lari* nas amostras avaliadas. Os resultados evidenciam que a bactéria permanece viável em todas as etapas da cadeia produtiva de frangos, representando um risco para a ocorrência de surtos de gastroenterites. A presença da bactéria em frangos aponta para a necessidade de educação de criadores de aves e comerciantes quanto ao risco à saúde pública que estes produtos representam. É necessária sensibilização para melhorar a gestão, além da realização de medidas preventivas e corretivas no sistema de produção e comercialização destes produtos. Além disso, a prevalência encontrada no presente estudo reforça a necessidade do estabelecimento de padrões legais que determinem a pesquisa do micro-organismo neste tipo de alimento.

Palavras-chave: *Campylobacter*, produtos avícolas, inspeção de alimentos, microbiologia de alimentos, PCR.

ABSTRACT

Chicken carcasses quality of abattoirs and points of sale: *Campylobacter* thermotolerant research

The ingestion of foods contaminated with *Campylobacter* spp. results in campylobacteriosis in humans. This disease is the main cause of diarrhea in the United States and European Union. The most common reservoirs of this microorganism are chickens and the consumption of their meat, raw or undercooked, is the main source of contamination to humans. The most prevalent species involved in infections are *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter lari* that can contaminate carcasses during the slaughter and handling of chickens. The aim of this study was to determine the prevalence of thermotolerant *Campylobacter* in chilled and later frozen chicken carcasses commercialized in the city of Goiânia, Goiás. With the support of the Municipal Sanitary Surveillance Department and the Goiás Agency for Agricultural and Farming Defense, forty cooled and frozen carcasses samples were collected in abattoirs and its retail outlets, from May to September/2015. The microbiological analysis was performed according to the methods of the International Organization for Standardization 10272-1:2006. For molecular identification, the Polymerase Chain Reaction technique was performed to detect the *hipO* (*Campylobacter jejuni*) and *glyA* genes (*Campylobacter coli* and *Campylobacter lari*). It was found a contamination prevalence of 17.5 % (n=7) of *Campylobacter* spp.. Between the 24 samples collected from slaughterhouses, 12.5% (n = 3) were contaminated. Among the 16 collected in points of sale, 25.0% (n = 4) presented positivity for the bacterium. *Campylobacter lari* was not detected in the evaluated samples. The results show that the bacteria remains viable at all stages of the chicken production chain, representing a risk for outbreaks of gastroenteritis. The presence of bacteria in chicken from market reinforces the need for education of poultry farmers and traders regarding the public health risk that these products represent. Awareness raising is needed to improve management, as well as preventive and corrective measures in the production and marketing of these products. In addition, the prevalence found in the present study reinforces the need to establish legal standards that determine the research of the microorganism in this type of food.

Key-words: *Campylobacter*, poultry products, food inspection, food microbiology, PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fluxograma de abate e coleta de amostras em abatedouros	24
Figura 2	Colônias típicas de <i>Campylobacter</i> spp. em ágar Columbia sangue: aparência mucoide, de pequena a média dimensão, geralmente com coloração acinzentada e não hemolíticas	27
Figura 3	Colônias típicas de <i>Campylobacter</i> spp em ágar mCCDA: colônias acinzentadas, com brilho metálico, planas e úmidas	28
Figura 4	Teste de hidrólise do hipurato	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APHA:	<i>American Public Health Association</i>
APPCC:	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
CBA:	<i>Columbia Blood Base Agar</i>
CDC:	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
DTA:	Doença Transmitida por Alimentos
EFSA:	<i>European Food Safety Authority</i>
EU:	<i>European Union</i>
FDA:	<i>Food and Drug Administration</i>
FoodNet:	<i>Foodborne Diseases Active Surveillance Network</i>
<i>glyA</i> :	Gene da serina hidroximetiltransferase
<i>hipO</i> :	Gene da hipuricase
ISO:	<i>International Organization for Standardization</i>
mCCDA:	<i>Modified Charcoal-Cefoperazone-Deoxycholate Agar</i>
MS:	Ministério da Saúde
PCR:	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PIB:	Produto Interno Bruto
PREBAF:	Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
SECTEC;	Secretaria de Ciência e Tecnologia
SGB:	Síndrome de Guillain-Barré
SIMEHGO:	Sistema de Meteorologia e Hidrologia de Goiás
UFC:	Unidades Formadoras de Colônias
USA:	<i>United States of America</i>
VNC:	Viáveis Não Cultiváveis
WHO:	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	9
1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 <i>Campylobacter</i> spp.	11
2.2 CAMPILOBACTERIOSE	12
2.3 FONTES DE CONTAMINAÇÃO DE CARCAÇAS	15
2.4 PRODUÇÃO AVÍCOLA	18
2.5 LEGISLAÇÃO RELACIONADA AO <i>Campylobacter</i> spp.	19
2.6 TESTES PARA IDENTIFICAÇÃO DO MICRO-ORGANISMO	20
3 OBJETIVOS	22
3.1 OBJETIVO GERAL	22
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4 MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 TIPO DE PESQUISA	23
4.2 LOCAL DE COLETA E AMOSTRAGEM	23
4.3 COLETA DAS AMOSTRAS	24
4.4 LOCAL DAS ANÁLISES	26
4.5 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	26
4.6 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA DE <i>Campylobacter</i> TERMOTOLERANTES	27
4.7 ARMAZENAMENTO DOS ISOLADOS E CEPAS PADRÃO	29
4.8 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	29
4.8.1 Extração do DNA	29
4.8.2 PCR convencional para identificação de espécies de <i>Campylobacter</i>	30
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
4.10 ASPECTOS ÉTICOS	31
REFERÊNCIAS	32
CAPÍTULO 2 – ARTIGO CIENTÍFICO	40
TÍTULO E IDENTIFICAÇÃO	40
RESUMO	41
INTRODUÇÃO	42
MATERIAL E MÉTODOS	43
RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
CONCLUSÕES	47
AGRADECIMENTOS	47
DECLARAÇÃO DE INTERESSE	47
FINANCIAMENTO	48
REFERÊNCIAS	48
FIGURAS E TABELAS	51

CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	52
APÊNDICES.....	53
ANEXOS.....	60

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

Doença transmitida por alimento (DTA) é um termo genérico aplicado a uma síndrome geralmente constituída de anorexia, náuseas, vômitos e/ou diarreia, acompanhada ou não de febre. Esta pode ser causada por bactérias, vírus, parasitas ou substâncias químicas que entram no corpo através da água ou alimentos contaminados. Síndromes digestivas, no entanto, não são as únicas manifestações clínicas dessas doenças, podendo ocorrer ainda afecções extra-intestinais que afetam vários órgãos e sistemas, podendo levar à morte (WHO, 2015). Um dos diversos micro-organismos que podem causar DTA é a bactéria *Campylobacter*. Suas espécies *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* são as que possuem maior significância clínica por serem as mais frequentemente relacionadas às doenças (USDA, 2016).

A DTA causada pelos micro-organismos do gênero *Campylobacter* é denominada campilobacteriose. Os sintomas mais comuns da doença são vômitos, cólicas e diarreias, que podem ser sanguinolentas (FDA, 2012). Além de síndrome de diarreia aguda, o patógeno pode gerar outras complicações clínicas, como artrite reativa e síndrome de Guillain-Barré (SGB) (HERNÁNDEZ; AGUILERA; CASTRO, 2013; PAYOT et al., 2006). *Campylobacter* é uma das quatro causas globais de doenças diarreicas e é considerado a causa bacteriana mais comum de gastroenterite humana no mundo (WHO, 2016).

Carne de aves cruas, água, leite não pasteurizado e derivados, como queijos, contaminados são as maiores fontes de infecção da bactéria. No entanto, o micro-organismo também pode estar presente em vegetais e alguns tipos de carne (FDA, 2012). A bactéria pode ser resistente à desidratação e outras situações ambientais (FERNÁNDEZ; VERGARA; TAPIA, 1985), sobreviver em soro humano (FERNÁNDEZ; GIUSTI; BERTOGLIO, 1995) e no leite (TRESIERRA-AYALA, GUSMÁN, FERNÁNDEZ, 2001).

Os maiores reservatórios de *Campylobacter* são os frangos (SMITH et al., 2007; STERN; LINE; CHEN, 2001), o que torna sua carne uma importante fonte de

contaminação para o consumidor. A maioria dos casos de campilobacteriose está associada ao consumo de carne de frango crua ou mal cozida e também à contaminação cruzada de outros alimentos com carnes nas condições mencionadas (CDC, 2014). A carne de frango, no entanto, é importante no Brasil, que tem uma elevada produção para consumo interno e exportação. Além disso, o consumo brasileiro desta carne merece destaque por possuir um custo mais baixo para a população, quando comparado a outros tipos de fontes proteicas na alimentação.

A presença de *Campylobacter* não é investigada na maioria dos casos de DTA bacterianas no Brasil. Isso se deve ao fato das metodologias de isolamento e caracterização do micro-organismo serem diferenciadas daquelas utilizadas em pesquisas de enteropatógenos bacterianos tradicionais (IOC, 2016). Além disso, os dados sobre a prevalência deste micro-organismo são variáveis devido aos reduzidos relatos sobre o patógeno e por não existirem programas de vigilância e notificação obrigatórios das campilobacterioses.

Diante da inexistência de legislação, o monitoramento do *Campylobacter* não é rotina nas granjas avícolas do Brasil. E, tendo em vista a representatividade brasileira no contexto mundial para produção avícola e sua exportação, a pesquisa da bactéria em carcaça de frango torna-se muito relevante. Nesse sentido, a hipótese principal do estudo foi a de que frangos abatidos em Goiás e comercializados em Goiânia e região metropolitana podem estar contaminados por bactérias do gênero *Campylobacter*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Campylobacter* spp.

O gênero *Campylobacter*, pertencente à família *Campylobacteraceae*, é composto por bactérias Gram-negativas curvas, não formadoras de esporos e microaerófilas (FDA, 2012). A bactéria, não hemolítica, possui motilidade característica em forma de “saca-rolhas” produzida por flagelo polar em uma ou nas duas extremidades da célula (NACHAMKIN, 2001). São identificadas 34 espécies e 14 subespécies do gênero *Campylobacter* (DSMZ, 2016), sendo que as espécies mais envolvidas em doenças humanas são as termotolerantes, aquelas que se multiplicam em temperatura ótima entre 41 e 43 °C. São termotolerantes as espécies *C. jejuni*, *C. coli*, *Campylobacter lari* e *Campylobacter upsaliensis* (WHO, 2011).

Poucas células de *Campylobacter* são encontradas quando a bactéria é detectada. Se a amostra estiver contaminada com outros micro-organismos, este número pode ser ainda menor (SILVA; AMSTALDEN, 2007) possivelmente devido à competição gerada no ambiente. Segundo Fernandes et al. (2010) e Mena et al. (2008), a dose infectante para ocorrência de infecção pode ser baixa em alimentos. Menos de 500 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de bactérias podem ocasionar a doença em seres humanos (CDC, 2014).

C. jejuni é a espécie mais frequentemente identificada nos casos de gastroenterite bacteriana em diversos países industrializados (EFSA, 2013) e países em desenvolvimento (FERNÁNDEZ, 2011) e também é o patógeno mais envolvido em casos de síndrome de Guillain-Barré (SGB), uma complicação da infecção por *Campylobacter* (POROPATICK; WALKER; BLACK, 2010) ou outras infecções (OMS, 2016). A espécie é considerada a mais virulenta devido à sua maior resistência à fagocitose (MS, 2011).

C. coli é reconhecido como causador de diarreia em 5,0 a 10,0 % de todos os casos de infecção por *Campylobacter*. Na América do Sul o micro-organismo tem sido isolado em 25,0 % dos casos das diarreias produzidas pelas espécies do gênero (FERNÁNDEZ, 2011). Além disso, 30,0 % dos casos de SGB diagnosticados são atribuídos à espécie *C. coli* (POROPATICK; WALKER; BLACK, 2010).

2.2 CAMPILOBACTERIOSE

No Brasil foram notificados cerca de 670 surtos de doenças transmitidas por alimentos somente em 2015. Entre os anos de 2007 e 2016 os sinais e sintomas mais prevalentemente associados a tais surtos foram diarreias, dores abdominais e vômitos. Dos indivíduos com DTA, 0,3 % apresentaram sintomas neurológicos. Cerca de 40,0 % das ocorrências no mesmo período aconteceram em residências. É sabido que mais de 90,0 % dos casos estão relacionados a bactérias. No entanto, mais de 70,0 % dos micro-organismos envolvidos não são identificados (MS, 2016). Apesar das estatísticas apresentadas, acredita-se que os dados mencionados estão subestimados pelas deficiências no sistema de investigação e notificação brasileira.

A campilobacteriose, doença que acomete o homem, ocorre pela ingestão de alimentos manipulados inapropriadamente ou mal cozidos, contaminados por *Campylobacter* spp.. A maior parte dos casos ocorre de forma isolada, como eventos esporádicos (NACHAMKIN, 2001). A bactéria se multiplica no intestino delgado, destrói a mucosa intestinal e invade o epitélio, produzindo inflamação com infiltração de leucócitos na lâmina própria. Pode-se observar a presença de leucócitos nas fezes em 25,0 a 80,0 % dos casos. É observado um período de incubação de dois a dez dias (GIUGNO; ODERIZ, 2010; OBERHELMAN et al., 2003). É uma doença auto-limitante cujo principal sintoma é a diarreia que pode durar de três a cinco dias podendo evoluir para diarreia sanguinolenta com risco de morte (ABU-MADI et al., 2016).

A doença pode ser diagnosticada apenas quando há realização de cultura de fezes do indivíduo com suspeita da patologia (CDC, 2014). Após a infecção pelo micro-organismo, a campilobacteriose em humanos geralmente demora de um a cinco dias para se desenvolver. Já os sintomas permanecem por cinco a sete dias (SCALLAN et al., 2015).

A hidratação é a opção de tratamento da campilobacteriose mais amplamente utilizada. No entanto, a terapia antimicrobiana muitas vezes é requerida (LEE; NEWELL, 2006). Em casos graves e prolongados, o uso de antimicrobianos é bastante comum, apesar da campilobacteriose ser uma doença autolimitada (ALLOS, 2001). Macrolídeos e quinolonas são antibióticos amplamente utilizados no controle da bactéria. No entanto, vários aspectos vêm contribuindo para a resistência a tais grupos de medicamentos (LEHTOPOLKU et al., 2012).

A prevenção da infecção pelo micro-organismo pode ser realizada com práticas simples, como cozinhar todos os produtos avícolas completamente. A carne deve ser cozida de forma homogênea, devendo atingir uma temperatura interna mínima de cerca de 73 °C. As mãos devem ser lavadas com sabão antes de preparar os alimentos. Devem ser lavadas também depois do manuseio de alimentos de origem animal crus, e antes de tocar em qualquer outro alimento, equipamento ou utensílio. A contaminação cruzada na cozinha pode ser evitada usando placas de corte separadas para alimentos de origem animal e de outros alimentos. Além disso, placas de corte, bancadas e utensílios devem ser higienizados com água quente e sabão depois de preparar alimentos crus de origem animal (CDC, 2014).

Calciati et al. (2012) realizaram estudo em escola de Barcelona após um surto que afetou 75 crianças que apresentaram diarreias, dores abdominais, febre, vômitos e náuseas. Após o surto, 45 amostras de fezes de crianças afetadas foram analisadas. Destas, 29 (n=64,4 %) foram positivas para *C. jejuni*. No entanto, análises realizadas na comida e na água foram negativas para todos os micro-organismos, incluindo *Campylobacter* spp.. Autoridades sanitárias encontraram deficiências estruturais na cozinha da escola e no processo de manipulação dos alimentos, como o uso de uma mesma superfície para manipular alimentos crus e cozidos. Além disso, a proximidade entre o equipamento de cortar vegetais e a área de cocção indica que a infecção dos indivíduos ocorreu devido à contaminação cruzada entre preparações elaboradas no local.

Campilobacteriose é a DTA que mais acomete a população na União Européia. Nestes países são notificados mais de 190 mil casos anualmente. Levando-se em conta as subnotificações, acredita-se que ocorram mais de nove milhões de casos da doença por ano, que tem um custo calculado para o sistema público de saúde estimado em 2,4 bilhões de euros. Isto exigiu das autoridades uma abordagem integrada para a segurança dos alimentos desde a produção até o consumo. A ação consiste em medidas de avaliação e gestão de riscos que envolvem diversas esferas do governo e de controle, como a *UE Member States*, *European Commission*, *European Parliament*, *European Food Safety Authority* (EFSA), além da *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC, 2013).

Campylobacter é também classificado como uma das bactérias patogênicas mais importantes nos EUA (SCALLAN et al., 2011). No país, a *Foodborne Diseases*

Active Surveillance Network (FoodNet) indica que cerca de 14 casos de campilobacteriose a cada 100.000 habitantes são diagnosticados anualmente. É sabido, no entanto, que há um elevado número de casos subnotificados ou não declarados. Estima-se que a doença afete 1,3 milhões de pessoas no país anualmente. Além disso, gera cerca de 80 mortes por ano nos EUA. A doença afeta mais crianças e jovens que pessoas de idade mais avançada, e homens são mais infectados que mulheres (CDC, 2014).

A campilobacteriose é mais frequente no verão do que no inverno (CDC, 2014). Sendo assim, bactérias do gênero *Campylobacter* são mais comumente isoladas em estações mais quentes do que nas frias (JORGENSEN et al., 2011). O Brasil, mais especificamente o estado de Goiás, apresenta clima predominantemente tropical. A temperatura média do estado varia entre 18 °C e 26 °C de acordo com o Sistema de Meteorologia e Hidrologia da Secretaria de Ciência e Tecnologia (SIMEHGO/SECTEC). Sendo assim, espera-se que devido ao clima, o estado possa apresentar aspectos favoráveis ao isolamento do micro-organismo durante maior parte do ano. Mas razões que justificam este fenômeno não são completamente elucidadas. Sabe-se, no entanto, que se ocorrem maiores possibilidades de isolamento, as chances de ocorrência de campilobacteriose são também aumentadas.

Diferenças na distribuição geográfica da doença são observadas. A campilobacteriose apresenta-se comum em todas as faixas etárias nos países industrializados, diferentemente dos países em desenvolvimento. Nestes, a doença é menos frequente em indivíduos com mais de dois anos (COKER et al., 2002), possivelmente devido à elevada exposição ambiental ao *Campylobacter*, resultando em infecção precoce seguida de imunidade protetora. Nos países industrializados a exposição é relativamente pouco frequente e a imunidade protetora só é adquirida por alguns grupos com exposição ao micro-organismo (CAWTHRAW et al., 2000).

A SGB é uma doença de caráter auto-imune que acomete, na maioria das vezes, a mielina da porção proximal dos nervos periféricos de forma aguda/subaguda. No Brasil ainda não existem dados epidemiológicos específicos da doença (MS, 2009). Ela ocorre em aproximadamente três a cada 10.000 casos de campilobacteriose (SCALLAN et al., 2015). Neste caso, o sistema imune responde à infecção produzindo anticorpos que reagem de forma cruzada com gangliosídeos na membrana celular nervosa. Esta resposta autoimune resulta em danos aos nervos

ou até mesmo no bloqueio da transmissão do impulso nervoso, podendo resultar em paralisia neuromuscular aguda (BERG et al., 2014). O diagnóstico da SGB é amplo e neurologicamente detalhado (YUKI; HARTUNG, 2012). A síndrome é mais frequente em homens do que em mulheres, apresentando incidência de 0,81 a 1,89 por 100.000 pessoas por ano (SEJVAR et al., 2011). Indivíduos com idade entre 15 e 29 anos, crianças menores de cinco anos e pessoas com sistema imune comprometido estão mais expostas à doença. Uma em cada 1.000 pessoas com deficiências imunológicas infectadas pela bactéria vai a óbito (FDA, 2012). Esta enfermidade pode ter outras causas, mas sabe-se que cerca de 2/3 dos casos de SGB são precedidos por diarreia (POROPATICK; WALKER; BLACK, 2010). Estima-se também que aproximadamente 40,0 % dos casos de SGB podem ser desencadeados por campilobacteriose (CDC, 2014).

2.3 FONTES DE CONTAMINAÇÃO DE CARCAÇAS

Espécies do gênero *Campylobacter* estão amplamente distribuídas na natureza. A maioria é capaz de habitar o trato gastrointestinal de animais de sangue quente, sendo frequentemente encontradas em aves domésticas, bovinos, suínos, ovinos, roedores, pássaros, cães e gatos (NACHAMKIN, 2001). Além disso, *Campylobacter* é um micro-organismo que faz parte da microbiota intestinal dos quatro primeiros grupos de animais mencionados (FDA, 2012). O intestino da ave funciona como um reservatório para *C. jejuni*. Sendo assim, as fezes desses podem servir, antes ou durante o abate, como fonte de contaminação (INGMER, 2010). Além disso, o micro-organismo apresenta afinidade pela superfície da pele do frango (CHANTARAPANONT; BERRANG; FRANK, 2004). Isso, devido à água que se acumula nos folículos da pele e fica disponível, diminuindo a possibilidade da bactéria entrar em contato com o gás carbônico (DAVIS; CONNER, 2007).

Espécies termofílicas estão mais associadas à campilobacteriose por tolerarem temperaturas próximas de 41 °C, valor que corresponde à temperatura do trato gastrointestinal das aves (STERN; LINE; CHEN, 2001). As bactérias do gênero podem se manter viáveis e infectantes para homens e animais por até quatro semanas ou mais em água a 4 °C. Nestas condições, no entanto, o micro-organismo não pode se multiplicar. Células estressadas podem estar em estado viável, mas

não cultivável. Nesta condição elas ainda têm o potencial de infecção (ROSSI; SONCINI; ANTUNES, 2006).

Em estudo de Franchin, Aidoo e Batista (2005) foi evidenciado que diversas fontes de infecção da bactéria em frangos, como a cloaca, água de lavagem das carcaças, gaiolas e penas estavam contaminadas. Tal realidade indica que frangos podem servir como veículo de contaminação de *Campylobacter* antes mesmo de serem abatidos. Outros estudos apontam que a bactéria do trato intestinal pode ser transferida para a pele do frango durante o abate e processamento da ave (WILLIS; MURRAY, 1997). Além disso, durante o processamento, um lote positivo para o *Campylobacter* pode persistir e contaminar os demais lotes, mesmo havendo limpeza e desinfecção diária do frigorífico (PERKO-MAKELA et al., 2009).

Além de bactérias do gênero *Campylobacter*, micro-organismos aeróbios mesófilos e coliformes indicam contaminação de origem entérica e condições higiênicas durante todas as etapas do abate e processamento das aves. Bactérias patogênicas, como a *Salmonella* spp. também podem contaminar as aves durante a criação, manipulação e preparo das carcaças ou durante o abate em praticamente todas as etapas (DIAS, 2015).

As aves que serão abatidas são retiradas das caixas utilizadas no transporte e penduradas na nória pelos pés. Em seguida, passam pelo processo de insensibilização (eletroanestesia ou por gás) e secção da jugular (sangria). Na sequência, ocorre a escaldagem, depena, evisceração, *chiller*, gotejamento, cortes, embalagem (rotulagem) e pesagem, nesta ordem. Por último, as aves são encaminhadas para estocagem e expedição. O corpo inteiro de uma ave após todo o processo de abate onde papo, traquéia, esôfago, intestinos, cloaca, baço, órgãos reprodutores e pulmões tenham sido removidos é o que se chama de carcaça (MA, 1998).

A contaminação de carcaças de frango durante o abate configura um grande desafio. A microbiota intestinal das aves saudáveis, composta por micro-organismos que podem causar doenças em seres humanos, e bactérias presentes nas penas das aves podem ser fontes de contaminação de carcaças e equipamentos em linhas de abate de abatedouros (SILVA, 2013).

Contaminação cruzada entre carcaças é um importante problema durante o processo de depenação. Alguns equipamentos que realizam a retirada das penas trabalham por centrifugação. Sendo assim, durante a rotação pode ocorrer

contaminação cruzada quando o material de carcaças contaminadas entra em contato com outras não contaminadas. Além disso, penas que ficam no equipamento após a depenagem podem contaminar as próximas carcaças da linha de abate. Outro fator preocupante é a possível compressão da carcaça, podendo resultar em expulsão das fezes armazenadas no intestino, com consequente contaminação da carcaça. O momento da evisceração também configura um momento de risco já que pode haver derramamento do conteúdo intestinal. Funcionários que ficam na linha de abate também podem propagar micro-organismos para outras peças ao fazerem uso da mesma faca em diferentes carcaças (SILVA, 2013).

Uma das medidas de controle para diminuir a possibilidade de transmissão de micro-organismos é o não empilhamento de gaiolas para evitar contaminação com sujidades de penas com fezes. Outra importante atitude é a higienização da ave com posterior secagem das mesmas antes da entrada na linha de abate. Vale ressaltar que linhas de abate mais modernas têm diversos equipamentos para diminuir a contaminação do alimento produzido (SILVA, 2013).

O comércio varejista também exerce importante influência sobre a qualidade microbiológica de carnes. Contaminação cruzada por meio de superfícies ou equipamentos contaminados pode acontecer. Desta forma, são necessários cuidados com a manipulação dos alimentos e com o contato com as superfícies potencialmente contaminadas (LOPES, 2009). A organização, sem misturar diferentes tipos de carnes, a correta higienização, o prazo de validade e controle da temperatura das ilhas, balcões refrigerados ou gôndolas de exposição dos mercados para venda é imprescindível. Além disso, estes devem ser dotados de termômetro e estar em perfeitas condições de funcionamento (MS, 2014).

A produção de frango vem mudando seu perfil nas últimas décadas. Existem países com estruturas técnicas adequadas para reprodução do animal. Alguns locais possuem grandes instalações de criação e biossegurança que atuam limitando a contaminação por *Campylobacter*. No entanto, há outras realidades onde as aves são criadas em fazendas com baixos ou nenhum nível de biossegurança. O contato das aves no criatório, durante o transporte e no processo de abate também viabiliza a contaminação cruzada pela bactéria (INGMER, 2010).

2.4 PRODUÇÃO AVÍCOLA

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de frangos de corte e o maior exportador do produto (ABPA, 2016). Segundo projeções do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (2015), a carne de frango é a que apresentará maiores taxas de crescimento da produção no período de 2014/2015 a 2024/2025, quando comparada às demais carnes. Esta deve crescer 3,0 % anualmente.

No Brasil, a avicultura emprega mais de 3,6 milhões de pessoas, direta e indiretamente, e responde por quase 1,5 % do Produto Interno Bruto (PIB) nacional (UBABEF, 2014). O país foi responsável pela produção de 13,14 milhões de toneladas de carne de frango em 2015. Além disso, Goiás representa uma fatia de 7,2 % desta produção, sendo que exportou 206.400 toneladas neste mesmo ano. O Brasil mantém, desde 2004, a posição de maior exportador mundial. Em 2015 a receita das vendas externas de frango atingiu US\$ 7,2 bilhões, sendo que as exportações de frango totalizaram 4,30 milhões de toneladas. Ademais, o brasileiro consumiu, em média, 43,25 kg de frango em 2015. O mercado interno é responsável pelo consumo de 67,3 % da produção (ABPA, 2016).

O melhoramento de linhagens e insumos, investimentos em tecnologias de automatização do sistema produtivo, controle das condições sanitárias de criação, aperfeiçoamento de pessoal quanto ao manejo das aves e sistema de produção integrado são aspectos que estão intimamente ligados à eficiência da cadeia de produção do alimento (MAPA, 2012).

O Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango (PREBAF), inicialmente uma ação planejada de monitoramento da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em *Enterococcus* sp. e *Salmonella* spp. isolados de carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil, foi realizado em 14 estados brasileiros. Entre 2004 e 2006 foram analisadas 2.710 amostras de carcaça de ave. O estudo, realizado pelo Ministério da Saúde, traça um perfil preliminar da resistência bacteriana aos antimicrobianos utilizados na produção de frangos e evidencia a necessidade de iniciar a pesquisa de *Campylobacter* spp.. Tendo em vista que este é um patógeno com comprovada intervenção na cadeia produtiva de frangos, além de ter relevância em saúde pública, o programa pretende incluir este gênero bacteriano e *Listeria*

monocytogenes ao seu escopo de avaliação em uma segunda fase de desenvolvimento (ANVISA, 2012).

Há, no entanto, vários estudos comprovando a contaminação por *Campylobacter* spp. em frangos produzidos no Brasil. Alguns destes estudos estão evidenciados no Quadro 1.

Quadro 1. Estudos realizados no Brasil sobre *Campylobacter*

Autor (ano)	Região do Brasil	Material alvo da análise	Prevalência de contaminação
Tosin e Machado (1995)	Sul (Santa Catarina)	Fezes de Manipuladores de alimentos	6,2 % (n=11) dentre 177 indivíduos pesquisados
Scarcelli et al. (2005)	Sudeste (São Paulo)	Fezes, carcaças, fetos abortados, úteros de humanos e animais	8,0 % (n=66) dentre 828 amostras analisadas
Gomes et al. (2006)	Sul (Rio Grande do Sul)	Fezes de galinha	5,2 % (n=21) dentre 404 amostras testadas
Kuana et al. (2008)	Sul	Frangos de corte durante fases de criação e carcaças	81,8 % (n=90) dentre 110 amostras conteúdos cecais de frango de corte durante criação 98,3 % (n=57) dentre 58 carcaças após o último <i>chiller</i>
Chaves et al. (2010)	Norte (Belém do Pará)	Água do abatedouro, pele, fígado e moela de frango	8,7 % (n=11) de <i>C. jejuni</i> dentre 126 amostras de água, pele, fígado e moela
Almeida e Rezende (2011)	Centro-oeste (Goiás)	Caixas de transporte e calha de evisceração	83,3 % (n=100) de 120 amostras analisadas
Feistel (2013)	Centro-oeste (Goiás)	Carcaças de frango	24,0 % (n=48) dentre as 200 amostras avaliadas
Oliveira (2014)	Centro-oeste (Goiás)	Carcaças de frango	11,0 % (n=11) dentre as 100 amostras avaliadas
Benetti et al. (2014)	Sul (Paraná)	Carne de frango	30,0 % (n=12) dentre 40 amostras analisadas
Hungaro et al. (2015)	Sudeste (Minas Gerais)	Carcaças de frango	16,8 % (n=16) de 95 amostras

2.5 LEGISLAÇÃO RELACIONADA AO *Campylobacter* spp.

Em 1997 a Portaria nº 451, de 19/09/97, considerou que produtos contaminados com *C. jejuni* são potencialmente capazes de causar enfermidades transmitidas por alimentos (MS, 1997). Esta portaria, no entanto, foi revogada pela Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 12/2001, da ANVISA, que não menciona o micro-organismo, não apontando sua patogenicidade. Sendo assim, o Brasil não

possui padrões legais para pesquisa de *Campylobacter* spp. em alimentos (BRASIL, 2001).

Diante da não obrigatoriedade da pesquisa e das metodologias de isolamento e caracterização diferentes daquelas utilizadas na pesquisa dos enteropatógenos bacterianos tradicionais, como *Salmonella*, *Shigella* e *Escherichia coli*, além do seu elevado custo, a pesquisa de *Campylobacter* spp. não é rotina nos laboratórios oficiais. Assim, a bactéria não é investigada na maioria dos casos de gastroenterites bacterianas ocorridos no Brasil.

2.6 TESTES PARA IDENTIFICAÇÃO DO MICRO-ORGANISMO

O plaqueamento direto facilita o isolamento de *Campylobacter* spp. por inibir a proliferação exacerbada de contaminantes naturalmente presentes na amostra através do uso de antibióticos específicos. Entretanto, é descrito como não suficientemente sensível para a detecção em amostras com baixa concentração do micro-organismo. O enriquecimento seletivo favorece o isolamento de *Campylobacter* nestas amostras (THEOPHILO; JAKABI, 2008). Assim, a combinação do plaqueamento direto e do enriquecimento em caldo Bolton por 24 horas pode ser avaliada para aumentar a probabilidade de isolamento (VOSS-RECH; VAZ, 2012). O caldo Bolton é considerado mais sensível que o caldo Preston, também um suplemento seletivo, para detecção de *Campylobacter* em amostras de frango. Além disso, o caldo Bolton pode ser suplementado com inibidores de β -lactamase ou agentes antibacterianos (SELIWIORSTOWA et al., 2016).

O desenvolvimento de novos meios seletivos ou incorporação de outros antimicrobianos aos meios já existentes para solucionar ou minimizar a interferência da microbiota contaminante faz-se necessária (BENETTI et al., 2014). Tal microbiota pode ser composta por *Pasteurella multocida*, *Micrococcus roseus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter diversus*, *Proteus mirabilis* e *E. coli* (SCHOENI; DOYLE, 1992).

Os métodos convencionais de isolamento da bactéria podem levar até dez dias para serem finalizados. Além disso, a discriminação das espécies *C. coli* e *C. jejuni* são baseadas em apenas um teste fenotípico, a capacidade de hidrólise do

hipurato. No entanto, *C. jejuni*, espécie capaz de hidrolisar o hipurato, não o faz em 10,0 % dos isolados analisados (ENGLEN; LADELY; FEDORKA-CRAY, 2003). A identificação fenotípica apresenta limitação também devido ao crescimento fastidioso, assacarolítico e existência de isolados bioquimicamente atípicos, o que prejudica o uso dos testes bioquímicos diferenciais (ALVES; OLIVEIRA, 2013).

Outras características, como atividade hemolítica, são úteis mas não auxiliam na discriminação de espécies e geralmente não são utilizadas nas análises clínicas laboratoriais (STEINHAUSEROVA et al., 2001). Existe também uma grande dificuldade de se recuperar a atividade das células de *Campylobacter* pelos métodos recomendados pela *International Organization for Standardization* (ISO, 2006). Sendo assim, testes moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) são uma boa alternativa para identificação do micro-organismo. Ensaio de PCR têm sido descritos para a identificação e caracterização de *Campylobacter* em amostras de alimentos (SAILS et al., 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a prevalência de *Campylobacter* termotolerantes em carcaças de frango refrigeradas e congeladas de abatedouros de Goiás e pontos de venda no município de Goiânia, Goiás.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar espécies de *Campylobacter* termotolerantes em amostras de carcaça de frango refrigeradas obtidas em abatedouros de Goiás;
- Isolar e identificar espécies de *Campylobacter* termotolerantes em amostras de carcaça de frango refrigeradas e congeladas advindas dos abatedouros pesquisados, comercializadas em açougues ou mercados de Goiânia e Região Metropolitana;
- Avaliar a viabilidade da bactéria após congelamento por 21 dias.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 TIPO DE PESQUISA

O estudo é do tipo observacional analítico.

4.2 LOCAL DE COLETA E AMOSTRAGEM

Para a realização do estudo e obtenção das amostras junto aos abatedouros e comércios foi firmada uma parceria (Apêndice C e D) entre a Faculdade de Nutrição (FANUT) da Universidade Federal de Goiás (UFG), a Agência Goiana de Defesa Agropecuária (AGRODEFESA) e a Divisão de Fiscalização de Alimentos do Departamento de Vigilância Sanitária Municipal (VISA) de Goiânia.

O estudo foi realizado em duas etapas. Em um primeiro momento a pesquisa aconteceu nos abatedouros cadastrados na AGRODEFESA do Estado de Goiás. Foram selecionados todos os abatedouros ($n=4$) sob inspeção estadual que se situam a uma distância que permitiu o transporte das amostras em tempo hábil com conservação de suas características. E, posteriormente, realizado em estabelecimentos varejistas de Goiânia, cadastrados na Vigilância Sanitária do Município, e Região Metropolitana de Goiânia que comercializam carcaças de frango dos abatedouros alvos da coleta da primeira etapa.

Os abatedouros selecionados, além de fornecerem as amostras para análise, indicaram todos os estabelecimentos com os quais comercializam os alimentos para que fossem coletadas amostras em seus pontos de venda. Diante do fato de alguns abatedouros terem apenas quatro pontos de venda, estabeleceu-se que a segunda etapa seria realizada neste número de estabelecimentos para cada frigorífico, desde que atendesse pelo menos 10,0 % do número de pontos de venda de cada frigorífico.

Nos abatedouros foram coletadas duas amostras em cada visita, que foram acondicionadas em sacos plásticos esterilizados codificados, para garantir a privacidade do estabelecimento, sempre na etapa de gotejamento (Figura 1). Quatro pontos de venda de cada abatedouro foram visitados em um segundo momento. Em

cada estabelecimento comercial foram coletadas amostras de carcaças preferencialmente resfriadas dispostas em embalagens para comercialização, como unidades amostrais.

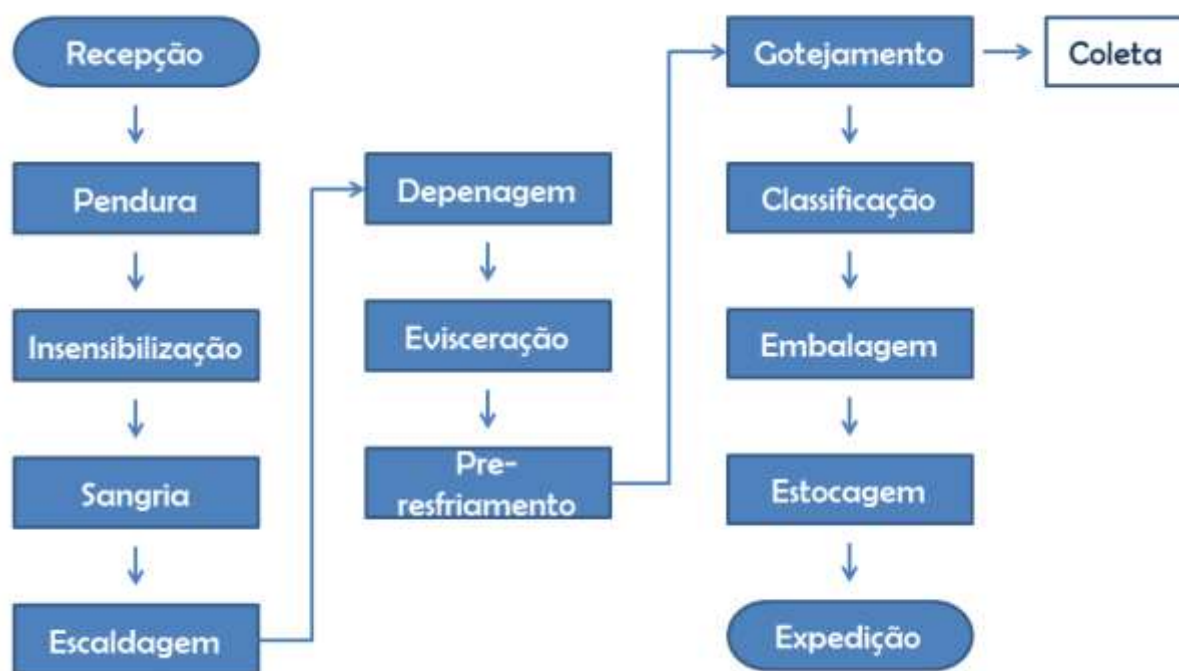


Figura 1. Fluxograma de abate e coleta de amostras em abatedouros

4.3 COLETA DAS AMOSTRAS

Os quatro abatedouros foram visitados pelos pesquisadores semanalmente, conforme Quadro 2, com agendamento e aviso prévio aos proprietários dos estabelecimentos. Apenas na primeira visita a cada estabelecimento os pesquisadores foram acompanhados por um fiscal da AGRODEFESA, responsável pela inspeção de aves. Ao final, cada abatedouro foi visitado quatro vezes, totalizando 12 visitas.

Quadro 2. Esquema de coleta nos abatedouros

Semana 1 Abatedouro C Dia: 04/05/15	Semana 2 Abatedouro D Dia: 11/05/15	Semana 3 Abatedouro A Dia: 18/05/15	Semana 4 Abatedouro B Dia: 25/05/15
Semana 5 Abatedouro C Dia: 01/06/15	Semana 6 Abatedouro D Dia: 08/06/15	Semana 7 Abatedouro A Dia: 15/06/15	Semana 8 Abatedouro B Dia: 22/06/15
Semana 9 Abatedouro C Dia: 29/06/15	Semana 10 Abatedouro D Dia: 06/07/15	Semana 11 Abatedouro A Dia: 13/07/15	Semana 12 Abatedouro B Dia: 20/07/15

As coletas foram realizadas pelo funcionário responsável pelo último momento do gotejamento da ave, momento que precede a embalagem. As carcaças de frango, com cerca de 2.500 g cada, foram coletadas ainda nos ganchos da nória. O funcionário responsável pela coleta recebeu, previamente, um documento com o passo-a-passo da técnica de coleta (Apêndice A).

Foram coletadas assepticamente, duas unidades de carcaça por abatedouro. As amostras coletadas foram imediatamente codificadas e transferidas para um recipiente isotérmico contendo placas de gelo reciclável, para evitar quaisquer alterações nos alimentos devido à temperatura ambiente, e transportadas ao laboratório em um prazo máximo de duas horas.

Os estabelecimentos comerciais foram visitados no mês de setembro de 2015 pelos pesquisadores e acompanhados por um fiscal de saúde pública da VISA do Município, exceto aqueles que se situavam em outro município. Nestes, os pesquisadores coletaram uma amostra congelada ou resfriada, dependendo da condição de armazenamento do local, sendo a amostra imediatamente transferida para um recipiente isotérmico contendo placas de gelo reciclável e transportadas ao laboratório em um prazo máximo de duas horas. Ao final, foram coletadas amostras em 16 pontos de venda.

4.4 LOCAL DAS ANÁLISES

As análises foram realizadas no Laboratório de Controle Higiênico Sanitário de Alimentos (LACHSA)/FANUT, nos Laboratórios Multiusuários e no Laboratório de Bacteriologia Aplicada (LABAP) do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da UFG.

4.5 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Uma das amostras de carcaça inteira coletada nos abatedouros e nos pontos de venda foi imediatamente processada ao chegar ao LACHSA/FANUT, para pesquisa de *Campylobacter* spp.. Para obtenção das alíquotas das amostras, foi utilizada a técnica de rinsagem de superfície (APHA, 2001) onde a amostra é massageada por 10 minutos em água peptonada. A técnica é utilizada para amostras de frango ou grandes pedaços de alimento.

Para avaliação da viabilidade dos isolados em carcaça de frango pós-congelamento rápido, a outra amostra coletada no abatedouro foi destinada ao resfriador/ congelador rápido. Assim que esta atingiu temperatura de -18 °C no congelador em questão, foi transferida para congelador convencional com temperatura média de -10 °C, onde foi armazenada por 21 dias. Após este período, a amostra foi transferida para refrigerador convencional (4 °C) onde permaneceu cerca de 12 horas para que ocorresse o descongelamento do produto, visando menor dano das possíveis células viáveis do micro-organismo em questão. Na sequência, a carcaça foi processada seguindo a mesma técnica das demais para avaliação da resistência de *Campylobacter* spp. ao congelamento. Sendo assim, foram analisadas 40 amostras nas duas etapas da pesquisa, incluindo aquelas que foram congeladas para análise da viabilidade do micro-organismo após o acondicionamento em baixas temperaturas.

4.6 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA DE *Campylobacter* TERMOTOLERANTES

As análises das amostras foram realizadas segundo método presença/ausência de *Campylobacter* da ISO 10272-1: 2006 (ISO, 2006). À carcaça acondicionada em saco plástico esterilizado foi acrescido 250 mL de água peptonada 0,1 %. O conjunto foi então massageado por 10 minutos. Uma alíquota de 10 mL da água peptonada de rinsagem foi adicionada a 90 mL de caldo Bolton que foi então incubado em estufa a 37 ± 1 °C em microaerofilia, com o auxílio de sachês de geração de atmosfera específica para *Campylobacter*. Após 4 - 6 h foi transferido para estufa a $41,5 \pm 1$ °C por 44 ± 4 h.

De cada cultura em caldo Bolton, foi estriada uma alçada (estrias de esgotamento) em Ágar Carvão Cefoperazona Desoxicolato Modificado (mCCDA), sendo em seguida incubadas a $41,5 \pm 1$ °C/ 44 ± 4 h, em atmosfera microaerófila. Após o período de incubação, uma colônia típica (Figuras 2 e 3) foi estriada (estrias de esgotamento) em placa de ágar Columbia Sangue (CBA), para purificação, sendo posteriormente incubada nas mesmas condições anteriormente descritas. Após a incubação, a cultura em CBA foi utilizada para a realização dos testes de confirmação, ou seja, morfologia e motilidade; teste de crescimento a 25 °C em atmosfera microaerófila; teste de crescimento a 41,5 °C em atmosfera aeróbica e teste de oxidase.

Foram realizados também testes para identificação de espécie, sendo eles teste de catalase, teste de sensibilidade à cefalotina e ao ácido nalidíxico, teste de hidrólise de hipurato e teste de hidrólise do indoxil acetato. Durante todas as análises das amostras foram utilizadas cepas padrão para teste positivo: cepas de *C. jejuni* biotipo I e II obtidas da Fundação André Tosello; cepas de *C. jejuni* biotipo I (Campy 1053) e II (Campy 1051), *C. coli* biotipo I (Campy 777) e II (Campy 776) e *C. lari* (Campy 1012) obtidas da Fundação Oswaldo Cruz. O Quadro 3 mostra as características esperadas das espécies *Campylobacter* termotolerantes nos testes de identificação.



Figura 2. Colônias típicas de *Campylobacter* spp. em ágar Columbia sangue: aparência mucóide, de pequena a média dimensão, geralmente com coloração acinzentada e não hemolíticas



Figura 3. Colônias típicas de *Campylobacter* spp em ágar mCCDA: colônias acinzentadas, com brilho metálico, planas e úmidas

Quadro 3. Características esperadas das espécies de *Campylobacter* termotolerantes nos testes de identificação

Teste	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>
Catalase	+	+	+	- ou levemente +
Sensibilidade ao ácido nalidíxico	S ^a	S ^a	V	S
Sensibilidade à cefalotina	R	R	R	S
Hidrólise do hipurato (Figura 4)	+	-	-	-
Hidrólise do indoxil acetato	+	+	-	+

^a Tem sido observada elevação na resistência.

-: negativo; +: positivo; V: variável; R: resistente; S: sensível

Fonte: ISO 10272-1: 2006

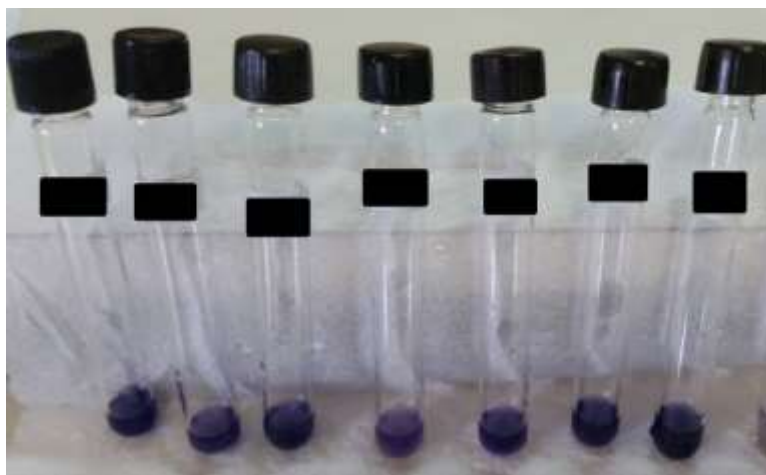


Figura 4. Teste de hidrólise do hipurato

4.7 ARMAZENAMENTO DOS ISOLADOS E CEPAS PADRÃO

Alíquotas do crescimento em mCCDA dos isolados suspeitos, aquelas que apresentaram morfologia de pequenos bastonetes curvos, motilidade tipo “saca rolha” e teste de oxidase positiva, foram depositadas em *ependorf* contendo 1 mL de solução de glicerol peptona (Apêndice B). Foram então acondicionadas em freezer de temperatura ultra baixa a -80°C . Junto aos isolados foram armazenadas as cepas padrão. Depois de 10 a 13 meses (variação devido ao tempo das coletas), todas as amostras suspeitas foram estriadas em ágar Müller Hinton Sangue e incubadas por 24 h em microaerofilia. Foram em seguida analisadas pela técnica PCR convencional para confirmação da espécie.

4.8 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

4.8.1 Extração do DNA

Para extração do DNA genômico dos isolados foi usada a técnica de Wang et al. (2002) com modificações. Uma alçada da amostra repicada em ágar Müller Hinton foi ressuspensa em 50 μL de tampão TE 1 X (10 mM Tris pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8,0;) em *ependorf* de 1,5 mL. Em seguida, fez-se a centrifugação a 15.000 g/2 min a 4°C . O *pellet* foi ressuspensa em 50 μL do mesmo tampão. A desnaturação em água fervente por 10 minutos foi feita na sequência, com posterior

agitação. A solução foi novamente centrifugada (15.000 g/5 min, 4 °C). Foram então recolhidos 50 µL do sobrenadante, que foi dispensado em um segundo *ependorf*, onde foram adicionados mais 50 µL de TE 1 X e utilizados como DNA *template* para as reações de PCR.

4.8.2 PCR convencional para identificação de espécies de *Campylobacter*

Para a identificação da espécie *C. jejuni* foi utilizado como alvo o gene da hipuricase (*hipO*) (LINTON et al., 1997). Já para *C. coli* foi utilizado como alvo o gene da serina hidroximetiltransferase (*glyA*) (LAGIER et al., 2004). Para a identificação da espécie *C. lari* foi utilizado o mesmo alvo do *C. coli* (*glyA*) (WANG et al., 2002). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR estão descritos no Quadro 4.

Quadro 4. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de *Monoplex* PCR

Genes	Sequência dos oligonucleotídeos	Pares de base	Autor
<i>C. coli</i> <i>glyA</i>	F ¹ – 5' CATATTGTAAAACCAAAGCTTATCGG 3'	133 pb	(LAGIER et al., 2004)
	R ² – 5' AGTCCAGCAATGTGTGCAATG 3'		
<i>C. lari</i> <i>glyA</i>	F ¹ – 5' TAGAGAGATAGCAAAAGAGA 3'	251 pb	(WANG et al., 2002)
	R ² – 5' TACACATAATAATCCCACCC 3'		
<i>C. jejuni</i> <i>hipO</i>	F ¹ – 5' GAAGAGGGTTTGGGTGGTG 3'	735 pb	(LINTON et al., 1997)
	R ² – 5' AGCTAGCTTCGCATAATAACTTG 3'		

¹Forward; ²Reverse

O ensaio foi realizado de acordo com Linton et al. (1997) com modificações, em volume total de 25 µL utilizando:

- Tampão de reação 5X (20 mM Tris-HCl, pH 8,4; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂);
- 200 µM de cada dNTP;
- 2,5 mM MgCl₂;
- 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador;
- 5,0 U de Taq DNA polimerase;
- 10 a 100 ng do DNA *template*.

A reação de PCR foi realizada em termociclador nas seguintes condições: 95 °C por 5 minutos, 30 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 59 °C por 50 segundos, 72 °C por

50 segundos, seguido de extensão adicional a 72 °C por 7 minutos. A temperatura ao final foi mantida a 4 °C.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5 % em tampão Tris-Borato-EDTA 0,5 X por 30 minutos a 50 V, seguido de 80 minutos a 80 V. O marcador de 50 bp foi utilizado como padrão de peso molecular. Um controle negativo, com mistura do PCR sem DNA, foi incluído em todos os géis. Como controles positivos foram empregadas as cepas padrão de *C. jejuni* ATCC 33560, *C. coli* ATCC 43478 e *C. lari* ATCC 35221. O gel foi corado com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL visualizado e fotografado sob transiluminação ultravioleta no sistema Molecular Imager GelDoc XR (Bio-Rad).

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada análise descritiva dos dados obtidos por meio de frequência e porcentagens.

4.10 ASPECTOS ÉTICOS

Foi garantido total sigilo aos estabelecimentos alvos da coleta de amostras. Foi criado um código para identificação de cada local visitado.

Ao final da pesquisa, cada estabelecimento receberá os resultados da análise microbiológica de suas amostras. Independentemente dos dados encontrados, os resultados codificados serão divulgados em reuniões científicas e publicações da área. Os estabelecimentos participantes da pesquisa não receberão nenhum tipo de punição, remuneração ou gratificação financeira. Toda a pesquisa foi realizada de acordo com os termos e condições da Resolução nº 466/2012 (BRASIL, 2013).

REFERÊNCIAS

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal (Brazilian Association of Animal Protein). **Annual Report 2016**. 2016. 132 p. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/storage/files/abpa_relatorio_anual_2016_ingles_web-versao_para_site_abpa_bloqueado.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2017.

ABU-MADI, M.; JERZY M. BEHNKE, J. M.; SHARMA, A.; BEARDEN, R.; AL-BANNA, N. Prevalence of Virulence/Stress Genes in *Campylobacter jejuni* from Chicken Meat Sold in Qatari Retail Outlets. **PloS One**, San Francisco, v.11, n.6, p. 1-15, 2016.

ALLOS, B. M. *Campylobacter jejuni* infections: update on emerging issues and trends. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v. 32, p. 201-206, 2001.

ALMEIDA, T. L.; REZENDE, C. S. M. *Campylobacter* spp. em ambiente de abate de aves do estado de Goiás: identificação e avaliação da suscetibilidade a antimicrobianos. In: 63ª Reunião Anual da SBPC, 2011, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 2011.

ALVES, J.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Presence of *Campylobacter* spp. in refrigerated chicken cuts. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 6, p. 2829-2836, 2013.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Relatório de pesquisa em vigilância sanitária de alimentos**: monitoramento da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em enterococos e salmonelas isolados de carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil. 1 ed. Brasília: ANVISA, 2012. 171 p. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/395481/Relat%25C3%25B3rioPrebaf-vers%25C3%25A3ofinal-mar2012.pdf/f6bb5296-e633-4f7b-b81f-48a99430da6a>>. Acesso em: 12 abr. 2016.

APHA - American Public Health Association. **Compendium of methods for the microbiological examination for foods**. Washington, 2001. 4 ed. 676 p.

BENETTI, T. M.; ABRHÃO, W. M.; FERRO, I. D.; MACEDO, R. E. F.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Avaliação de diferentes alíquotas de enxaguadura para a contagem pelo método direto de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango resfriadas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 73, n. 4, p. 372-376, 2014.

BERG, B. V. D.; WALGAARD, C.; DRENTHE, J.; FOKKE, C.; JACOBS, B. C.; DOORN, P. A. V. Guillain-Barré syndrome: pathogenesis, diagnosis, treatment and prognosis. **Nature Reviews Neurology**, London, v. 10, p. 469-482, 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001**. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial da União, Brasília, 2001.

BRASIL. Conselho Nacional de Saúde. **Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012**. Aprova normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Diário Oficial da União, Brasília, 2013.

BRASIL, Ministério da Agricultura. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Portaria nº 210 de 10 de novembro de 1998**. Brasília, 1998, 34 p. Disponível em: <<http://www.cidasc.sc.gov.br/inspecao/files/2012/08/port-210.pdf>>. Acesso em: 09 nov. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Instrução Normativa DIVISA/SVS Nº 4 DE 15/12/2014**. Aprova o regulamento técnico sobre boas práticas para estabelecimentos comerciais de alimentos e para serviços de alimentação, e o roteiro de inspeção, anexo. Brasília, 2014. Disponível em: <<https://www legisweb.com.br/legislacao/?id=281122>>. Acesso em: 30 dez. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 451, de 19 de setembro de 1997**. Revogada pela Resolução nº 12, de 02/01/01. Brasília, 1996. 9 p. Disponível em: <<http://www.ipef.br/legislacao/bdlegislacao/detalhes.asp?Id=9643>>. Acesso em: 12 jan. 2017.

CALCIATI, E.; LAFUENTE, S.; SIMÓ, M. D.; BALFAGON, P.; BARTOLOMÉ, R.; CAYLÀ, J. A *Campylobacter* outbreak in a Barcelona school. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, Barcelona, v. 30, n. 5, p. 243-245, 2012.

CAWTHRAW, S. A. L.; LIND, L.; KAIJSER, B.; NEWELL, D. G. Antibodies, directed towards *Campylobacter jejuni* antigens, in sera from poultry abattoir workers. **Clinical and Experimental Immunology**, London, v. 122, n. 55-60, 2000.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. **Foodborne Illness A-Z: Campylobacter**. 2014. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/foodsafety/diseases/campylobacter/index.html>>. Acesso em: 05 abr. 2016.

CHANTARAPANONT, W.; BERRANG, M. E.; FRANK, J. F. Direct microscopic observation of viability of *Campylobacter jejuni* on chicken skin treated with selected chemical sanitizing agents. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 67, n. 6, p. 1146–1152, 2004.

CHAVES, S. O. C.; SOUZA, C. O.; FREITAS, J. A.; SANTOS, D. D.; ARAÚJO, C. V.; SILVA, R. R. Ocorrência de *Campylobacter* em granjas e abatedouro avícolas na mesorregião metropolitana de Belém, PA, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 3, 2010.

COKER, A. O.; ISOKPEHI, R. D.; THOMAS, B. N.; AMISU, K. O.; OBI, C. L. Human campylobacteriosis in developing countries. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 8, p. 237-244, 2002.

DAVIS, M. A.; CONNER, D. E. Survival of *Campylobacter jejuni* on poultry skin and meat at varying temperatures. **Poultry Science**, Oxford, v. 86, p. 765-767, 2007.

DIAS, M. R. **Rastreamento molecular de *Salmonella* spp. e contaminação microbiológica na linha de abate e processamento de frangos de corte.** 2015. 99 f. Dissertação (mestrado em Medicina Veterinária II) – Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.

DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. **Prokaryotic Nomenclature Up-to-Date.** Braunschweig: Germany. Disponível em: <<https://www.dsmz.de/bacterial-diversity/prokaryotic-nomenclature-up-to-date/prokaryotic-nomenclature-up-to-date.html>>. Acesso em: 02 ago. 2016.

EFSA – European Food Safety Authority. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and foodborne outbreaks in 2011. **EFSA Journal**, v. 11, n. 4, 3129 p, 2013.

ENGLEN, M. D.; LADELY, S. R.; FEDORKA-CRAY, P. J. Isolation of *Campylobacter* and identification by PCR. **Methods in Molecular Biology**, Totowa, v. 216, p. 109–121, 2003.

FDA – Food and Drug Administration. **Handbook - Bad Bug Book/ Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins: *Campylobacter jejuni*.** 2012. Disponível em: <<http://www.fda.gov/food/foodborneillnesscontaminants/causesofillnessbadbugbook/ucm070024.htm>>. Acesso em: 25 fev. 2015.

FEISTEL, J. C. **Caracterização de *Campylobacter* spp. isoladas em carcaças de frango.** 2013. 97 f. Dissertação (mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

FERNANDES, M.; MENA, C.; SILVA, J.; TEIXEIRA, P. Study of cytolethal distending toxin (cdt) in *Campylobacter coli* using a multiplex polymerase chain reaction assay and its distribution among clinical and food strains. **Foodborne Pathogens and Disease**, New Rochelle, v. 7, n. 1, p. 103-106, 2010.

FERNÁNDEZ, H. *Campylobacter* y campylobacteriosis: uma mirada desde América del Sur. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, Lima, v. 28, n. 1, p. 121-127, 2011.

FERNÁNDEZ, H.; GIUSTI, G.; BERTOGLIO, J. C. Effect of the complement system on the sensitivity of *Campylobacter coli* to human blood serum. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 28, n. 2, p. 227-229, 1995.

FERNÁNDEZ, H.; VERGARA, M.; TAPIA, F. Dessication resistance in thermotolerant *Campylobacter* species. **Infection**, Heidelberg, v. 13, n. 3, 197 p., 1985.

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

GIUGNO, S; ODERIZ, S. Etiología bacteriana de la diarrea aguda en pacientes pediátricos. **Acta Bioquímica Clínica Latino-americana**, La Plata, v. 44, n. 1, p. 63-69, 2010.

GOMES, F. R.; CURCIOI, B. R.; LADEIRAI, S. R. L.; FERNÁNDEZ, H.; MEIRELES, M. C. A. *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, 2006.

HERNÁNDEZ, C.; AGUILERA, M.; CASTRO, G.; *Campylobacter jejuni*: una bacteria olvidada?, situación en México. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología**, México, v. 33, n. 2, p. 77-82, 2013.

HUNGARO, H. M.; MENDONÇA, R. C. S.; ROSA, V. O.; BADARÓ, A. C. L.; MOREIRA, M. A. S.; CHAVES, J. B. P. Low contamination of *Campylobacter* spp. on chicken carcasses in Minas Gerais state, Brazil: Molecular characterization and antimicrobial resistance. **Food Control**, Vurrey, v. 51, p. 15–22, 2015.

INGMER, H. Challenges of *Campylobacter jejuni* in poultry production. International – Short Communication. **Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 145, 1 p., 2010.

IOC – Instituto Oswaldo Cruz. **Coleção de *Campylobacter***. Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=342>>. Acesso em: 20 maio 2016.

ISO - INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Microbiology of food and animal feeding stuffs** – Horizontal method for detection and enumeration of thermotolerant *Campylobacter* spp. – Part 1: detection method. (ISO 10272-1:2006), Geneva, 16 p., 2006.

JORGENSEN F.; ELLIS-IVERSEN, J.; RUSHTON, S.; BULL, S. A.; HARRIS, S. A.; BRYAN, S. J.. Influence of season and geography on *Campylobacter jejuni* and *C. coli* subtypes in housed broiler flocks reared in Great Britain. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, p. 3741–3748, 2011.

KUANA, S. L.; SANTOS, L R.; BEATRIZ, L.; SALLE, C. T. P.; MORAES, H. L. S.; NASCIMENTO, V. P. Ocorrência de *Campylobacter* em 75 frangos de corte e nas carcaças correspondentes. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 9, n. 2, p. 480-486, 2008.

LAGIER, M. J.; JOSEPH, L. A.; PASSARETTI, T. V.; MUSSER, K. A.; CIRINO, N. M. A real-time multiplexed PCR assay for rapid detection and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 18, p. 275–282, 2004.

LEE, M. D.; NEWELL, D. G. *Campylobacter* in Poultry: filling an ecological niche. **Avian Diseases**, Amherst, v. 50, n. 1, p. 1-9, 2006.

LEHTOPOLKU, M.; KOTILAINEN, P.; PUUKKA, P.; NAKARI, U.; SIITONEN, A.; EEROLA, E. Inaccuracy of the disk diffusion method compared with the agar dilution method for susceptibility testing of *Campylobacter* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 50, p. 52-56, 2012.

LINTON, D.; LAWSON, A. J.; OWEN, R. J.; STANLEY, J. PCR Detection, Identification to Species Level, and Fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Direct from Diarrheic Samples. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, n. 10, p. 2568- 2572, 1997.

LOPES, G. V. ***Campylobacter* spp. no abate a varejo: ocorrência em carcaças de bovinos para exportação e em cortes refrigerados de aves e bovinos**. 2009. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Brasil Projeções do Agronegócio 2011/12 a 2021/22**. Brasília, 2012, 50 p. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Ministerio/gestao/projecao/Projecoes%20do%20Agronegocio%20Brasil%202011-20012%20a%202021-2022%20\(2\)\(1\).pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Ministerio/gestao/projecao/Projecoes%20do%20Agronegocio%20Brasil%202011-20012%20a%202021-2022%20(2)(1).pdf)>. Acesso em: 05 out. de 2016.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeções do Agronegócio: Brasil 2014/15 a 2024/25**. Brasília, 2015, 133 p. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/PROJECOEES_DO_AGRONEGOCIO_2025_WEB.pdf>. Acesso em: 07 nov. de 2016.

MENA, C.; RODRIGUES, D.; SILVA, J.; GIBBS, P.; TEIXEIRA, P. Occurrence, identification, and characterization of *Campylobacter* species isolated from portuguese poultry samples collected from retail establishments. **Poultry Science**, Oxford, v. 8, p. 167-190, 2008.

MS – MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial de *Campylobacter***. Brasília, 2011, 42 p. Disponível em: <<http://u.saude.gov.br/images/pdf/2015/janeiro/09/manual-tecnico-diagnostico-laboratorial-campylobacter.pdf>>. Acesso em: 01 jan 2016.

MS - MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil**. Brasília, 2016, 19 p. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/08/Apresenta----o-Surtos-DTA-2016.pdf>>. Acesso em: 12 out. 2016.

MS – MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas: Síndrome de Guillain-Barré**. Portaria SAS/ MS nº 497, de 23 de dezembro de 2009. p. 545-563. Disponível em: <<http://www.saude.ba.gov.br/novoportal/images/stories/PDF/protocolo-sindrome-guillain-barre-livro-2009.pdf>>. Acesso em: 09 nov. 2016.

NACHAMKIN, I. *Campylobacter jejuni*. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R. MONTVILLE, T. J. **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**, Washington (DC): ASM Press. 2001. cap. 9, p. 179-192.

OBERHELMAN, R. A.; GILMAN, R. H.; SHEEN, P.; CORDOVA, J.; TAYLOR, D. N.; ZIMIC, M.; MEZA, R. PÉREZ, J.; LEBRON, C. CABRERA. L.; RODGERS, F. G.; WOODWARD, D. L.; PRICE, L. J. *Campylobacter* transmission in a Peruvian shantytown: a longitudinal study using strain typing of *Campylobacter* isolates from chickens and humans in household clusters. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 187, n. 2, p. 260-269, 2003.

OLIVEIRA, J. J. **Isolamento e caracterização de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango e ovos comerciais**. 2014. 80 f. Dissertação (mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE). **Identificação e gestão da síndrome de Guillain-Barré no contexto do Vírus Zika**. Orientações provisórias. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204474/5/WHO_ZIKV_MOC_16.4_por.pdf>. Acesso em: 05 nov. 2016.

PAYOT, S.; BOLLA, J.; CORCORAN, D.; FANNING, S.; MGRAUD, F.; ZHANG, Q. Mechanism of fluoroquinolone and macrolide resistance in *Campylobacter* spp. **Microbes and Infection**, Paris, v. 8, p. 1967-1972, 2006.

PERKO-MAKELA, P.; ISOHANNI, P.; KATZAV, M.; LUND, M.; HANNINEN, M. L.; LYHS, U. A longitudinal study of *Campylobacter* distribution in a turkey production chain. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, v. 51, n. 18, 10 p., 2009.

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

ROSSI, D. A.; SONCINI, R. A.; ANTUNES, R. C. **Transmissão vertical de *Campylobacter* sp em um sistema de produção avícola**. 2006. 65 f. Dissertação – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006. Disponível em: < http://www.avisite.com.br/cet/img/20080826_sanidade_belchiolina.pdf>.

SAILS, A. D.; FOX, A. J.; BOLTON, F. J.; WAREING, D. R.; GREENWAY, D. L. A real-time PCR assay for the detection of *Campylobacter jejuni* in foods after enrichment culture. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 1383-1390, 2003.

SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R. M.; ÂNGULO, F. J.; TAUXE, R. V.; WIDDOWSON, M. A.; ROY, S. L.; JONES, J. L.; GRIFFIN, P. M. Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 17, n. 1, p. 16-22, 2011.

SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R. M.; MAHON, B. E.; JONES, T. F.; GRIFFIN, P. M. An assessment of the human health impact of seven leading foodborne pathogens in the United States using disability adjusted life years. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 143, p. 2795-2804, 2015.

SCARCELLI, E.; PIATTI, R. M.; HARAKAVAI, R.; MIYASHIRO, S.; FERNANDES, F. M. C.; CAMPOS, F. R.; FRANCISCO, W.; GENOVEZ, M. E.; RICHTZENHAIN, L. J. Molecular subtyping of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* strains isolated from different animal species in the state of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 36, n. 4, p. 378–382, 2005.

SCHOENI, J. L.; DOYLE, M. P. Reduction of *Campylobacter jejuni* colonization of chicks by cecum-colonizing bacteria producing anti-*C. jejuni* metabolites. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 2, p. 664-670, 1992.

SEJVAR, J. J.; BAUGHMAN, A. L.; WISE, M.; MORGAN, O. W. Population incidence of Guillain–Barré syndrome: a systematic review and meta analysis. **Neuroepidemiology**, Basel, v. 36, p. 123–133, 2011.

SELIWIORSTOWA, T.; ZUTTER, L.; HOUF, K.; BOTTELDOORN, N.; BARÉ, J.; DAMME, I. V. Comparative performance of isolation methods using Preston broth, Bolton broth and their modifications for the detection of *Campylobacter* spp. from naturally contaminated fresh and frozen raw poultry meat. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 234, p. 60–64, 2016.

SILVA, M. V. Slaughtering and processing. In: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). **Poultry Development Review**. Rome: FAO. 2013. p. 18-21. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/019/i3531e/i3531e.pdf>>. Acesso em: 12 abr. 2016.

SILVA, N.; AMSTALDEN, V. C. **Detecção de *Campylobacter***: Manual de métodos de análise microbiológica. São Paulo: Livraria Varela, p. 142-148, 2007.

SMITH, D.; NORTHCUTT, J.; CASON, J.; HINTON, A.; BUHR, R.; INGRAM, K. Effect of external or internal fecal contamination on numbers of bacteria on prechilled broiler carcasses. **Poultry Science**, Edinburgh, v. 86, p. 1241-1244, 2007.

STEINHAUSEROVA, I.; CESKOVA, J.; FOJTIKOVA, K.; OBROVSKA, I. Identification of thermophilic *Campylobacter* spp. by phenotypic and molecular methods. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 90, p. 470-475, 2001.

STERN, N. J.; LINE, J. E.; CHEN, H. C. *Campylobacter* In: DOWNES, F. P., ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4. ed. Washington (DC): APHA, 2001. cap. 31, p. 301-310.

THEOPHILO, G. N. D; JAKABI, M. ***Campylobacter* spp.**: Diagnóstico laboratorial: métodos clássicos e moleculares. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2008. 35 p. Disponível em: <http://bvs.panalimentos.org/local/file/inclusiones2008/2GSS_CURSO_CAPACITACAO_NIVEL3_BRASILIA2008_estanaBVS/GSS_2008_pdf/GSS-III-Manual%20Campylobacter.pdf>. Acesso em: 05 fev. 2016.

TOSIN, I.; MACHADO, R. A. Occurrence of *Campylobacter* spp in food handlers of hospital kitchens in urban area of Southern region Brazil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 29, n. 6, p. 472-477, 1995.

TRESIERRA-AYALA, A.; GUZMÁN, A.; FERNÁNDEZ, H. Survival rate of *Campylobacter coli* strains in sterile buffalo and bovine milk. **Archivos de Medicina Veterinária**, Valdivia, v. 33, n. 2, p. 111-114, 2001.

UBABEF - União Brasileira de Avicultura. **Relatório Anual UBABEF 2014**, 2014. Disponível em: < <http://www.ubabef.com.br/files/publicacoes/8ca705e70f0cb110ae3aed67d29c8842.pdf>>. Acesso em: 20 fev. 2015.

USDA - United States Department of Agriculture. **Laboratory Guidebook**: Notice of Change. 2016. Disponível em: <<http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/0273bc3d-2363-45b3-befb-1190c25f3c8b/MLG-41.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 03 fev. 2016.

VOSS-RECH, D.; VAZ, C. S. L. Técnicas laboratoriais para isolamento de *Campylobacter* em material avícola. In.: WORKSHOP DE DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE *CAMPYLOBACTER* APLICADO À AVICULTURA, 1, 2012, Concórdia. **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2012. p. 21-28. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/74931/1/final6999.pdf>>. Acesso em: 03 fev. 2016.

WANG, G.; CLARK, C. G.; TAYLOR, T. M.; PUCKNELL, C.; BARTON, C.; PRICE, L.; WOODWARD, D. L.; RODGERS, F. G. Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus subsp. fetus*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 12, p. 4744–4747, 2002.

WHO – World Health Organization. **Media Center 2011: *Campylobacter***. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/en/>. Acesso em: 23 jul. 2015.

WHO – World Health Organization. **Media Center 2016: *Campylobacter***. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/en/>. Acesso em: 12 jan. 2017.

WHO – World Health Organization. **World Health Day 2015: Food Safety**. 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/campaigns/world-health-day/2015/whd-toolkit-en.pdf>>. Acesso em: 05 abr. 2015.

WILLIS, W. L.; MURRAY, C. *Campylobacter jejuni* seasonal recovery observations of retail market broilers. **Poultry Science**, Oxford, v. 76, n. 2, p. 314-317, 1997.

YUKI, N.; HARTUNG, H-P. Guillain-Barré Syndrome. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 366, n. 24, p. 2294-2304, 2012.

CAPÍTULO 2 – ARTIGO CIENTÍFICO

As instruções aos autores para submissão de manuscritos no primeiro periódico (International Journal of Food Sciences and Nutrition) ao qual este artigo será submetido estão apresentadas no Anexo A.

***Campylobacter* termotolerantes em carcaça de frango**

Maria Luiza Rezende Ribeiro^a, Manuela Barbosa de Moraes^b, Janaina Costa Feitel^c, Maria Raquel Hidalgo Campos^a, Juliana Lamaro-Cardoso^d; Liana Jayme Borges^a; Maria Cláudia Porfirio André^d

^a*Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil;* ^b*Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil;* ^c*Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil;* ^d*Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil*

M. L. R. Ribeiro - e-mail: maria_luizarr@hotmail.com; phone: +55 62 3209 6270; Faculdade de Nutrição, 74605-080, Goiânia, Goiás, Brasil.

***Campylobacter* termotolerantes em carcaça de frango**

Frangos podem ser reservatórios de *Campylobacter* termotolerantes (*Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* e *Campylobacter lari*) se contaminando durante operações de abate e manipulação, sendo a principal fonte de contaminação da bactéria para o homem. O objetivo desse estudo foi determinar a prevalência de *Campylobacter* termotolerantes em carcaças de frango refrigeradas e posteriormente congeladas de abatedouros e seus pontos de venda. Foram coletadas 40 amostras de carcaças de frango da região centro-oeste do Brasil. A identificação molecular da bactéria foi realizada por Reação em Cadeia da Polimerase convencional. Foi encontrada prevalência de 17,5 % (n=7) de contaminação de carcaças por *Campylobacter* spp., Dentre as 24 amostras coletadas em abatedouros, 12,5 % (n=3) estavam contaminadas. Já entre as coletadas em pontos de venda, 25,0 % (n=4) apresentaram positividade para a bactéria. Os resultados evidenciam que há necessidade de estabelecer critérios de fiscalização para esta bactéria neste produto visando aumentar a segurança dos consumidores.

Palavras-chave: *Campylobacter*; produtos avícolas; inspeção de alimentos; microbiologia de alimentos; PCR

Introdução

Campylobacter é uma das bactérias patogênicas mais importantes para a segurança alimentar e saúde pública. Aves domésticas, como frangos, atuam como um reservatório da bactéria e são considerados os mais importantes veículos de transmissão do micro-organismo para o homem (Umaraw et al. 2015). As espécies *Campylobacter jejuni*, *C. coli* e *C. lari* são as que possuem maior significância clínica relacionada ao consumo de alimentos e infecções, além disso, são as mais frequentemente isoladas em frangos (USDA 2011).

A campilobacteriose, doença causada por bactérias do gênero *Campylobacter*, é uma das causas mais comuns de diarreia nos Estados Unidos (CDC 2014) e União Europeia (EFSA 2013). Os sintomas mais comuns da doença são vômitos, cólicas e diarreias, que podem ser sanguinolentas (FDA 2012). Essa é uma doença auto-limitante cujo principal sintoma, a diarreia, pode durar de três a cinco dias (Abu-Madi et al. 2016). Uma possível complicação clínica da doença é a Síndrome de Guillain-Barré (SGB), uma resposta à infecção que pode resultar em paralisia neuromuscular aguda (Berg et al. 2014). Aproximadamente 40,0 % dos casos de SGB podem ser desencadeados por campilobacteriose (CDC 2014).

Durante o abate pode haver disseminação de *Campylobacter* spp. para diferentes lotes por contaminação cruzada (Marotta et al. 2015). Esta contaminação entre carcaças é um importante problema durante o processo de depenagem, evisceração e quando há compressão das carcaças. Funcionários que ficam na linha de abate também podem propagar micro-organismos para outras peças ao fazerem uso da mesma faca em diferentes carcaças (Silva 2013).

O comércio varejista também exerce importante influência sobre a qualidade microbiológica de carnes. Por isso, são necessários cuidados com a manipulação dos alimentos expostos para venda e em contato com as superfícies potencialmente contaminadas (Lopes 2009). A separação de diferentes tipos de carnes, a correta higienização, o prazo de validade monitorado e o controle da temperatura das ilhas, balcões refrigerados ou gôndolas de exposição dos mercados para venda são medidas imprescindíveis (MS 2015). No entanto, nenhuma intervenção é plenamente satisfatória para o controle do micro-organismo em frangos de corte até o momento (Humphrey et al. 2014).

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de frangos de corte e o maior exportador do produto. O país foi responsável pela produção de 13,14 milhões de toneladas de carne de frango em 2015. O mercado interno é responsável pelo consumo de 67,3 % da produção. Além disso, Goiás representa uma fatia de 7,2 % desta produção, sendo que exportou 206.400

toneladas neste mesmo ano. O Brasil mantém, desde 2004, a posição de maior exportador mundial, sendo que em 2015 as exportações de frango totalizaram 4,30 milhões de toneladas (ABPA, 2016).

Apesar de todos estes fatores, a legislação no Brasil não estabelece critérios para a detecção desta bactéria em carnes de aves e outros alimentos, mesmo sendo esta a maior causa de gastroenterite aguda em países desenvolvidos e em desenvolvimento.

O objetivo deste estudo foi determinar a prevalência de *Campylobacter* termotolerantes em carcaças de frango refrigeradas e posteriormente congeladas de abatedouros e dos pontos de venda destes abatedouros em Goiânia e região metropolitana.

Material e métodos

Coleta e processamento das amostras

O estudo foi realizado em duas etapas. Em um primeiro momento a pesquisa aconteceu nos abatedouros cadastrados no sistema de vigilância sanitária da região central do Brasil. Foram selecionados todos os abatedouros (n=4) sob inspeção estadual que se situam a uma distância que permitiu o transporte das amostras em tempo hábil com conservação de suas características.

Cada abatedouro foi visitado três vezes. Duas amostras foram coletadas em cada visita, sendo uma para análise imediata e outra destinada ao congelamento rápido, para avaliar viabilidade do micro-organismo após 21 dias de congelamento a -18 °C.

As coletas foram realizadas pelo funcionário responsável pelo último momento do gotejamento da ave, momento que precede a embalagem. As carcaças de frango foram coletadas ainda nos ganchos da nória. Ao final da primeira etapa, 24 amostras foram coletadas nos abatedouros.

Posteriormente, o estudo foi realizado em estabelecimentos varejistas da região, cadastrados no sistema de vigilância sanitária municipal que comercializam carcaças de frango dos abatedouros alvos da coleta da primeira etapa. Os abatedouros selecionados, além de fornecerem as amostras para análise, indicaram todos os estabelecimentos com os quais comercializam os alimentos para que fossem coletadas amostras em seus pontos de venda. Dezesesseis pontos de venda, quatro referentes a cada um dos quatro abatedouros, foram visitados. Uma amostra de carcaça resfriada ou congelada foi coletada em cada um destes locais. As visitas e as coletas realizadas foram facilitadas e intermediadas pela equipe colaboradora (AGRODEFESA e VISA).

Uma amostra de carcaça inteira coletada nos abatedouros e nos pontos de venda foi imediatamente processada ao chegar ao LACHSA/FANUT, para pesquisa de *Campylobacter* termotolerantes. Para obtenção das alíquotas das amostras, foi utilizada a técnica de rinsagem de superfície (APHA 2001). As análises das amostras foram realizadas segundo método presença/ausência de *Campylobacter* da International Organization for Standardization (ISO) 10272-1: 2006 (ISO 2006).

Alíquotas do crescimento em mCCDA das amostras suspeitas foram armazenadas congeladas em solução de glicerol peptona a -80°C . Na sequência todas as amostras suspeitas foram estriadas em ágar Müeller Hinton Sangue e incubadas por 24 h em microaerofilia. Foram em seguida analisadas pela técnica PCR convencional para confirmação da espécie.

Extração do DNA e PCR convencional para identificação de espécies de Campylobacter

Para extração do DNA genômico dos isolados foi usada a técnica de Wang et al. (2002) com modificações.

Para a identificação da espécie *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari* foram pesquisados os genes evidenciados na Tabela 1, assim como os oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR. O ensaio foi realizado de acordo com Linton et al. (1997) com modificações.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5 % em tampão Tris-Borato-EDTA 0,5 X por 30 minutos a 50 V, seguido de 80 minutos a 80 V. O marcador de 50 bp foi utilizado como padrão de peso molecular. O gel foi corado com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL visualizado e fotografado sob transiluminação ultravioleta no sistema Molecular Imager GelDoc XR (Bio-Rad).

Durante todas as análises das amostras foram utilizadas cepas padrão para teste positivo: cepas de *C. jejuni* biotipo I e II obtidas da Fundação André Tosello; cepas de *C. jejuni* biotipo I (Campy 1053) e II (Campy 1051), *C. coli* biotipo I (Campy 777) e II (Campy 776) e *C. lari* (Campy 1012) obtidas da Fundação Oswaldo Cruz.

A análise descritiva dos dados obtidos foi realizada por meio de frequência e porcentagens. Além disso, toda a pesquisa foi realizada de acordo com os termos e condições da Resolução nº 466/2012 (CNS 2013).

Resultados e discussão

Dentre as 40 amostras coletadas, 17,5 % (n=7) obtiveram confirmação de contaminação pelas espécies de *Campylobacter* termotolerantes avaliadas (Tabela 2). Das 24 amostras coletadas

em abatedouros, 12,5 % (n=3) estavam contaminadas. Já entre as coletadas em pontos de venda, 25,0 % (n=4) apresentaram positividade para a bactéria. Observa-se maior contaminação das carcaças expostas à venda no comércio em relação às coletadas nos abatedouros (Figura 1). Desta forma, ressalta-se a importância de medidas de controle da bactéria não apenas nos criatórios e abatedouros, mas principalmente nos pontos de venda.

Levando-se em conta a provável presença de *Campylobacter* na microbiota de frangos, a contaminação cruzada durante o abate ou exposição para venda torna-se possível (Tosin & Machado 1995). Em pesquisa realizada por Oliveira e Oliveira (2013), 34,7 % das amostras analisadas foram positivas para *Campylobacter* spp.. Neste estudo foram analisadas 75 amostras, sendo 25 de carcaças de abatedouros sob inspeção federal antes e 25 após chiller, além de 25 congeladas do comércio varejista. Já no presente estudo, dentre as 12 amostras resfriadas de abatedouros e as 16 dos seus pontos de venda, 17,9 % (n=5) das amostras apresentaram contaminação pelo micro-organismo, evidenciando também necessidade de maior rigor no que diz respeito à qualidade microbiológica durante toda a cadeia de produção.

Campylobacter spp. é considerado altamente sensível ao congelamento (ISO 2006). O tratamento reduz o número do micro-organismo em carnes cruas (CDC 2014) e pele de frango (Sampers et al. 2010). Observou-se no presente estudo, no entanto, que baixas temperaturas não foram suficientes para eliminar a bactéria em 21 dias, em especial *C. jejuni*. Mais de 16,0 % das amostras congeladas apresentaram-se contaminadas, frente a 8,3 % das amostras resfriadas do mesmo lote analisadas. Tal diferença pode ser explicada pelo fato das unidades amostrais analisadas nos dois momentos (resfriadas e após 21 dias de congelamento) serem distintas. Além disso, diferentes carcaças podem ter diferentes níveis de contaminação, o que pode afetar a sensibilidade do método (PCR). É importante destacar também que o suco de frango possui compostos protetores, como peptídeos e lipídeos, que prolongam a viabilidade de *C. jejuni* durante armazenagem e em temperaturas de refrigeração (Birk et al. 2004).

Micro-organismos como os do gênero *Campylobacter* que sofreram congelamento e sobreviveram ou apresentaram injúrias subletais podem, em certas condições, sair do estado de células viáveis não cultiváveis (VNC) (Sampers et al. 2010), onde, apesar da manutenção do potencial de infecção, não podem ser detectadas em análises convencionais. Harrison et al. (2013), evidenciaram que após congelamentos seguidos de descongelamentos, o número de bactérias diminuía a cada ciclo.

O comércio varejista exerce importante influência sobre a qualidade microbiológica de carnes, seja ela resfriada ou congelada. A prevalência de 25,0 % encontrada no presente estudo, no entanto, não evidenciou diferença em relação ao método de conservação, já que

50,0 % (n=2) das amostras contaminadas foram coletadas congelada e a outra metade resfriada.

Nos pontos de venda a contaminação cruzada por meio de superfícies ou equipamentos contaminados pode acontecer. Desta forma, são necessários cuidados com a manipulação dos alimentos e com o contato com as superfícies potencialmente contaminadas (Lopes 2009). A organização, a separação dos diferentes tipos de carnes nas gôndolas, a correta higienização das superfícies, o monitoramento do prazo de validade e o controle da temperatura das ilhas ou gôndolas de exposição dos mercados para venda é imprescindível (MS 2015).

A prevalência de *C. jejuni* evidenciada no presente estudo nos pontos de venda foi maior que a encontrada por Mezher et al. (2016) em estudo realizado em abatedouros e pontos de venda na Itália. Nesta pesquisa, dentre as 156 amostras de aves coletadas no varejo, 6,4 % (n=10) estavam contaminadas. Das 53 amostras coletadas os abatedouros, 3,8 % (n=2) apresentaram contaminação. A maior prevalência encontrada nos alimentos oriundos de pontos de venda sugere que essa diferença pode ser devido à contaminação cruzada, como resultado de manipulação dos produtos no varejo. Em estudo de Bai et al. (2014) realizado na China, 26,2 % (n=63) das amostras de pontos de venda analisadas apresentaram contaminação por *Campylobacter*.

No presente estudo, todas as amostras dos pontos de venda foram coletadas embaladas. Sabe-se, no entanto, que as embalagens podem apresentar violações, como pequenos furos ou lacre ineficiente. Tais orifícios podem viabilizar a contaminação de carnes. Além disso, é frequente o descongelamento com posterior re-congelamento de alimentos em mercados, possibilitando formação e acúmulo de suco destas carnes. Este líquido, possivelmente contaminado, pode entrar em contato com diversos alimentos, viabilizando a disseminação de micro-organismos, como *Campylobacter* spp.. Em estudo realizado no comércio varejista da região centro-oeste brasileira todas as amostras de carcaças de frango positivas (n=7) para *Campylobacter* apresentaram avaria na embalagem, como rompimento (Oliveira 2014). Sendo assim, a opção por carcaças de frangos com embalagem sem avarias é uma importante medida que o consumidor deve tomar.

Estudos realizados na região centro-oeste do país corroboram os resultados encontrados no presente estudo. Em pesquisa realizada por Almeida e Rezende (2011) em abatedouros de Goiás, *Campylobacter* apresentou positividade em 83,3 % (n=100) das amostras analisadas. Em estudo realizado por Feistel (2013) em abatedouros da região sob inspeção federal, 24,0 % (n=48) das carcaças analisadas apresentaram contaminação pela

bactéria em questão. Outro estudo evidenciou contaminação em 11,0 % (n=11) das carcaças coletadas em comércios varejistas da segunda maior cidade da região. Apesar da elevada representatividade na produção mundial de produtos avícolas, a região apresenta elevada contaminação por *Campylobacter* spp.

Conforme a *World Organization for Animal Health* (OIE, 2016), *C. jejuni* é responsável por aproximadamente 80,0 % dos surtos de campilobacteriose humana, enquanto *C. coli*, por cerca de 10,0 %. No presente estudo *C. jejuni* estava presente em 14,3 % (n=4) das amostras analisadas, enquanto o *C. coli* foi detectado em 3,6 % (n=1). Dentre os micro-organismos identificados, a espécie *C. jejuni* estava presente em 80,0 % (n=4) das amostras contaminadas.

Os órgãos de vigilância sanitária exercem importante função sobre a manutenção da saúde do consumidor, uma vez que realizam o controle e inspeção nos locais onde é realizada a produção e venda de alimentos. Intervenções em diferentes níveis da produção de aves devem ser realizadas para redução do número de infecções por *Campylobacter* spp. Mas o impacto no controle desta bactéria em amostras de carne de frango, como evidenciado neste estudo, só seria efetivo se existisse uma legislação que preconizasse o controle da bactéria nestes e em outros produtos suscetíveis à contaminação desde a produção até a comercialização, estabelecendo limites de detecção e tolerância desta bactéria nestes produtos, o que hoje é inexistente no Brasil.

Conclusões

Campylobacter jejuni e *C. coli* foram identificados em amostras de carcaça de frango refrigeradas e congeladas de abatedouros da região central de Goiás e em seus pontos de venda. A prevalência encontrada no presente estudo reforça a necessidade do estabelecimento de medidas de controle de *Campylobacter* em carcaça de frango, já que no Brasil a legislação não estabelece limites para a sua presença nos alimentos.

Agradecimentos

À Agência Goiana de Defesa Agropecuária (AGRODEFESA) e ao Departamento de Vigilância Sanitária Municipal (VISA) de Goiânia, GO pelo suporte e viabilização das coletas das amostras nos estabelecimentos industriais e comerciais.

Declaração de interesse: Os autores declaram nenhum conflito de interesse.

Financiamento:

M. L. R. Ribeiro recebeu bolsa de estudos pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. A pesquisa não recebeu financiamento de nenhuma agência de fomento ou empresa.

Referências

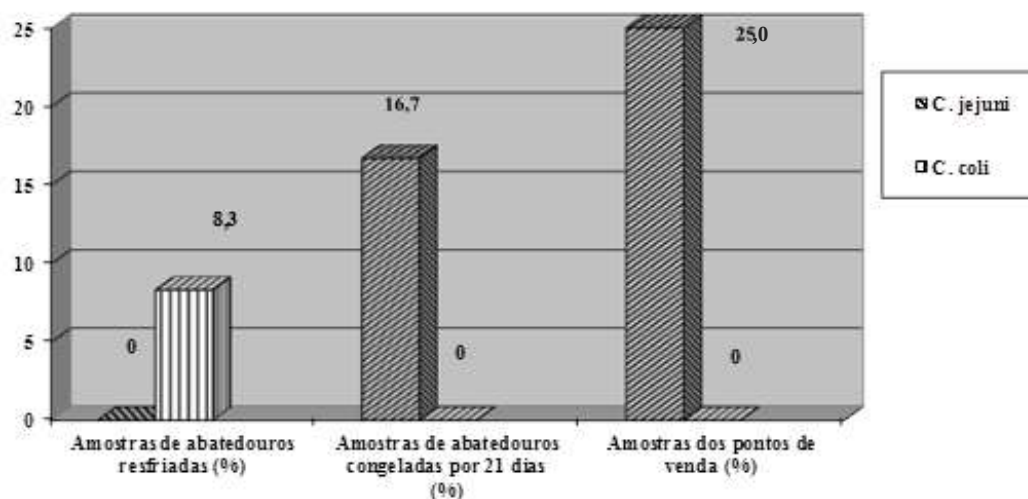
- [ABPA] Associação Brasileira de Proteína Animal (Brazilian Association of Animal Protein. Annual Report 2016. 2016. 1-132. Available at: http://abpa-br.com.br/storage/files/abpa_relatorio_anual_2016_ingles_web_versao_para_site_abpa_bloqueado.pdf
- Abu-Madi M, Jerzy M, Behnke JM, Sharma A, Bearden R, Al-Banna N. 2016. Prevalence of virulence/stress genes in *Campylobacter jejuni* from chicken meat sold in Qatari retail outlets. PLoS ONE. 11:15.
- Almeida TL, Rezende CSM. 2011. *Campylobacter* spp. em ambiente de abate de aves do estado de Goiás: identificação e avaliação da suscetibilidade a antimicrobianos. In: 63ª Reunião Anual da SBPC, 2011, Goiânia. Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 2011.
- [APHA] American Public Health Association. 2001. Compendium of methods for the microbiological examination for foods. APHA. 676p.
- Bai Y, Cui S, Xu X, Li F. 2014. Enumeration and characterization of *Campylobacter* species from retail chicken carcasses in Beijing, China. Foodborne Pathog Dis. 11:861-867.
- Berg BVD, Walgaard C, Drenthen J, Fokke C, Jacobs BC, Doorn PAV. 2014. Guillain-Barré syndrome: pathogenesis, diagnosis, treatment and prognosis. Nat Rev Neurol. 10:469-482.
- Birk T, Ingmer H, Andersen MT, Jorgensen K, Brondsted L. 2004. Chicken juice, a food-based model system suitable to study survival of *Campylobacter jejuni*. Lett Appl Microbiol. 80:66-71.
- [CDC] Centers for Disease Control and Prevention. 2014. Foodborne Illness A-Z: *Campylobacter* [Internet]. 2014. Available from: <http://www.cdc.gov/foodsafety/diseases/campylobacter/index.html>
- [CNS] Conselho Nacional de Saúde. 2013. Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012. Aprova normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Diário Oficial da União.

- [EFSA] European Food Safety Authority. 2013. The European Union summary report on trends and sources of zoonosis, zoonotic agents and foodborne outbreaks in 2011. EFSA J. 11:3129.
- [FDA] Food and Drug Administration. 2012 Handbook - Bad Bug Book/ Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins: *Campylobacter jejuni*. Available from: <http://www.fda.gov/food/foodborneillnesscontaminants/causesofillnessbadbugbook/ucm070024.htm>
- Feistel JC. 2013. Caracterização de *Campylobacter* spp. isoladas em carcaças de frango. [Dissertation] Goiânia (GO): Federal University of Goiás.
- Harrison D, Corry JEL, Tchórzewska MA, Morris VK, Hutchison ML. 2013. Freezing as an intervention to reduce the numbers of *campylobacters* isolated from chicken livers. Lett Appl Microbiol. 57:206–213.
- Humphrey S, Chaloner G, Kemmett K, Davidson N, Williams N, Kipar A, Humphrey T, Wigley P. 2014. *Campylobacter jejuni* is not merely a commensal in commercial broiler chickens and affects bird welfare. Mbio. 5:1-7.
- [ISO] International Organization for Standardization. 2006. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for detection and enumeration of thermotolerant *Campylobacter* spp. – Part 1: detection method. (ISO 10272-1:2006). 16.
- Lagier MJ, Joseph LA, Passaretti TV, Musser KA, Cirino NM. 2004. A real-time multiplexed PCR assay for rapid detection and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Mol Cell Probes. 18:275–282.
- Linton D, Lawson AJ, Owen RJ, Stanley J. 1997. PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. J Clin Microbiol. 35:2568- 2572.
- Lopes GV. 2009. *Campylobacter* spp. no abate a varejo: ocorrência em carcaças de bovinos para exportação e em cortes refrigerados de aves e bovinos [dissertation] São Paulo (SP): University of São Paulo.
- Marotta F, Garofolo G, Donato G, Aprea G, Platone I, Cianciavicchia S, Alessiani A, Giannatale E. 2015. Population diversity of *Campylobacter jejuni* in poultry and its dynamic of contamination in chicken meat. Biomed Res Int. 1-10.
- Mezher Z, Saccares S, Marcianò R, Santis P, Rodas EMF, Angelis V, Condoleo R. 2016. Occurrence of *Campylobacter* spp. in poultry meat at retail and processing plants' levels in central Italy. Ital J Food Saf. 5:47–49.

- [MS] Ministério da Saúde. Instrução Normativa DIVISA/SVS Nº 4 DE 15/12/2014. 2015. Aprova o regulamento técnico sobre boas práticas para estabelecimentos comerciais de alimentos e para serviços de alimentação, e o roteiro de inspeção, anexo. 2015. Available from: <https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=281122>
- [OIE] World Organisation for Animal Health. 2016. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2016. Chapter 2.9.3, *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Available from: <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>
- Oliveira AL, Oliveira RBP. 2013. Enumeration of *Campylobacter* spp. and presence of *Campylobacter jejuni* in broiler carcasses in the state of Minas Gerais, Brazil. *Ciênc Rural*. 43:480 – 484.
- Oliveira JJ. 2014. Isolamento e caracterização de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango e ovos comerciais. [Dissertation] Goiânia (GO): Federal University of Goiás.
- Sampers I, Habib I, Zutter L, Dumoulin A, Uyttendaele M. 2010. Survival of *Campylobacter* spp. in poultry meat preparations subjected to freezing, refrigeration, minor salt concentration, and heat treatment. *Int J Food Microbiol*. 137:147–153.
- Silva MV. 2013. Slaughtering and processing. In: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Poultry Development Review. 18-21. Available from: <http://www.fao.org/docrep/019/i3531e/i3531e.pdf>
- Tosin I, Machado RA. 1995. Occurrence of *Campylobacter* spp in food handlers of hospital kitchens in urban area of Southern region Brazil. *Rev Saúde Pública*. 29:472-477.
- Umaraw P, Prajapatib A, Vermac AK, Pathakd V, Singhd VP. 2015. Control of *Campylobacter* in poultry industry from farm to poultry processing unit: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 57:659-665.
- [USDA] United States Department of Agriculture. Disposition/Food Safety: Overview of food microbiology. 2011. Available from: https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/dcbfde80-3d65-4b21-9685-d6676367aac/PHVt-Food_Microbiology.pdf?MOD=AJPERES
- Wang G, Clark CG, Taylor TM, Pucknell C, Barton C, Price L, Woodward DL, Rodgers FG. 2002. Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*. *J Clin Microbiol*. 40:4744–4747.

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR

Genes	Sequência dos oligonucleotídeos	Pares de base	Autor
<i>C. coli</i> <i>glyA</i>	F ¹ – 5' CATATTGTAAAACCAAAGCTTATCGG 3' R ² – 5' AGTCCAGCAATGTGTGCAATG 3'	133 pb	(Lagier et al. 2004)
<i>C. lari</i> <i>glyA</i>	F ¹ – 5' TAGAGAGATAGCAAAAGAGA 3' R ² – 5' TACACATAATAATCCCACCC 3'	251 pb	(Wang et al. 2002)
<i>C. jejuni</i> <i>hipO</i>	F ¹ – 5' GAAGAGGGTTTGGGTGGTG 3' R ² – 5' AGCTAGCTTCGCATAATAACTTG 3'	735 pb	(Linton et al. 1997)

¹Forward; ²Reverse**Figura 1.** Prevalência de *Campylobacter jejuni*, *C. coli* determinadas por análise molecular, em amostras de carcaças de frango obtidas em abatedouros e seus pontos de venda da região centro-oeste do Brasil**Tabela 2.** Amostras de carcaças de frangos positivas para *Campylobacter* spp. obtidas em abatedouros de Goiânia, Go, Brasil

Amostras	Abatedouro A	Abatedouro B	Abatedouro C	Abatedouro D	Total de amostras contaminadas
Resfriadas de abatedouros	-	-	-	1 <i>C. coli</i>	1
Congeladas por 21 dias de abatedouros	1 <i>C. jejuni</i>	1 <i>C. jejuni</i>	-	-	2
Pontos de venda	-	-	2 <i>C. jejuni</i>	2 <i>C. jejuni</i>	4
Total					7

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tendo em vista a representatividade brasileira na produção de carne de frango, esse trabalho mostrou-se relevante, uma vez que evidenciou contaminação das carcaças por espécies de *Campylobacter* termotolerantes. Pode-se observar que a contaminação não está presente apenas no abatedouro, mas também no ponto de venda, evidenciando a necessidade de novas medidas de prevenção de contaminação para minimizar o risco para o consumidor.

A metodologia de isolamento e cultivo preconizada na ISO, apesar de amplamente utilizado precisa de adequações, principalmente no que diz respeito à identificação das espécies. Além disso, os suplementos seletivos parecem não ser suficientes para inibir a microbiota contaminante, talvez pela elevada contaminação que amostras de carcaça de frango apresentam.

A equipe colaboradora (AGRODEFESA e VISA) exerceu papel imprescindível na pesquisa. Esta facilitou e intermediou as visitas e as coletas realizadas.

Por meio de uma reunião para apresentação dos dados da pesquisa para a equipe colaboradora, espera-se estimular uma reflexão dos fiscais e, conseqüentemente, de proprietários e funcionários dos estabelecimentos alvo da coleta no sentido de conscientização da necessidade de cuidados na manipulação e processamento do produto frente aos riscos de contaminação.

Espera-se com os resultados obtidos nesta pesquisa, subsidiar os órgãos fiscalizadores e de controle de qualidade de alimentos no sentido de estabelecer padrões e limites de detecção desta bactéria em alimentos mais suscetíveis à contaminação pela bactéria, como é o caso de aves e seus derivados.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Procedimento de coleta



Procedimento de Coleta

Deverão ser coletadas 2 amostras de carcaças de frango inteiros e crus e 200 g de coração, imediatamente após o abate, logo após a embalagem e antes do congelamento (após *chiller*)



As 2 carcaças e os 200 g de coração deverão ser armazenados em sacos plásticos esterilizados, sendo estes fechados com nó imediatamente após a coleta e armazenados em caixa térmica contendo gelo também fornecida pelos pesquisadores.

APÊNDICE B – Meio Glicerol Peptona

Peptona	1,0 g
NaCl (Fisher)	0,5 g
Glicerol (Merck)	25 mL
Água destilada	75 mL

Agitar todos os ingredientes até a completa dissolução;

Ajustar o pH à 7,00 +/- 0,2;

Distribuir em tubos (eppendorf), cada tubo terá 1,0 mL;

Autoclavar por 15 minutos a 121 °C.

A quantidade elaborada possibilita a armazenagem de 100 isolados.

APÊNDICE C – Carta de Solicitação de Cooperação (VISA)



UFG
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

Goiânia, 20 fevereiro de 2015

Ao Dr. Geraldo Edson Rosa
Diretor do Departamento de Vigilância Sanitária de Goiânia/SMS

Aos cuidados da Dra. Tânia Maria Souza Agostinho/Fiscal de Saúde Pública/VISA

Assunto: solicitação (faz)

Juntamente com nossos cumprimentos, vimos encaminhar a V. S^a uma solicitação de cooperação da Divisão de Alimentos/VISA/SMS para realização de um importante projeto de pesquisa junto a estabelecimentos comercializadores de produtos avícolas na cidade de Goiânia, intitulado "Pesquisa de *Campylobacter* spp. em carcaça e coração de frango comercializado Goiânia, Goiás".

Informamos que este estudo envolverá a participação de um grupo de docentes e acadêmicos de graduação e pós-graduação *Stricto sensu* da Universidade Federal de Goiás, sendo, a Profa. Dra. Maria Raquel Hidalgo Campos da Faculdade de Nutrição, a Profa. Dra. Cintia Silva Minafra e Rezende da Escola de Veterinária e Zootecnia e, a Profa. Dra. Maria Cláudia Dantas Porfírio Borges André do Instituto de Patologia Tropical. Contaremos também com a importante parceria do Setor de Cadastro, Convênio e Inspeção da AGRODEFESA, nas pessoas do Gerente Dr. Eurípedes Divino Amorim e, da Fiscal Estadual Agropecuário Dra. Flávia Ribeiro Rezende Borges.

Ressaltamos que este projeto se justifica visto que no Brasil, o Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango, do Ministério da Saúde, determina em produtos avícolas, a investigação da presença de *Listeria monocytogenes* e *Campylobacter* spp. e perfis de suscetibilidade a antimicrobianos dos isolados. Permitindo avaliar a exposição ao risco para consumidores de carne de frango. A questão vinculada à suscetibilidade pode ser reforçada pelas publicações científicas onde se constata que os isolados de *Campylobacter* spp. têm apresentado resistência a antimicrobianos, em alguns casos, com níveis superiores a 40%.

Tendo em vista o papel do Brasil, em nível mundial, na produção de frangos e subprodutos, salienta-se a relevância do tema aqui proposto, uma vez que perpassam as fronteiras nacionais. Segundo a União Brasileira de Avicultura, em 2012, a produção avícola é um importante segmento econômico, sendo o País o terceiro maior produtor e o maior exportador mundial de carne de frango. No contexto regional, Goiás representou 6,04% da produção nacional, sendo o sexto produtor de carne de frango do país, caracterizando-se pela presença de agroindústrias representativas para o agronegócio brasileiro nos mercados interno e externo.

O consumo de carne de frango no Brasil, em 2012, foi de 45 kg per capita. O baixo custo da carne de frango para a população e a preferência por vísceras comestíveis como os corações, nem sempre preparadas de forma a eliminar possíveis patógenos, pelo gosto deste alimento mal cozido

**UFG****UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**

Considerando o exposto, esta pesquisa, envolverá duas dissertações de mestrado, sendo, uma da mestranda Manuela Barbosa de Moraes do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos e, outra da mestranda Maria Luiza Rezende Ribeiro do Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde.

Assim, pretende-se pesquisar e caracterizar a prevalência das espécies termotolerantes de *Campylobacter* em alimentos avícolas (carcaça e coração), provenientes de abatedouros do estado de Goiás que possuem o cadastro junto ao Sistema de Inspeção Estadual (SIE) e, dos açougues que recebem esta matéria-prima dos abatedouros selecionados, localizados nas sete regiões administrativas do Município de Goiânia. Utilizar-se-á técnicas convencionais e moleculares combinadas, bem como a identificação do perfil de suscetibilidade a diferentes bases antimicrobianas a serem eleitas para tratamentos aplicados a humanos.

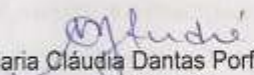
Esclarecemos que os recursos financeiros destinados à realização da pesquisa, bem como, os laboratórios para as análises dos produtos a serem investigados serão disponibilizados pelos Programas de Pós-Graduação envolvidos. A participação dos órgãos de fiscalização será fundamental no processo de aproximação junto aos locais onde os produtos serão coletados.

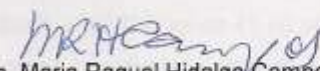
Acreditamos que esta importante parceria, entre o espaço acadêmico da UFG e os principais órgãos de fiscalização e saúde pública de Goiás, possa disponibilizar dados epidemiológicos relevantes no controle de qualidade de produtos avícolas processados e comercializados em Goiás, e também, garantir as ações de segurança e educação sanitária junto à população.

Na certeza de contarmos com o vosso valioso apoio, colocamo-nos à disposição para quaisquer esclarecimentos que se façam necessários.

Atenciosamente,


Prof. Dra. Cintia Silva Minafra e Rezende
EVZ/UFG


Prof. Dra. Maria Cláudia Dantas Porfírio Borges André
IPTSP/UFG


Prof. Dra. Maria Raquel Hidalgo Campos
FANUT/UFG

*Recebi cópia
em 20/02/21
[Signature]*

APÊNDICE D – Carta de Solicitação de Cooperação (AGRODEFESA)



Goiânia, 20 fevereiro de 2015

Ao Dr. Eurípedes Divino Amorim
Gerente do Setor de Cadastro, Convênio e Inspeção da AGRODEFESA

Aos cuidados da Dra. Flávia Ribeiro Rezende Borges/Fiscal Estadual Agropecuário

Assunto: solicitação (faz)

Juntamente com nossos cumprimentos, vimos encaminhar a V. S^a uma solicitação de cooperação da AGRODEFESA para realização de um importante projeto de pesquisa junto a abatedouros avícolas de Goiás, intitulado "Pesquisa de *Campylobacter* spp. em carcaça e coração de frango comercializado Goiânia, Goiás".

Informamos que este estudo envolverá a participação de um grupo de docentes e acadêmicos de graduação e pós-graduação *Stricto sensu* da Universidade Federal de Goiás, sendo, a Profa. Dra. Maria Raquel Hidalgo Campos da Faculdade de Nutrição, a Profa. Dra. Cintia Silva Minafra e Rezende da Escola de Veterinária e Zootecnia e, a Profa. Dra. Maria Cláudia Dantas Porfírio Borges André do Instituto de Patologia Tropical. Contaremos também com a importante parceria do Departamento de Vigilância Sanitária de Goiânia da Secretaria Municipal de Saúde, nas pessoas do Diretor Dr. Geraldo Edson Rosa e, da Fiscal de Saúde Pública Dra. Tânia Maria Souza Agostinho.

Ressaltamos que este projeto se justifica visto que no Brasil, o Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango, do Ministério da Saúde, determina em produtos avícolas, a investigação da presença de *Listeria monocytogenes* e *Campylobacter* spp. e perfis de suscetibilidade a antimicrobianos dos isolados, Permitindo avaliar a exposição ao risco para consumidores de carne de frango. A questão vinculada à suscetibilidade pode ser reforçada pelas publicações científicas onde se constata que os isolados de *Campylobacter* spp. têm apresentado resistência a antimicrobianos, em alguns casos, com níveis superiores a 40%.

Tendo em vista o papel do Brasil, em nível mundial, na produção de frangos e subprodutos, salienta-se a relevância do tema aqui proposto, uma vez que perpassam as fronteiras nacionais. Segundo a União Brasileira de Avicultura, em 2012, a produção avícola é um importante segmento econômico, sendo o País o terceiro maior produtor e o maior exportador mundial de carne de frango. No contexto regional, Goiás representou 6,04% da produção nacional, sendo o sexto produtor de carne de frango do país, caracterizando-se pela presença de agroindústrias representativas para o agronegócio brasileiro nos mercados interno e externo.

O consumo de carne de frango no Brasil, em 2012, foi de 45 kg per capita. O baixo custo da carne de frango para a população e a preferência por vísceras comestíveis como os corações, nem sempre preparadas de forma a eliminar possíveis patógenos, pelo gosto deste alimento mal cozido, representa alto risco para saúde pública.

**UFG****UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**

Considerando o exposto, esta pesquisa, envolverá duas dissertações de mestrado, sendo, uma da mestrandia Manuela Barbosa de Moraes do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos e, outra da mestrandia Maria Luiza Rezende Ribeiro do Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde.

Assim, pretende-se pesquisar e caracterizar a prevalência das espécies termotolerantes de *Campylobacter* em alimentos avícolas (carcaça e coração), provenientes de abatedouros do estado de Goiás que possuem o cadastro junto ao Sistema de Inspeção Estadual (SIE) e, dos açougues que recebem esta matéria-prima dos abatedouros selecionados, localizados nas sete regiões administrativas do Município de Goiânia. Utilizar-se-á técnicas convencionais e moleculares combinadas, bem como a identificação do perfil de suscetibilidade a diferentes bases antimicrobianas a serem eleitas para tratamentos aplicados a humanos.

Esclarecemos que os recursos financeiros destinados à realização da pesquisa, bem como, os laboratórios para as análises dos produtos a serem investigados serão disponibilizados pelos Programas de Pós-Graduação envolvidos. A participação dos órgãos de fiscalização será fundamental no processo de aproximação junto aos locais onde os produtos serão coletados.

Acreditamos que esta importante parceria, entre o espaço acadêmico da UFG e os principais órgãos de fiscalização e saúde pública de Goiás, possa disponibilizar dados epidemiológicos relevantes no controle de qualidade de produtos avícolas processados e comercializados em Goiás, e também, garantir as ações de segurança e educação sanitária junto à população.

Na certeza de contarmos com o vosso valioso apoio, colocamo-nos à disposição para quaisquer esclarecimentos que se façam necessários.

Atenciosamente,


Prof. Dra. Cintia Silva Minafra e Rezende
EVZ/UFG


Prof. Dra. Maria Cláudia Dantas Porfírio Borges André
IPTSP/UFG


Prof. Dra. Maria Raquel Hidalgo Campos
FANUT/UFG



ANEXOS

ANEXO A – Instruções aos autores para submissão de manuscrito no periódico International Journal of Food Sciences and Nutrition

Instructions for authors

Thank you for choosing to submit your paper to us. These instructions will ensure we have everything required so your paper can move through peer review, production and publication smoothly. Please take the time to read and follow them as closely as possible, as doing so will ensure your paper matches the journal's requirements. For general guidance on the publication process at Taylor & Francis please visit our Author Services website.



SCHOLARONE MANUSCRIPTS™

This journal uses ScholarOne Manuscripts (previously Manuscript Central) to peer review manuscript submissions. Please read the guide for ScholarOne authors before making a submission. Complete guidelines for preparing and submitting your manuscript to this journal are provided below.

Contents list

About the journal

Peer review

Preparing your paper

- Structure
- Word count
- Style guidelines
- Formatting and templates
- References
- Expression of Food Composition Data
- Checklist
 - Using third-party material in your paper
 - Disclosure statement Clinical Trials Registry Complying with ethics of experimentation
- Consent
- Health and safety
 - Submitting your paper
 - Publication charges Copyright options
 - Complying with funding agencies
 - Open access My Authored Works
 - Article reprints

About the journal

International Journal of Food Sciences and Nutrition is an international, peer reviewed journal, publishing high-quality, original research. Please see the journal's Aims & Scope for information about its focus and peer-review policy.

Please note that this journal only publishes manuscripts in English.

International Journal of Food Sciences and Nutrition accepts the following types of article:

- **Research papers:** These are complete studies dealing with one of the covered topics.
- **Brief communications:** These are short research articles intended to present exciting findings that will have a major impact in food science and nutrition.
- **Comprehensive reviews:** These articles are intended to be full-length critical appraisals of topics that would be of long-term archival value. Emphasis should be placed on late-breaking advances.
- **Commentaries:** These should be knowledge-based or consensus-type articles (e.g. working group statement) expressing objective opinions, experiences or perspectives on an important area related to food science or nutrition.
- **Gap-bridging research:** These articles cover extremely recent topics, with the main aim of indicating to the reader what new research is needed to increase the scientific knowledge in specific areas of food science and nutrition.
- **Letters to the editor:** These are expected to provide comments on papers recently published in IJFN or other subjects that are of broad interest to the nutrition research community. The letter and a reply, if appropriate, are published together whenever possible.
- **Conference papers:** These should summarise conferences and scientific events in one single paper.

Peer review

Taylor & Francis is committed to peer-review integrity and upholding the highest standards of review. Once your paper has been assessed for suitability by the editor, it will then be double blind peer-reviewed by independent, anonymous expert referees. Find out more about what to expect during peer review and read our guidance on publishing ethics.

Preparing your paper

All authors submitting to medicine, biomedicine, health sciences, allied and public health journals should conform to the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals, prepared by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE).

Structure

Your paper should be compiled in the following order: title page; keywords; abstract; main text; acknowledgments; declaration of interests statement; references; appendices (as appropriate); table(s) with caption(s) (on individual pages); figures; figure captions (as a list).

Word count

Please include a word count for your paper.

Brief communications are limited to 3,500 words; inclusive of the abstract, introduction, materials and methods, results, discussion, references and figure captions.

Style guidelines

Please refer to these style guidelines when preparing your paper, rather than any published articles or a sample copy.

Please use British spelling consistently throughout your manuscript.

Please use double quotation marks, except where "a quotation is 'within' a quotation". Please note that long quotations should be indented without quotation marks.

Formatting and templates

Papers may be submitted in any standard format, including Word and LaTeX. Figures should be saved separately from the text. To assist you in preparing your paper, we provide formatting template(s).

Word templates are available for this journal. Please save the template to your hard drive, ready for use.

References

Please use this reference guide when preparing your paper. An EndNote output style is also available to assist you.

Expression of Food Composition Data

Checklist: what to include

1. **Author details.** Please ensure everyone meeting the International Committee of Medical Journal Editors (ICJME) requirements for authorship is included as an author of your paper. Please include all authors' full names, affiliations, postal addresses, telephone numbers and email addresses on the cover page. Where available, please also include ORCiDs and social media handles (Facebook, Twitter or LinkedIn). One author will need to be identified as the corresponding author, with their email address normally displayed in the article PDF (depending on the journal) and the online article. Authors' affiliations are the affiliations where the research was conducted. If any of the named co-authors moves affiliation during the peer-review process, the new affiliation can be given as a footnote. Please note that no changes to affiliation can be made after your paper is accepted. Read more on authorship.

2. A non-structured **abstract** abstract of no more than 150 words. Read tips on writing your abstract.
3. **Graphical abstract.** This is an image to give readers a clear idea of the content of your article. It should be a maximum width of 525 pixels. If your image is narrower than 525 pixels, please place it on a white background 525 pixels wide to ensure the dimensions are maintained. Save the graphical abstract as a .jpg, .png, or .gif. Please do not embed it in the manuscript file but save it as a separate file, labelled GraphicalAbstract1.
4. You can opt to include a **video abstract** with your article. Find out how these can help your work reach a wider audience, and what to think about when filming.
5. Three to six **keywords.** Read making your article more discoverable, including information on choosing a title and search engine optimization **keywords.** Read making your article more discoverable, including information on choosing a title and search engine optimization.
6. **Funding details.** Please supply all details required by your funding and grant-awarding bodies as follows: *For single agency grants* This work was supported by the under Grant . *For multiple agency grants* This work was supported by the < under="" grant=""> ; > under Grant ; and .</>>
7. **Disclosure statement.** This is to acknowledge any financial interest or benefit that has arisen from the direct applications of your research. Further guidance on what is a conflict of interest and how to disclose it.
8. **Biographical note.** Please supply a short biographical note for each author. This could be adapted from your departmental website or academic networking profile and should be relatively brief words).
9. **Geolocation information.** Submitting a geolocation information section, as a separate paragraph before your acknowledgements, means we can index your paper's study area accurately in JournalMap's geographic literature database and make your article more discoverable to others. More information.
10. **Supplemental online material.** Supplemental material can be a video, dataset, fileset, sound file or anything which supports (and is pertinent to) your paper. We publish supplemental material online via Figshare. Find out more about supplemental material and how to submit it with your article.
11. **Figures.** Figures should be high quality (1200 dpi for line art, 600 dpi for grayscale and 300 dpi for colour). Figures should be saved as TIFF, PostScript or EPS files.
12. **Tables.** Tables should present new information rather than duplicating what is in the text. Readers should be able to interpret the table without reference to the text. Please supply editable files.
13. **Equations.** If you are submitting your manuscript as a Word document, please ensure that equations are editable. More information about mathematical symbols and equations.
14. **Units.** Please use SI units (non-italicized).

Using third-party material in your paper

If you wish to include any material in your paper for which you do not hold copyright, you will need to obtain written permission from the copyright owner prior to submission. More information on requesting permission to reproduce work(s) under copyright.

Disclosure statement

Please include a disclosure of interest statement, using the subheading "Disclosure of interest." If you have no interests to declare, please state this (suggested wording: *The authors report no conflicts of interest*). For all NIH/Wellcome-funded papers, the grant number(s) must be included in the disclosure of interest statement. Read more on declaring conflicts of interest.

Clinical Trials Registry

In order to be published in a Taylor & Francis journal, all clinical trials must have been registered in a public repository at the beginning of the research process (prior to patient enrolment). Trial registration numbers should be included in the abstract, with full details in the methods section. The registry should be publicly accessible (at no charge), open to all prospective registrants, and managed by a not-for-profit organization. For a list of registries that meet these requirements, please visit the WHO International Clinical Trials Registry Platform (ICTRP). The registration of all clinical trials facilitates the sharing of information among clinicians, researchers, and patients, enhances public confidence in research, and is in accordance with the ICMJE guidelines.

Complying with ethics of experimentation

Please ensure that all research reported in submitted papers has been conducted in an ethical and responsible manner, and is in full compliance with all relevant codes of experimentation and legislation. All papers which report *in vivo* experiments or clinical trials on humans or animals must include a written statement in the Methods section. This should explain that all work was conducted with the formal approval of the local human subject or animal care committees (institutional and national), and that clinical trials have been registered as legislation requires. Authors who do not have formal ethics review committees should include a statement that their study follows the principles of the Declaration of Helsinki.

Consent

All authors are required to follow the ICMJE requirements on privacy and informed consent from patients and study participants. Please confirm that any patient, service user, or participant (or that person's parent or legal guardian) in any research, experiment, or clinical trial described in your paper has given written consent to the inclusion of material pertaining to themselves, that they acknowledge that they cannot be identified via the paper; and that you have fully anonymized them. Where someone is deceased, please ensure you have written consent from the family or estate. Authors may use this Patient Consent Form, which should be completed, saved, and sent to the journal if requested.

Health and safety

Please confirm that all mandatory laboratory health and safety procedures have been complied with in the course of conducting any experimental work reported in your paper. Please ensure your paper contains all appropriate warnings on any hazards that may be involved in carrying out the experiments or procedures you have described, or that may be involved in instructions, materials, or formulae.

Please include all relevant safety precautions; and cite any accepted standard or code of practice. Authors working in animal science may find it useful to consult the International Association of Veterinary Editors' Consensus Author Guidelines on Animal Ethics and Welfare and Guidelines for the Treatment of Animals in Behavioural Research and Teaching. When a product has not yet been approved by an appropriate regulatory body for the use described in your paper, please specify this, or that the product is still investigational.

Submitting your paper

This journal uses ScholarOne to manage the peer-review process. If you haven't submitted a paper to this journal before, you will need to create an account in the submission centre. Please read the guidelines above and then submit your paper in the relevant Author Centre, where you will find user guides and a helpdesk.

If you are submitting in LaTeX, please convert the files to PDF beforehand (you will also need to upload your LaTeX source files with the PDF).

Please note that *International Journal of Food Sciences and Nutrition* uses CrossCheck™ to screen papers for unoriginal material. By submitting your paper to *International Journal of Food Sciences and Nutrition* you are agreeing to originality checks during the peer-review and production processes.

On acceptance, we recommend that you keep a copy of your Accepted Manuscript. Find out more about sharing your work.

Publication charges

There are no submission fees or page charges for this journal.

Colour figures will be reproduced in colour in your online article free of charge. If it is necessary for the figures to be reproduced in colour in the print version, a charge will apply.

Charges for colour figures in print are £250 per figure (\$395 US Dollars; \$385 Australian Dollars; 315 Euros). For more than 4 colour figures, figures 5 and above will be charged at £50 per figure (\$80 US Dollars; \$75 Australian Dollars; 63 Euros). Depending on your location, these charges may be subject to local taxes.

Copyright options

Copyright allows you to protect your original material, and stop others from using your work without your permission. Taylor & Francis offers a number of different license and reuse options, including Creative Commons licenses when publishing open access. Read more on publishing agreements.

Complying with funding agencies

We will deposit all National Institutes of Health or Wellcome Trust-funded papers into PubMedCentral on behalf of authors, meeting the requirements of their respective open access (OA) policies. If this applies to you, please tell our production team when you receive your article proofs, so we can do this for you. Check funders' OA policy mandates here. Find out more about sharing your work.

Open access

This journal gives authors the option to publish open access via our Open Select publishing program, making it free to access online immediately on publication. Many funders mandate publishing your research open access; you can check open access funder policies and mandates [here](#).

Taylor & Francis Open Select gives you, your institution or funder the option of paying an article publishing charge (APC) to make an article open access. Please contact openaccess@tandf.co.uk if you would like to find out more, or go to our Author Services website.

For more information on [license options](#), embargo periods and APCs for this journal please go [here](#).

My Authored Works

On publication, you will be able to view, download and check your article's metrics (downloads, citations and Altmetric data) via My Authored Works on Taylor & Francis Online. This is where you can access every article you have published with us, as well as your free eprints link, so you can quickly and easily share your work with friends and colleagues.

We are committed to promoting and increasing the visibility of your article. Here are some tips and ideas on how you can work with us to promote your research.

Article reprints

For enquiries about reprints, please contact the Taylor & Francis Author Services team at reprints@tandf.co.uk. To order a copy of the issue containing your article, please contact our Customer Services team at Adhoc@tandf.co.uk.

Queries

Should you have any queries, please visit our Author Services website or contact us at authorqueries@tandf.co.uk.

Updated March 2016