

DETECÇÃO DE *CAMPYLOBACTER* TERMOFÍLICOS E OUTROS MICROORGANISMOS INDICADORES DE QUALIDADE EM FRANGOS DESTINADOS À EXPORTAÇÃO

Marcos Aurélio Chien-Lon Minoru Yau*

Harissa El Ghoz Frausto**

Mirian Ueda Yamaguchi***

RESUMO: Alimentos de origem animal, especialmente frangos, representam um fator fortemente ligado à epidemiologia de doenças transmitidas por alimentos. As indústrias avícolas implementam medidas de biossegurança e controle para a eliminação de microorganismos, entretanto, apesar de úteis, são insuficientes para eliminar todos os patógenos do produto final. O objetivo deste trabalho foi verificar a qualidade microbiológica de cortes de frango destinados à exportação, por meio do estudo da prevalência de bactérias que atuam como agentes etiológicos de doenças transmitidas por produtos originados de frango. Microorganismos de grande importância, no que diz respeito à segurança alimentar, devido a sua alta prevalência e por atuarem como os maiores causadores de gastroenterites em humanos, são os *Campylobacter* termofílicos, que apresentaram-se com 6,5% de positividade neste estudo. Outros microorganismos indicadores de qualidade também demonstraram-se em desacordo com normas e regulamentos vigentes, tais como: *Salmonella sp.* (2,2%), *Listeria sp.* (29,4%) e contagem de bactérias aeróbias mesófilas (4,3%). Entretanto, as contagens de coliformes totais, coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e *Staphylococcus* coagulase-positiva confirmaram-se dentro dos limites padrões estabelecidos. Sendo assim, 16,4% das 61 amostras pesquisadas estavam inaceitáveis ao consumo humano, valores estes, que, apesar de baixos, evidenciam-se como potencial risco à saúde da população consumidora.

* Discente do Curso de Biomedicina do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR. E-mail: marcos_yau@hotmail.com

** Bioquímica Responsável pelo Setor de Microbiologia do Laboratório São Camilo de Análises de Alimentos e Água. E-mail: micro@laboratoriosocamillo.com.br

*** Docente Mestre do Curso de Biomedicina do Centro Universitário de Maringá - CESUMAR. E-mail: mirianuy@irapida.com.br

PALAVRAS-CHAVE: *Campylobacter* Termofílicos; Frango; Indicadores de Qualidade; Exportação.

DETECTION OF THERMOPHILIC *Campylobacter* AND OTHER QUALITY INDICATOR MICROORGANISMS IN CHICKEN FOR EXPORT

SUMMARY: Food of animal origin, especially chicken, represents a factor strongly connected to the epidemiology of foodborne diseases. The poultry industry implements biosecurity measures and control to eliminate microorganisms. However, although useful, they are insufficient to eliminate all pathogens of the final product. The aim of this study was to assess the microbiological quality of portions of chicken for export through the study of the prevalence of bacteria that act as etiological agents of diseases caused by products of chicken. The thermophilic *Campylobacter* are microorganisms of great importance regarding food security due to its high prevalence and action as the major cause of gastroenteritis in humans – their positivity rate in this study was 6.5%. Other quality indicators microorganisms also showed at odds with existing rules and regulations, such as: *Salmonella* sp. (2.2%), *Listeria* sp. (29.4%) and counting of mesophilic aerobic bacteria (4.3%). However, the counts of total coliform, thermotolerant coliform, *Escherichia coli* and coagulase-positive *Staphylococcus* confirmed to be within the limits established standards. Therefore, 16.4% from the 61 surveyed samples were unacceptable for human consumption. These values, although low, show themselves as a potential risk to the health of consumers.

KEYWORDS: Thermophilic *Campylobacter*; Chicken; Quality Indicators; Export.

INTRODUÇÃO

A cada ano, bactérias do gênero *Campylobacter*, especialmente as espécies termofílicas *Campylobacter jejuni* e *C. coli*, são responsáveis por estimadamente 400 milhões de casos de gastroenterite humana, tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento, o que as tornam o principal agente etiológico da “diarreia dos viajantes” e a causa mais importante de doença bacteriana transmitida por alimentos, superando doenças entéricas causadas por *Salmonella*

sp., *Shigella sp.* e *Escherichia coli* verotoxigênica, representando um dos mais importantes enteropatógenos para a saúde pública (ZOETE *et al.*, 2007; MOORE *et al.*, 2005).

Os primeiros relatos a respeito deste microorganismo foram realizados por Theodor Escherich em 1886, em um artigo publicado a respeito de uma bactéria patogênica espiralada, não cultivável, associada às enterites infantis (BUTZLER, 2004). Durante muitas décadas, *Campylobacter* era reconhecida apenas como uma causa de doença veterinária, devido ao seu frequente isolamento em bovinos e ovinos. Apenas anos mais tarde, com o aperfeiçoamento de métodos de isolamento, foi possível reconhecer o aumento significativo de casos de doença humana causadas por *Campylobacter* (MOORE *et al.*, 2005).

Campylobacter (Campylobacteriaceae) é constituído por dezoito espécies, seis subespécies e duas biovars. Em relação ao grau de patogenicidade, os representantes mais importantes do gênero são as espécies termofílicas *Campylobacter jejuni*, *C. coli* e *C. lari*, responsáveis por 99% das campylobacterioses (*C. jejuni* 90%). Estas possuem uma variação de temperatura ideal para crescimento bastante limitada, com temperatura máxima de aproximadamente 46°C e mínima de 30°C (HUMPHREY *et al.*, 2007; NEWELL; FEARNLEY, 2003). Estas bactérias diferem muito de outros patógenos associados com doenças transmitidas por alimentos, pois são essencialmente microaerofílicas, crescendo melhor em uma atmosfera contendo concentrações reduzidas de oxigênio (aproximadamente 5%), elevadas concentrações de dióxido de carbono (5 a 10%) e ainda altas concentrações de nitrogênio (ideal 85%) (HUMPHREY *et al.*, 2007).

Campylobacteriose é uma zoonose causada por bactérias comensais do trato gastrointestinal de uma grande variedade de animais selvagens e domésticos (bovinos, suínos, ovinos, gatos, cães, roedores e principalmente aves) (HUMPHREY *et al.*, 2007). É um organismo capaz de sobreviver em uma grande quantidade de ambientes (KEENER *et al.*, 2004). A maior incidência de *Campylobacter* está ligada às aves, pelo fato de possuírem a temperatura intestinal muito próxima à ideal para o crescimento da bactéria (42°C). Estas podem eliminar quantidades superiores a 10⁹ bactérias por grama de fezes, sem mesmo apresentar sintomas clínicos da doença, revelando sua importância na disseminação do organismo no ambiente (SNELLING *et al.*, 2005; CONLAN *et al.*, 2007). *Campylobacter* é altamente infectante em baixas doses, desencadeando doença em humanos com a ingestão inferior a 500 células (ACMSF, 2005). Desta forma, o principal fator de risco é o consumo de carne de frango contaminada, sendo a ingestão da carne de frango crua, mal cozida ou recontaminada após o cozimento a forma de transmissão mais comum para contrair a campylobacteriose em todo o mundo, causando de 50 a 70% das infecções esporádicas (KEENER *et al.*, 2004; CON-

LAN *et al.*, 2007).

O processo inflamatório causado por *Campylobacter* gera uma sintomatologia variada, que vai desde diarreia aquosa e moderada autolimitada até volumosa e sanguinolenta, acompanhada de dor de cabeça, dor abdominal, febre, indisposição, náusea e vômitos ocasionais (BUTZLER, 2004; SNELLING *et al.*, 2005).

Campylobacter pode gerar algumas complicações e sequelas a longo prazo, que compreendem problemas gastrointestinais (perfuração do cólon, hepatite, pancreatite), reumatológicos (Síndrome de Reiter), pulmonares (pneumonia), dermatológicos (erupção da pele, abscesso), intravasculares (bacteremia, choque séptico, endocardite, aneurisma, síndrome urêmica-hemolítica), renais (infecção do trato urinário), neurológicos (meningite, meningoencefalite) e abortos após a infecção intestinal (BUTZLER, 2004; MEAD, 2004; CRUSHELL *et al.*, 2004). Entretanto, a manifestação pós-infecciosa mais grave e que tem sido alvo de muitas pesquisas nos últimos anos devido à sua importância clínica, é a Síndrome de Guillain-Barré (GBS). O desenvolvimento da GBS está mais ligado à infecção por *C. jejuni* e ocorre através de um mecanismo de mimetismo antigênico entre os lipo-oligosacarídeos da bactéria e os gangliosídeos da membrana dos nervos periféricos (POLY; GUERRY, 2008). Isso resulta em doença inflamatória autoimune, onde ocorre destruição da bainha de mielina dos nervos periféricos, causando paralisia neuromuscular aguda, podendo comprometer os músculos da respiração e levar à morte (TAKAHASHI *et al.*, 2004). Estima-se que 1 em cada 1000 casos de campylobacteriose pode evoluir para a GBS (BUTZLER, 2004).

Outra complicação associada com *C. jejuni* é a Síndrome Miller-Fisher, uma variante da Síndrome de Guillain-Barré, também autoimune, caracterizada por paralisia do nervo motor ocular, perda da coordenação dos movimentos musculares voluntários e perda dos reflexos (KOZMINSKI, 2008).

A detecção rápida desta bactéria é de suma importância para garantir a sanidade dos alimentos. Porém, o processo de isolamento e identificação das espécies de *Campylobacter* é demorado e complexo por envolver microorganismos fastidiosos que possuem lenta velocidade de multiplicação e necessitam de condições apropriadas às suas características metabólicas (OLIVEIRA *et al.*, 2005). Os métodos convencionais para seu isolamento em alimentos requerem um mínimo de 4 dias para obtenção de um resultado negativo, o que inclui etapas de pré-enriquecimento, enriquecimento e plaqueamento em ágar seletivo e cerca de 7 dias para confirmação do resultado positivo através da identificação bioquímica (MOORE *et al.*, 2005). Além disso, existem outros métodos de pesquisa da bactéria de forma mais rápida, sensível e específica, destacando-se os testes imunoenzimáticos (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* ou *Enzyme Linked Fluorescent Assay*) ou moleculares (*Polymerase Chain Reaction*) (JORGE, 2005).

A flora microbiana das aves é bastante complexa e muitos outros microorganismos, além de *Campylobacter*, podem estar presentes. Dentre estes, pode-se citar *Salmonella sp.*, *Listeria sp.*, *Escherichia coli*, *Clostridium sp.*, *Staphylococcus aureus* e outros microorganismos indicadores de higiene, como o grupo coliformes totais e termotolerantes e as bactérias aeróbias mesófilas (FORSYTHE, 2002).

Salmonella (Enterobacteriaceae) é conhecida há mais de 100 anos e inclui cerca de 2.500 sorotipos, representando um dos patógenos emergentes mais prevalentes da atualidade (WHO, 2005). A classificação de *Salmonella* em espécies é pouco usada nos estudos epidemiológicos, sendo mais utilizada a nomenclatura relacionada à sorotipagem, por meio da detecção de antígenos capsulares, somáticos e flagelares. Possuem ampla distribuição na natureza, podendo estar presente em porcos, leite e ovos. Porém, assim como *Campylobacter*, as aves constituem o reservatório de maior importância (LOPES *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Alguns sorotipos de *Salmonella* podem causar complicações como septicemia, febre tifoide ou paratifoide e Síndrome de Reiter. Geralmente *Salmonella* está relacionada com surtos envolvendo um grande número de pessoas (FDA/CFSAN, 1992).

A Instrução Normativa nº 70, de 06 de Outubro de 2003, instituiu o Programa de Redução de Patógenos (PRP) pelo monitoramento microbiológico e controle de *Salmonella sp.* em carcaças de frangos e perus. A amostragem de carcaças analisadas é baseada na quantidade de aves abatidas diariamente pelo abatedouro (BRASIL, 2003a).

Bactérias do gênero *Listeria*, principalmente *L. monocytogenes*, também são utilizadas como indicadores higiênicos em todos os estágios da cadeia de processamento de alimentos. É um microorganismo de ampla distribuição ambiental, com caráter ubiquitário, devido à sua capacidade de tolerar pH extremos, de se desenvolver e multiplicar em uma ampla faixa de temperatura (0°C a 44°C) e em ambientes com baixa atividade de água e concentrações elevadas de NaCl. Este conjunto de características faz com que seja considerado um patógeno emergente de grande importância na área de alimentos (APHA, 2001).

A listeriose lidera o posto de doenças associadas a alimentos que causam maior número de mortes e hospitalizações (91%), envolvendo principalmente gestantes, recém-natos e imunocomprometidos (JEMMI; STEPHAN, 2006; EFSA, 2007).

Staphylococcus aureus é a principal espécie do grupo de *Staphylococcus* coagulase-positiva. É uma bactéria patogênica que causa doença de perigo moderado, com sintomas autolimitados e sem ameaça de morte ou sequelas, mas que causa severos desconfortos que são decorrentes da ingestão de toxinas produzidas pelos microorganismos. Os sintomas são evidenciados pela ingestão de uma dose de

toxina menor que 1 µg no alimento contaminado (SILVA *et al.*, 2007). *S. aureus* não é resistente ao calor, sendo facilmente destruído na pasteurização ou na cocção de alimentos, diferentemente de suas toxinas, que resistem ao tratamento térmico e às enzimas proteolíticas (CDC, 2006).

Os principais reservatórios compreendem animais de sangue quente e seres humanos, sendo os manipuladores de alimentos a fonte mais frequente de contaminação. A carne de frango representa uma fonte significativa de contaminação devido ao seu alto teor proteico, alta disponibilidade de água e pH próximo à neutralidade (PEPE *et al.*, 2006).

A contagem total de aeróbios mesófilos em placa (*Aerobic Plate Count*), ou também denominada como contagem padrão em placa (PCA), é o método mais utilizado como indicador geral de qualidade higiênico-sanitária dos alimentos. As bactérias aeróbias mesófilas são constituídas de espécies da família Enterobacteriaceae, dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, dentre outros. Porém, não diferencia tipos de bactéria, nem mede todas as populações bacterianas, mas sim, aquelas que crescem na presença de oxigênio e em faixas de temperatura compreendidas entre 20°C e 45°C (SILVA *et al.*, 2007).

O grupo dos coliformes totais é um subgrupo da família Enterobacteriaceae, que inclui 44 gêneros e 176 espécies. Pertencem a este grupo bactérias originárias do trato gastrointestinal de humanos e animais de sangue quente (*Escherichia*), além de bactérias não entéricas (*Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia* e *Klebsiella*, entre outras). Destaca-se, deste grupo, os coliformes termotolerantes, popularmente conhecidos como coliformes fecais, que crescem preferencialmente em temperaturas próximas a 45±0,5°C (APHA, 2001).

A contagem de coliformes totais e termotolerantes é utilizada para avaliar as condições higiênico-sanitárias do produto, pois, quando em alto número, indica contaminação durante o processamento, limpeza e sanificação inadequada ou tratamento térmico insuficiente. A enumeração de termotolerantes é também empregada como indicador de contaminação fecal, visto que a população deste grupo é constituída de alta proporção de *Escherichia coli* (CARDOSO *et al.*, 2005).

As diversas classes de *E. coli* envolvidas em diarreia são identificadas e classificadas com base em seus fatores de patogenicidade. A mais importante delas é a *E. coli* O157:H7, que é um sorotipo classificado como enterohemorrágico ou também conhecido por *E. coli* verotoxigênica (CDC, 2008a).

A Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, estabelece a tolerância máxima permitida para coliformes termotolerantes em carcaças inteiras, fracionadas ou em cortes de até 10⁴ UFC/g e para miúdos de aves de até 10⁵ UFC/g. Porém, a respectiva legisla-

ção não estabelece parâmetros para contagem padrão em placas de microrganismos aeróbios mesófilos nem para os outros patógenos supracitados em frangos (BRASIL, 2001).

As aves têm um papel especialmente importante, pois podem ser portadoras assintomáticas, excretando continuamente estas bactérias pelas fezes, podendo causar contaminações cruzadas de grande importância nos abatedouros de aves (COLLES *et al.*, 2008; VAN GERWE *et al.*, 2005).

O Brasil é o líder absoluto nas exportações mundiais de carne de frango desde 2004, exportando para aproximadamente 150 países, tendo alcançado no ano de 2007 mais de 3,2 milhões de toneladas, com aumento de 21% em relação ao ano anterior. Atribui-se esta posição de destaque a excelência nos cuidados em biossegurança em toda a cadeia de produção, qualidade e sanidade dos produtos (ABEF, 2008a; UBA, 2008). Além disso, o consumo mundial de frangos passou de 49 milhões de toneladas em 2000 para quase 60 milhões de toneladas em 2007 (ABEF, 2008b).

O presente estudo teve como objetivo analisar a qualidade higiênico-sanitária de cortes de frango brasileiro destinados à exportação, enfocando os patógenos alimentares, especialmente *Campylobacter*, devido ao seu grande impacto na saúde pública mundial, além de haver pouca pesquisa a respeito desta bactéria no Brasil.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 PESQUISA DE *Campylobacter* TERMOFÍLICOS

2.1.1 Preparação da Amostra

Todas as amostras foram analisadas em um laboratório particular de análises de alimentos e água credenciado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e habilitado pela REBLAS/ANVISA na cidade de Maringá, PR.

No período de abril a setembro de 2008 foram analisadas 61 amostras de 13 abatedouros do Paraná, Santa Catarina e São Paulo, com capacidade de processamento entre 40 mil aves/dia a 500 mil aves/dia. Todas as amostras chegaram congeladas em embalagens prontas para serem exportadas. Em seguida, foram colocadas em temperatura de refrigeração (8-10°C) até o total descongelamento.

Após o descongelamento, foram pesadas asepticamente $25 \pm 0,2$ g de porções representativas de diversas partes de cada amostra no interior de sacos plásticos

estéreis *Whirl-Pak* (NASCO). Em seguida, adicionou-se 225 mL de caldo enriquecido seletivo Bolton, suplementado com mistura de antibióticos contendo 20 mg/L de cefoperazona, 20 mg/L de trimetoprim, 20 mg/L de vancomicina e 50 mg/L de cicloheximida (Oxoid, SR 183E), além de 12,5 mL de hemácias desfi-brinadas de equino (Biotério BoaVista). Após a homogeneização em *Stomacher* por 60 segundos, a amostra foi colocada em jarra de anaerobiose (Permutation) contendo gerador de atmosfera de microaerofilia (CampyGen, Oxoid) e fechada hermeticamente, resultando em um ambiente de aproximadamente 5% de O₂, 10% de CO₂ e 85% de N₂, gerando condições ideais para a recuperação e crescimento de *Campylobacter*.

A amostra foi incubada por 4-6 horas em estufa de 36±1°C para a etapa de pré-enriquecimento e por mais 44±4 horas em estufa de 41,5±1°C, correspondente à etapa de enriquecimento seletivo, conforme o método descrito pela ISO 10272-1:2006 (*International Organization for Standardization: Horizontal method for detection and enumeration of Campylobacter spp.*).

2.1.2 Teste de Triagem por Ensaio Imunoenzimático

Ao término do período de incubação, a detecção de *Campylobacter sp.* consistiu-se em testes imunoenzimáticos pelo método ELFA (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*) com o sistema automatizado VIDAS® *Campy* (BioMérieux).

2.1.3 Identificação de *Campylobacter* Termofílicos

Resultados positivos pelo método imunoenzimático foram confirmados por meio do plaqueamento diferencial em meios de cultura seletivos. As culturas enriquecidas das amostras positivas foram inoculadas em ágar mCCDA (*modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar*) (Oxoid CM 739) suplementado com 32 mg/L de cefoperazona e 10 mg/L de anfotericina B (Oxoid SR 155E) e em Agar Bolton Modificado (FRANCHIN *et al.*, 2005) suplementado com a mesma quantidade dos antibióticos utilizados para o caldo enriquecido seletivo Bolton. Em seguida, ambas as culturas foram incubadas invertidas em ambiente de microaerofilia por mais 44±4 horas em temperatura de 41,5±1 °C.

Posteriormente selecionou-se uma colônia característica (incolor ou levemente acinzentada, lisa, convexa e brilhante, com borda regular) de cada placa e inoculou-se em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*, Oxoid) e mais três colônias isoladas foram repicadas em ágar TSA (*Tryptic Soy Agar*, Difco), para a rápida multiplicação da bactéria. As subculturas foram incubadas em estufa de 36°C por 24±2 horas.

Após a incubação, a partir do caldo BHI preparou-se uma lâmina úmida para confirmação da morfologia característica, em forma de espiral ou “S”, e observação dos movimentos característicos de saca-rolha ou vaivém, em microscópio de contraste de fases (Bioval).

Em seguida, a partir do crescimento em ágar TSA, realizou-se a identificação de *Campylobacter* termofílicos pelo sistema padronizado API *Campy* (BioMérieux), por meio de 20 minitestes com substratos desidratados, divididos em duas partes: uma envolvendo testes enzimáticos e convencionais e outra envolvendo testes de assimilação ou inibição. Utilizou-se como controle positivo a cepa *Campylobacter jejuni* ATCC 33291.

2.2 PESQUISA DE *Salmonella* sp.

Das 61 amostras analisadas para pesquisa de *Campylobacter* sp., em 45 delas realizou-se pesquisa de *Salmonella* sp. Pesou-se, da amostra descongelada, mais $25 \pm 0,2$ g no interior de outro saco estéril *Whirl-Pak*, de forma asséptica. Adicionou-se 225 mL de água peptonada tamponada 1% (Oxoid) e após a homogeneização em Stomacher por 60 segundos, realizou-se a etapa de pré-enriquecimento durante 16-20 horas em estufa de $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Em seguida, transferiu-se 0,1 mL em 10 mL de caldo *Salmonella Xpress* (BioMérieux) e incubou-se em banho-maria a $41,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por mais 24-26 horas. Após esta etapa de enriquecimento seletivo, realizou-se a detecção pelo método VIDAS[®], seguindo-se a metodologia BIO 12/16-09/05 validada pela AFNOR (*Association Française de Normalisation*) conforme a ISO 16140. Resultados positivos no método VIDAS[®] foram estriados em ágar MLCB (*Manitol Lysine Crystal Violet Brilliant Green Agar*, Oxoid) e ágar BPLS (*Brilliant Green Phenol Red Lactose Sucrose Agar*, Oxoid) e incubados invertidos em estufa de $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24-26 horas. Após a seleção das colônias suspeitas, foi realizada a triagem em ágar TSI (*Triple Sugar Iron*, Oxoid), ágar LIA (*Lysine Iron Agar*, Difco), meio SIM (*Sulphide Indol Motility*, BBL) e caldo Ureia (*Difco*). Logo após, realizou-se as provas sorológicas dos antígenos polivalentes, flagelares e somáticos (Probac) para antígenos específicos de *Salmonella* sp. e posterior identificação da enterobactéria em API 20E (BioMérieux). Utilizou-se como controle positivo a cepa *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028.

2.3 PESQUISA DE *Listeria* sp.

Realizou-se pesquisa de *Listeria* sp. em 17 amostras das 61 pesquisadas no total. Inicialmente pesou-se $25 \pm 0,2$ g da amostra, como descrito anteriormente, e adicionou-se 225 mL de caldo *Half-Fraser* (Difco) suplementado com 1,25 mL

de citrato férrico de amônio (Difco) e incubou-se a $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24-26 horas, correspondendo ao 1º enriquecimento seletivo. Logo após, transferiu-se 0,1 mL em 10 mL de caldo *Fraser* suplementado (Difco), incubando-o em temperatura de $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ por mais 24 a 48 horas, como etapa secundária do enriquecimento seletivo. Em seguida realizou-se a pesquisa pelo método VIDAS®, segundo a metodologia *AOAC Official Method 999.06 (Association of Official Analytical Chemists)*. Resultados positivos foram estriados em ágar *Palcam* (Difco) e ágar *Oxford* (Difco) e incubados sob as mesmas condições descritas anteriormente. Colônias características foram confirmadas pela prova da catalase (Lab. Catarinense), coloração de Gram (NewProv), fermentação de xilose, manitol e ramnose (InLab) e por fim, realizou-se API *Listeria* (BioMérieux) para identificação das espécies. Utilizou-se como controle positivo a cepa *Listeria monocytogenes* ATCC 7644.

2.4 CONTAGEM DE BACTÉRIAS AERÓBIAS MESÓFILAS

Realizou-se o método de contagem padrão em placa, utilizando-se ágar Padrão de Contagem (PCA, Oxoid), segundo a metodologia descrita pela Instrução Normativa (IN) nº 62, de 26 de Agosto de 2003 (BRASIL, 2003b). Foram pesados outros $25\pm 0,2$ g da amostra e diluídos em 225 mL de água peptonada tamponada 0,1% (Oxoid). A partir desta diluição inicial (10^{-1}), realizaram-se as demais diluições seriadas (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5}) em solução salina peptonada 0,1% e inoculou-se uma alíquota de 1 mL de cada diluição em placas de Petri estéreis (CralPlast). Em seguida, realizou-se o método de *Pour Plate* (plaqueamento em profundidade) por meio da adição de 15-20 mL de ágar PCA fundido e resfriado em banho-maria a $46-48^{\circ}\text{C}$. Após a homogeneização adequada e solidificação, as placas foram incubadas invertidas a $36^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas.

2.5 CONTAGEM DE COLIFORMES TOTAIS, TERMOTOLERANTES E *Escherichia coli*

A partir da diluição inicial utilizada na contagem de mesófilos, pipetou-se 1 mL das diluições seriadas em placas de Petri estéreis. Adicionou-se o ágar VRBA (*Violet Red Bile Agar*, Oxoid) fundido e resfriado em banho-maria a $46-48^{\circ}\text{C}$, homogeneizou-se e deixou-se em repouso até sua solidificação. Em seguida, adicionou-se uma segunda camada do mesmo meio. Após a incubação a $36^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas, realizaram-se as provas confirmatórias para colônias características, por meio da transferência da colônia para um tubo contendo caldo Verde Brillante Bile 2% Lactose (Oxoid), incubados a $36^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas (coliformes totais) e tubos com caldo EC (Difco), incubados em banho-maria a $45\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas

(coliformes termotolerantes), segundo a IN n° 62 (BRASIL, 2003b). A confirmação de *Escherichia coli* consistiu-se na turbidez e formação de gás no interior do tubo contendo caldo EC MUG (Difco) e visualização de fluorescência azul quando submetido à luz ultravioleta, com posterior inoculação em ágar EMB (*Eosin Methylene Blue*, Oxoid) e presença de colônias indol-positivas (NewProv). Utilizou-se como controle positivo a cepa *Escherichia coli* ATCC 11229.

2.6 CONTAGEM DE *Staphylococcus* COAGULASE-POSITIVA

Seguiu-se a metodologia descrita pela IN n° 62 (BRASIL, 2003b) e utilizou-se da mesma diluição inicial usada na contagem de bactérias aeróbias mesófilas. Realizou-se o método *Spread Plate* (plaqueamento em superfície), inoculando-se 0,1 mL de cada diluição sobre a superfície já solidificada de ágar *Baird-Parker* (Oxoid) suplementada com telurito de potássio (Inlab) e suspensão de gema de ovo 50%. Com o auxílio de bastão do tipo “hockey” estéril, espalhou-se o inóculo por toda a superfície do meio, até sua absorção. Após a incubação a $36^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas, as colônias típicas foram transferidas para tubos contendo caldo BHI e posteriormente confirmadas pela prova da catalase, coloração de Gram e prova da coagulase (LaborClin). Utilizou-se como controle positivo a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos das análises microbiológicas de *Campylobacter* termofílicos, *Salmonella* sp., *Listeria* sp., *Staphylococcus* coagulase-positiva, coliformes totais e termotolerantes, *Escherichia coli* e bactérias aeróbias mesófilas, efetuadas nas 61 amostras estão demonstrados na Tabela 1 (p. 392). As 61 amostras constituíram-se de coxa e sobrecoxa, filé de peito, asas e miúdos (fígado, moela e coração) em embalagens para exportação.

O critério de classificação da amostra como qualidade aceitável ou inaceitável está de acordo com a legislação brasileira vigente, Resolução RDC n° 12, de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), com o Regulamento n° 2073 da Comissão das Comunidades Europeias de 15 de novembro de 2005 (COMUNIDADES EUROPEIAS, 2005) e com padrões exigidos pela gerência de qualidade interna dos próprios abatedouros. A Resolução RDC n° 12 estabelece o limite máximo apenas para a presença de coliformes termotolerantes, limitando a contagem máxima de 10^4 UFC/g para carnes resfriadas, congeladas, ou “in natura” de aves (carcaças inteiras, fracionadas ou em cortes) ou contagem máxima de 10^5 UFC/g

para miúdos de aves. O Regulamento n° 2073 utiliza como critério microbiológico de carcaças de frangos a ausência de *Salmonella sp.* em 25 g de amostra. Já os padrões internos dos abatedouros consideram aceitáveis amostras que apresentem contagens inferiores a 10^2 UFC/g para *Staphylococcus* coagulase-positiva e inferiores a 10^5 UFC/g de bactérias aeróbias mesófilas. Atualmente, não há nenhuma restrição que regule a contaminação por *Campylobacter sp.*, embora considere-se qualidade aceitável a ausência de patógenos alimentares em 25 g de amostra.

Tabela 1 Número e porcentagem de análises em desacordo com padrões estabelecidos pela Resolução RDC n° 12, de 02 de janeiro de 2001, Regulamento n° 2073 da Comissão das Comunidades Europeias de 15 de Novembro de 2005 e padrões exigidos pela gerência de qualidade interna dos próprios abatedouros.

BACTÉRIA	ANÁLISES (n)	INACEITÁVEIS (Desacordo com Padrão)	%	LIMITE PADRÃO
<i>Campylobacter sp.</i>	61	4	6,5	Ausência/25g
<i>Salmonella sp.</i>	45	1	2,2	Ausência/25g
<i>Listeria sp.</i>	17	5	29,4	Ausência/25g
<i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva	39	0	0	< 10^2 UFC/g
Coliformes Totais	49	0	0	< 10^4 UFC/g
Coliformes Termotolerantes	49	0	0	< 10^4 UFC/g
<i>Escherichia coli</i>	15	0	0	< 10^4 UFC/g
Mesófilos	47	2	4,3	< 10^5 UFC/g

Sendo assim, das 61 amostras de cortes de frango, 10 (16,4%) apresentaram-se em condições inaceitáveis para o consumo humano, segundo os critérios supracitados. Além disso, duas amostras (3,3%) envolviam a presença tanto de *Listeria sp.* quanto de *Campylobacter* termofílicos. As contagens de bactérias aeróbias mesófilas acima do limite aceitável estabelecido pelos abatedouros ($>10^5$ UFC/g) foram de $4,4 \times 10^5$ UFC/g e $1,35 \times 10^7$ UFC/g.

A Tabela 2 mostra o número e porcentagem das espécies identificadas segundo os testes enzimáticos e de assimilação ou inibição de crescimento, confirmando que *Campylobacter jejuni* (75%) e *Listeria monocytogenes* (40%) são as espécies mais prevalentes de cada gênero (CDC, 2008b; CDC, 2008c; USDA, 2006; FDA/CFSAN, 1992).

Tabela 2 Número e porcentagem das espécies identificadas das amostras positivas para *Campylobacter spp.*, *Listeria spp.* e *Salmonella spp.* nos cortes de frango destinados à exportação.

AMOSTRAS POSITIVAS	ESPÉCIES	n(%)
<i>Campylobacter spp.</i> (n=4)	<i>C. jejuni</i>	3(75%)
	<i>C. coli</i>	1(25%)
<i>Listeria spp.</i> (n=5)	<i>L. monocytogenes</i>	2(40%)
	<i>L. seeligeri</i>	1(20%)
	<i>L. ivanovii</i>	1(20%)
	<i>Listeria sp.</i>	1(20%)
<i>Salmonella spp.</i> (n=1)	<i>Salmonella sp.</i>	1(100%)

Todas as amostras pesquisadas chegaram ao laboratório congeladas. Isso representa um fator que dificulta a recuperação da bactéria, podendo ser em consequência da inibição das reações enzimáticas pela queda de temperatura, ou pela formação de cristais de gelo, que pode resultar no rompimento da estrutura celular e molecular da bactéria (MAZIEIRO, 2007; FORSYTHE, 2002).

Em estudo realizado por Mazieiro (2007), confirmou-se a diminuição da prevalência de *Campylobacter* termofílicos em carnes de frango submetidas à temperatura de congelamento, apresentando 93,3% de positividade em amostras frescas, 53,3% em amostras refrigeradas a 4°C por 7 dias e um decréscimo para 36,6% em amostras congeladas a -20°C por 28 dias. Houve também uma diminuição da média da contagem da bactéria, passando de 3,08 Log₁₀ em amostras frescas para 0,71 Log₁₀ nas congeladas.

A redução da prevalência em amostras congeladas também esteve presente em um estudo realizado pela *Food Standards Agency* (FSA), no Reino Unido, onde a positividade para *Campylobacter sp.* passou de 56% em amostras frescas para 31% em amostras de frango congeladas (FSA, 2001). Em contrapartida, não foram encontradas diferenças significativas na sobrevivência de *Campylobacter sp.* em diferentes temperaturas de refrigeração e congelamento em outros estudos (DAVIS; CONNER, 2007; BHADURI; VAN NIEROP *et al.*, 2005).

Segundo Butzler (2004), quase todas as partes da carcaça de frango, seja ela fresca, resfriada ou congelada, estão frequentemente contaminadas pela bactéria, podendo contaminar qualquer carne crua para consumo, o que confirma a distribuição dos patógenos nos diferentes tipos de amostras pesquisadas. A exportação brasileira de cortes de frangos (1,8 milhão de toneladas em 2007) foi maior que a de frango inteiro (1,1 milhão de toneladas) (ABEF, 2008a), embora

a prevalência de *Campylobacter* sp. e outros patógenos tenha sido maior em frango inteiro do que em cortes (HARISSON *et al.*, 2001; STOYANCHEV *et al.*, 2007; FSA, 2001).

Após o processo de embalagem, a redução do número de patógenos pode ser decorrente da combinação de fatores como exposição ao oxigênio, diminuição da umidade e supressão do organismo pela flora bacteriana competitiva (MABOGO, 2003). Porém, pesquisas envolvendo embalagens inteiras de frango encontraram 34% de confirmação de *Campylobacter* sp. e 11% confirmaram a presença de *Salmonella* sp. (HARISSON *et al.*, 2001). No mesmo estudo encontrou-se 3% de positividade de *Campylobacter* sp. na superfície externa das embalagens e ausência de *Salmonella* sp. nessas amostras.

A incidência das doenças transmitidas por alimentos causadas por patógenos como *Campylobacter*, *Salmonella*, *Escherichia coli* verotoxigênica (VTEC), *Listeria*, *Shigella* e outros é constantemente monitorada em países como Canadá (CANADIAN INTEGRATED SURVEILLANCE REPORT, 2003; THOMAS *et al.*, 2006), Estados Unidos (FOODBORNE DISEASES ACTIVE SURVEILLANCE NETWORK, 2007), Austrália (HALL *et al.*, 2005), Japão (INFECTIOUS DISEASES SURVEILLANCE CENTER, 2008), Hong Kong (THE HONG KONG SOCIETY FOR INFECTIOUS DISEASES, 2004) e países-membros da União Europeia (EFSA, 2007). A campylobacteriose apresentou-se como a causa mais comum de doença gastrointestinal bacteriana nestes países, seguida de *Salmonella* sp., VTEC e *Listeria* sp.. A incidência de *Campylobacter* sp. variou de 0,96 casos confirmados em 100.000 habitantes no Japão a 51,6 na União Europeia, no ano de 2005. Houve decréscimo significativo na incidência da maioria dos patógenos em relação às pesquisas de anos anteriores.

No Brasil, o Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo registrou 274 surtos envolvendo 4997 casos de doenças diarreicas transmitidas por água e alimentos em 2007 (CVE, 2008). Treze surtos foram causados por *Salmonella* sp. e 228 surtos não obtiveram confirmação do agente etiológico.

Estudos recentes de prevalência demonstraram uma variação entre 32% e 90% de frangos *Campylobacter*-positivos e 4% a 52% de amostras positivas para *Salmonella* sp. (CARDINALE *et al.*, 2003; GORMLEY *et al.*, 2008; VAN NIEROP *et al.*, 2005; ZHAO *et al.*, 2001; CUI *et al.*, 2005; JOUAHRI *et al.*, 2007; HARISSON *et al.*, 2001). Pesquisas brasileiras revelaram variação de 47% a 87% de positividade para *Campylobacter* sp. e 15% a 32% para *Salmonella* sp. em frangos e produtos de frangos (MODOLO *et al.*, 2005; CARDOSO *et al.*, 2005; FREITAS; NORONHA, 2007; CARVALHO; CORTEZ, 2005; SANTOS *et al.*, 2000).

A presença de *Listeria* sp. em frangos também apresentou-se com grande variação, que foi de 8% a 70% (JEMMI; STEPHAN, 2006; KALOREY *et al.*, 2005;

PRAAKLE-AMIN *et al.*, 2005).

Não há relação significativa entre contagens altas de mesófilos ou outros indicadores de qualidade, como coliformes e *Salmonella sp.*, com a prevalência de *Campylobacter sp.* em amostras de frangos (CASON *et al.*, 1997; CARDOSO *et al.*, 2005).

Apesar de se dar pouca atenção à pesquisa de *Campylobacter sp.*, existem muitos programas de monitoramento microbiológico focados no controle de *Salmonella sp.* em frangos, como a Instrução Normativa nº 70, de 06 de Outubro de 2003, que instituiu o Programa de Redução de Patógenos (BRASIL, 2003a), o Regulamento nº 2073 da Comissão das Comunidades Europeias de 15 de Novembro de 2005 (COMUNIDADES EUROPEIAS, 2005) e a *WHO Global Salmonella Surveillance Network* iniciada no ano de 2000 (WHO, 2005).

Para aumentar a segurança e a qualidade dos alimentos, o sistema de inspeção deve ser realizado em conjunto com as práticas de garantia de qualidade, baseado nos princípios das Boas Práticas de Fabricação (BPF), Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (PPHO) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC). Estes princípios são recomendados por entidades internacionais como a Organização Mundial do Comércio (WTO), Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), Organização Mundial da Saúde (WHO) e MERCOSUL. A implantação do sistema é exigida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e Ministério da Saúde e por países como Estados Unidos (FDA/CFSAN, 1997) e países da União Europeia (EFSA, 2007).

Desde as exigências para a implantação destas práticas pelos Estados Unidos em 1996, a contaminação de frango por *Campylobacter sp.* tem diminuído de 25% (WHO, 2001) a 50% (GIBBENS *et al.*, 2001). Antes disso, a positividade para *Campylobacter* apresentava-se maior em abatedouros que não empregavam medidas de biossegurança e controle de qualidade (DIAS *et al.*, 1990; CASON *et al.*, 1997; STERN; LINE, 1992).

Este estudo pôde comprovar a boa qualidade dos cortes de frango brasileiro devido à baixa prevalência dos patógenos pesquisados, resultando em um alto número de amostras (83,6%) em condições aceitáveis para o consumo humano, segundo os padrões nacionais e internacionais. A qualidade do frango brasileiro também foi comprovada em um estudo realizado no Reino Unido, onde apresentou uma frequência menor de contaminação por *Campylobacter sp.* e *Salmonella sp.*, quando comparadas a produtos de frango originados de outros países exportadores da Europa e da Ásia (FSA, 2001).

Os abatedouros pesquisados reconhecem a importância da implantação e empregam rigorosamente as medidas higiênico-sanitárias e garantia de qualidade durante todo o processamento dos produtos avícolas a fim de garantir a segurança e

salubridade destes alimentos para os países importadores. Porém, a eliminação de todos os patógenos não pode ser atingida de forma eficiente, mas demonstra-se uma redução em relação ao produto final, que, ao combinar com boas práticas de manejo e cozimento adequado, pode diminuir significativamente a incidência de doenças transmitidas por alimentos.

4 CONCLUSÕES

Apesar de todos os esforços das indústrias avícolas no que diz respeito à adoção de medidas de biossegurança e programas de garantia de qualidade, não é possível eliminar eficientemente todos os patógenos durante a cadeia de processamento de frangos. Porém, a redução dos níveis de contaminação da carne de frango é importante para diminuir a prevalência de doenças transmitidas por alimentos, além de garantir a qualidade e a salubridade dos produtos de frango aos países importadores e, conseqüentemente, aos consumidores.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório São Camilo de Análises de Alimentos e Água de Maringá, Paraná, que possibilitou a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

ABEF - Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos. **Relatório Anual 2007/2008**. 2008a. Disponível em: <http://www.abef.com.br/portal/clientes/abef/cat/Relat%F3rio%202007-08_9952.pdf>. Acesso em: 3 maio 2008.

ABEF - Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos. **Consumo Mundial de Carne de Frango: Principais Países 2000-2007**. 2008b. Disponível em: <http://www.abef.com.br/noticias_portal/exibenoticia.php?notcodigo=12>. Acesso em: 3 maio 2008.

ACMSF - Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food. **Second Report on Campylobacter**, 2005. Disponível em: <<http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/acmsfcampylobacter.pdf>>. Acesso em: 19 abr. 2008.

APHA - *American Public Health Association*. **Compendium of methods of the microbiological examination of foods**. 4. ed. USA: APHA, 2001.

BHADURI, S.; COTTRELL, B. Survival of Cold-Stressed *Campylobacter jejuni* on Ground Chicken and Chicken Skin during Frozen Storage. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 70, n. 12, 2004.

BRASIL. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Dispõe sobre os princípios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**, 2001. Disponível em: <http://www.abic.com.br/arquivos/leg_resolucao12_01_anvisa.pdf>. Acesso em: 23, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 70, de 06 de outubro de 2003. Programa de Redução de Patógenos – Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* sp. em Carcaças de Frangos e Perus. **Diário Oficial [da] União**, 2003a. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=3136>>. Acesso em: 23 de agosto, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial [da] União**, 2003b. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2851>>. Acesso em: 23 ago. 2008.

BUTZLER, J. P. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. **Clinical Microbiology and Infection Journal**, Belgium, v. 11, n. 4, p. 341-342 abr. 2004.

CANADIAN INTEGRATED SURVEILLANCE REPORT. **Salmonella, Campylobacter, pathogenic E. coli and Shigella, from 1996 to 1999**. Health Canada: CCDR, 2003.

CARDINALLE, E. *et al.* Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in Retail Chicken Carcasses in Senegal. **Revue d'Élevage et de Médecine Veterinaire des Pays Tropicaux**, v. 56, n. 1/2, p. 13-16, 2003.

CARDOSO, A. L. S. P. *et al.* Pesquisa de *Salmonella spp*, coliformes totais, coliformes fecais, mesófilos, em carcaças e cortes de frango. **Revista Higiene Alimentar**, v. 19, n. 128, p. 144-150, jan./fev. 2005.

CARVALHO, A. C. F. B.; CORTEZ, A. L. L. *Salmonella spp.* em carcaças, carne mecanicamente separada, lingüiças e cortes comerciais de frango. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 6, p. 1465-1468, nov.-dez. 2005.

CASON, J. A. *et al.* Relationship Between Aerobic Bacteria, Salmonellae, and *Campylobacter* on Broiler Carcasses. **Poultry Science**, v. 76, n. 7, p. 1037-1041, 1997.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. **Staphylococcal Food Poisoning**, 2006. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/staphylococcus_food_g.htm>. Acesso em: 23 ago. 2008.

_____. **Escherichia coli General Information**, 2008a. Disponível em: <http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease_listing/stec_gi.html>. Acesso em: 23 ago. 2008.

_____. **Campylobacter General Information**, 2008b. Disponível em: <http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease_listing/campylobacter_gi.html>. Acesso em: 23 ago. 2008.

_____. **Listeriosis General Information**, 2008c. Disponível em: <http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease_listing/listeriosis_gi.html>. Acesso em: 23 ago. 2008.

COLLES, F. M. *et al.* *Campylobacter* infection of broiler chickens in a free-range environment. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 8, p. 2042-2050, ago. 2008.

COMUNIDADES EUROPÉIAS. Regulamento (CE) nº 2073/2005 da Comissão, de 15 de Novembro de 2005. **Jornal Oficial da União Européia**, n. 338, p. 1-26, 22 dez. 2005.

CONLAN, A. J. K. *et al.* *Campylobacter jejuni* colonization and transmission in broiler chickens: a modelling perspective. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 4, n. 16, p. 819-829, out. 2007.

CRUSHELL, E. *et al.* Enteric *Campylobacter*: Purging its Secrets? **Pediatric Re-**

search Journal, v. 55, n. 1, p. 3-12, jan. 2004.

CUI, S. *et al.* Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Campylobacter spp.* and *Salmonella* Serovars in Organic Chickens from Maryland Retail Stores. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 7, p. 4108–4111, 2005.

CVE - Centro de Vigilância Epidemiológica. **Surtos de doenças transmitidas por água e alimentos notificados ao CVE, Estado de São Paulo, ano 2007.** 2008. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/hidri_estat.html>. Acesso em: 6 set. 2008.

DAVIS, M. A.; CONNER, D. E. Survival of *Campylobacter jejuni* on Poultry Skin and Meat at Varying Temperatures. **Poultry Science**, v. 86, p. 765-767, 2007.

DIAS, T. C. *et al.* Chicken Carcasses as a Source of *Campylobacter jejuni* in Belo Horizonte, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 32, n. 6, p. 414-418, 1990.

EFSA - European Food Safety Authority. **The Community Summary Report On Trends And Sources Of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance And Foodborne Outbreaks In The European Union In 2006.** European Community: EFSA, 2007.

FDA/CFSAN - Food and Drugs Administration/Center for Food Safety and Applied Nutrition. **Hazard analysis and critical control point principles and application guidelines.** 1997. Disponível em:<<http://www.cfsan.fda.gov/~comm/nacmcfp.html>>. Acesso em: 5 jul. 2008.

_____. **Bad Bug Book**, 1992. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~mow/intro.html>>. Acesso em: 5 jul. 2008.

FOODBORNE DISEASES ACTIVE SURVEILLANCE NETWORK – Food-Net / Center for Diseases Control and Prevention (CDC). Preliminary FoodNet Data on the Incidence of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food - 10 States, 2006. 2007. Disponível em:<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5614a4.htm?s_cid=mm5614a4_e>. Acesso em: 23 ago. 2008.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar.** Porto Alegre, RS: ARTMED, 2002.

FRANCHIN, P. R. *et al.* Sources of poultry meat contamination with thermophilic *Campylobacter* before slaughter. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 157-162, abr. /jun. 2005.

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

FSA - *Food Standards Agency*. **UK-wide Survey of *Salmonella* and *Campylobacter* Contamination of Fresh and Frozen Chicken on Retail Sale**. United Kingdom: FSA, 2001.

GIBBENS, J. C. *et al.* A trial of biosecurity as a means to control *Campylobacter* infection of broiler chickens. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 48, n. 2, p. 85-99, jan. 2001.

GORMLEY, F. J. *et al.* Has Retail Chicken Played a Role in the Decline of Human Campylobacteriosis?. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 2, p. 383-390, jan. 2008.

HALL, G. *et al.* Estimating Foodborne Gastroenteritis, Australia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 8, p. 1257-1264, ago 2005.

HARISSON, W. A. *et al.* Incidence of *Campylobacter* and *Salmonella* isolated from retail chicken and associated packaging in South Wales. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, n. 6, p. 450-454, dec. 2001.

HUMPHREY, T. *et al.* *Campylobacter* as zoonotic pathogens: A food production perspective. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, p. 237-257, 2007.

INFECTIOUS DISEASES SURVEILLANCE CENTER. **Infectious Agents Surveillance Report**. 2008. Disponível em: <<http://idsc.nih.gov/iasr/iasr-ge1.html>>. Acesso em: 6 set. 2008.

JEMMI, T.; STEPHAN, R. *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator. **Revue scientifique et technique / Office International des Epizooties**, 2006, v. 25, n. 2, p. 571-580, 2006.

JORGE, L. S. **Comportamento do *Campylobacter jejuni* em diferentes substratos e comparação entre metodologias convencionais e métodos imunoenzimáticos para sua recuperação.** Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 2005.

JOUAHRI, M. *et al.* Prevalence and control of thermotolerant *Campylobacter* species in raw poultry meat in Morocco. **Meso**, 262 v. 9, p. 262 – 267, 2007.

KALOREY, D. R. *et al.* Prevalence of *Listeria monocytogenes* in poultry meat in Vidharba region of India. **XVII European Symposium on the Quality of Poultry Meat.** The Netherlands, 2005.

KEENER, K. M. *et al.* Comprehensive Review of *Campylobacter* and Poultry Processing. **Institute of Food Technologists**, v. 3, p. 106-116, 2004.

KOZMINSKI, M. P. Miller Fisher Variant of Guillain-Barré Syndrome: A Report of Case. **Journal of the American Osteopathic Association**, v. 108, n. 2, p. 51-52, fev. 2008.

LOPES, M. *et al.* Pesquisa de *Salmonella spp.* e microrganismos indicadores em carcaças de frango e água de tanques de pré-resfriamento em abatedouro de aves. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 3, p. 465-476, jul./set. 2007.

MABOGO, R. D. L. **The prevalence and survival of *Campylobacter*, *Salmonella* and *Listeria* species in poultry processing plant.** Dissertation (Master of Science) - Department of Biotechnology, University of the Western Cape (UWC). South Africa, 2003.

MAZIEIRO, M. T. **Contaminação de carcaças de frango por *Campylobacter jejuni* antes e após armazenamento sob resfriamento ou congelamento.** Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos) - Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, 2007.

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

MODOLO, J. R. *et al.* *Campylobacter* em carcaças resfriadas de frangos: análise espacial do fator de risco para a saúde pública. **Revista Higiene Alimentar**, v.

19, n. 135, p. 40-46, set. 2005.

MOORE, J. E. *et al.* *Campylobacter*. **Veterinary Research**, v. 36, p. 351-382, 2005.

NEWELL, D. G.; FEARNLEY, C. Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 8, p. 4343-4351, ago. 2003.

OLIVEIRA, M. F. M. *et al.* Aspectos da contaminação alimentar por *Salmonella*. **Revista Higiene Alimentar**, v. 21, n. 148, p. 47-53, jan./fev. 2007.

OLIVEIRA, T. C. *et al.* Detection of *Campylobacter jejuni* in naturally contaminated chicken skin by melting peak analysis of amplicons in real-time PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 104, n. 1, p. 105-111, sep. 2005.

PEPE, O. *et al.* *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Enterotoxin A in Breaded Chicken Products: Detection and Behavior during the Cooking Process. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 11, p. 7057-7062, 2006.

POLY, F.; GUERRY, P. Pathogenesis of *Campylobacter*. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 24, n. 1, p. 27-31, 2008.

PRAAKLE-AMIN, K. *et al.* Prevalence and genetic characterization of *Listeria monocytogenes* in retail broiler meat in Estonia. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 2, p. 436-440, 2005.

SANTOS, D. M. S. *et al.* Salmonella em carcaças de frango congeladas. **Revista Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 39-42, jan./mar. 2000.

SILVA, N. *et al.* **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 3. ed. São Paulo, SP: VARELA, 2007.

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

STERN, N. J.; LINE, J. E. Comparison of three methods for recovery of *Campylobacter spp.* from Broiler Carcasses. **Journal of Food Protection**, v. 55, n. 99, p. 663-666, 1992.

STOYANCHEV, T. *et al.* Prevalence of *Campylobacter spp.* in poultry and poultry products for sale on the Bulgarian retail market. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 92, n. 3, p. 285-288, Oct. 2007.

TAKAHASHI, M. *et al.* Epidemiology of *Campylobacter jejuni* Isolated from Patients with Guillain-Barré and Fisher Syndromes in Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 335-339, jan. 2005.

THE HONG KONG SOCIETY FOR INFECTIOUS DISEASES. **Travel Health Survey. 2004.** Disponível em: <<http://www.hksid.org/pdf/2004TravelHealthSurvey.pdf>>. Acesso em: 6 set. 2008.

THOMAS, M. K. *et al.* Estimated numbers of community cases of illness due to *Salmonella*, *Campylobacter* and verotoxigenic *Escherichia coli*: Pathogen-specific community rates. **The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 229-234, 2006.

UBA - União Brasileira de Avicultura. **Relatório Anual 2007/ 2008.** 2008. Disponível em:<http://www.uba.org.br/uba_rel08_internet.pdf>. Acesso em: 3 maio 2008.

USDA - United States Department of Agriculture. **Foodborne Illness and Disease, 2006.** Disponível em: <http://www.fsis.usda.gov/fact_sheets/Foodborne_Illness_&_Disease_Fact_Sheets/index.asp>. Acesso em: 23 ago. 2008.

VAN GERWE, T. J. W. M. *et al.* Quantifying Transmission of *Campylobacter spp.* among Broilers. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 10, p. 5765-5770, 2005.

VAN NIEROP, W. *et al.* Contamination of chicken carcasses in Gauteng, South Africa, by *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Campylobacter*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, n. 1, p. 1-6, mar. 2005.

WHO - World Health Organization. **Food and health in Europe: a new basis for action.**, 2001. Disponível em: <<http://www.euro.who.int/document/E82161.pdf>>. Acesso em: 30 ago. 2008.

WHO - World Health Organization. **Who Global Salm-Surv.** 2005. Disponí-

vel em: <<http://www.who.int/salmsurv/GSSProgressReport2005.pdf>>. Acesso em: 3 ago. 2008.

ZHAO, C. *et al.* Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, and *Salmonella* Serovars in Retail Chicken, Turkey, Pork, and Beef from the Greater Washington, D.C., Area. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 12, p. 5431-5436, 2001.

ZOETE, M. R. *et al.* Vaccination of chickens against *Campylobacter*. **Vaccine**, v. 25, n. 30, p. 5548-5557, Jul. 2007.

Recebido em: 21 Agosto 2009

Aceito em: 29 Setembro 2009