

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

VIABILIDADE DE *Campylobacter jejuni* E
MICROORGANISMOS INDICADORES EM RAÇÃO
DE FRANGOS DE CORTE

Matheus Bocchini Rodrigues Alves

Médico Veterinário

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

VIABILIDADE DE *Campylobacter jejuni* E
MICROORGANISMOS INDICADORES EM RAÇÃO
DE FRANGOS DE CORTE

Matheus Bocchini Rodrigues Alves

Orientador: Prof. Dr. Paulo Lourenço da Silva

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária - UFU, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias (Produção Animal).

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL

Março de 2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

-
- A474v
2014 Alves, Matheus Bocchini Rodrigues, 1981-
Viabilidade de *Campylobacter jejuni* e microrganismos indicadores em ração de frangos de corte/ Matheus Bocchini Rodrigues Alves. – 2014.
45 f. : il.
- Orientador: Paulo Lourenço da Silva.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Inclui bibliografia.
1. Veterinária - Teses. 2. *Campylobacter* - Teses. 3. Frango de corte - Teses. I. Silva, Paulo Lourenço. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

A vida deve ser uma constante educação.
Gustave Flaubert

Dedico esta dissertação aos meus pais Flávio e
Lana, meus irmãos Danilo e Lucas e a Flávia.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Flávio e Lana, pelo constante incentivo, amor e educação; graças a eles, o início e continuidade de todas as conquistas realizadas, exemplo de Pais.

Aos meus irmãos, Danilo e Lucas, pela força, companheirismo, grande amizade e confiança, “meus grandes irmãos”...

À Flávia, minha companheira nesta trajetória, pelo constante apoio, paciência e compreensão durante este período que muitas vezes estive ausente.

Ao Prof. Dr. Paulo Lourenço da Silva, meu “mestre”, um grande profissional, pela orientação, amizade e a confiança a mim depositada.

À Prof. Dra. Belchiolina Beatriz Fonseca pela amizade, apoio e grande ajuda com seu conhecimento e experiência com *Campylobacter*.

À Prof. Dra. Daise Aparecida Rossi pelas dicas, amizade e por disponibilizar o laboratório e permitir a realização deste trabalho.

À Eliane, Roberta e Priscila, por me ensinarem as metodologias laboratoriais e me ajudarem durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus avós, tios, primos e amigos que, de uma forma ou outra, contribuíram com sua amizade; gostaria de expressar minha profunda gratidão.

Às empresas Lohmann do Brasil e Granja Planalto por permitirem a realização desta pós-graduação.

SUMÁRIO

	Página
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	8
A. Desenho do estudo	8
B. Preparo do inoculo de <i>Campylobacter jejuni</i>	9
C. Processamento das amostras	9
D. Quantificação de bactérias heterotróficas mesófilas	10
E. Quantificação de coliformes totais e <i>Escherichia coli</i>	11
F. Quantificação de <i>Campylobacter</i> spp.....	11
G. Presença/Ausência de <i>Campylobacter jejuni</i>	12
H. Análise estatística.....	12
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
A. Microrganismos mesófilos	12
B. Coliformes	18
C. <i>Campylobacter jejuni</i>	21
V. CONCLUSÕES.....	27
VI. REFERÊNCIAS	28

VIABILIDADE DE *Campylobacter jejuni* E MICRORGANISMOS INDICADORES EM RAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE

RESUMO – O objetivo desse estudo foi avaliar a viabilidade de *Campylobacter jejuni* e quantificar microrganismos indicadores (bactérias mesófilas, coliformes totais e *E. coli*) em rações inicial e final de frangos de corte artificialmente contaminadas com 10^3 e 10^5 UFC de *C. jejuni* por grama de ração, mantidas em duas diferentes temperaturas de armazenamento (25 e 37°C) e analisadas em quatro períodos de armazenamento distintos 0, 24, 72 e 120 horas. A *C. jejuni* sobreviveu durante todo o período avaliado e se multiplicou quando inoculada 10^3 UFC, sendo observadas as maiores contagens quando a ração foi mantida na temperatura de 37°C. Houve multiplicação de microrganismos mesófilos, mas a quantidade de coliformes não aumentou com o tempo. Este trabalho alerta para a necessidade de melhores investigações sobre a importância da ração na epidemiologia da *C. jejuni* em frangos de corte e a relação mesófilo e *Campylobacter*.

Palavras-chave: *Campylobacter*, coliformes, frango de corte, mesófilos, viabilidade

VIABILITY OF *Campylobacter jejuni* AND BIOINDICATORS IN BROILER FEED

ABSTRACT – The objective of this study was to evaluate the viability of *Campylobacter jejuni* and quantify indicator microorganisms (mesophilic bacteria, total coliforms and *E. coli*) in initial and final broiler feed artificially contaminated with 10^3 and 10^5 CFU of *C. jejuni* per gram of ration, kept at two different temperatures of storage (25 and 37°C) and analyzed on four different storage periods 0, 24, 72 and 120 hours. *C. jejuni* survived throughout the study period and multiplied when inoculated with 10^3 UFC, with the highest counts observed when the feed was kept at a temperature of 37°C. Overall, there was a multiplication of mesophilic microorganisms, but the amount of coliforms didn't increase with time. This work shows that the importance of feed in the epidemiology of *C. jejuni* in broilers should be better assessed and instigates other studies to verify the possible symbiotic relationship between *C. jejuni* and mesophilic.

Keywords: Campylobacter, coliforms, broiler, mesophiles, viability

I. INTRODUÇÃO

O Brasil é destaque no mercado mundial de carne de frango. De acordo com o Relatório Anual 2012 da Ubabef, foi o terceiro maior produtor de carne de frango em 2011 (com crescimento de 6,7% em relação ao ano anterior) e o maior exportador mundial de frango (aumento de 3,2% em relação a 2010), o que gerou uma receita cambial de US\$ 8,2 bilhões (incremento de 21,2%). O consumo per capita de carne de frango também aumentou 7,46% em relação a 2010, passando para 47,38 kg/ hab./ 2011.

Associado a esta expansão do setor e aumento do consumo *per capita*, também se aumenta as exigências por parte do mercado consumidor e a preocupação em relação a qualidade e garantias do produto final (seguro e livre de patógenos). Devido a isso, cada vez mais o conceito de qualidade total deve ser compreendido e executado por todos os segmentos da cadeia de produção de frangos de corte.

A preocupação relacionada à segurança dos alimentos e doenças transmitidas por alimento torna-se cada vez maior. A inocuidade dos alimentos de origem animal destinados ao consumo humano transformou-se em um elemento essencial dos debates sobre saúde pública tanto nacional quanto internacional. Nesse contexto, *Campylobacter* vem sendo considerada emergente e de grande importância, portanto merecendo atenção especial do setor indústria e governamental como o Ministério da Agricultura.

A campilobacteriose é uma das mais importantes doenças transmitidas por alimentos em diversos países. *Campylobacter jejuni* é o principal causador de diarreias bacterianas nos Estados Unidos e Europa (FDA, 2012; EFSA, 2010; EFSA, 2009) e há notificação de números superiores aos casos de salmonelose. Nesse contexto a carne de frango ganha expressão já que seu consumo é o principal fator de risco para campilobacteriose humana (HUMPHREY et al., 2007).

Na União Europeia, os casos de salmonelose em humanos registrou uma queda pelo sexto ano consecutivo, reduzindo quase 9% em 2010, enquanto que os casos de campilobacteriose continuam sendo os mais relatados em humanos desde

2006, de acordo com o relatório anual sobre zoonoses e surtos de origem alimentar divulgados pela Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (*European Food Safety Authority*) e Centro Europeu para a Prevenção e Controle de Doenças (*European Center for Disease Prevention and Control*). Em 2010 foram registrados um total de 212.064 casos de campilobacteriose em humanos, aumentando pelo quinto ano consecutivo de 7% de casos em relação a 2009. Em gêneros alimentícios, *Campylobacter* foi encontrado principalmente na carne de aves crua (ANNUAL REPORT ON ZOOSE AND FOODBORNE OUTBREAKS, 2012).

Espécies de *Campylobacter* termotolerantes estão adaptadas ao trato urogenital e intestinal dos animais e podem ser isoladas de suínos, bovinos e ovinos (HUMPHREY et al, 2007). A prevalência é mais significativa nas aves domésticas e o seu trato intestinal é considerado como principal reservatório de *Campylobacter jejuni* (MACHADO et al., 1994).

Dentro da granja vários fatores estão envolvidos com a infecção das aves, no entanto ainda pouco se sabe sobre a participação da ração na epidemiologia da doença. Linhas de pesquisas envolvendo a cadeia de produção avícola e a epidemiologia da campilobacteriose em aves domésticas são fundamentais para saber como e quando exatamente os frangos se infectam ou podem se infectar com *Campylobacter* spp. Isso ajudaria no melhor entendimento dos fatores predisponentes para infecção das aves e assim, reduzir os riscos de infecção e adotar medidas de profilaxia e controle.

II. REVISÃO DE LITERATURA

O gênero *Campylobacter* pertence à família *Campylobacteriaceae* e é composto por 19 espécies (HUMPHREY et al, 2007). *Campylobacter* spp. são bacilos gram negativos, curvos ou espiralados, em forma de “S” ou asa de gaivota e não formam esporos. São pequenos bastonetes, delgados que medem 0,2µm a 0,5µm de largura por 0,5µm a 8µm de comprimento (PENNER, 1988). São bactérias microaerófilas e termotolerantes que crescem em temperatura ótima de 37 a 43°C

(TRABULSI, 1998; MALBRÁN, 2001; GODOY et al., 2010). Requerem baixas concentrações de oxigênio (5%) e altas concentrações de CO₂ (1%-10%) para cultivo (TORTORA, 2005). Fagundez (2005) cita que bactérias do gênero *Campylobacter* são extremamente sensíveis ao congelamento, à concentração de oxigênio do ar, ao ressecamento e não se multiplicam em alimentos deixados por muitas horas sob alta tensão atmosférica (BLASER et al., 1980; BAYLISS et al., 2000).

A *Campylobacter* é móvel e apresenta um flagelo único em um ou ambos extremos (MALBRÁN, 2001). Não possui fímbrias, porém, tem-se demonstrado que o flagelo e o lipopolissacarídeo (LPS) atuam como adesinas que permitem a adesão da bactéria à célula epitelial e ao muco intestinal (TRABULSI, 1998).

Campilobacteriose é frequentemente transmitida por alimentos principalmente pelo consumo de carne de frango. Nesses animais, a colonização por *C. jejuni* não resulta em sintomas clínicos e dependendo do país, 20 a 100% dos lotes podem ser positivos no abatedouro (JACOBS-REITSMA, 2000).

As carcaças e vísceras das aves podem ser contaminadas com o material fecal durante as etapas do processo de abate e conseqüentemente contaminação e detecção do *Campylobacter* nos produtos acabados destinados ao consumo humano (SAKUMA et al., 1992; CARVALHO et al., 2001). O alimento contendo baixa quantidade desta bactéria, como 500 UFCs, é suficiente para causar a colonização e a infecção nos homens (ALTEKRUSE, 1999).

Evidências em estudos epidemiológicos, como do tipo caso controle e investigações moleculares, suportam a idéia de que há relação entre contaminação por *Campylobacter* em humanos e aves e que as cepas de *Campylobacter* encontradas em aves e humanos são similares (MILLER et al., 2006; SHEPPARD et al., 2009; WASSENAAR et al., 2009).

A colonização por *Campylobacter* é mais frequente a partir da segunda e terceira semana de vida das aves (GREGORY et al., 1997). Jacobs-Reitsma (1997) também comentam que geralmente o primeiro isolamento em aves ocorre entre a terceira e quarta semana de vida, raramente antes da terceira semana. As aves são

portadoras destas bactérias e a infecção pelo *Campylobacter* não causa sinais clínicos aparentes nas aves, o que torna difícil identificar o problema nas granjas.

A *Campylobacter* está presente no trato intestinal da maioria das espécies de aves, embora usualmente não sofram nenhuma enfermidade. *Campylobacter* podem atingir rapidamente números extremamente elevados nos conteúdos cecais, quando a colonização é estabelecida em aves desafiadas experimentalmente, tão alta quanto 10^9 UFC (WASSENAAR et al., 1993), embora este nível pode ser menor em aves naturalmente colonizadas. Podem ser isolados também do baço, fígado, sangue e ceco, e de acordo com Lee (2006), o ceco pode conter entre 10^4 e 10^7 UFC/g de fezes, e segundo Jacob-Reitsma et al. (1995) as aves contaminadas podem eliminar de 10^6 a 10^9 UFC/g de *Campylobacter jejuni* em fezes, sendo assim esse material um importante fonte de introdução e disseminação do *Campylobacter* dentro de um lote.

Bactérias do gênero *Campylobacter* apresentam uma rápida disseminação e propagação entre as aves, sendo que uma grande proporção destas aves excretará o agente através das fezes até o abate (DOYLE, 1988); O mesmo foi citado por Jacob-Reitsma et al. (1995) que em seu trabalho verificou que quando o lote de frangos de corte se tornou positivo, todas as aves se tornaram positivas dentro de uma semana e permaneceram positivas até o abate (taxas de isolamento próximas a 100%), o que torna muito difícil o seu tratamento e prevenção.

Vaz et al (2011) salientam que a transmissão para frangos de corte ocorre pela via horizontal, estando envolvidas tanto a rota oro-fecal quanto a contaminação ambiental residual ou por vetores. As fontes de infecção das aves na granja podem ser a ração, a água e o ambiente de criação contaminado, apesar de que Carvalho et al. (2001) consideram as aves contaminadas como a principal fonte de infecção nas granjas comerciais. Na transmissão horizontal, além das fontes citadas acima, pode-se também considerar os vetores como roedores, insetos, aves silvestres, cascudinhos, moscas, animais domésticos, homem, cama, equipamentos, veículos, fezes de outras aves ou animais presentes nos arredores do galpão, ou seja, falhas também de biosseguridade (BAILEY, 1993; PATTISON, 2001).

Berndtson et al. (1996) estudaram os fatores responsáveis pela introdução e disseminação de *C. jejuni* em aves de granjas comerciais e sugeriram a cama, os

pés dos tratadores e a água como os principais veiculadores deste agente. De acordo com Bailey et al. (1991), a cama deve ser considerada como uma provável fonte de disseminação deste agente.

Para Berndtson et al. (1996), se *C. jejuni* não for isolada, é muito bem aceito que ração, aditivos de ração e cama de galpão não são potenciais fontes de infecção para as aves. Van De Giesse et al. (1992) em sua pesquisa também coletou amostras de ração, cama e água de bebida de lote de frango de corte de propriedade avaliada e foram negativas para *Campylobacter jejuni*.

Para Pearson et al. (1993) a transmissão horizontal particularmente através da água de bebida contaminada com *Campylobacter* parece ser uma fonte potencial de infecção e reinfecção entre as aves de um mesmo lote, também devido o *Campylobacter* spp. sobreviver na água durante um longo período (KAZWALA et al., 1990). De acordo com Bjerkle et al. (1999), a água não clorada é considerada como um importante veículo da infecção, enquanto que a sua cloração pode ser eficaz na inativação deste microorganismo. Os resultados encontrados por Kapperud et al. (1993) também mostram a desinfecção da água de bebida como a medida preventiva de maior impacto sobre a prevalência de *Campylobacter* entre os lotes de frango na região estudada.

A importância dos roedores como reservatório do agente e fonte de contaminação foi também demonstrado por Rodrigues et al. (1998), com taxas de isolamento de *Campylobacter* de 57,45% nas fezes de rato preto. Enquanto que no trabalho de Carvalho et al. (2001), as amostras de fezes de ratos foram negativas para *Campylobacter jejuni*, apesar que durante o período da pesquisa, a granja passou por um processo de controle de pragas, dificultando a continuidade das coletas de amostras.

Apesar das características fisiológicas das matrizes, dos ovos e da *Campylobacter* spp. serem favoráveis à entrada e sobrevivência da bactéria nos ovos, muitos pesquisadores não encontraram evidências de que a transmissão vertical deste agente possa ocorrer (CORY e ATABAY, 2001).

Os métodos de prevenção da infecção de *Salmonella* na cadeia produtiva também funcionam para reduzir a infecção de *Campylobacter*, como: lavagem e

desinfecção de galpões, vazio sanitário, banho dos empregados, troca de roupa e calçados, uso de pedilúvios, desinfecção de veículos e equipamentos, controle de pragas. Essas práticas devem ser intensificadas nos meses de verão, período naturalmente favorável à infecção pela *Campylobacter* spp. (WEDDERKOPP et al., (2000). De acordo com Shane (2002), apesar da ração não ser considerada como um meio de infecção para as aves, a peletização e a adição de ácidos orgânicos eliminarão de forma eficaz a *Campylobacter* spp.

A qualidade higiênica dos alimentos pode ser avaliada pela quantificação de organismos indicadores (SANTOS et al., 2000). A exposição da ração ao ambiente pode comprometer a sua qualidade microbiológica e a avaliação de microrganismos indicadores pode ser uma ferramenta importante para avaliar sua qualidade microbiológica (HINTON e MEAD, 1992; CARDOSO et al., 2005).

O grupo coliforme é composto por bactérias da família Enterobacteriaceae, dos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*. Dentre estas, apenas a *E.coli* tem como habitat primário o trato intestinal do homem e animais homeotérmicos. Coliformes são bastonetes curtos, anaeróbios facultativos, Gram (-) e não esporulados. Os coliformes totais, utilizados como bioindicadores de práticas de higiene deficientes, fermentam a lactose com produção de gás a temperatura de 35 a 37°C, por 48 horas. Os coliformes termotolerantes são coliformes totais que continuam fermentando lactose com produção de gás, incubados à temperatura de 44 a 45,5°C. Sua presença indica contaminação fecal e associação com patógenos (SILVA et al., 2007).

Para a garantia da qualidade das rações devem-se levar em consideração vários pontos desde a produção, recebimento e estocagem da matéria-prima até a produção e armazenagem do produto final (ração), ou seja, atenção durante todo o processo de produção destas rações (SILVA, 1998).

O controle da ração como possível fonte de veiculação de patógenos aos frangos, portanto é importante a análise de *Salmonella* spp., coliformes fecais, coliformes totais e mesófilos. Esses microrganismos são utilizados no controle da qualidade higiênica dos produtos derivados do frango para o consumidor final (CARDOSO et al., 2005). Quando presentes em grande número nestes alimentos indicam falhas durante a produção, como matéria-prima contaminada, limpeza e

desinfecção inadequada de superfícies, higiene insuficiente e condições inapropriadas de tempo e temperatura durante a produção ou conservação dos alimentos, dentre outros (HINTON e MEAD, 1992).

Cardoso et al. (1998) e Carvalho et al. (2005) comentam que a maioria dos microrganismos encontrados nas aves são aeróbios mesófilos. Estas bactérias são constituídas principalmente por espécies de Enterobacteriaceae, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium* e *Streptococcus*. Crescem em aerobiose em temperatura de incubação entre 15 e 40°C, com temperatura média de 35°C e poucos conseguem se desenvolver abaixo de 7°C.

Os coliformes são microrganismos anaeróbios facultativos, gram negativo e não formadores de esporos. A temperatura ótima de crescimento situa-se entre 30 e 37°C, a temperatura máxima é de cerca de 40°C e a mínima está entre 2 e 5°C (TRABULSI, 1999, TORTORA et al., 2005).

Os microrganismos do gênero *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, formam o grupo denominado coliforme (SILVA e JUNQUEIRA, 1995). Alguns destes microrganismos existem no ambiente, mas o habitat da maioria é o trato intestinal dos animais homeotermos e do ser humano, portanto sua presença indica contaminação de origem ambiental e fecal do produto (MOTTA e BELMONT, 2000).

III. MATERIAL E MÉTODOS

A. Desenho do estudo

Utilizou-se nesse trabalho dois tipos de ração de frangos de corte (ração inicial e ração final) provenientes de uma indústria com ciclo completo de produção, localizada no estado de Goiás. A ração inicial era composta por 3.050kcal de energia e 21% de proteína e a ração final 3.300kcal de energia e 18% de proteína. A quantidade dos componentes da ração, o premix e os promotores de crescimento não foram informados pelo fabricante.

Antes do estudo as rações foram testadas para presença de *Campylobacter* spp., quantificação de coliformes totais, *E. coli* e microrganismos mesófilos. A metodologia utilizada está descrita nos itens D - G abaixo. Toda a ração utilizada era negativa para *Campylobacter* spp. e *E. coli*, antes da inoculação artificial com *Campylobacter jejuni*. A quantidade de microrganismos mesófilos era de 5,79 logUFC/g de ração inicial e 5,56 logUFC/g de ração final. A quantidade de coliformes totais era de 3,69 logUFC/g de ração final e 3,10 logUFC/g de ração inicial, sendo ausentes coliformes fecais.

As rações foram inoculadas com uma cepa referência de *Campylobacter jejuni* NCTC 11351 com a finalidade de avaliar a sobrevivência da bactéria em diferentes condições. Essa é uma cepa bem caracterizada e utilizada no mundo inteiro em pesquisas com *Campylobacter jejuni*.

Foram realizadas três repetições para cada ração analisada, em duplicata, testadas em duas temperaturas de armazenamento (25°C e 37°C), dois inóculos (10^3 e 10^5 UFC/g de ração) e em quatro períodos de armazenamento distintos (0, 24, 72 e 120 horas).

A quantificação de bactérias mesófilas e *Campylobacter* spp., assim como a avaliação de presença de *Campylobacter* spp. foi realizada de acordo com o método tradicional (ISO, 2006; SILVA et al., 2007), enquanto a contagem de coliformes foi realizada com o uso de *Compact Dry* (Compact Dry EC Nissui Pharmaceutical Com. Ltda.).

B. Preparo do inóculo de *Campylobacter jejuni*

Foi utilizada a cepa padrão NCTC 11351 de *Campylobacter jejuni* em segundo repique. A cepa congelada foi reativada em caldo Bolton (Oxoid®) e incubada em condições de microaerofilia a 37°C por 4 a 6 horas e 41,5°C por 44 horas $\pm$ 4 horas. Alíquotas foram semeadas em 14 placas de ágar m-CCDA (Oxoid®), incubadas em microaerofilia a 37°C por 4 a 6 horas e 41,5°C por 44 horas $\pm$ 4 horas.

Posteriormente, as colônias formadas nas placas foram divididas e transferidas para dois frascos contendo 200 mL de caldo Bolton (Oxoid®) e incubadas. A suspensão de células formada foi quantificada em placas de ágar m-CCDA (Oxoid®) e as diluições correspondentes às concentrações de 10^3 e 10^5 UFC/mL de *Campylobacter jejuni* foram utilizadas para a contaminação do grupo teste das rações inicial e final. O mesmo procedimento foi realizado para as três repetições.

C. Processamento das amostras

O frasco contendo 200 mL do inóculo correspondente a concentração 10^3 UFC.g⁻¹ de ração, foi dividido em duas alíquotas, cada qual com 100 mL, que foi transferido para um quilograma da ração inicial, e o restante para um quilograma da ração final, em sacos plásticos estéreis. Procedeu-se da mesma forma para o inóculo de concentração 10^5 UFC.g⁻¹ de ração.

A homogeneização do inóculo na ração foi feita pela agitação vigorosa por um minuto e, então, divididas em duas partes iguais.

Para a ração inicial, foram incubados dois pacotes de cada inóculo a temperatura de 25°C, e as outras duas porções à temperatura de 37°C, sendo feito o mesmo processo para a ração final.

As análises microbiológicas de cada amostra foram realizadas imediatamente (tempo 0) e após armazenamento por 24, 72 e 120 horas (Figura 1). Procedeu-se da mesma maneira para todas as repetições.

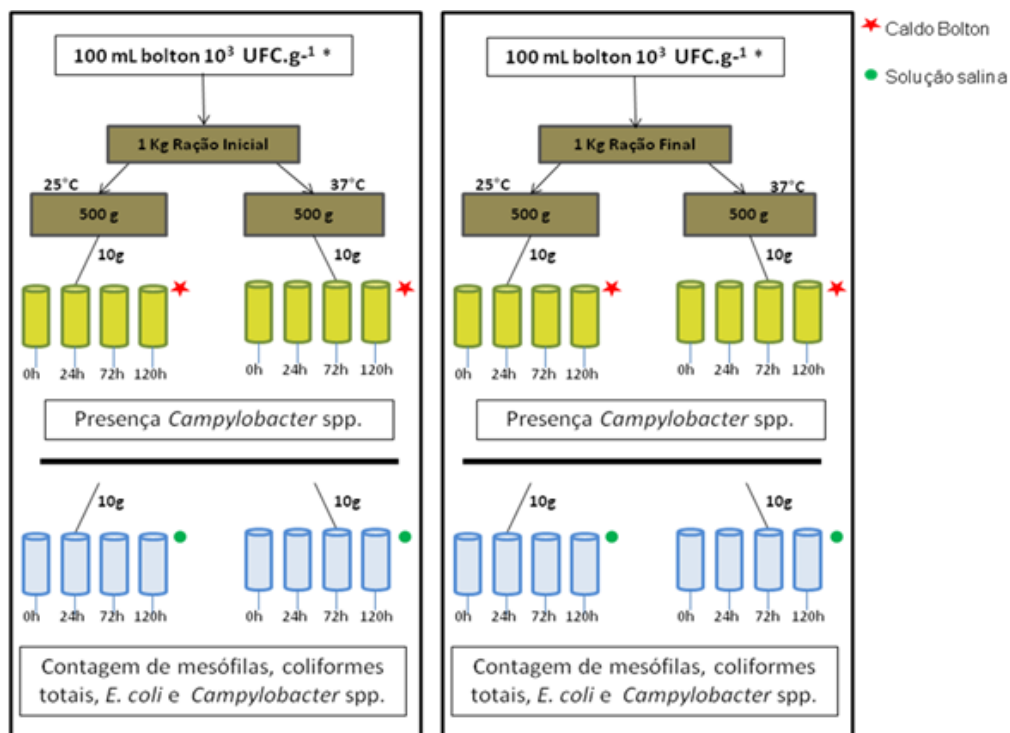


Figura 1. Processamento das amostras de ração inicial e final.

* O mesmo procedimento foi realizado para o inóculo 10^5 UFC.g⁻¹ de ração.

D. Quantificação de bactérias heterotróficas mesófilas

A contagem de bactérias mesófilas presentes na ração foi realizada pelo método de contagem padrão em placas em profundidade, utilizando o ágar PCA (*Plate Count Agar*, DifcoTM).

O procedimento consistiu na pesagem de 10g da ração em 90 mL de peptona de caseína a 0,1% estéril, correspondente à diluição 10^{-1} . Posteriormente, 1 mL da diluição 10^{-1} foi transferido para um tubo contendo 9 mL do mesmo diluente, equivalendo a diluição 10^{-2} e, assim, sucessivamente até chegar a diluição 10^{-5} . Para contagem em placa foram utilizadas as diluições 10^{-2} a 10^{-5} . De cada diluição transferiu-se alíquotas de 1,0 mL para placas de Petri, onde se verteu de 15 a 20 mL do meio PCA (DifcoTM). Após a homogeneização e solidificação do meio, as placas foram incubadas, em posição invertida, em estufa com temperatura de 35°C por 24-48 horas para a contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos (SILVA et al., 2007).

Após a contagem os resultados foram multiplicados pela recíproca da diluição utilizada e o resultado expresso como UFC.g⁻¹.

E. Quantificação de coliformes totais e *Escherichia coli*

Para a enumeração de coliformes totais e *E. coli* foi utilizado o método cromogênico *Compact Dry EC* (Nissui Pharmaceutical Com. Ltda.), que diferencia em uma mesma placa os coliformes totais e *E. coli*. O método é aprovado pelos órgãos de certificação internacional: AOAC 110402, Microval MV0806-004LR e Nordaval 037.

Das diluições 10^{-1} e 10^{-2} , anteriormente preparadas para a contagem de bactérias mesófila, alíquotas de 1 mL foram inoculadas nas placas de *Compact Dry*. Após, as placas foram incubadas a 35°C por 24 horas e, então, foi realizada as contagens de *E. coli* (colônias azuis), e coliformes totais (somatório das colônias rosa e azul).

Após a contagem os resultados foram multiplicados pela recíproca da diluição utilizada e o resultado expresso como UFC.g⁻¹.

F. Quantificação de *Campylobacter* spp.

A contagem de *Campylobacter* spp. foi realizada seguindo o protocolo de análise da ISO 10272-2 (ISO, 2006).

O procedimento foi feito por meio da pesagem de 10g de cada uma das amostras de ração em 90mL de solução peptona de caseína a 1%, equivalente a diluição 10^{-1} . Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas em tubos de 9mL da mesma solução até a diluição 10^{-4} .

Foram utilizadas as diluições 10^{-2} 10^{-3} e 10^{-4} , das quais alíquotas de 0,1mL foram semeadas na superfície de placas de m-CCDA (Oxoid®) suplementado com suplemento antibiótico (Oxoid®) e 5% de sangue equino hemolisado (Probac®). As amostras foram distribuídas em toda superfície com auxílio da alça de Drigalski e as placas foram incubadas em microaerofilia a 37°C por 4 a 6 horas e 41,5°C por 44 horas $\pm$ 4 horas. As colônias típicas do gênero *Campylobacter* foram contadas e o resultado anotado. No mínimo cinco colônias de cada placa foram confirmadas como pertencentes ao gênero pela coloração de Gram modificada e teste da catalase.

G. Presença/Ausência de *Campylobacter jejuni*

Para avaliação da ausência de *Campylobacter* spp. na análise inicial e nos controles negativos das rações inicial e final, e da presença deste microrganismo no grupo teste, foi utilizado o protocolo descrito na ISO 10272-1 (ISO, 2006).

Foram pesadas 10g de cada amostra de ração em 90 mL de caldo Bolton (Oxoid®) suplementado com antibióticos (Oxoid®) e 5% de sangue equino hemolisado, incubadas em microaerofilia (Probac®) a 37°C por 24 horas. Após, uma alíquota de 0,1mL da amostra pré-enriquecida foi semeada na superfície de placas de ágar m-CCDA (Oxoid®) suplementado com antibióticos (Oxoid®) e 5% de sangue equino hemolisado, encobertas por membrana filtrante de celulose com poros de 0,45µm (Millipore®). As placas ficaram em repouso por 30 minutos ou até que todo conteúdo da membrana fosse filtrado. Após a retirada da membrana as placas foram incubadas a 37° C por 44 horas $\pm$ 4 horas em atmosfera microaerofilia (Probac®).

H. Análise estatística

Para análise do teste de normalidade foi realizado o teste de Teste Kolmogorov-Smirnov. Constatada a normalidade, foi realizada a análise da variância seguida pelo teste de Turkey ($p \leq 0,05$) para avaliar as diferenças entre as médias. Para as análises foi utilizado o programa GraphPad Prism.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A. Microrganismos mesófilos

A quantidade de microrganismos mesófilos no grupo teste aumenta com o tempo na ração inicial a partir do dia 3 quando inoculada com 10^3 UFC de *C. jejuni* mantidas a 25°C. Também ocorre um aumento no número de mesófilas no grupo controle em relação ao tempo a partir do dia 5 (tabela 1). A contagem de bactérias mesófilas foi maior no grupo teste comparado ao controle e a ração AC no dia 5. O aumento de mesófilas no grupo controle também ocorreu em relação a ração AC,

porém o aumento no grupo teste é maior comparado ao grupo controle (tabela 1). Fato semelhante ocorre em ração inicial inoculada com 10^5 UFC de *C. jejuni* mantidas a 25°C (tabela 2).

Esses resultados indicam que microrganismos mesófilos se multiplicam durante o tempo na ração inicial quanto mantido a temperatura de 25°C já que houve aumento em número no grupo controle e teste em relação à quantidade inicial de mesófilas (antes da inoculação de *C. jejuni*). No entanto, além do tempo a presença da *C. jejuni* é um fator importante para o aumento do número de bactérias mesófilas, pois no grupo teste há um aumento no dia 5 em relação ao grupo controle negativo (tabelas 1 e 2).

Tabela 1. Contagem de mesófilas (log UFC/g) em ração inicial inoculada com 10^3 UFC de *C. jejuni* mantidas a 25°C.

	Dia zero	Dia 3	Dia 5
Teste	5,58 ^{aA}	5,96 ^{bA}	7,34 ^{cA}
CN	5,90 ^{aA}	5,85 ^{aA}	6,67 ^{bB}
AC	5,79 ^A	5,79 ^A	5,79 ^C

AC: antes da contaminação, CN: controle negativo. Letras minúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística. Letras minúsculas na mesma coluna ou maiúsculas na mesma linha não devem ser interpretadas.

Tabela 2. Contagem de mesófilas (log UFC/g) em ração inicial inoculada com 10^5 UFC de *C. jejuni* mantidas a 25°C.

	Dia zero	Dia 3	Dia 5
Teste	5,58 ^{aA}	6,06 ^{bA}	7,18 ^{cA}
CN	5,90 ^{aA}	5,85 ^{aA}	6,67 ^{bB}
AC	5,79 ^A	5,79 ^A	5,79 ^C

AC: antes da contaminação, CN: controle negativo. Letras minúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística. Letras minúsculas na mesma coluna ou maiúsculas na mesma linha não devem ser interpretadas.

Quando mantidas a 37°C na ração inicial inoculada com 10^3 UFC de *C. jejuni* houve aumento de mesófilas nos grupos teste e controle durante o tempo a partir do dia 3. Esse aumento se mantém no dia 5 no grupo teste, mas no grupo controle aumento do número de microrganismos mesófilos continua. Em relação a ração AC, a partir do dia 3 há aumento de bactérias mesófilas nos grupos teste e controle e esse aumento também é verificado no dia 5 (tabela 3). Fato semelhante ocorre quando se inocula 10^5 UFC de *C. jejuni* e a ração é mantida a temperatura de 37°C,

porém nesse caso o aumento do número de mesófilas no grupo teste ocorre já no primeiro dia se mantendo até o dia 5 (tabela 4).

Os resultados da ração inicial mantida a 37⁰C mostram que há aumento de microrganismos mesófilos nos grupos teste e controle em relação à quantidade inicial de bactérias mesófilas na ração AC de *C. jejuni*, mas que esse aumento a partir do dia 3 para rações inoculadas com 10³UFC e a partir do dia 5 para rações inoculadas com 10⁵UFC, é similar entre os grupos teste e controle. Assim, o aumento dos microrganismos mesófilos é provavelmente devido ao fator tempo sendo que no grupo teste esse aumento ocorre mais precocemente que no grupo controle com inóculo de 10⁵UFC.

Tabela 3. Contagem de mesófilas (log UFC/g) em ração inicial inoculada com 10³UFC de *C. jejuni* mantidas a 37⁰C.

	Dia 1	Dia 3	Dia 5
Teste	5,87 ^{aA}	7,18 ^{bA}	7,61 ^{bA}
CN	5,04 ^{aB}	6,88 ^{bA}	7,48 ^{cA}
AC	5,79 ^A	5,79 ^B	5,79 ^B

AC: antes da contaminação, CN: controle negativo. Letras minúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística. Letras minúsculas na mesma coluna ou maiúsculas na mesma linha não devem ser interpretadas.

Tabela 4. Contagem de mesófilas (log UFC/g) em ração inicial inoculada com 10⁵UFC de *C. jejuni* mantidas a 37⁰C.

	Dia 1	Dia 3	Dia 5
Teste	7,39 ^{aA}	7,49 ^{aA}	7,48 ^{aA}
CN	5,04 ^{aB}	6,88 ^{bB}	7,48 ^{cA}
AC	5,79 ^C	5,79 ^C	5,79 ^B

AC: antes da contaminação, CN: controle negativo. Letras minúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística. Letras minúsculas na mesma coluna ou maiúsculas na mesma linha não devem ser interpretadas.

A variável temperatura parece influenciar a quantidade de microrganismos mesófilos na ração inicial para frangos de corte. E quando armazenada a temperatura de 25⁰C há influência da presença de *C. jejuni* na multiplicação de bactérias mesófilas enquanto a temperatura de 37⁰C apenas a variável tempo leva a multiplicação dos microrganismos mesófilos na ração inicial.

As bactérias mesófilas apresentam temperatura ótima de crescimento entre 25⁰C e 40⁰C (TORTORA et al., 2005). Na ração inicial armazenada a 25⁰C a

presença da *C. jejuni* leva um aumento da quantidade de mesófilos. A causa desse aumento não é objeto desse trabalho, mas provavelmente, apesar da incubação em placas de bactérias mesófilas nesse estudo ter sido de 35°C o que é compatível com o crescimento da *C. jejuni*, a tendência de multiplicação de microrganismos mesófilos na ração, não é pela contagem direta da *C. jejuni*. Isso porque, bactérias do gênero *Campylobacter* são microrganismos microaerófilos e para contagem de mesófilas a incubação é em ambiente de aerofilia. Assim, deve haver alguma relação de simbiose entre microrganismos mesófilos e a *C. jejuni*. Esse mecanismo não é bem explorado na literatura, mas é possível que a presença de *C. jejuni* gere metabólitos que favoreçam não apenas a sobrevivência, mas também a multiplicação de microrganismos mesófilos. Trabalhos futuros devem ser realizados a fim de verificar uma relação de simbiose entre a *C. jejuni* e os microrganismos mesófilos.

Interessantemente quando a ração foi mantida a temperatura de 37°C a presença da *C. jejuni* não interferiu na quantidade de microrganismos mesófilos e nessa temperatura de armazenamento apenas o fator tempo leva a um aumento de microrganismos mesófilos já que o aumento foi em ambos (grupo teste e controle) (tabelas 3 e 4). A temperatura ideal para o crescimento de *C. jejuni* esta entre 37 a 43°C (TRABULSI, 1998; MALBRÁN, 2001; GODOY et al., 2010). E esse trabalho mostrou que a *C. jejuni* se multiplica mais quando a ração inicial é armazenada a temperatura de 37°C comparada a 25°C (tabelas 17 e 18). Assim pesquisas futuras devem ser realizadas a fim de verificar se há uma relação de simbiose entre *C. jejuni* e bactérias mesófilas e se esse efeito é limitado pela temperatura de armazenamento da ração.

Na ração final mantida a 25°C inoculada com 10³UFC de *C. jejuni* a quantidade de mesófilas aumentou no dia 5 para o grupo teste e no grupo controle houve uma diminuição em relação ao tempo. Em relação à ração AC há maior quantidade de microrganismos mesófilos no dia 5 no grupo teste e uma quantidade é inferior no grupo controle. No grupo teste a quantidade de bactérias mesófilas é maior no dia 5 em relação aos grupos controle e a ração AC (tabela 5). Fato

semelhante ocorreu quando a ração final foi mantida a 25°C e inoculada com 10⁵UFC de *C. jejuni* (tabela 6).

Os resultados de contagem de bactérias mesófilas na ração final armazenadas a 25°C indicam que microrganismos mesófilos não se multiplicam a partir do dia 3 na ração final quando a ração é armazenada a temperatura de 25°C, a não ser quando há presença da *C. jejuni* mostrando que a presença dessa bactéria é um fator importante para o aumento de bactérias mesófilas nas condições estudadas.

Tabela 5. Contagem de mesófilas (log UFC/g) em ração final inoculada com 10³UFC de *C. jejuni* mantidas a 25°C.

	Dia 3	Dia 5
Teste	5,47 ^{aA}	6,05 ^{bA}
CN	5,32 ^{aA}	4,65 ^{bB}
AC	5,56 ^A	5,56 ^C

AC: antes da contaminação, CN: controle negativo. Letras minúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística. Letras minúsculas na mesma coluna ou maiúsculas na mesma linha não devem ser interpretadas.

Tabela 6. Contagem de mesófilas (log UFC/g) em ração final inoculada com 10⁵UFC de *C. jejuni* mantidas a 25°C.

	Dia 3	Dia 5
Teste	6,02 ^{aA}	7,16 ^{bA}
CN	5,32 ^{aA}	4,60 ^{bB}
AC	5,56 ^A	5,56 ^C

AC: antes da contaminação, CN: controle negativo. Letras minúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística. Letras minúsculas na mesma coluna ou maiúsculas na mesma linha não devem ser interpretadas.

Na ração final mantida a 37°C inoculada com 10³UFC de *C. jejuni* a quantidade de mesófilas aumenta com o tempo nos grupos teste e controle. Em relação à ração AC, há menor quantidade de bactérias mesófilas nos grupos teste e controle no dia 1, mas a partir do dia 3 a quantidade de microrganismos mesófilos é maior no grupo teste e no grupo controle a quantidade de microrganismos mesófilos é igual à ração AI (tabela 7).

Quando o inóculo era 10⁵UFC de *C. jejuni* mantida a 37°C, a quantidade de bactérias mesófilas aumenta com o tempo a partir do dia 3 e essa quantidade se mantém no dia 5. No grupo controle também há aumento de mesófilas a partir do dia 3. Em relação à ração AC já no dia 1 houve aumento do número de bactérias

mesófilas no grupo teste e esse aumento durou durante todo o período avaliado enquanto no grupo controle houve uma diminuição no dia 1 e a partir do dia 3 a quantidade era igual a ração antes da inoculação (tabela 8).

Tabela 7. Contagem de mesófilas (log UFC/g) em ração final inoculada com 10^3 UFC de *C. jejuni* mantidas a 37°C.

	Dia 1	Dia 3	Dia 5
Teste	4,99 ^{aA}	6,04 ^{bA}	6,77 ^{cA}
CN	4,51 ^{aB}	5,23 ^{bB}	5,92 ^{cB}
AC	5,56 ^C	5,56 ^{AB}	5,56 ^B

AC: antes da contaminação, CN: controle negativo. Letras minúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística. Letras minúsculas na mesma coluna ou maiúsculas na mesma linha não devem ser interpretadas.

Tabela 8. Contagem de mesófilas (log UFC/g) em ração final inoculada com 10^5 UFC de *C. jejuni* mantidas a 37°C.

	Dia 1	Dia 3	Dia 5
Teste	6,12 ^{aA}	7,47 ^{bA}	7,47 ^{bA}
CN	4,52 ^{aB}	5,24 ^{bB}	5,90 ^{cB}
AC	5,56 ^C	5,56 ^B	5,56 ^B

AC: antes da contaminação, CN: controle negativo. Letras minúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística. Letras minúsculas na mesma coluna ou maiúsculas na mesma linha não devem ser interpretadas.

A ração final quando armazenada a 25°C houve uma diminuição no número de bactérias mesófilas no grupo controle, diferente do que ocorreu na ração inicial onde houve crescimento bacteriano, durante o período avaliado. Apesar da dificuldade em justificar tal ocorrência, pode-se inferir que, possivelmente, algum ingrediente presente na ração final, ou diferenças no processo de mistura ou níveis nutricionais possa ter provocado a redução no número de bactérias mesófilas com o tempo no grupo controle.

Nas tabelas 7 e 8, observa-se que na ração final armazenada a 37°C houve multiplicação de microrganismos mesófilos no grupo teste com o tempo e em relação ao grupo controle e a ração AC. Na ração inicial à temperatura de 37°C houve multiplicação de microrganismos mesófilos em relação à ração AC, tanto no grupo teste como no grupo controle. Essa diferença entre os tipos de ração pode estar relacionada a algum componente da ração, ou níveis nutricionais (diferença entre níveis energéticos ou proteicos) ou mesmo erros no processo de mistura durante a

preparação da ração na fábrica. Esses resultados mostram que o tipo de ração também pode interferir na quantidade de microrganismos mesófilos na ração.

A presença da *C. jejuni* na ração final armazenadas à 25 e 37°C leva a uma multiplicação de microrganismos mesófilos no grupo teste, mesmo com essa possível variável na ração final que possa ter inibido ou reduzido a multiplicação no grupo controle destes respectivos tratamentos. Esse resultado vem reforçar a hipótese da relação de simbiose entre a *C. jejuni* e microrganismos mesófilos.

A quantidade de microrganismos indicadores é um parâmetro útil como indicador geral de populações bacterianas avaliando a qualidade do produto, prática de manufatura de matéria prima, condições de armazenamento e processamento, além das indicações relevantes sobre as condições higiênico-sanitárias. Além disso, a maioria dos microrganismos que se encontra nas aves vivas são os aeróbios mesófilos (FRANCO e LANDGRAF, 1996; CARDOSO et al., 2005). Além disso, conforme verificado nesse trabalho, uma alta quantidade de microrganismos mesófilos nas rações pode ser um indicativo da presença de bactérias patogênicas inclusive, *Campylobacter jejuni*.

B. Coliformes

Não houve alteração na quantidade de coliformes no grupo teste ou no grupo controle da ração inicial quando inoculada com 10^3 UFC de *C. jejuni* na mantidas a 25°C com o tempo ou em relação à ração AC (tabela 9). Quando se inoculou 10^5 UFC/g *C. jejuni* na ração inicial mantida a 25°C o mesmo evento ocorreu (tabela 10). Esses resultados indicam que a presença da *C. jejuni* ou o tempo não altera a quantidade de coliformes.

Tabela 9. Contagem de coliformes (log UFC/g) em ração inicial inoculada com 10^3 UFC de *C. jejuni* mantidas a 25⁰C.

	Dia 3	Dia 5
Teste	3,69 ^{aA}	4,11 ^{aA}
CN	2,77 ^{aA}	3,69 ^{aA}
AC	3,69 ^A	3,69 ^A

AC. antes da contaminação, CN: controle negativo. Letras minúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística. Letras minúsculas na mesma coluna ou maiúsculas na mesma linha não devem ser interpretadas.

10. Contagem de coliformes (log UFC/g) em ração inicial inoculada com 10^5 UFC de *C. jejuni* mantidas a 25⁰C.

	Dia 1	Dia 3	Dia 5
Teste	3,52 ^{aA}	3,43 ^{aA}	3,17 ^{aA}
CN	2,77 ^{aA}	2,77 ^{aA}	3,69 ^{aA}
AC	3,69 ^A	3,69 ^A	3,69 ^{aA}

AC. antes da contaminação, CN: controle negativo. Letras minúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística. Letras minúsculas na mesma coluna ou maiúsculas na mesma linha não devem ser interpretadas.

A avaliação de coliformes na ração inicial mantida a 37⁰C não foi realizada por erros laboratoriais durante a avaliação desses microrganismos.

Não houve alteração no número de coliformes na ração final mantida a 25⁰C com inóculo de 10^3 UFC (tabela 11) ou 10^5 UFC de *C. jejuni* (tabela 12) nos grupos teste e controle com o tempo ou em relação a ração AC. Esses resultados indicam que a presença da *C. jejuni* ou o tempo não altera a quantidade de coliformes nas condições avaliadas.

Tabela 11. Contagem de coliformes (log UFC/g) em ração final inoculada com 10^3 UFC de *C. jejuni* mantidas a 25⁰C.

	Dia 3	Dia 5
Teste	2,74 ^{aA}	3,10 ^{aA}
CN	3,46 ^{aA}	3,10 ^{aA}
AC	3,10 ^A	3,10 ^A

AC. antes da contaminação, CN: controle negativo. Letras minúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística. Letras minúsculas na mesma coluna ou maiúsculas na mesma linha não devem ser interpretadas.

Tabela 12. Contagem de coliformes (log UFC/g) em ração final inoculada com 10^5 UFC de *C. jejuni* mantidas a 25⁰C.

	Dia 3	Dia 5
Teste	3,37 ^{aA}	2,78 ^{aA}
CN	3,50 ^{aA}	3,10 ^{aA}
AC	3,10 ^A	3,10 ^A

AC. antes da contaminação, CN: controle negativo. Letras minúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística. Letras minúsculas na mesma coluna ou maiúsculas na mesma linha não devem ser interpretadas.

A avaliação de coliformes na ração final mantida a 37⁰C não foi realizada por erros laboratoriais durante a avaliação desses microrganismos.

Diferente do que houve com os microrganismos mesófilos, em geral, não houve multiplicação de coliformes durante o tempo comparado a ração AC quando as rações final e inicial foram mantidas a temperatura de 25⁰C. A não multiplicação de coliformes totais a temperatura de 25⁰C era esperada já que a temperatura ideal de crescimento de coliformes está entre 30 e 37⁰C (SILVA et al., 2007). Como não foi possível avaliar as rações finais e iniciais mantidas a 37⁰C não se pode afirmar que há influencia da temperatura sobre o crescimento de coliformes nas condições testadas. Mas o que se pode concluir é que em temperatura ambiente (25⁰C) a presença da *C. jejuni* não altera a quantidade de coliformes totais na ração com o tempo.

Kapperud et al (1993) verificaram que a colonização de *Campylobacter* nos lotes de frango também estava associada com a presença de coliformes totais e fecais nas amostras de água. Pellegrini (2012) verificou associação positiva da quantidade de coliformes e bactérias patogênicas com *Salmonella* spp na ração. Apesar de não existir na literatura uma associação positiva entre a presença de *Campylobacter* e o número de coliformes na ração, esse trabalho mostra que a presença dessa bactéria na ração inicial e final para frangos de corte quando mantidas a 25⁰C não leva a um aumento no número de coliformes não existindo assim nenhuma relação de simbiose. Dessa forma, se há uma relação entre *Campylobacter* e coliformes na ração, similar ao que ocorre na água (KAPPERUD et al., 1993) ou com *Salmonella* (PELLEGRINI, 2012) provavelmente deve ser por outros fatores como por exemplo, más condições de higiene e armazenamento do processamento da ração.

C. *Campylobacter jejuni*

Em todos os tratamentos, *C. jejuni* sobreviveu na ração durante todo o tempo avaliado. Na ração inicial armazenada a 25°C inoculada com 10³UFC de *C. jejuni* houve multiplicação da bactéria a partir do dia 3 e se mantendo no dia 5 em relação ao inoculo (tabela 13). Esse evento não foi percebido ao se inocular 10⁵UFC, pois nesse tratamento a quantidade de *C. jejuni* não aumentou com o tempo se mantendo igual à quantidade inoculada até o dia 5 (tabela 14).

Tabela 13. Contagem de *C. jejuni* (log UFC/g) em ração inicial inoculada com 10³UFC de *C. jejuni* mantidas a 25°C.

	Dia zero	Dia 3	Dia 5
Teste	2,90 ^{aA}	4,40 ^{bA}	4,26 ^{bA}
CN	1,00 ^{bB}	1,00 ^{bB}	1,00 ^{bB}
Inoculo	3,00 ^A	3,00 ^C	3,00 ^C

CN: controle negativo. Letras minúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística. Letras minúsculas na mesma coluna ou maiúsculas na mesma linha não devem ser interpretadas. O valor de log UFC = 1 representa o valor de UFC = zero.

Tabela 14. Contagem de *C. jejuni* (log UFC/g) em ração inicial inoculada com 10⁵UFC de *C. jejuni* mantidas a 25°C

	Dia zero	Dia 3	Dia 5
Teste	4,77 ^{aA}	4,64 ^{aA}	4,72 ^{aA}
CN	1,00 ^{aB}	1,00 ^{aB}	1,00 ^{aB}
Inoculo	5,00 ^A	5,00 ^A	5,00 ^A

CN: controle negativo. Letras minúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística. Letras minúsculas na mesma coluna ou maiúsculas na mesma linha não devem ser interpretadas. O valor de log UFC = 1 representa o valor de UFC = zero.

Na ração inicial armazenada a 37°C inoculada com 10³UFC de *C. jejuni* houve multiplicação da *C. jejuni* a partir do dia 3 e se mantendo no dia 5 em relação ao inoculo (tabela 15). Esse evento não foi percebido ao se inocular 10⁵UFC, pois nesse tratamento a quantidade de *C. jejuni* não aumentou com o tempo se mantendo igual à quantidade inoculada até o dia 5 (tabela 16).

Tabela 15. Contagem de *C. jejuni* (log UFC/g) em ração inicial inoculada com 10^3 UFC de *C. jejuni* mantidas a 37°C.

	Dia 3	Dia 5
Teste	5,26 ^{aA}	5,08 ^{aA}
CN	1,00 ^B	1,00 ^B
Inoculo	3,00 ^C	3,00 ^C

CN: controle negativo. Letras minúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística. Letras minúsculas na mesma coluna ou maiúsculas na mesma linha não devem ser interpretadas. O valor de log UFC = 1 representa o valor de UFC = zero.

Tabela 16. Contagem de *C. jejuni* (log UFC/g) em ração inicial inoculada com 10^5 UFC de *C. jejuni* mantidas a 37°C.

	Dia 3	Dia 5
Teste	4,88 ^{aA}	4,45 ^{aA}
CN	1,00 ^B	1,00 ^B
Inoculo	5,00 ^A	5,00 ^A

CN: controle negativo. Letras minúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística. Letras minúsculas na mesma coluna ou maiúsculas na mesma linha não devem ser interpretadas. O valor de log UFC = 1 representa o valor de UFC = zero.

Ao se comparar qual a temperatura de armazenamento da ração leva maior multiplicação de *C. jejuni* percebeu-se com o inóculo de 10^3 UFC na ração inicial armazenada a 37°C há um maior número de *C. jejuni* durante o tempo em relação à ração inicial mantida a 25°C (tabela 17). Com inóculo de 10^5 UFC/g mantida nas mesmas condições acima, esse evento não ocorre e assim a quantidade de *C. jejuni* a 25°C e 37°C são iguais (tabela 18).

Tabela 17. Contagem de *Campylobacter jejuni* (log UFC/g) em ração inicial inoculada com 10^3 UFC de *C. jejuni* mantidas a 25°C e 37°C.

⁰ C/ 10^3 UFC	Dia 3	Dia 5
25°C	4,40 ^{aA}	4,26 ^{aA}
37°C	5,26 ^{aB}	5,08 ^{bB}

Letras minúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística. Letras minúsculas na mesma coluna ou maiúsculas na mesma linha não devem ser interpretadas.

Tabela 18. Contagem de *Campylobacter jejuni* (log UFC/g) em ração inicial inoculada com 10^5 UFC de *C. jejuni* mantidas a 25 °C e 37°C.

⁰ C/ 10^5 UFC	Dia 3	Dia 5
25°C	4,64 ^{aA}	4,72 ^{aA}
37°C	4,88 ^{aA}	4,44 ^{aA}

Letras minúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística. Letras minúsculas na mesma coluna ou maiúsculas na mesma linha não devem ser interpretadas.

Na ração final armazenada a 25⁰C inoculada com 10³UFC de *C. jejuni* houve multiplicação da *C. jejuni* a partir do dia 3 e se mantendo no dia 5 em relação ao inoculo (tabela 19). Esse evento não foi percebido ao se inocular 10⁵UFC, pois nesse tratamento a quantidade de *C. jejuni* não aumentou com o tempo se mantendo igual a quantidade inoculada até o dia 5 (tabela 20). Esses resultados são semelhantes ao que ocorreu com a ração inicial mantida nas mesmas condições.

Tabela 19. Contagem de *Campylobacter jejuni* (log UFC/g) em ração final inoculada com 10³UFC de *C. jejuni* mantidas a 25⁰C.

	Dia zero	Dia 3	Dia 5
Teste	3,14 ^{aA}	4,77 ^{bA}	4,62 ^{bA}
CN	1,00 ^B	1,00 ^B	1,00 ^B
Inoculo	3,00 ^A	3,00 ^C	3,00 ^C

CN: controle negativo. Letras minúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística. Letras minúsculas na mesma coluna ou maiúsculas na mesma linha não devem ser interpretadas. O valor de log UFC = 1 representa o valor de UFC = zero.

Tabela 20. Contagem de *Campylobacter jejuni* (log UFC/g) em ração final inoculada com 10⁵UFC de *C. jejuni* mantidas a 25⁰C.

	Dia zero	Dia 3	Dia 5
Teste	5,33 ^{aA}	4,78 ^{aA}	4,94 ^{aA}
CN	1,00 ^B	1,00 ^B	1,00 ^B
Inoculo	5,00 ^A	5,00 ^A	5,00 ^A

CN: controle negativo. Letras minúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística. Letras minúsculas na mesma coluna ou maiúsculas na mesma linha não devem ser interpretadas. O valor de log UFC = 1 representa o valor de UFC = zero.

Quando a ração final foi armazenada a 37⁰C inoculada com 10³UFC de *C. jejuni* houve multiplicação da bactéria a partir do dia 3 e se mantendo no dia 5 em relação ao inoculo (tabela 21). Esse evento não foi percebido ao se inocular 10⁵UFC, pois nesse tratamento a quantidade de *C. jejuni* diminuiu com o tempo e se manteve igual à quantidade inoculada até o dia 5 (tabela 22).

Tabela 21. Contagem de *Campylobacter jejuni* (log UFC/g) em ração final inoculada com 10^3 UFC de *C. jejuni* mantidas a 37°C.

	Dia 3	Dia 5
Teste	4,88 ^{aA}	5,01 ^{aA}
CN	1,00 ^B	1,00 ^B
Inoculo	3,00 ^C	3,00 ^C

CN: controle negativo. Letras minúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística. Letras minúsculas na mesma coluna ou maiúsculas na mesma linha não devem ser interpretadas. O valor de log UFC = 1 representa o valor de UFC = zero.

Tabela 22. Contagem de *Campylobacter jejuni* (log UFC/g) em ração final inoculada com 10^5 UFC de *C. jejuni* mantidas a 37°C.

	Dia 3	Dia 5
Teste	5,50 ^{aA}	4,86 ^{bA}
CN	1,00 ^B	1,00 ^B
Inoculo	5,00 ^C	5,00 ^A

CN: controle negativo. Letras minúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística. Letras minúsculas na mesma coluna ou maiúsculas na mesma linha não devem ser interpretadas. O valor de log UFC = 1 representa o valor de UFC = zero.

Ao se comparar qual a temperatura de armazenamento da ração final leva maior multiplicação de *C. jejuni* verificou-se que com inoculo de 10^3 UFC mantida a 37°C há um maior número de *C. jejuni* durante o tempo em relação a ração mantida a 25°C (tabela 23) no dia 5. Com inoculo de 10^5 UFC/g mantida nas mesmas condições acima, a quantidade de *C. jejuni* a 25°C é menor no dia 3 em relação a ração mantida a temperatura de 37°C, mas os valores se igualam no dia 5 (tabela 24).

Tabela 23. Contagem de *Campylobacter jejuni* (log UFC/g) em ração final inoculada com 10^3 UFC de *C. jejuni* mantidas a 25 e 37°C.

⁰ C/ 10^3 UFC	Dia 3	Dia 5
25°C	4,77 ^{aA}	4,62 ^{aA}
37°C	4,88 ^{aA}	5,01 ^{aB}

Letras minúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística. Letras minúsculas na mesma coluna ou maiúsculas na mesma linha não devem ser interpretadas.

Tabela 24. Contagem de *Campylobacter jejuni* (log UFC/g) em ração final inoculada com 10^5 UFC de *C. jejuni* mantidas a 25 e 37°C.

⁰ C/ 10^5 UFC	Dia 3	Dia 5
25°C	4,78 ^{aA}	4,94 ^{aA}
37°C	5,50 ^{aB}	4,86 ^{bA}

Letras minúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística. Letras minúsculas na mesma coluna ou maiúsculas na mesma linha não devem ser interpretadas.

A ração não tem sido considerada por alguns pesquisadores uma fonte de contaminação importante dentro da granja (LINDBLUM et al., 1986; CARVALHO et al., 2001; JACOBS et al., 1995). Jacobs et al (1995) não encontraram a presença de *Campylobacter* em amostras de ração coletadas antes de entrar em contato com os frangos em oito ciclos consecutivos em duas granjas na Holanda, mas a *Campylobacter* ssp. foi isolado de 56% e 91% das amostras de fezes cecais frescas nas duas granjas. Em outro experimento, Lindblom et al (1986), verificaram que frangos de corte alojados em ambiente controlado se tornaram colonizados depois de nove semanas e a água e ração foram consideradas improváveis fontes de infecção devido aos resultados bacteriológicos negativos.

Carvalho et al (2001) pesquisaram a presença de *C. jejuni* em amostras de ração coletadas em diferentes pontos dos comedouros em duas granjas comerciais situadas na região de Ribeirão Preto-SP, durante o período de 6 ciclos diferentes e isolou o agente em apenas uma amostra de um total de 170 amostras de ração (0,6%). O que também não permite chegar a uma conclusão e afirmar que a ração seria um potencial veiculador da *C. jejuni* é que este foi isolado na ração somente no final do ciclo do lote (42º dia) enquanto o isolamento em suabes cloacais aconteceu anteriormente.

Apesar dos autores acima não considerarem a ração uma fonte importante de contaminação dos lotes, nesse trabalho verificamos que a *C. jejuni* é capaz de sobreviver durante dias na ração. Portanto, apesar de nesse estudo a inoculação ter sido *in vitro* pode-se considerar que a ração em algum momento pode ter um papel epidemiológico importante nas granjas para disseminação da *C. jejuni*.

A multiplicação da *C. jejuni* quando se inocula 10^3 UFC e a não multiplicação quando inoculada 10^5 UFC de *C. jejuni* pode ter ocorrido devido a uma saturação do número da bactéria nas rações quando atinge contagem próximo a 10^5 UFC. Apesar de essa hipótese ser considerada, esse tipo de saturação não ocorre em outros locais como, por exemplo, no ceco, onde a colonização de *C. jejuni* pode chegar a 10^9 UFC.

A maior multiplicação de *C. jejuni* quando mantida a temperatura de 37°C era esperada já que *C. jejuni* são microrganismos termófilos. Malbrán (2001) e Vaz et al (2011) comentaram que a *Campylobacter jejuni* cresce bem entre 37 e 42°C,

portanto a temperatura de 37°C pode ter favorecido o maior crescimento de *Campylobacter jejuni* quando comparada com as rações mantidas a 25°C e inoculadas com 10³UFC de *Campylobacter jejuni*. Dessa forma, a temperatura pode ser um fator importante dentro das granjas e fábricas de rações principalmente para locais onde a temperatura é alta e não há investimento em ambiência.

Patrick et al (2004) constataram uma correlação entre temperatura ambiente e incidência de campilobacteriose; quando a temperatura ambiente se eleva, há um aumento correspondente na incidência de campilobacteriose em humanos e frangos de corte infectados. Wedderkopp et al. (2001) em suas avaliações na Dinamarca quanto a presença de *Campylobacter jejuni* em lotes de frango, verificaram maior prevalência de amostras positivas durante o período de verão e menor no inverno, constatações semelhantes também foram obtidas por Jacobs-Reitsma et al. (1994). Com base nos achados desses autores podemos especular que a temperatura é um fator importante no isolamento de *Campylobacter*.

As amostras de ração do trabalho de Jacobs et al (1995) foram coletadas antes de entrar em contato com as aves no galpão e ocorreu ausência de isolamento de *Campylobacter* destas amostras. Provavelmente se coletadas no ambiente das aves (principalmente se o lote for positivo), a ração poderia tornar-se contaminada e conseqüentemente via de infecção para as demais aves, pois a viabilidade desta bactéria nas rações foi verificada neste presente estudo.

Muitos autores citados anteriormente, não consideram a ração uma fonte de contaminação primária de *Campylobacter jejuni*. No entanto, essa pesquisa apresenta resultados que devem servir a outras investigações. Muitas vezes as fábricas de rações são habitadas por pragas e/ou animais sinantrópicos destacando-se aves como pombos que são considerados importantes reservatórios de *C. jejuni* e eventualmente, as fezes desses animais podem contaminar a ração que vai para a granja. Essa especulação deveria ser melhor entendida em trabalhos futuros.

V. CONCLUSÕES

Campylobacter jejuni se mantém viável em rações inicial e final de frango de corte quando se inocula 10^5 UFC e se multiplicam quando se inocula 10^3 UFC e a ração permanece armazenada em temperaturas de 25 ou 37°C durante 5 dias. Na temperatura de 37°C a multiplicação de *C. jejuni* é maior comparada à temperatura de 25°C. Além disso, a presença da *C. jejuni* leva a um aumento de microrganismos mesófilos nas rações final e inicial, mas não leva a um aumento no número de coliformes totais. Os resultados deste estudo sugerem que a ração, quando contaminada com *Campylobacter*, pode ser reservatório ambiental significativo e fonte de infecção para as aves, representando um risco aos animais na granja e sendo necessário que este alimento seja incluído nos programas de monitoramento.

VI. REFERÊNCIAS

ALTEKRUSE, S.F.; STERN, N.J.; FIELDS, P.I.; SWERDLOW, D. L. *Campylobacter jejuni*: an emerging foodborne pathogen. **Emerging Infectious Diseases**, v.5, n.1, p.28-35, 1999.

ANNUAL REPORT ON ZONOSSES AND FOODBORNE OUTBREAKS. Salmonella down, Campylobacter up in Europe poultry-related food poisoning: Latest report shows year-on-year fall in Salmonella, but Campylobacter a growing problem. Disponível em: <http://www.wattagnet.com/149394.html>, 2012. Acesso em jan. 2013.

BAILEY, J.S.; COX, N. A.; BLANKENSHIP, L. C.; STERN, N. J. Effect of competitive exclusion microflora on the distribution of Salmonella serotypes in integrated poultry operation. **Poultry Science**, v.70, n.1, p.15, 1991.

BAILEY, J. S. Control of *Salmonella* and *Campylobacter* in poultry production: a summary of work at Russel Research Center. **Poultry Science**, v. 72, p. 1169-1173, 1993.

BAYLISS, C.; MACPHEE, S.; MARTIN, K.; HUMPHREY, T.; BETTS, R. Comparison of three enrichment media for the isolation of *Campylobacter* ssp. From foods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, p. 884-891, 2000.

BERNDSTON, E.; EMANUELSON, U.; ENGVALL, A. 1 – year epidemiological study of campylobacters in 18 Swdish chickens farm. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 26, p. 167-185, 1996.

BJERKLLE, S. Control del *Campylobacter*. **Indústria Avícola**, v. 46, n. 3, p. 12-14, 1999.

BLASER, M.; HARDESTY, H.; POWERS, B.; WANG, W. Survival of *Campylobacter fetus* subsp. *Jejuni* in biological milieus. **Journal of Clinical Microbiology**, vol 27, p.

309-313, 1980.

CARDOSO, A.L.S.P.; CASTRO, A.G.M.; TESSARI, E.N.C.; BALDASSI, L.; PINHEIRO, E.S. Pesquisa de Salmonella spp, coliformes totais, coliformes fecais, mesófilos, em carcaças e cortes de frango. **Higiene Alimentar**, v.19, n.128, p.144-150, 2005.

CARVALHO, A. C. F. B., LIMA, V. H. C., PEREIRA, G. T. Campylobacter em granja avícola. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. p.191-195. 2001.

CARVALHO, A.C.F.B.; CORTEZ, A.L.L.; SALOTTI, B.M.; BÜRGER, K.P.; VIDAL-MARTINS, A.M.C. Presença de microrganismos mesófilos, psicrotróficos e coliformes em diferentes amostras de produtos avícolas. **Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo**, v.72, n.3, p.303-307, 2005.

CORRY, J.E.; ATABAY, HI. Poultry as a source of Campylobacter and related organisms. In: SYMPOSIUM SERIES SOCIETY FOR APPLIED MICROBIOLOGY vol. 30. 2001. pp. 96S-114S.

DOYLE, M. P. Campylobacter jejuni. In: Oblinger, J. L. ed. **Bacteria associated with foodborne disease - A scientific stratus summary**. Chicago, IFT, p. 1-18, 1998.

EFSA. The Community Summary Report Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007. **The European Food Safety Authority Journal**, v. 223, 2009.

EFSA - European Food Safety Authority – Analysis of the baseline survey on the prevalence of Campylobacter in broiler batches and of Campylobacter and Salmonella on broiler carcasses in the EU, 2008, **The EFSA Journal**. Italy, v. 8, n. 3, p. 1503, 2010.

FAGUNDEZ, R.Q. **Detecção de Campylobacter**. Botucatu, 2005. Dissertação

(mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Botucatu, 2005.

FDA. Food and Drug Administration – FDA. Disponível em:

<<http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm070024.htm>>. Acesso em: jul. 2012.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microrganismos patogênicos de importância nos alimentos**. In: FRANCO, B.D.G.M. & LANDGRAF, M. (Eds.). Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Atheneu, 1996, p. 33-38.

GODOI, H. S; GANDRA, T. K. V; GANDRA, E. A. *Campylobacter* spp em alimentos. Uma revisão. **Arquivos de Ciência Veterinária e Zoologia**, v. 13, n. 1, p. 37-41, 2010.

GREGORY, E.; BARNHART, H.; DREESEN, D.W.; STERN, N.J.; CORN, J.L. Epidemiological study of *Campylobacter* spp. in broilers: source, time of colonization and prevalence. **Avian Diseases**, v.41, p.890-8, 1997.

HINTON, M.; MEAD, G. C. Bacterial pathogens in animal feed and their control. **World's Poultry Science Journal**, v.48, n.1, p.72-73, 1992.

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

JACOBS-REITSMA, W.F.; BOLDER, N.M.; MULDER, R.W.A.W. Cecal carriage of *Campylobacter* and *Salmonella* in Dutch broiler flocks at slaughter: a one-year study. **Poultry Science**, 73: 1260- 1266, 1994.

JACOBS-REITSMA, W. F.; GIESSEN, A. W.; BOLDER, N. M.; MULDER, R. W. A. W. Epidemiology of *Campylobacter* spp. at two dutch broiler farms. **Epidemiology and Infection**, v. 114, p. 413-421, 1995.

JACOBS-REITSMA, W. ***Campylobacter in the food supply***. In: Nachamkin I, Blaser MJ, editors. *Campylobacter*. 2nd ed. Washington, D.C: American Society for Microbiology; 2000. pp. 467–481.

JACOBS-REITSMA W.F. Aspects of epidemiology of campylobacter in poultry. **Veterinary Quarterly**, 19:3, 113-117, 2001.

KAPPERUD, G.; SKJERVE, E.; VIK, L.; HAUGE, K.; LYSAKER, A.; AALMEN, I.; OSTROFF, S. M.; POTTER, M. Epidemiological investigation of risk factors for campylobacter colonization in Norwegian broiler flocks. **Epidemiology and Infection**, v. 111, p. 245-255, 1993.

KAZWALA, R. R.; COLLINS, J. D.; HANNAN, J. CRINION, R. A.; O'MAHONY, H. Factors responsible for the introduction and spread of Campylobacter jejuni infection in commercial poultry production. **Veterinary Record**, v. 126,n. 13, p.305–306, 1990.

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

LINDBLOM, G. B.; SJOGREN, E.; KAIJSER, B. Natural campylobacter colonization in chickens raised under different environmental conditions. **Journal of Hygiene**, v. 96, 385-391, 1986.

MACHADO, R. A., TOSIN, I., LEITÃO, M. F. F. Ocurrence of Salmonella sp. E *Campylobacter* sp. In chickens during industrial processing. **Revista de Microbiologia**, v.25, n° 4, p. 239-244, 1994.

MALBRÁN, C. G. **Manual de Procedimientos Campylobacter** – Ministério da Salud. Instituto Nacional de Enfermidades Infecciosas, Departamento de Bacteriología – Serviço Bacteriologia Sanitária, Buenos Aires, 2001, pp. 29.

MILLER, W.G.; ENGLIN, M.D.; KATHARIOU, S.; WESLEY, I.V.; WANG, G. Identification of host-associated alleles by multilocus sequence typing of *Campylobacter coli* strains from food animals. **Microbiology**, v. 152, p. 245-255, 2006.

MOTTA, M.R.A.; BELMONT, M.A. Avaliação microbiológica de amostras de carne moída comercializada em supermercados da região Oeste de São Paulo. **Higiene Alimentar**, v.14, n.78/79, p.59-62, 2000.

PATRICK, M.E.; CHRISTIANSEN, L. E.; WAINO, M.; ETHELBERG, S.; MADSEN, H.; WEGENER, H.C. Effects of climate on incidence of *Campylobacter* spp. in humans and prevalence in broiler flocks in Denmark. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 70, n.12, p. 7474-7480, 2004.

PATTISON, M. Practical intervention strategies for *Campylobacter*. **Journal of Applied Microbiology**, v.90, p.121S-125S, 2001.

PEARSON, A. D., M. GREENWOOD, T. D. HEALING, D. ROLLINS, M. SHAHAMAT, J. DONALDSON, AND R. R. COLWELL. Colonization of broiler chickens by waterborne *Campylobacter jejuni*. **Applied Environmental Microbiology**, v.59, p.987-996, 1993.

PELLEGRINI, D.C.P. **Avaliação de pontos de contaminação por *Salmonella* sp. E coliformes totais durante o preparo de dietas para suínos**. Porto Alegre, 2012. Tese (doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012, 145pp.

PENNER, J. L. The genus *Campylobacter*: a decade of progress. **Clinical Microbiology Review**, v.1, p. 157-172, 1988.

RODRIGUES, J.; SOUSA, D.; PENHA-GONÇALVES, A. Ocorrência e caracterização de *Campylobacter* spp em pardal, rato e pombo. **Revista**

Portuguesa de Ciências Veterinárias, v.93, n.526, p.74-78, 1998.

SAKUMA, H., FRANCO, D. G. M., FERNADEZ, H. Occurence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in retail raw chicken meat and giblets in São Paulo, Brazil. **Revista de Microbiologia**, v. 23, p. 13-16, 1992.

SANTOS, E.J., CARVALHO, E.P., SANCHES, R.L., BARROS, B.E.B. Qualidade microbiológica de farinhas de carne e ossos produzidas no Estado de Minas Gerais para produção de ração animal. **Clínica Agropecuária**, v.24, n.2, p.425-433, 2000.

SHANE, S. M. Contaminação por *Campylobacter* em Frangos. In: CONFERÊNCIA APINCO 2002 DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2002, Campinas. **Anais...**Campinas: FACTA - Fundação Apinco de Ciências Aviárias, 2002. p. 253-261.

SHEPPARD, S.K.; DALLAS, J.F.; MACRAE, M.; MCCARTHY, N.D.; SPROSTON, E.L.; FORBS, K.J. *Campylobacter* genotypes from food animals, environmental sources and clinical disease in Scotland 2005/6. **International journal of food microbiology**, v. 134, p. 96-103, 2009.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**, 3ª Edição, São Paulo: Varela, 2007.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

TRABULSI, R. T. et al. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 1999. 586p.

VAN De GIESSE, A.; MAZURIER, S.I.; JACOBS-REITSMA, W.; JANSEN, W.; BERKERS, P.; RITMEESTER, W.; WERNARS, K. Study on the Epidemiology and Control of *Campylobacter jejuni* in Poultry Broiler Flocks. **Applied and**

Environmental Microbiology, v. 58, n.6, p. 1913-1917, 1992.

VAZ, C. S L.; VOSS-RECH, D.; POZZA, J. S.; WURFEL, S. F. R.; MATTOS, G. L. M.; SANTOS, F. B. O.; SILVA, V. S. Aspectos Epidemiológicos de *Campylobacter* em Frangos de Corte. **Avicultura Industrial**, N.10, p. 12-17, 2011.

WASSENAAR, T. M., B. A. VAN DER ZEIJST, R. AYLING, and D. G. NEWELL. Colonization of chicks by motility mutants of *Campylobacter jejuni* demonstrates the importance of flagellin A expression. **J. Gen. Microbiol.** 139:1171-1175, 1993.

WASSENAAR, T.M.; FERNANDEZ-ASTORGA, A.; ALONSO, R.; MARTEINSSON, V.T.; MAGNUSSON, S.H. Comparison of *Campylobacter* fla-SVR genotypes isolated from humans and poultry in three European regions. **Letters in Applied Microbiology**, v.49, p. 388-395, 2009.

WEDDERKOPP, A. et al. National surveillance of *Campylobacter* in broilers at slaughter in Denmark in 1998. **Avian Diseases**, v.44, n.4, p.993-9, 2000.

WEDDERKOPP, A.; GRADEL, K.O.; JORGENSEN, J.C. & MADSEN, M. Pre-harvest surveillance of *Campylobacter* and *Salmonella* in Danish broiler flocks: a 2-year study. **International Journal of Food Microbiology**, v. 68, p.53-59, 2001.