

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

TRANSMISSÃO VERTICAL DE *Campylobacter*
***coli* EM MATRIZES PESADAS E AVES LPE**

Gutemberg da Silva Felipe
Médico Veterinário

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL
Julho de 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**TRANSMISSÃO VERTICAL DE *Campylobacter*
coli EM MATRIZES PESADAS E AVES LPE**

Gutemberg da Silva Felipe

Orientadora: Dra. Daise Aparecida Rossi

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

Julho de 2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- F315t Felipe, Gutemberg da Silva, 1974-
Transmissão vertical de *Campylobacter coli* em matrizes pesadas e aves LPE [manuscrito] / Gutemberg da Silva Felipe. - 2009.
60 f.
- Orientadora: Daise Aparecida Rossi.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Inclui bibliografia.
1. *Campylobacter* - Teses. I. Rossi, Daise Aparecida. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 579.835

"É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me
esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver ..."

(Martin Luther King)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, pois sem Ele, nada seria possível e não seria capaz de desenvolver esse trabalho. Aos meus pais Lucemberg e Nilza pelo esforço, dedicação e compreensão, em todos os momentos desta e de outras etapas de minha vida. Em especial, ao meu amigo Jairo Pena, pelo mútuo aprendizado de vida, durante nossa convivência, no campo profissional e particular, além da minha eterna gratidão. E a todos aqueles que acreditam que a ousadia e o erro são caminhos para as grandes realizações.

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar meu caminho e me dar forças para sempre seguir em frente.

Aos meus pais pela sólida formação dada até minha juventude e pelo apoio e incentivo na continuidade de minha jornada, meus eternos agradecimentos.

Às minhas colegas de trabalho, Roberta Torres de Melo e Diene Siqueira da Silva, pelas sugestões e proveitosa troca de experiências durante a realização deste trabalho além da disponibilidade em me auxiliar quando foi preciso, e em especial à Belchiolina Beatriz Fonseca, pelo seu profissionalismo exemplar, pelo apoio nos momentos bons e menos bons, e pela sua amizade.

Aos meus amigos, Claudio Yudi, Ana Carolina e Paulo Freitas.

Aos professores, André L. Quagliatto Santos; Robson C. Antunes; Ednaldo C. Guimarães; Evandro de Abreu Fernandes e Mara R. B. de Matos Bueno.

A minha orientadora, a quem devoto a mais sincera e efusiva admiração, a qual prontamente aceitou o desafio de orientar esta pesquisa me acompanhando e me direcionando em todas as etapas do trabalho, apesar de todas as dificuldades ligadas ao tema.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS.....	16
2.1. Geral.....	16
2.2. Específicos.....	16
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1. Inóculo bacteriano.....	25
4.2. Grupos Experimentais.....	26
4.2.1. Inoculação de <i>C. coli</i> em matrizes de corte e análise do conteúdo interno dos ovos e embriões.....	26
4.2.2. Inoculação de <i>C. coli</i> em ovos de aves SPF.....	28
4.3. Análise laboratorial.....	29
4.3.1. Preparo das amostras.....	29
4.3.2. Análise molecular.....	30
4.3.3. Pesquisa de <i>Campylobacter</i> sp – cultivo convencional.....	31
4.4. Análise Estatística.....	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1. <i>Campylobacter</i> em suabes cloacais de matrizes inoculadas com <i>C.</i> <i>coli</i>	33
5.2. <i>Campylobacter</i> nos ovos frescos, embriões e pintinhos provenientes das matrizes artificialmente infectadas por via intraesofágica.....	36
5.3. <i>Campylobacter</i> no conteúdo dos ovos, embriões e pintinhos provenientes de ovos SPF artificialmente inoculados na câmara de ar....	40
5.4. Comparação entre as técnicas de análise e contagem das bactérias.....	49
6. CONCLUSÃO.....	52
REFERÊNCIAS.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

CCDA – “Cefoperazone deoxycholate Agar”

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

DNTPs – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

I – Amostras Indeterminadas

LPE – Livres de Patógenos Específicos

M – Matrizes

ME – Mortalidade Embrionária

N – Amostras Negativas

PCR – Reação Polimerase em Cadeia

P – Amostras Positivas

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

VNC – Células Viáveis e Não Cultiváveis

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Número e tipo de amostras coletadas para análise de matrizes pesadas inoculadas via Intraesofágica.

TABELA 2. *Campylobacter* sp em suabe cloacal de aves artificialmente inoculadas por via intraesofágica, utilizando protocolos de análise molecular^a e cultivo convencional^b.

TABELA 3. Espécies de *Campylobacter* isoladas em suabes cloacais de matrizes e galo inoculados artificialmente via intraesofágica e positivas em análise molecular¹.

TABELA 4. *Campylobacter* em ovos frescos provenientes de matrizes inoculadas via intraesofágica com *Campylobacter coli*.

TABELA 5. Viabilidade e presença de *Campylobacter* em embriões de seis dias de incubação, provenientes de ovos de matrizes inoculadas via intraesofágica com *Campylobacter coli*.

TABELA 6. Viabilidade e presença de *Campylobacter* em embriões ou pintos eclodidos após 21 dias de incubação, provenientes de ovos de matrizes inoculadas via intraesofágica com *C. coli*.

TABELA 7. Influência da positividade para *C. coli* na mortalidade embrionária (ME) de embriões provenientes de matrizes inoculadas via intra-esofágica (teste do quiquadrado χ^2).

TABELA 8. Presença de *Campylobacter* em albume e vitelo de ovos SPF, previamente inoculados via câmara de ar com 10^3 UFC.mL⁻¹ de *C. coli* e incubados por 24 horas.

TABELA 9. Viabilidade e presença de *Campylobacter* em embriões com 6 dias de incubação provenientes de ovos SPF, previamente inoculados via câmara de ar com 10^3 UFC.mL⁻¹ de *C. coli*, incubados por seis dias.

TABELA 10. Viabilidade e presença de *Campylobacter* em embriões provenientes de ovos SPF, previamente inoculados via câmara de ar com 10^3 UFC.mL⁻¹ de *C. coli*, incubados por 13 dias.

TABELA 11. Viabilidade e presença de *Campylobacter* em embriões provenientes de ovos SPF, previamente inoculados via câmara de ar com 10^3 UFC.mL⁻¹ de *C. coli*, incubados por 17 dias.

TABELA 12. Viabilidade e presença de *Campylobacter* no vitelo de embriões, ou jejuno, ceco e vitelo de pintos provenientes de ovos SPF inoculados na câmara de ar com 10^3 UFC.mL⁻¹ de *C. coli*, incubados por 21 dias.

TABELA 13.A. Teste do quiquadrado (χ^2) relacionando viabilidade e a presença para *Campylobacter coli* em embriões provenientes de ovos SPF do grupo teste e grupo controle inoculados na câmara de ar com 10^3 UFC.mL⁻¹ de *C. coli*, incubados por 21 dias.

TABELA 13.B. Teste do quiquadrado (χ^2) relacionando viabilidade e a presença para *Campylobacter coli* em embriões provenientes de ovos SPF do grupo teste positivo e teste negativo inoculados na câmara de ar com 10^3 UFC.mL⁻¹ de *C. coli*, incubados por 21 dias.

TABELA 14. Teste kappa relacionando os resultados de PCR e cultivo microbiológico convencional em suabes cloacais de matrizes inoculadas via intraesofágica com 10^3 UFC.g⁻¹ de *C. coli*.

TABELA 15. Teste kappa relacionando os resultados de PCR e cultivo microbiológico convencional em embriões e pintos provenientes de ovos SPF inoculados com 10^3 UFC.g⁻¹ de *C. coli*.

TRANSMISSÃO VERTICAL DE *Campylobacter coli* EM MATRIZES PESADAS E AVES LPE

RESUMO – Objetivando investigar a existência de transmissão vertical, quatro matrizes pesadas e um galo foram artificialmente inoculados via intraesofágica com *Campylobacter coli* (FIOCRUZ-RJ), e seus ovos e embriões foram pesquisados para a presença da bactéria pelas técnicas de PCR *real time* e cultivo em placas. Nestas amostras também foi verificada a viabilidade e a idade da mortalidade embrionária. Paralelamente, 50 ovos SPF (*specific pathogen free*) foram inoculados na câmara de ar com 10^3 UFC de *C. coli* e após incubação, seus embriões foram submetidos às mesmas análises. Nos embriões e ovos férteis de matrizes inoculadas, a bactéria somente foi identificada pela metodologia molecular, mas nos ovos SPF a bactéria foi detectada por ambas as técnicas. Não houve relação entre a mortalidade embrionária e positividade para *Campylobacter coli* em embriões de matrizes inoculadas via intraesofágica ($P < 0,05$). Porém o mesmo teste (quiquadrado- χ^2) mostrou que a presença da bactéria é causa de mortalidade embrionária precoce de embriões provenientes de ovos SPF. Existe boa concordância entre o teste de PCR *real time* e o cultivo em placas em amostras de fezes de matrizes inoculadas via intraesofágica, e excelente concordância quando foram analisadas amostras de embriões SPF oriundos de ovos inoculados na câmara de ar, cujos resultados foram comparados pelo coeficiente kappa. Em embriões de matrizes inoculadas via intraesofágica a *C. coli* só foi detectada no protocolo molecular, com positividade baixa, não sendo recuperada pela técnica do cultivo em placas. Os resultados deste estudo permitem concluir que é possível a transmissão vertical de *C. coli* em aves SPF, sendo esta uma via de disseminação do agente. Porém, deve haver algum fator, provavelmente relacionado com a imunidade materna, que inibe a viabilidade da bactéria no interior de ovos embrionados provenientes de matrizes pesadas. Assim, apesar de ser um evento possível, a via transovarina parece não causar danos em embriões de matrizes ou ser principal via de transmissão de *C. coli* em lotes de reprodutoras já previamente expostas ao agente.

Palavras-chave: *Campylobacter coli*. Métodos de isolamento. Mortalidade embrionária. PCR. Transmissão vertical.

VERTICAL TRANSMISSION OF *Campylobacter coli* IN BROILER BREEDER AND SPF BIRDS

ABSTRACT – Aiming to investigate the existence of vertical transmission, four matrices and a rooster have been artificially inoculated by esophagus with *Campylobacter coli* (FIOCRUZ-RJ), and their eggs and embryos were surveyed for the presence of bacteria by real time PCR and culture plates. In these samples was also verified the feasibility and age of embryo mortality. In parallel, 50 eggs SPF (specific pathogen free) were inoculated in the air chamber with 10^3 CFU of *C. coli* and, after incubation, their embryos were subjected to the same analysis. In embryos and fertile eggs inoculated matrices, the bacterium was identified only by molecular methods, but in SPF eggs, the bacterium was detected by both techniques. There was no relationship between embryo mortality and positivity for *Campylobacter coli* in embryos inoculated' matrices by esophagus ($P < 0.05$). But the same test (chisquare- χ^2) showed that the presence of bacteria is the cause of early embryonic mortality of embryos derived from SPF eggs. There is good agreement between the test of real time PCR and cultivation on plates in fecal samples from inoculated matrices by esophagus, and excellent agreement in the SPF embryos samples analyzed from eggs inoculated in the air chamber, which the results were compared using the kappa coefficient. In matrices embryos inoculated by esophagus, *C. coli* was detected only in molecular protocol with low positivity, not being recovered by the cultive on plates technique. The results of this study indicate that it is possible vertical transmission of *C. coli* in SPF poultry, which is a way of disseminating the agent. However, there must be some factor, probably related to maternal immunity, which inhibits the viability of the bacteria inside of embryonated eggs from broiler breeders. Thus, although being a possible event, transovarina route seems not to cause damage to embryos of matrices or be the main route of transmission of *C. coli* in lots of breeding previously exposed to the agent.

Key words: *Campylobacter coli*. Isolation methods. Embryonic mortality. PCR. Vertical transmission.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca por ser um importante produtor e exportador mundial de alimentos ricos em proteína animal, sendo a carne de frango um dos principais produtos. Esse alimento tem grande relevância nutricional e econômica, porém pode também albergar microrganismos, agentes etiológicos de doenças alimentares. Estas doenças geram problemas para a saúde humana e, portanto, de importância para a saúde pública. Assim, a indústria avícola deve ter um excelente *status* sanitário em sua cadeia produtiva para que todas as fases do processo garantam um produto final de qualidade adequada.

Na cadeia produtiva da carne de frango, alguns microrganismos são de controle obrigatório, não só pelas exigências do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento do Brasil, mas também, por especificações dos países importadores. *Salmonella* spp. é um exemplo clássico de bactéria em que a identificação, o controle e a notificação são exigidos. Outros microrganismos são monitorados pelas indústrias importadoras devido a acordos entre países exportadores e importadores. Isso exige dos produtores grande rigor para garantir a concorrência das empresas. Dentre as bactérias ligadas à cadeia produtiva, e impactantes na qualidade da carne oferecida ao consumidor, destaca-se a *Campylobacter* spp.

Campylobacter spp. é a primeira causa de gastroenterite de origem alimentar em países desenvolvidos (MOORE et al., 2005; EFSA, 2009). Dentre as espécies de importância para saúde humana, *C. jejuni* e *C. coli* são responsáveis pela maioria das infecções (TAM et al., 2003; MOORE et al., 2005). Hald e colaboradores (2000) incluíram também *C. lari* como espécie envolvida em casos humanos.

Nos países desenvolvidos, *C. jejuni* se destaca o agente etiológico mais freqüente de gastroenterites em humanos (HALD et al., 2000; MOORE et al., 2005; EFSA, 2009), mas em países subdesenvolvidos, *C. coli* é a espécie mais envolvida tanto em casos humanos (SAKUMA; FRANCO; FERNANDEZ, 1992),

como em número de isolamentos frangos (FERNANDEZ; PISÓN, 1996; JORGENSEN et al., 2002). No Brasil, *C. coli* foi a segunda espécie mais isolada por Kuana e colaboradores (2008) em 546 amostras provenientes de 22 lotes diferentes de frango de corte coletadas em granjas e plantas de processamento em estados do sul.

Devido à importância da *C. jejuni* para os países desenvolvidos muitos estudos são voltados para essa espécie. Porém, para *C. coli*, o número de trabalhos é inferior e pouco se sabe da importância dessa bactéria na transmissão nos lotes de frango de frango.

Estudos da epidemiologia de doenças bacterianas aviárias demonstram que os agentes etiológicos podem ser transmitidos via horizontal ou vertical. No caso das espécies de *Campylobacter*, o entendimento da possibilidade ou não da via vertical na transmissão do agente é importante para um melhor controle dos lotes de reprodutoras. Desta forma, muitos estudos em aves são conduzidos em países desenvolvidos. Porém, apesar dos estudos existentes, a epidemiologia da doença ainda é causa de discussão pelos pesquisadores do assunto. As pesquisas sobre a possibilidade ou não da transmissão vertical deste microrganismo apresentam resultados contraditórios, e ainda não foi comprovada. Estudos que contribuam sobre a real possibilidade desta via de transmissão são de grande importância, principalmente para um país como o Brasil, que se destaca como o primeiro exportador de carne de frango do mundo.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Investigar a transmissão vertical de *C. coli* de matrizes pesadas para a progênie.

2.2. Específicos

Pesquisar a presença de *C. coli* por meio do cultivo convencional e PCR *real time* em:

- suabes cloacais de matrizes inoculadas via intraesofágica com *C. coli*;
- em ovos e embriões de diferentes idades de incubação, provenientes de matrizes artificialmente inoculadas; e em embriões oriundos de ovos SPF inoculados na câmara de ar com *C. coli*;
- em mecônio de pintos oriundos de matrizes inoculadas via intraesofágica;
- em intestino de pintos recém eclodidos oriundos de ovos SPF inoculados na câmara de ar.

Analisar a associação entre a presença de *C. coli* e a mortalidade embrionária de embriões provenientes de ovos SPF inoculados na câmara de ar e em embriões de matrizes inoculadas via intraesofágica.

Comparar os resultados obtidos para a identificação de *C. coli* pelos métodos de cultivo convencional e PCR *real time*.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

A frequência de isolamento das espécies de *Campylobacter* spp. que causam doenças gastrointestinais em humanos no Brasil é 9% em suínos, 5% em cães e 8% em gatos. Nos suínos, *C. coli* é a espécie predominante. Em cães e gatos, o maior índice de isolamento é observado em indivíduos com menos de seis meses de idade (AQUINO et al., 2002).

Animais domésticos e seus subprodutos são fontes de infecção de *Campylobacter* spp. para seres humanos e outros animais suscetíveis. A bactéria é encontrada como comensal no trato gastrointestinal de uma ampla variedade de espécies como bovinos, ovinos, suínos, cabras, gatos, roedores silvestres e domésticos, coelhos e, principalmente, de algumas aves industriais e de vida livre (ZOO NOSES REPORT, 2002).

Segundo Germano e Germano (2001) *Campylobacter* spp. pode sobreviver durante quatro semanas ou mais em água a 4°C. Porém, de acordo com Food Safety and Inspection Service (1997) e Altekruze e colaboradores (1998) a bactéria não se multiplica em água, apesar de permanecer viável e infectante para homens e animais.

Aproximadamente 75% das aves de corte apresentam *C. jejuni* e/ou *C. coli* no intestino, e essa contaminação pode estar associada, principalmente, à entrada da bactéria nos galpões a partir do ambiente externo (HUMPHREY, 1999). Quando um lote de frango se torna positivo para *Campylobacter* spp., a prevalência de infecção é alta, e pode chegar a 100% das aves testadas (GREGORY et al., 1997).

Berndtson e colaboradores (1996) verificaram que a positividade para *Campylobacter* spp. aumenta com a idade das aves. De acordo com Cox e colaboradores (2000) não há diferenças significativas entre os sexos das aves para a ocorrência de *Campylobacter* spp. Estes autores sugerem que a contaminação na granja pode ser a causa da positividade em carcaças dentro do abatedouro.

Em estudo na Suécia, em 18 granjas avícolas, durante um ano, foi observada uma prevalência de 27% para *Campylobacter* spp. nos plantéis estudados. Do total, somente duas granjas foram negativas em todas as amostras, e demonstrou-se que a boa qualidade de manejo nesses galpões foi vital para o controle e prevenção da bactéria (BERNDTSON et al., 1996).

No Brasil, os percentuais de isolamentos de *C. jejuni* e *C. coli* a partir de fezes de frangos aparentemente saudáveis variaram entre 25,7% em São Paulo (CASTRO et al., 1997) a 50% em Santa Catarina (MACHADO; TOSIN; LEITÃO, 1994) e 44,83% em Minas Gerais (MELO et al., 2008). Zaki e Reda (1995) pesquisaram *Campylobacter* spp. em frangos de corte e poedeiras, encontrando positividade de 2,5% e 4%, respectivamente. Os locais de isolamento foram fígado, vesícula biliar e cloaca.

A presença da *Campylobacter* spp. nos lotes de frangos de corte apresenta uma variação sazonal. Segundo Lilja e Hínninen (2001), o pico de isolamentos ocorre nos meses de verão. Esta sazonalidade sugere um possível papel das aves migratórias ou a presença sazonal de insetos na transmissão da doença para as aves (JACOBS-REISTMA, 1994). Willis e Murray (1997) também encontraram alta prevalência (87% a 97% de amostras positivas para *C. jejuni*) em aves durante os meses de verão.

De acordo com Young e colaboradores (1999), a colonização cecal por *C. jejuni* ocorre quando uma quantidade de 10^2 UFC é inoculada oralmente em frangos de corte. Achen e colaboradores (1998) observaram que a colonização de *C. jejuni* ocorreu rapidamente quando a bactéria foi inoculada por via oral em pintinhos após o nascimento. Depois de 24 e 48 horas da inoculação, os autores verificaram que 50% e 70% das aves, respectivamente, eliminaram a *C. jejuni*. Pintinhos de um dia de idade geralmente não são infectados de forma natural por *C. jejuni* (YOUNG et al., 1999). Porém, em muitos lotes, a colonização já é detectável com menos de 10 dias de idade, e continua por muitas semanas (NEWELL; WAGENAAR, 2000). Em condições laboratoriais, três dias de contato com inoculação artificial são suficientes para a contaminação da maioria das aves (SHANKER; LEE; SORREL, 1990).

Como um organismo comensal em aves, *Campylobacter* spp. coloniza as células mucosas do intestino e suas criptas (BEERY; HUGDAHL; DOYLE, 1988). As aves podem ter um alto número de *Campylobacter* spp. no intestino (até 9,0 log₁₀ UFC/g de conteúdo cecal), sem apresentar sintomas (EVANS, 1997).

A prevalência de *Campylobacter* spp. em carcaças processadas é quase sempre menor que no trato intestinal das aves (HARIHARAN; MURPHY; KEMPF, 2004). Hald e colaboradores (2000) isolaram *Campylobacter* sp em 52% das aves antes do abate e em 24% das carcaças após o processamento. De acordo com Silva Jr. (1995), durante o processo de abate e evisceração, a carcaça pode se contaminar com as fezes do animal, contaminando equipamentos e utensílios, e comprometendo assim, todas as etapas seguintes de processamento e industrialização. Na saída do *chiller*, a prevalência de *Campylobacter* spp. nas carcaças é mais baixa que no início do processamento (BERRANG; DICKENS, 2000).

No Brasil, Franchin e colaboradores (2005) encontraram 91,7% de lotes de frangos de corte positivos para *Campylobacter* spp. antes do abate. A positividade encontrada foi em 79,2% das amostras de penas, 45% das cloacas, 50% em gaiolas de transporte, 37,5% em camas de aviários, 33,3% em suportes para peitos e 25% em água de lavagem da gaiola.

Modolo e colaboradores (2005) pesquisaram *Campylobacter* spp. em carcaças de frangos em Botucatu – SP, e encontraram 72% de positividade em estabelecimentos de regiões centrais daquela cidade. Nas regiões periféricas, o índice foi de 22%. As proporções de isolamento nas carcaças, considerando somente os estabelecimentos positivos foram respectivamente, 38% e 12,5% nas regiões centrais e periféricas. Também no Brasil, Aquino e colaboradores (2002) pesquisaram *Campylobacter* spp. em carcaças de frango, e a frequência de isolamento foi de 60% (37/62), sendo as prevalências de *C. jejuni* e *C. coli* praticamente iguais (aproximadamente 30% cada).

O fígado das aves é um importante veículo de *Campylobacter* spp. No sul do Chile, foram analisadas 126 amostras de fígado congeladas, coletadas em vários supermercados e detectado 92,9% de positividade, sendo a *C. coli* a

espécie mais isolada (92 amostras), seguida pela *C. jejuni* (FERNANDEZ; PISÓN, 1996).

A transmissão de *Campylobacter* spp. entre um ciclo de produção para o outro foi estudada por Jacobs-Reistma (1995) em duas granjas de frango de corte com renovação da cama de piso, higienização e vazio sanitário. Nesse estudo longitudinal, os resultados dos isolamentos e sorotipagens não permitiram a comprovação da transmissão, já que houve identificação de diferentes sorotipos entre lotes consecutivos, e também lotes negativos seguidos de ciclos positivos. Para Berndtson e colaboradores (1996), o aumento da prevalência de *Campylobacter* spp. está associada ao menor período de vazio sanitário.

A ração é geralmente inadequada para a sobrevivência de *Campylobacter* spp. devido ao baixo conteúdo de água (EVANS, 1992). Rosef e colaboradores (1993) encontraram 50% de positividade em um total de 146 moscas capturadas nos arredores de uma granja avícola, e Hoop e Ehram (1987) isolaram *Campylobacter* spp. de caixas de transporte de frangos de corte e, em algumas delas, mesmo após a lavagem e desinfecção.

A transmissão horizontal por meio da ingestão da água contaminada com *Campylobacter* spp. parece ser a origem potencial da infecção e reinfecção entre lotes de frangos de corte (PEARSON et al., 1996). Gibbens e colaboradores (2001) afirmaram que esta via é o principal fator de risco para a infecção de lotes de frangos por *Campylobacter* sp.

Bull e colaboradores (2006) utilizaram diferentes técnicas moleculares para caracterizar cepas de *Campylobacter* spp. isoladas em sete lotes de frangos de frangos. Dentre estes lotes, verificou-se que dois apresentaram alguns isolados indistinguíveis dos encontrados nos lotes de origem das matrizes. Contudo, esses autores, não consideram a transmissão vertical como a via mais importante devido à proximidade entre lotes de reprodutoras e de frangos, e também, pela colonização tardia dos lotes de frangos. Também, encontraram subtipos das bactérias nos frangos, que eram idênticos aos encontrados fora do aviário tanto antes, quanto após o alojamento. Das amostras pesquisadas também encontraram relação entre ração, água e o ar

dentro do aviário em um lote. Para o autor esses achados são importantes indícios da contaminação de *Campylobacter* nos lotes de frango pelo ambiente.

Segundo Berndtson e colaboradores (1996), a presença de outros animais domésticos não interfere nos índices de positividade para *Campylobacter* spp. em lotes de frangos de corte. Porém, o manuseio de outras aves parece ser um importante fator de risco. Prevalência de *Campylobacter* spp. foi 40% em lotes onde componentes da equipe manusearam outras aves, e 18% onde isso não aconteceu. Kapperud e colaboradores (1993) encontraram como fatores de risco o manuseio de outras aves, e também a manipulação concomitante de suínos.

Alguns fatores relacionados ao ambiente aumentam o risco da ocorrência de *Campylobacter* spp. em lotes de frangos de corte. Dentre esses, se destacam a alta temperatura e ar estático no aviário, pobre qualidade da água, ausência de pedilúvio e presença de cascudinhos (*Alphitobius diaperinus*) (REFRÉGIER-PETTON et al., 2001). Em granjas onde havia presença de aves selvagens, o índice de lotes positivos para *Campylobacter* spp. foi de 29% e, em granjas localizadas em áreas com poucas aves selvagens, esse índice caiu para 16% (BERNDTSON et al., 1996).

As condições sanitárias parecem ser também importantes para a menor prevalência de *Campylobacter* spp. Berndtson e colaboradores (1996) encontraram 39% de positividade em lotes que mantinham baixo *status* sanitário, e 22% em granjas com manejo sanitário mais rigoroso. Citaram como medidas sanitárias a mudança de botas e roupas para adentrar na granja. Em locais em que foram observados vestígios de roedores, detectou-se 40% de positividade, em contraste a 23% onde isso não ocorreu.

Berndtson e colaboradores (1996) estudaram a epidemiologia da *Campylobacter* spp. em granjas de frangos de corte analisando fezes dos animais em lotes subsequentes. Desses lotes, em 16 ocasiões, encontraram dois lotes subsequentes positivos, e dentre estes, em nove foi realizada sorotipagem dos espécimes. Em seis vezes os sorotipos eram idênticos em ambos os lotes. Os autores sugerem que há possibilidade da permanência de

Campylobacter spp. de um lote para outro, e ainda, que a lavagem e a desinfecção são suficientes para eliminar *Campylobacter* spp.

Analisando espécimes de *Campylobacter jejuni* isolados de cecos, de cloaca e de ovidutos de 11 galinhas positivas dentro de um lote, Camarda e colaboradores (2000) encontraram alta diversidade sugerindo uma múltipla exposição das aves aos agentes. Porém, em estudos realizados no Reino Unido, Ayling e colaboradores (1996) concluíram que os lotes raramente são colonizados por mais de um genótipo. O mesmo genótipo de *C. jejuni* pode ser encontrado no intestino e trato reprodutivo de galinhas, indicando a colonização ascendente do oviduto através da cloaca (CAMARDA et al., 2000). Mas nem sempre as cepas do oviduto são idênticas às do intestino, sugerindo que algumas cepas podem preferencialmente colonizar o oviduto, embora isso não seja freqüente (Di MODUGNO; NASTI; CAMARDA, 1997).

Jacobs-Reitsma (1995) relata que as aves reprodutoras usualmente são colonizadas por múltiplas cepas de *Campylobacter*. Maruyama e Katsube (1990) desafiaram codornas oralmente com *C. jejuni* ($9,6 \log \text{UFC}^{-1}$), e recuperaram os espécimes em ovos. A recuperação no trato reprodutivo foi no magno-istmo e glândula da casca em três de sete reprodutoras. Todas as codornas apresentaram-se positivas nas amostras coletadas na cloaca, mas apenas 28% das cascas dos ovos e 4% do conteúdo dos ovos foram positivos. Uma das três codornas com trato reprodutivo positivo apresentava focos brancos no fígado, e em outra, o ovário estava contaminado, sugerindo infecção sistêmica.

Para Hiett e colaboradores (2002) há diversidade em cepas recuperadas no trato reprodutivo das aves, e algumas destas são idênticas às isoladas de fezes. Estes fatos sugerem a contaminação ascendente de *Campylobacter* spp. do trato reprodutor por meio da cloaca. Zimmer e colaboradores (2003) compararam por meio das técnicas do PCR-RAPD (*Random amplification of polymorphic DNA*), espécimes de *Campylobacter* spp. isolados da água de bebida e das aves em três lotes consecutivos e não encontraram semelhança entre as cepas.

Aproximadamente 4% dos ovos de galinha foram experimentalmente infectados com *C. jejuni* após imersão em uma suspensão com a bactéria. Porém, o microrganismo não foi encontrado no conteúdo interno dos ovos após os mesmos terem permanecido em contato com cultura de *C. jejuni* (ALLEN; MORISHITA; LEY, 2001). Hanninen e colaboradores (1984) recuperaram *Campylobacter* spp. em 2% dos embriões de ovos bicados que não eclodiram. Experimentalmente, King e colaboradores (1993) observaram que a inoculação de algumas cepas de *Campylobacter jejuni* na membrana corioalantoide de ovos embrionados de galinhas é letal para o embrião.

Cox e colaboradores (2005) isolaram *Campylobacter* spp. em 26% dos folículos maduros e 13% de folículos ovarianos imaturos de reprodutoras em diferentes idades. Jacobs-Reitsma (1995) pesquisaram a presença da *Campylobacter* em suabes cloacais em 43 lotes de reprodutoras de nove granjas e encontraram um índice de 67% (29/43) de positividade. Nesse estudo, dois lotes de uma granja B, e dois lotes de uma granja C tinham a mesma origem. Porém, os lotes da granja C foram positivos, e os da granja B foram negativos para *Campylobacter* spp., o que sugere o maior risco da contaminação horizontal. Cox e colaboradores (2006) encontraram *Campylobacter jejuni* no timo, baço, fígado e ceco de reprodutoras após quatro dias de inoculação intravaginal ou oral.

Cox e colaboradores (2002) compararam espécimes de *Campylobacter* isolados de reprodutoras e de sua progênie por dois métodos genotípicos: a ribotipagem com a enzima de restrição *Pst*I e a seqüência do DNA de uma região variável do gene *fla A*. Os padrões genéticos encontrados foram idênticos nos dois métodos. Pearson e colaboradores (1996) realizaram estudo retrospectivo e prospectivo em lotes consecutivos de seis a oito aviários durante os anos de 1984 a 1994, e encontraram alta positividade nos lotes (35,5%). Porém, o isolamento de sorotipos idênticos em lotes consecutivos foi baixo, levando a concluir que não houve transmissão entre lotes. Quando esses autores estudaram os incubatórios que forneciam aves para esses aviários (incubatório A e B), observaram que os isolamentos aconteciam predominantemente em aves provenientes do lote B. Em duas ocasiões

distintas, houve alternância entre os incubatórios A e B no fornecimento das aves. Nessas ocasiões, os isolamentos também só aconteceram em aves provenientes do lote B, reforçando a conclusão anterior. Além da alta positividade nas aves do incubatório B, os espécimes isolados mostraram baixa diversidade de sorotipos. Os autores julgaram que esses dados são evidências de uma origem comum da *C. jejuni*, introduzida provavelmente, por transmissão vertical.

No Brasil, Fonseca e colaboradores (2006) não encontraram positividade em mecônio de pintinhos oriundos de lotes de matrizes positivas para *Campylobacter* spp. por técnica de microbiologia convencional. Porém, Fonseca e colaboradores (2007) em outro estudo encontraram 80% de positividade utilizando o método de PCR. Os autores sugerem pesquisas detalhadas para melhor entendimento da transmissão vertical da *Campylobacter* spp. em frangos de corte.

Matrizes de 16 semanas a 14 meses de idade apresentam anticorpos contra *Campylobacter jejuni* em títulos variados, e não relacionados à idade das aves. Os ovos provenientes destas matrizes também apresentam anticorpos para essa bactéria. Frangos de corte possuem altos títulos destes anticorpos na primeira e segunda semana de vida, porém, na terceira e quarta semana, os títulos caem substancialmente ou desaparecem, reaparecendo na quinta semana. A ausência de anticorpos na terceira semana de vida coincide com as infecções por *Campylobacter* em muitos lotes de frango de corte (SAHIN et al., 2001). Esses mesmos autores observaram que os anticorpos reagem com diferentes cepas da mesma espécie, porém, tem reação limitada a espécies diferentes.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Inóculo bacteriano

A cepa utilizada para as inoculações experimentais foi *Campylobacter coli* originalmente isolada de frangos de criação extensiva na cidade do Rio de Janeiro. A cepa foi isolada, identificada e caracterizada pela Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ), que forneceu a amostra para o experimento em forma de cultura pura semeada em superfície de agar para transporte.

A cultura foi reativada por semeadura em caldo Bolton (Oxoid®) suplementado com 5% de sangue hemolisado incubada em condições de microaerofilia (Probac microaerobic generator®) a 37° C por 24 horas. Após crescimento procedeu-se a semeadura na superfície do ágar CCDA - *Campylobacter* Blood-Free Selective Ágar base (CCDA) (Oxoid ®) adicionado de 5% de sangue equino hemolisado, incubado a 37° C por 48 horas nas mesmas condições de microaerofilia.

Para as inoculações experimentais, com auxílio de uma alça descartável estéril, colônias puras foram colhidas da superfície do ágar e adicionadas a 5mL de solução de cloreto de sódio 0,85% estéril. Após homogeneização em vortex, a turbidez da solução era comparada à escala de MacFarland para estabelecer a concentração aproximada de células/mL. A partir do número de células estimado eram realizadas diluições seriadas até se atingir a concentração estipulada para a inoculação. O número de células (UFC) na solução utilizada para a inoculação foi determinado por meio do PCR real time BAX System®.

4.2. Grupos Experimentais

4.2.1. Inoculação de *C. coli* em matrizes de corte e análise do conteúdo interno dos ovos e embriões

Foram utilizadas quatro matrizes de corte e um galo da linhagem Cobb-Vantress. As aves foram criadas em uma empresa de produção comercial até a idade de 29 semanas (203 dias) e após transferidas para uma baia experimental localizada no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia. Antes do alojamento a baia foi previamente lavada com detergente neutro e água sob pressão e desinfetada com ácido peracético 2% aspergido no chão e paredes. Essas aves imediatamente antes da transferência para a baia apresentaram negatividade para *Campylobacter* spp. em suabe cloacal quando analisadas pelo método de cultivo em placas e PCR *real time*.

As galinhas foram experimentalmente inoculadas com 10^3 UFC de *Campylobacter coli* (FIOCRUZ) no dia do alojamento (203 dias de idade) e após 7 e 24 dias, aos 210 e 227 dias de idade, respectivamente. O galo foi inoculado somente na idade de 203 dias (dia do alojamento). A inoculação foi realizada por meio da via intraesofágica. Durante 28 dias (até 231 dias de idade) as aves foram monitoradas para a presença de *C. coli* por meio de 11 coletas. Para isso, procedeu-se suabe cloacal nas aves após 3, 5, 7, 10, 12, 14, 18, 20, 24, 26 e 28 dias do alojamento, correspondente às idades das aves de 206, 208, 210, 213, 215, 217, 221, 223, 227, 229 e 231 dias.

Os ovos das aves inoculadas foram coletados após três dias da inoculação em duas vezes ao dia (início da manhã e final da tarde). Anteriormente à coleta havia higienização das mãos utilizando lavagem com sabão neutro e posterior desinfecção com álcool gel. Além disso, para contato com as aves, o coletador usou vestimenta e botas previamente higienizadas

utilizadas apenas para esse fim. Após a coleta, os ovos foram imediatamente desinfetados com solução de formol 1% por aspersão.

Os ovos foram destinados a cada grupo experimental respeitando a ordem de coleta. Assim, o primeiro ovo era analisado imediatamente (sem incubação), e os posteriores eram incubados e retirados para análise conforme a ordem: o segundo, após 24 horas, o terceiro após seis dias, o quarto após 13 dias, o quinto após 17 dias, e o sexto aos 21 dias (dia da eclosão). Após, o ciclo era reiniciado, com o sétimo ovo coletado sendo analisado imediatamente, e os outros incubados e analisados após 24 horas, seis dias, 13 dias, 17 dias, 21 dias, e assim repetidamente. Todos os ovos eram devidamente identificados.

Em todas as amostras (vitelo, albumem e mecônio) foi investigada a presença de *C. coli*, e os embriões resultantes foram classificados quanto à viabilidade ou idade de mortalidade embrionária.

A incubação foi realizada em incubadora experimental localizada no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) da Universidade Federal de Uberlândia, durante os meses de maio a julho de 2008. As duas incubadoras utilizadas para a incubação dos ovos controles e teste, respectivamente, eram monitoradas diariamente quanto à temperatura, umidade, viragem e ventilação (anexo 1 – ficha de controle das incubadoras). O número de amostras e o material coletado para análise de cada grupo experimental pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1. Número e tipo de amostras coletadas para análise de matrizes pesadas inoculadas via Intraesofágica.

Grupo	Número de amostras
Galinhas (suabes cloacais)	48 (12 ^a x 4 ^b)
Galo (suabes cloacais)	12 (12 ^a x 1 ^b)
Ovos frescos (albume)	10
Ovos frescos (vitelo)	10
Embrião 24 horas incubação (vitelo)	14
Embrião embrionado seis dias incubação (vitelo)	16
Embrião embrionado 13 dias incubação (vitelo)	13
Embrião embrionado 17 dias incubação (vitelo)	13
Conteúdo saco vitelino de pintos recém eclodidos	10
Mecônio pintos recém eclodidos	8
Total	154

a- Número de coletas (sendo uma coleta anterior à primeira inoculação) "coleta controle"; b- Número de aves.

4.2.2. Inoculação de *C. coli* em ovos de aves SPF

Foram utilizados 100 ovos livres SPF, divididos em grupo teste e controle. No grupo teste, 50 ovos SPF foram artificialmente inoculados com 0,1mL de uma solução de cloreto de sódio 0,85% contendo 10^3 UFC de *C. coli* de origem aviária (isolado FIOCRUZ). A inoculação foi realizada na câmara de ar, no pólo superior, sem rompimento da membrana corioalantóide, utilizando seringa de insulina estéril. O grupo controle consistiu de 50 ovos SPF inoculados com 0,1mL de uma solução de cloreto de sódio 0,85% estéril, pela mesma via que os ovos do grupo teste, porém sem a bactéria.

Imediatamente após inoculação, os ovos foram incubados em duas incubadoras experimentais destinadas a cada grupo (teste e controle), localizadas no CBEA nas mesmas condições dos ovos das matrizes.

Após incubação por 24 horas, seis ovos foram retirados para análise. Aos seis dias, 13 dias e 17 dias foram retirados 10 ovos, e no dia da eclosão (21 dias) foram analisados 14 ovos.

Além da análise de *C. coli* também foi avaliada a idade da mortalidade embrionária pelo aspecto morfológico do embrião, com exceção das amostras coletadas com 24 horas após incubação.

4.3. Análise laboratorial

4.3.1. Preparo das amostras

As análises foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada da Universidade Federal de Uberlândia. Os ovos foram higienizados externamente utilizando gaze estéril umedecida em álcool etílico 70% e analisados em fluxo laminar, onde depois de quebrados assepticamente, eram depositados em placas de Petri estéreis. Dos ovos frescos e incubados por 24 horas, provenientes das matrizes ou ovos de galinhas SPF, 1mL da albume e 1mL da vitelo eram adicionados a 9mL de caldo Bolton (Oxoid). Do conteúdo dos ovos incubados por seis dias, 13 dias, 17 dias e 21 dias, 1mL do vitelo foi adicionado a 9mL de caldo Bolton. No dia da eclosão (21 dias de incubação), além da coleta de vitelo nos embriões oriundos de matrizes inoculadas via intraesofágica retirados com 21 dias de incubação eclodidos ou com mortalidade embrionária superior a 18 dias, houve coleta de mecônio pela fricção do intestino sendo 1g adicionado a 9mL de caldo Bolton. Já nos embriões oriundos de ovos SPF inoculados na câmara de ar e retirados com 21 dias de incubação eclodidos ou com mortalidade embrionária superior a 18 dias foram retiradas amostras do jejuno e do ceco, sendo 1g de cada segmento adicionado a 9mL de caldo Bolton.

Todas as amostras acondicionadas em caldo Bolton foram analisadas imediatamente para presença de *C. coli* por técnicas de cultivo convencional em placas e técnica molecular (PCR *real time* BAX System).

4.3.2. Análise molecular

PCR automatizado (BAX System®, Dupont) foi utilizado para verificar a presença e quantificar *Campylobacter* sp. Foi realizado o protocolo direto, com procedimentos realizados de acordo com as orientações do fabricante (USER'S GUIDE, 2007). No laboratório, imediatamente após a chegada, após homogeneização, alíquotas de 5µL das amostras acondicionadas em 9mL de caldo Bolton foram transferidas para microtubos (Bioexpress, USA) contendo 200µL de solução de lise (BAX System®). Estes microtubos foram aquecidos a 37°C por 20 minutos e 95°C por 10 minutos, e depois transferidos para bloco de resfriamento (2°C a 8°C) durante 5 minutos. Após resfriamento, 50µL dos lisados foram transferidos para os tubos de PCR contendo em forma de *pelet* (BAX System®), os *primers* para *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari*, dNTPs, a Taq-DNA polimerase, corante fluorescente, controle positivo interno e demais reagentes necessários para a PCR. Os tubos foram transferidos para o termociclador/detector, onde o programa pré-estabelecido no *hardware* do equipamento foi executado. Ao final do ciclo de amplificação e detecção, o equipamento automaticamente liberou os resultados na tela do computador identificando a espécie encontrada e o número de UFC por grama ou mililitro da amostra.

A cepa de *Campylobacter jejuni* ATCC 33291, previamente diluída em caldo Bolton foi processada em paralelo e considerada controle positivo.

4.3.3. Pesquisa de *Campylobacter* sp – cultivo convencional

O protocolo de análise convencional por cultivo foi realizado de acordo com Karmali e colaboradores (1986) e Bolton e Robertson (1982), utilizando caldo Bolton e agar seletivo CCDA - *Campylobacter* Blood-Free Selective Ágar base (Oxoid®), ambos adicionados do seus suplementos antibiótico (Oxoid ®) e 5% de sangue equino hemolisado. Como controle positivo, em paralelo ao processamento das amostras, foi utilizada a cepa de *Campylobacter jejuni* ATCC 33291.

Amostras das aves coletadas por suabe cloacal foram estriadas em duplicata diretamente em ágar CCDA (Oxoid®), adicionado com o suplemento antibiótico seletivo CCDA (Oxoid®) e 5% de sangue de cavalo hemolisado. As placas foram incubadas em atmosfera de microaerofilia (Probac microaerobic generator®) em jarras para anaerobiose nas temperaturas de 37°C e 42°C por 48 horas.

As demais amostras foram enriquecidas em caldo Bolton (Oxoid®) e incubadas em atmosfera de microaerofilia (Probac microaerobac generator®), em jarras de anaerobiose a 37°C por 24 horas. Após esse período, alíquotas de cada amostra foram semeadas em ágar CCDA como descrito acima, porém apenas na temperatura de 37°C, e incubadas por 48 h oras.

Amostras positivas em PCR e negativas em cultivo convencional foram novamente pré-enriquecidas em caldo Bolton sem antibiótico com 5% de sangue de cavalo hemolisado incubadas por 24 horas em atmosfera de microaerofilia a 37°C. Após esse período, as amostras foram estriadas em ágar CCDA conforme mencionado acima, ágar Brucella (Oxoid) e ágar Miller Hinton (Oxoid). Os dois últimos foram suplementados com a mistura antibiótica, sangue de ovino hemolisado e suplemento FBP (Oxoid). As placas foram incubadas em duplicata a 37°C e 42°C por 48 horas em jarras para anaerobiose, sob atmosfera de microaerofilia.

Colônias suspeitas de pertencerem ao gênero *Campylobacter* foram confirmadas pela coloração de Gram para verificar a morfologia em vírgula ou “asa de gaivota”.

4.4. Análise estatística

Foi utilizada estatística descritiva aplicando-se valor relativo em forma de percentagem para positividade em PCR, cultivo convencional e número de embriões ou pintos viáveis. Para comparação entre os resultados do cultivo convencional e PCR foi calculado o coeficiente kappa. Para verificar a relação entre a presença da bactéria e a mortalidade embrionária foi utilizado o teste do quiquadrado.

As análises das variáveis foram realizadas com o uso do programa estatístico Biostat 5.0 (AIRES, 2007). Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. *Campylobacter* em suabes cloacais de matrizes inoculadas com *C. coli*

Os resultados obtidos para a presença de *Campylobacter* em suabes cloacais realizados nas matrizes e galo selecionados para este estudo indicam que não houve regularidade na excreção deste microrganismo (Tabelas 2 e 3). Animais positivos em uma coleta tornavam-se negativos na subsequente, e novamente positivos na próxima coleta, sem que as aves fossem novamente inoculadas.

Duas hipóteses possíveis podem ser especuladas para explicar a irregularidade na eliminação de *Campylobacter* observada neste estudo:

- 1) Apesar de a maioria das espécies encontradas serem *Campylobacter coli*, foi identificada espécie diferente daquela inoculada. Assim, as aves podem ter se infectado com a cepa inoculada, esta tenha sido eliminada do seu organismo, e depois, tenham sido infectadas por outra cepa presente do ambiente. Essa hipótese é reforçada, já que outra espécie, a *Campylobacter jejuni* (Tabela 3) também foi identificada em algumas amostras, tanto em conjunto com *C. coli*, quanto isoladamente.
- 2) Outra hipótese está relacionada com o tipo de amostra coletada. Apesar de suabes cloacais ou retais serem utilizados para detecção de agentes microbianos, e inclusive serem previstos pelo Programa Nacional de Sanidade Avícola (BRASIL, 2003), alguns autores afirmam que a utilização de fezes frescas propicia a detecção de um maior número de amostras positivas para microrganismos como *Salmonella* sp, do que o suabe cloacal ou retal (HIGGINS, 1981; SANDBERG et al., 2003). Ou seja, consideram suabes cloacais como materiais menos eficientes para detecção de bactérias entéricas quando comparadas a amostras de fezes. Não há na literatura um estudo similar ao realizado neste

experimento para *Campylobacter*, porém, os achados desse trabalho permitem supor que há possibilidade de as aves estarem infectadas, porém a detecção do agente não foi realizada em todas as coletas por estas serem realizadas por meio de suabes cloacais. Nesse estudo, a opção pelo uso de suabes em cada animal individualmente, foi devida à facilidade da coleta, e para diminuir a possibilidade de contaminação cruzada, mais provável em uma coleta de fezes.

Tabela 2. *Campylobacter* sp em suabe cloacal de aves artificialmente inoculadas por via intraesofágica, utilizando protocolos de análise molecular^a e cultivo convencional^b.

Aves testes							
Inoculações / idade das aves	DPI	Protocolo análise	M ¹	M ²	M ³	M ⁴	Galo*
1 ^a / 203 dias	3	Convencional ¹	P	N	P	P	N
		Molecular ²	P	N	P	P	N
	5	Convencional ¹	N	N	N	N	N
		Molecular ²	P	N	P	N	N
2 ^a / dia 210	7	Convencional ¹	N	N	N	N	N
		Molecular ²	N	N	N	N	N
	10	Convencional ¹	P	N	P	P	N
		Molecular ²	P	N	N	P	N
	12	Convencional ¹	N	N	N	N	N
		Molecular ²	N	N	N	N	P
	14	Convencional ¹	N	N	N	N	N
		Molecular ²	N	N	N	P	N
	18	Convencional ¹	P	P	N	N	N
		Molecular ²	P	P	N	N	N
	20	Convencional ¹	N	N	N	N	N
		Molecular ²	N	N	N	N	P
3 ^a / dia 227	24	Convencional ¹	N	P	P	N	N
		Molecular ²	N	P	P	N	N
	26	Convencional ¹	P	P	P	N	N
		Molecular ²	N	N	P	P	N
	28	Convencional ¹	P	N	P	P	N
		Molecular ²	P	P	P	N	N

a – PCR real time Bax System® (User's Guide, 2007); b – cultivo convencional em placas (KARMALI et al., 1986); M¹⁻⁴ – matrizes; N – Negativo; P – Positivo; * inoculado somente no dia 203; DPI - dias ap'ps inoculação.

A detecção de *C. jejuni* nas cloacas das aves inoculadas com *C. coli* (Tabela 3) pode também ser conseqüente destas aves já estarem infectadas desde o ambiente de origem. Apesar de terem sido analisadas antes da infecção experimental, e todas mostrarem resultados negativos tanto no cultivo convencional quanto na PCR, a análise foi realizada somente uma vez. Assim, como os resultados mostraram que o microrganismo também não foi detectado em todas as aves inoculadas, e nem em todos os períodos, o mesmo pode ter acontecido com os animais selecionados, que poderiam ser positivos, mas no momento da análise não eliminavam a bactéria. Outros autores encontraram múltiplas cepas em aves reprodutoras (JACOBS-REITSMA, 1995; CAMARDA et al., 2000). Porém, para Ayling e colaboradores (1996) os lotes raramente são colonizados por mais de um genótipo.

Tabela 3. Espécies de *Campylobacter* isoladas em suabes cloacais de matrizes e galo inoculados artificialmente via intraesofágica e positivas em análise molecular¹.

Inoculações/ idade das aves	DPI	Aves testadas				Galo*
		M ¹	M ²	M ³	M ⁴	
1 ^a / dia 203	3			<i>C. coli</i>	<i>C. Coli</i> , <i>C.jejuni</i>	
	5	<i>C coli</i>		<i>C coli</i>		
	10	<i>C. coli</i>			<i>C.Coli</i> , <i>C.jejuni</i>	
2 ^a / dia 210	12					<i>C. coli</i>
	14				<i>C. coli</i>	
	18	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>			
	20					<i>C. jejuni</i>
3 ^a / dia 227	24		<i>C. coli</i>	<i>C. Coli</i> , <i>C. jejuni</i>		
	26	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>			
	28	<i>C. Coli</i> , <i>C. Jejuni</i>	<i>C. Coli</i>	<i>C. coli</i>		

1 – PCR real time Bax System® (User's Guide, 2007); M¹⁻⁴ – matrizes; * inoculado somente no dia 203.

5.2. *Campylobacter* nos ovos frescos, embriões e pintinhos provenientes das matrizes artificialmente infectadas por via intraesofágica

Campylobacter coli não foi detectada em nenhum dos embriões provenientes dos ovos incubados por 24 horas, 13 dias e 17 dias em nenhuma das técnicas de análise utilizadas para o diagnóstico. Porém, houve positividade em amostras de ovos frescos, em embriões com mais de seis dias de idade e em mecônio ou vitelo de pintinhos recém eclodidos, pelo uso da técnica molecular. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 4, 5 e 6.

Nos ovos frescos, *Campylobacter coli* foi detectado em 20% (2/10) das amostras por PCR *real time*, sendo uma somente na vitelo e a outra, na vitelo e no albume. Nos embriões de seis dias, a positividade foi de 12,5% (2/16), uma em embrião viável e a outra em embrião morto aos cinco dias de incubação. Nos embriões ou pintos recém eclodidos, das dez amostras analisadas, duas (20%) foram positivas, sendo uma identificada no vitelo e a outra no mecônio, ambas em embriões vivos. Shanker e colaboradores (1990) encontraram duas aves infectadas no incubatório após a inoculação de 167 ovos com *C. jejuni*.

A maior positividade com o uso de técnicas moleculares demonstrada neste estudo concorda com Hiett e colaboradores (2002), que também encontraram positividade para *Campylobacter jejuni* somente pela técnica de PCR. Análise de penugem e casca de ovos no incubatório, negativas no cultivo convencional, foram positivas em 100% e 70%, respectivamente, com o uso de técnicas moleculares. Experimentalmente, outros autores (KING et al., 1993; ZAKI; REDA, 1995) encontraram positividade para *Campylobacter jejuni* associada com mortalidade embrionária em embriões inoculados, porém, em condições de campo essa relação não foi estabelecida para *C. coli*. Fonseca e colaboradores (2007) encontraram 80% de positividade em mecônio de pintos de corte oriundos de matrizes naturalmente infectadas com *Campylobacter* utilizando técnica de PCR, porém pelo cultivo convencional não foi encontrada positividade nessas mesmas aves.

Apesar de técnicas de PCR *real time* serem capazes de detectar o DNA de células mortas, o método utilizado (Bax System da DuPont®), só apresenta resultados positivos para contagens maiores que 10^3 UFC.g⁻¹ (USER'S GUIDE, 2007). As contagens obtidas nas amostras por esta técnica variaram entre $1,9 \times 10^4$ UFC.g⁻¹ a $1,7 \times 10^6$ UFC.g⁻¹. Independente da comprovação de que as células detectadas estavam mortas, eram viáveis ou não cultiváveis (VNC) ou a metodologia convencional possuir sensibilidade menor que o método molecular, estes resultados indicam que houve multiplicação da bactéria pós-inoculação, transmissão vertical ou penetração da bactéria através da casca.

Tabela 4. *Campylobacter* em ovos frescos provenientes de matrizes inoculadas via intraesofágica com *Campylobacter coli*.

Ovos	Amostra Analisada	Protocolo de análise			
		Molecular ¹			Convencional ²
		Resultado	Espécie	UFC.g ⁻¹	
1	Albume	N	--	--	N
	Vitelo	N	--	--	N
2	Albume	N	--	--	N
	Vitelo	N	--	--	N
3	Albume	N	--	--	N
	Vitelo	N	--	--	N
4	Albume	N	--	--	N
	Vitelo	I	--	--	N
5	Albume	P	<i>C. coli</i>	$1,9 \times 10^4$	N
	Vitelo	P	--	--	N
6	Albume	N	--	--	N
	Vitelo	I	--	--	N
7	Albume	P	<i>C. coli</i>	$8,2 \times 10^5$	N
	Vitelo	N	--	--	N
8	Albume	N	--	--	N
	Vitelo	I	--	--	N
9	Albume	I	--	--	N
	Vitelo	N	--	--	N
10	Albume	N	--	--	N
	Vitelo	I	--	--	N

1 – PCR real time Bax System® (User's Guide, 2007); 2 – cultivo convencional em placas (KARMALI et al., 1986); N – Negativo; P – Positivo; I – indeterminado (resultado inconclusivo).

Tabela 5. Viabilidade e presença de *Campylobacter* em embriões de seis dias de incubação, provenientes de ovos de matrizes inoculadas via intraesofágica com *Campylobacter coli*.

Embrião	Protocolo de análise			Convencional ²	Viabilidade do Embrião
	Resultado	Espécie	UFC.g ⁻¹		
1	N	-	-	N	Vivo
2	N	-	-	N	Vivo
3	N	-	-	N	Vivo
4	N	-	-	N	Vivo
5	I	-	-	N	Vivo
6	N	-	-	N	Vivo
7	N	-	-	N	Vivo
8	P	<i>C. coli</i>	1,7 x 10 ⁶	N	Vivo
9	N	-	-	N	Vivo
10	N	-	-	N	Vivo
11	N	-	-	N	Vivo
12	N	-	-	N	Vivo
13	N	-	-	N	Vivo
14	N	-	-	N	ME 4 dias
15	N	-	-	N	ME 2 dias
16	P	<i>C. coli</i>	4,4 x 10 ⁴	N	ME 5 dias

1 – PCR real time Bax System® (User's Guide, 2007); 2 – cultivo convencional em placas (KARMALI et al., 1986); N – Negativo; P – Positivo; I – indeterminado (resultado inconclusivo); ME – mortalidade embrionária.

Tabela 6. Viabilidade e presença de *Campylobacter* em embriões ou pintos eclodidos após 21 dias de incubação, provenientes de ovos de matrizes inoculadas via intraesofágica com *C. coli*.

Protocolo de análise						
Embrião/ Pinto	Amostra coletada	Molecular			Convencional ²	Viabilidade do Embrião
		Resultado	Espécie	UFC.g ⁻¹		
1	Vitelo	N	--	--	N	Vivo
1	Mecônio	N	--	--	N	
2	Vitelo	N	--	--	N	Vivo
2	Mecônio	N	--	--	N	
3	Vitelo	N	--	--	N	Vivo
3	Mecônio	N	--	--	N	
4	Vitelo	P	<i>C. coli</i>	2,8X10 ⁴	N	Vivo
4	Mecônio	N	--	--	N	
5	Vitelo	N	--	--	N	ME 21 dias
5	Mecônio	N	--	--	N	
6	Vitelo	N	--	--	N	Vivo
6	mecônio	N	--	--	N	
7	vitelo	N	--	--	N	ME 4 dias
8	vitelo	N	--	--	N	ME 19 dias
8	mecônio	N	--	--	N	
9	vitelo	N	--	--	N	ME 3 dias
10	vitelo	N	--	--	N	Vivo
10	mecônio	P	<i>C. coli</i>	4,7X10 ⁴	N	

1 – PCR real time Bax System® (User's Guide, 2007); 2 – cultivo convencional em placas (KARMALI et al., 1986); N – Negativo; P – Positivo; I – indeterminado (resultado inconclusivo); ME – mortalidade embrionária.

Não houve relação entre a mortalidade embrionária e positividade para *Campylobacter coli* (Tabela 7) quando os resultados foram analisados pelo teste do quiquadrado (χ^2) Em condições experimentais, após inoculação em ovos, alguns autores concluíram que a bactéria causa mortalidade embrionária (KING et al., 1993; ZAKI; REDA, 1995). Mas para Jacobs-Reitsma (1995) e Bull e colaboradores (2006) essa não é a principal via de transmissão.

Tabela 7. Influência da positividade para *C. coli* na mortalidade embrionária (ME) de embriões provenientes de matrizes inoculadas via intra-esofágica (teste do quiquadrado χ^2).

<i>Campylobacter</i>			
Embrião*	Positivos	Negativos	Total
Viáveis	3	37	40
Mortos	1	11	12
Total	4	48	52
$P = 0,9243$			

* Ovos inférteis e com ME inferior a 6 dias de incubação não foram incluídos.

5.3. *Campylobacter* no conteúdo dos ovos, embriões e pintinhos provenientes de ovos SPF artificialmente inoculados na câmara de ar

As Tabelas de 8 a 12 mostram os resultados obtidos em técnicas de cultivo convencional e PCR, com as contagens da bactéria e a viabilidade dos embriões oriundos de ovos SPF inoculados. Houve alta positividade tanto em PCR como em cultivo microbiológico convencional nos embriões do grupo teste, sendo *Campylobacter coli* a única espécie encontrada. Todas as amostras do grupo controle em todos os períodos analisados foram negativas.

Em ovos embrionados do grupo teste incubados por 24 horas (Tabela 8), a positividade foi de 66,66% (4/6) em albume e vitelo pela técnica molecular. Todas as amostras do grupo controle (vitelo e albume) foram negativas nas duas técnicas de análise utilizadas. *Campylobacter coli* foi detectada no albume e vitelo com contagens variando de $1,0 \times 10^4$ UFC.g⁻¹ a $3,9 \times 10^7$ UFC.g⁻¹. Dos resultados positivos em albume, em uma amostra a bactéria foi detectada somente pela técnica molecular (Amostra 4) e nas demais foram detectadas pelas duas técnicas. Em outra amostra (amostra 2) foi encontrada somente no vitelo, e as duas técnicas de análise foram capazes de detectar o microrganismo.

A positividade e contagens determinadas neste estudo comprovam que *Campylobacter coli* é capaz de atravessar a membrana da casca e atingir o interior de ovos SPF, e ainda, manterem-se viáveis, cultiváveis e com capacidade de multiplicação.

Tabela 8. Presença de *Campylobacter* em albume e vitelo de ovos SPF, previamente inoculados via câmara de ar com 10^3 UFC.mL⁻¹ de *C. coli* e incubados por 24 horas.

Ovo	Amostra coletada	Protocolo de análise			
		Resultado	Molecular		Convencional
			Espécie	UFC.g ⁻¹	
1	albume	N	--	--	N
1	vitelo	N	--	--	N
2	albume	N	--	--	N
2	vitelo	P	<i>C. coli</i>	$9,6 \times 10^6$	P
3	albume	P	<i>C. coli</i>	$1,0 \times 10^4$	P
3	vitelo	P	<i>C. coli</i>	$3,9 \times 10^7$	P
4	albume	P	<i>C. coli</i>	$5,2 \times 10^4$	N
4	vitelo	P	<i>C. coli</i>	$7,9 \times 10^6$	P
5	albume	P	<i>C. coli</i>	$1,9 \times 10^4$	P
5	vitelo	N	--	--	N
6	albume	P	<i>C. coli</i>	$2,4 \times 10^7$	P
6	vitelo	P	<i>C. coli</i>	$7,9 \times 10^6$	N

1 – PCR real time Bax System® (User's Guide, 2007); 2 – cultivo microbiológico convencional em placas (KARMALI et al., 1986); N – Negativo; P – Positivo.

Aos 6 dias, 13 dias e 17 dias de incubação, *Campylobacter coli* foi detectada nos embriões por pelo menos uma das técnicas utilizadas em 50,0% (5/10), 100,0% (10/10) e 80% (8/10) das amostras, respectivamente (Tabelas 9, 10 e 11). Dos cinco embriões de seis dias e positivos para *C. coli*, dois eram viáveis, dois eram mortos e um era infértil. Dos dez embriões de 13 dias e positivos, sete eram inviáveis, um infértil e dois eram viáveis. Já dos oito embriões de 17 dias, positivos para a bactéria, todos eram inviáveis.

Tabela 9. Viabilidade e presença de *Campylobacter* em embriões com 6 dias de incubação provenientes de ovos SPF, previamente inoculados via câmara de ar com 10^3 UFC.mL⁻¹ de *C. coli*, incubados por seis dias.

Embrião	Protocolo de análise				Viabilidade do Embrião
	Molecular			Convencional	
	Resultado	Espécie	UFC.g ⁻¹		
1	P	<i>C. coli</i>	1,8x10 ⁷	P	ME 5 dias
2	P	<i>C. coli</i>	3,4x10 ⁴	P	Vivo
3	N	-	-	N	Vivo
4	N	-	-	N	Vivo
5	N	-	-	N	Vivo
6	N	-	-	N	Vivo
7	P	<i>C. coli</i>	1,8x10 ⁷	P	Infértil
8	P	<i>C. coli</i>	1,4x10 ⁸	P	Vivo
9	P	<i>C. coli</i>	9,6x10 ⁵	P	ME 2 dias
10	N	--	--	N	ME 3 dias

1 – PCR real time Bax System® (User Guide, 2007); 2 – cultivo microbiológico convencional em placas (KARMALI et al., 1986); N – Negativo; P – Positivo; ME – morte embrionária.

Dos dez embriões de seis dias do grupo controle, negativos para a presença de *Campylobacter* nos dois protocolos de análise, seis estavam vivos, um infértil, dois tinham morte embrionária com três dias e um tinha morte embrionária com dois dias.

Tabela 10. Viabilidade e presença de *Campylobacter* em embriões provenientes de ovos SPF, previamente inoculados via câmara de ar com 10^3 UFC.mL⁻¹ de *C. coli*, incubados por 13 dias.

Embrião	Protocolo de análise				Viabilidade do Embrião
	Molecular			Convencional	
	Resultado	Espécie	UFC.g ⁻¹		
1	P	<i>C. coli</i>	3,0x10 ⁷	P	ME 2 dias
2	P	<i>C. coli</i>	8,9x10 ⁶	P	ME 2 dias
3	P	<i>C. coli</i>	4,6x10 ⁶	P	ME 2 dias
4	P	<i>C. coli</i>	3,2x10 ⁶	P	infértil
5	P	<i>C. coli</i>	1,1x10 ⁶	P	ME 3 dias
6	P	<i>C. coli</i>	2,4x10 ⁶	P	ME 3 dias
7	P	<i>C. coli</i>	2,0x10 ⁷	P	ME 2 dias
8	P	<i>C. coli</i>	2,0x10 ⁷	P	ME 2 dias
9	P	<i>C. coli</i>	3,9x10 ⁵	N	Vivo
10	P	<i>C. coli</i>	1,1x10 ⁶	P	Vivo

1 – PCR real time Bax System® (User's Guide, 2007); 2 – cultivo microbiológico convencional em placas (KARMALI et al., 1986); N – Negativo; P – Positivo; ME – morte embrionária.

Dos dez embriões de 13 dias do grupo controle, negativos para a presença de *Campylobacter* nos dois protocolos de análise, seis estavam vivos, um infértil, um tinha morte embrionária com dois dias, um apresentava mortalidade embrionária aos três dias e outro, morte embrionária aos dois dias.

Tabela 11. Viabilidade e presença de *Campylobacter* em embriões provenientes de ovos SPF, previamente inoculados via câmara de ar com 10^3 UFC.mL⁻¹ de *C. coli*, incubados por 17 dias.

Embrião	Protocolo de análise			Convenciona I	Viabilidade do Embrião
	Molecular		UFC.g ⁻¹		
	Resultado	Espécie			
1	P	<i>C. coli</i>	<1,0x10 ⁴	P	ME 2 dias
2	P	<i>C. coli</i>	5,5x10 ⁴	P	ME 1 dia
3	P	<i>C. coli</i>	6,8x10 ⁶	P	ME 4 dias
4	N	--	--	N	Vivo
5	N	--	--	N	ME 2 dias
6	P	<i>C. coli</i>	1,5x10 ⁷	P	ME 3 dias
7	P	<i>C. coli</i>	2,0x10 ⁶	P	ME 3 dias
8	P	<i>C. coli</i>	3,8x10 ⁶	P	ME 3 dias
9	P	<i>C. coli</i>	9,7x10 ⁵	P	ME 2 dias
10	P	<i>C. coli</i>	8,6x10 ⁶	P	ME 2 dias

1 – PCR real time Bax System® (User's Guide, 2007); 2 – cultivo microbiológico convencional em placas (KARMALI et al., 1986); N – Negativo; P – Positivo; ME – morte embrionária.

Dos dez embriões de 17 dias do grupo controle, negativos para a presença de *Campylobacter* nos dois protocolos de análise, seis estavam vivos, dois tinham morte embrionária com quatro dias, dois tinham morte embrionária com três dias e um tinha morte embrionária com dois dias.

Nos embriões de seis, 13 e 17 dias, somente em uma das amostras (embrião de 13 dias) houve discordância entre os resultados da técnica molecular e de cultivo microbiológico convencional (positivo em PCR e negativa no método convencional). Nesta amostra, a contagem foi de $3,9 \times 10^5$ UFC.g⁻¹, e em todas as outras positivas nesta idade, para ambos os métodos, as contagens foram maiores que $1,0 \times 10^6$ UFC.g⁻¹. Porém, o número de bactérias não pode ser utilizado para explicar a diferença entre os métodos de análises, já que um embrião de seis dias com contagem de $3,4 \times 10^4$ UFC.g⁻¹ e outro de 17 dias, com contagem $<1,0 \times 10^4$ UFC.g⁻¹ mostrou conformidade entre as duas técnicas.

Nas amostras provenientes dos ovos incubados por 21 dias, eclodidos, viáveis ou com mortalidade embrionária superior a 19 dias de incubação, *Campylobacter* sp não foi encontrada em amostras intestinais de jejuno e ceco ou vitelo. Nesse período de incubação, *Campylobacter* estava presente apenas em embriões com mortalidade até sete dias de incubação.

Todas as amostras do grupo controle mostraram resultados negativos, e das 14 amostras do grupo teste, cinco 35,7% foram positivas, todas em embriões com mortalidade precoce (Tabela 12). Nestas cinco amostras, *Campylobacter coli* foi somente isolada no vitelo, não sendo detectada no jejuno ou ceco.

O conjunto dos resultados de maior positividade, recuperação da bactéria e número de *C. coli* observada nos ovos SPF, em comparação com a menor positividade e não recuperação da bactéria inoculada nos ovos das matrizes permite especular que algum fator diferencie a sobrevivência e multiplicação. As hipóteses para a presença da bactéria não viável no interior dos ovos das matrizes são provavelmente relacionadas à imunologia das aves. Sahin e colaboradores (2001) verificaram alto nível de anticorpos contra *Campylobacter* em frangos na primeira e segunda semana, porém, com declínio ou mesmo desaparecimento na terceira e quarta semana reaparecendo na quinta semana. A ausência de anticorpos até a terceira semana coincide com as infecções por *Campylobacter* em muitos lotes de frango (STERN, 1992; YOUNG et al., 1999; NEWELL; WAGENAAR, 2000) sustentando que a imunidade materna é uma importante barreira à infecção.

Os resultados positivos em PCR nas amostras provenientes das matrizes, mas sem recuperação de colônias, indicam que a *C. coli* foi capaz de invadir o ovo, porém, as bactérias não foram cultiváveis. Então é provável que a proteção materna seja um fator importante para impedir a viabilidade da bactéria.

Alguns pesquisadores afirmam que a viabilidade de *Campylobacter jejuni* é drasticamente diminuída quando a bactéria é inoculada dentro do albume. Essa foi a hipótese para explicar resultados negativos em ovos de galinha por Sahin e colaboradores (2003) em ovos de codorna. Porém, estudos

in vitro demonstraram que concentrações de albúme tão altas quanto 94%, quando adicionados em meio de cultivo incubado por 24 horas, não foram capazes de inibir o crescimento de *Campylobacter jejuni* (PAULA et al., 2009).

Tabela 12. Viabilidade e presença de *Campylobacter* no vitelo de embriões, ou jejuno, ceco e vitelo de pintos provenientes de ovos SPF inoculados na câmara de ar com 10^3 UFC.mL⁻¹ de *C. coli*, incubados por 21 dias.

Embrião/ Pinto	Material coletado	Protocolo de análise				Viabilidade
		Molecular			Convencio nal	
		Resultado	Espécie	UFC.g ⁻¹		
1	Vitelo	N	--	--	N	ME 20 dias
	Jejuno	N	--	--	N	
	Ceco	N	--	--	N	
2	Vitelo	N	--	--	N	Eclodido
	Jejuno	N	--	--	N	
	Ceco	N	--	--	N	
3	Vitelo	N	--	--	N	Bicado Vivo
	Jejuno	N	--	--	N	
	Ceco	N	--	--	N	
4	Vitelo	N	--	--	N	Bicado Vivo
	Jejuno	N	--	--	N	
	Ceco	N	--	--	N	
5	Vitelo	N	-	-	N	ME 3 dias
6	Vitelo	N	--	--	N	ME 20 dias
	Jejuno	N	--	--	N	
	Ceco	N	--	--	N	
7	Vitelo	P	3,3x10 ⁶	<i>C. coli</i>	P	ME 2 dias
8	Vitelo	P	1,2x10 ⁶	<i>C. coli</i>	P	ME 2 dias
9	Vitelo	P	5,3x10 ⁶	<i>C. coli</i>	P	
10	Vitelo	N	--	--	N	Bicado Vivo ME 2 dias
	Jejuno	N	--	--	N	
	Ceco	N	--	--	N	
11	Vitelo	P	2,5x10 ⁷	<i>C. coli</i>	P	ME 6 dias
12	Vitelo	P	1,1x10 ⁷	<i>C. coli</i>	N	ME 6 dias
13	Vitelo	N	--	--	N	Bicado Vivo
	Jejuno	N	--	--	N	
	Ceco	N	--	--	N	
14	saco da gema	N	--	--	N	Bicado Vivo
	Jejuno	N	--	--	N	
	Ceco	N	--	--	N	

1 – PCR real time Bax System® (User's Guide, 2007); 2 – cultivo microbiológico convencional em placas (KARMALI et al., 1986); N – Negativo; P – Positivo; ME – morte embrionária.

Os resultados indicam então, que a explicação mais provável seja que os ovos SPF não contenham anticorpos capazes de inibir a viabilidade de *C. coli*. Porém, nestes casos, a infecção causa morte embrionária precoce, justificando o fato de a bactéria não ser detectada em pintos recém eclodidos.

Das 14 amostras coletadas dos ovos incubados por 21 dias no grupo controle, negativas para a presença de *Campylobacter* nos dois protocolos de análise, seis eclodiram, três estavam vivos e bicaram os ovos sem eclodir, um era infértil, um teve morte embrionária com um dia, um com quatro dias, um com seis dias, e um teve morte embrionária com sete dias.

Pelo teste do quiquadrado (Tabela 13.A) foi demonstrado que houve maior mortalidade em embriões do grupo teste que do grupo controle. O teste foi realizado considerando os ovos férteis incubados por seis a 21 dias dos grupos teste e controle. Considerando somente os embriões do grupo teste, a comparação entre a mortalidade embrionária e amostras positivas e negativas para *Campylobacter coli* (Tabela 13.B), demonstrou que embriões positivos para *Campylobacter coli* apresentaram maior mortalidade do que aqueles negativos para o agente. Esses resultados indicam que a mortalidade foi associada com a presença da bactéria.

Tabela 13.A. Viabilidade e a presença para *Campylobacter coli* em embriões provenientes de ovos SPF do grupo teste e grupo controle inoculados na câmara de ar com 10^3 UFC.mL⁻¹ de *C. coli*, incubados por 21 dias.

Embrião	Grupos		Total
	Teste	Controle	
Vivo	15	24	39
Morto	27	17	44
Total	42	41	83
$P(\chi^2) = 0,0001$			

*Ovos inférteis e com morte embrionária inferior a 6 dias não entraram na análise.

Tabela 13.B. Viabilidade e a presença para *Campylobacter coli* em embriões provenientes de ovos SPF do grupo teste positivo e teste negativo inoculados na câmara de ar com 10^3 UFC.mL⁻¹ de *C. coli*, incubados por 21 dias.

Embrião	Grupos		Total
	Teste positivo	Teste negativo	
Vivo	1	14	15
Morto	22	5	27
Total	23	19	42
$P (x^2) = 0,001$			

*Ovos inférteis e com morte embrionária inferior a 6 dias não entraram na análise.

Estudos sobre a transmissão vertical de *C. coli* assim como a mortalidade embrionária induzida pela bactéria são incomuns na literatura. Mas outros estudos com o gênero *Campylobacter* ou a espécie *C. jejuni* foram explorados por alguns autores. A maior mortalidade embrionária relacionada à infecção do ovo por *Campylobacter* está de acordo com King e colaboradores (1993) que observaram que a inoculação de algumas cepas de *Campylobacter jejuni* na membrana corioalantóide de ovos embrionados de galinhas é letal para o embrião. Lam e colaboradores (1992) observaram mortalidade em embriões de perus inoculados com cepas de *C. jejuni* isoladas de perus adultos, e em embriões de frangos inoculados com uma cepa originária de galinhas, respectivamente. Zaki e Reda (1995), após inoculação, encontraram 0,72% de positividade para *C. jejuni* em embriões com mortalidade embrionária inicial, 1,85% em embriões com mortalidade embrionária tardia, e 2,15% em embriões que bicaram os ovos, mas não conseguiram eclodir.

A transmissão vertical de *Campylobacter* sp em aves é discutida por pesquisadores desse tema. Para Jacobs-Reitsma (1995) e Bull e colaboradores (2006) essa não é a principal via de transmissão. Porém, Pearson e colaboradores (1996) utilizando análise epidemiológica e Cox e colaboradores (2002) por comparação de padrões genéticos da bactéria isolada nas reprodutoras e sua progênie concordam que a transmissão vertical pode ser uma importante via de disseminação de *Campylobacter* sp em aves.

5.4. Comparação entre as técnicas de análise e contagem das bactérias

O cálculo do coeficiente kappa demonstrou boa concordância entre os resultados da técnica molecular e de cultivo microbiológico convencional para amostras de suabes cloacais de matrizes inoculadas via intraesofágica (Tabela 14).

Tabela 14. Teste kappa relacionando os resultados de PCR e cultivo microbiológico convencional em suabes cloacais de matrizes inoculadas via intraesofágica com 10^3 UFC.g⁻¹ de *C. coli*.

Cultivo	PCR		Total
	P	N	
P	12	4	16
N	7	32	39
Total	19	36	55
k= 0,5406		p<0,0001	

Nas amostras dos embriões provenientes das matrizes inoculadas por via intraesofágica só houve concordância entre os resultados do método molecular e convencional de cultivo em placas quando as amostras apresentavam resultados negativos. Resultados positivos só foram obtidos com a técnica molecular. Porém, no caso dos resultados obtidos dos produtos dos ovos SPF, o cálculo do coeficiente kappa demonstra que há uma excelente concordância entre os dois métodos de análise (Tabela 15).

Tabela 15. Teste kappa relacionando os resultados de PCR e cultivo microbiológico convencional em embriões e pintos provenientes de ovos SPF inoculados na câmara de ar com 10^3 UFC.g⁻¹ de *C. coli*.

Cultivo	PCR		Total
	P	N	
P	32	0	32
N	4	40	44
Total	36	40	76
k= 0,8921		p<0,0001	

A constatação que o método molecular e o cultivo microbiológico convencional em placas são equivalentes para a detecção de *Campylobacter* nos produtos dos ovos SPF discorda de resultados obtidos por Hiett e colaboradores (2002). Estes autores encontraram maior positividade em PCR comparado com cultivo microbiológico convencional quando analisaram amostras de penugem e casca de ovos. Porém, são semelhantes aos resultados obtidos nos produtos dos ovos provenientes das matrizes, onde a bactéria só foi detectada pelo método molecular.

Apesar dos resultados positivos para *Campylobacter* nos produtos dos ovos provenientes das matrizes pela técnica molecular, foi possível observar também que as contagens obtidas eram na maioria das vezes inferiores às obtidas nos produtos dos ovos SPF. Nestes últimos, o número de bactérias por grama de embrião de 24 horas, seis dias, 13 dias, 17 dias e 21 dias, em somente uma das amostras foi maior que 10^5 UFC.g⁻¹. Considerando a quantidade inoculada (10^3 UFC.mL⁻¹), é possível afirmar que a bactéria foi capaz de penetrar no interior dos ovos, sobreviver e se multiplicar. Tal fato é confirmado pela comprovação de que a espécie inoculada nas matrizes foi a mesma identificada nos ovos ou embriões.

O conjunto dos resultados de maior positividade, recuperação da bactéria e número de *C. coli* observada nos ovos SPF, em comparação com a menor positividade e não recuperação da bactéria inoculada nos ovos das matrizes permite especular que a presença de algum fator influenciando a sobrevivência e multiplicação da bactéria. As hipóteses para a presença da bactéria não viável no interior dos ovos das matrizes podem estar relacionadas com a imunidade das aves. Sahin e colaboradores (2001) verificaram altos títulos de anticorpos contra *Campylobacter* em frangos de corte na primeira e segunda semana, porém, com declínio ou mesmo desaparecimento na terceira e quarta semana reaparecendo na quinta semana de idade. A diminuição ou ausência de anticorpos a partir da terceira semana coincide com as infecções por *Campylobacter* em muitos lotes de frango (STERN, 1992; YOUNG et al., 1999; NEWELL; WAGENAAR, 2000), sustentando que a imunidade materna é uma importante barreira à infecção.

Os resultados positivos por PCR nas amostras provenientes das matrizes, mas sem recuperação de colônias, indicam que *C. coli* foi capaz de invadir o ovo, porém, as bactérias se mostraram não cultiváveis. Então uma provável imunidade passiva ou presença de anticorpos no interior destes ovos embrionados deve de alguma forma, oferecer proteção contra o agente, reforçando a hipótese de uma proteção materna.

Alguns pesquisadores afirmam que a viabilidade de *Campylobacter jejuni* é drasticamente diminuída quando a bactéria é inoculada dentro do albume. Essa foi a hipótese para explicar resultados negativos em ovos de galinha por Sahin e colaboradores (2003) em ovos de codorna. Porém, estudos *in vitro* demonstraram que concentrações de albume tão altas quanto 94%, quando adicionados em meio de cultivo incubado por 24 horas, não foram capazes de inibir o crescimento de *Campylobacter jejuni* (PAULA et al., 2009).

Os resultados indicam então, que a explicação mais provável seja que como os ovos SPF não contêm anticorpos capazes de inibir a viabilidade de *C. coli*, nestes casos, a infecção causa a morte embrionária precoce, justificando o fato da bactéria não ser detectada em pintos recém eclodidos.

6. CONCLUSÃO

A transmissão vertical em condições experimentais mostrou ser uma via possível de disseminação de *C. coli* e mortalidade embrionária precoce em ovos embrionados de aves SPF, provavelmente relacionado com a imunidade materna, que inibe a viabilidade da bactéria no interior de ovos embrionados. Assim, apesar de ser um evento provável, a transmissão transovarina de *Campylobacter* parece não ser a causa de danos em embriões de galinhas ou mesmo ser a principal via de transmissão de *Campylobacter coli* em lotes de reprodutoras pesadas previamente já expostas ao agente.

REFERÊNCIAS

- ACHEN, M.; MORISHITA, T. Y.; LEY, E. C. Shedding and colonization of *Campylobacter jejuni* in Broiler from day-of-hatch to slaughter age. **Avian Disease**, Minnesota, v. 42, p. 732-737, 1998.
- ALLEN, K. J.; MORISHITA, T. Y.; LEY, E. C. Shedding and colonization of *Campylobacter jejuni* ATCC 33291 to assess eggshell and penetration in fresh and retail eggs. **Journal of Food Protection**, Des Moines, Iowa, US, v. 64, p. 2058-2062, 2001.
- AIRES, D. L. BIOESTAT. **Aplicações estatísticas nas áreas de ciências biomédicas**. Software, 2007.
- ALTEKRUSE, S. F.; SWERDLOW, D. L.; STERN, N. J. *Campylobacter jejuni*. **Veterinary Clinics of North America**, Philadelphia, v.14, n. 1, p. 31-39, 1998.
- AQUINO, M. H. C.; PACHECO, A. P. G.; FERREIRA, M. C. S.; TIBANA, A. Frequency of isolation and Identification of Thermophilic *Campylobacters* from Animals in Brazil. **The Veterinary Journal**, London, v. 164, p. 159-161, 2002.
- AYLING, R. D.; WOODWARD, M. J.; EVANS, S.; NEWELL, D. G. Restriction fragment length polymorphism of polymerase chain reaction product applied to the differentiation of poultry *campylobacters* for epidemiological investigations. **Research in Veterinary Science**, London, v. 60, p. 168-172, 1996.
- BEERY, J. T.; HUGDAHL, M. B.; DOYLE, M. P. Colonization of gastrointestinal tracts of chicks by *Campylobacter jejuni*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, n. 10, p. 2365-2370, 1988.
- BERNDTSON, E.; EMANUELSON, U.; ENGVALL, A.; DANIELSOON-THAM, M. L. A 1 year epidemiological study of *campylobacters* in 18 Swedish chicken farms. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 26, p. 167-185, 1996.
- BERRANG M. E., DICKENS J. A. Presence and level of *Campylobacter* spp. on broiler carcasses throughout the processing plant. **Journal of Applied Poultry Research**, Athens, v. 9, p. 43-47, 2000.

BOLTON, F. J.; ROBERTSON, L. A selective medium for isolating *Campylobacter jejuni/coli*. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 35, p. 462-467, 1982.

BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa conjunta n. 78. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Edição número 215. Poder Executivo, Brasília/DF, 5 jan. 2003. Secção 1.

BULL, S. A.; ALLEN, V. M.; DOMINGUE, G.; JORGENSEN, F.; FROST, J. A.; URE, R.; WHYTE, R. S. A. Sources of *Campylobacter* spp. colonizing housed broiler flocks during rearing. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 1, p. 645-652, 2006.

CAMARDA, A.; NEWELL, D. G.; NASTI, R.; Di MODUGNO, G. Genotyping *Campylobacter jejuni* strains isolated from the gut and oviduct of laying hens. **Avian Diseases**, Minnesota, v. 44, p. 907-912. 2000.

CASTRO, A. G. M.; GENOVEZ, M. E.; SCARCELLI, E.; TORRES, A. P.; CARDOSO, M. V.; PASCHOAL, A. P.; SOUZA, C. A. I.; CARRASCO, S. Monitoramento de *Campylobacter* spp. ao longo da linha de abate de frangos de corte. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 64, p. 21-26, 1997.

COX, N. A.; STERN, N. J.; CRAVEN, M. E.; BERRANG, M. E.; MUSGROVE, M. T. Prevalence of *Campylobacter* and *Salmonella* in the cecal droppings of turkeys during production. **Journal of Applied Poultry Research**, Athens, v. 9, p. 542-545, 2000.

COX, N. A.; HIETT, K. L.; STERN, N. J.; BERRANG, M. E. Identification of a new source of *Campylobacter* contamination in poultry: Transmission from breeder hens to broiler chickens. **Avian Diseases**, Minnesota, v. 46, p. 535-541, 2002.

COX, N. A.; BAILEY, J. S.; RICHARDSON, L. J.; BUHR, R. J.; COSBY, D. E.; WILSON, J. L.; HIETT, K. L.; SIRAGUSA, G. R.; BOURASSA, D. V. Presence of Naturally Occurring *Campylobacter* and *Salmonella* in the mature and immature ovarian follicles of late-life broiler breeder hens. **Avian Diseases**, Minnesota, v. 49, p. 285-287, 2005.

COX, N. A.; RICHARDSON, L. J.; BUHR, R. J.; BAILEY, J. S.; WILSON, J. L.; HIETT, K. L. Detection of *Campylobacter jejuni* in Various Lymphoid Organs of Broiler Breeder Hens After Oral or Intravaginal Inoculation. **Poultry science**, v. 85, n. 8, p. 1378-1382, 2006.

Di MODUGNO, G.; NASTI, R.; CAMARDA, A. Isolation of *Campylobacter jejuni* from laying hens oviduct: preliminary results. In: COST Action 97 Pathogenic microorganisms in poultry and eggs. 5. **Poultry and food safety**. NAGY, B.; MULDER, R. W. A. (Ed). Brussels: European Commission. 1997. p. 269-274.

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

EVANS, S. L. Introduction and spread of thermophilic campylobacters in broiler flocks. **The Veterinary Record**, London, v. 131, p. 574-576, 1992.

EVANS, S. L. Introduction and spread of thermophilic campylobacters in broiler flocks. **Acta veterinaria Scandinavica**, Supplementum, Kobenhavn, v. 27, p. 540-547, 1997.

FERNANDEZ, H.; PISÓN, V. Isolation of thermotolerant species of *Campylobacter* from commercial chicken livers. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 29, p. 75-80, 1996.

FONSECA, B. B.; SONCINI, R. A.; GUIMARÃES, A. R.; ROSSI, D. A. *Campylobacter* sp in eggs from cloacal swab positive breeder hens, **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 573-575, 2006.

FONSECA, B. B.; SONCINI, R. A.; FREZZA, A. L. C.; ROSSI, D. A. *Campylobacter* sp em mecônio de pintinhos e cloaca de reprodutoras de corte. **Bioscience journal**, v. 23, n. 3, p. 128-132, 2007.

FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE [FSIS/CDC/FDA]. Sentinel site study: The establishment and implementation of an active surveillance system for bacterial foodborne diseases in the United States. **Report to Congress**. Washington, DC, 1997.

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

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. Agentes bacterianos de toxinfecções. In: GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. São Paulo: Varela, 2001. p. 199-247.

GIBBENS, J. C.; PASCOE, S. J.; EVANS, S. J.; DAVIES, R. H.; SAYERS, A. R. A trial of biosecurity as a means to control *Campylobacter* infection of broiler chickens. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 48, p. 85-99, 2001.

GREGORY, E.; BARNHART, H.; DREESEN, D. W.; STERN, N. J. Epidemiological study of *Campylobacter* spp. in broilers: Source, time of colonization and prevalence. **Avian Disease**, Minnesota, v. 41, p. 890-898, 1997.

HALD, B.; WEDDERKOOP, A.; WADSEN, M. Thermophilic *Campylobacter*. In Danish broiler production: a cross-sectional survey and a retrospective analysis of risk factors for occurrence in broiler flocks. **Avian Pathology**, Huntingdon, v. 29, p. 123-131, 2000.

HANNINEN, M. L.; KORKEALA, H.; PAKKALA, P. Growth and survival characteristics of *C. jejuni* in liquid eggs. **The Journal of Hygiene**, Cambridge, v. 92, p. 53-58, 1984.

HARIHARAN, H.; MURPHY, G. A.; KEMPF, I. *Campylobacter jejuni*: Public health hazards and potential control methods in poultry: a review. **Veterinary Medicine**, Rotterdam, v. 49, n. 11, p. 441-446, 2004.

HIETT, K. L.; COX, N. A.; STERN, N. Direct Polymerase Chain Reaction Detection of *Campylobacter* spp. In Poultry Hatchery Samples. **Avian Diseases**, Minnesota, v. 46, n. 1, p. 219-223, 2002.

HIGGINS R. Studies on the dissemination of *Salmonella* in nine broiler flocks. **Avian Diseases**, v. 26, p. 26-33, 1981.

HOOP, R.; EHRSAM, H. Ein Beitrag zur Epidemiologie Von *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in der Hühnermast. **Schweizer Archiv für Tierheilkunde**, Bern, v. 129. p. 193-203, 1987.

HUMPHREY, T. The significance of Campylobacter species as foodborne pathogens. **PHLS Food Microbiology Research Unit**, United Kingdom 1999. 5p. Disponível em: <<http://www.probe.br/science.html>>. Acesso em: 02 ago. 2008.

JACOBS-REITSMA, W. F. **Epidemiology of *Campylobacter* in Breeder poultry**. Thesis Wageningen Agricultural University, Wageningen, 1994.

JACOBS-REITSMA, W. F. *Campylobacter* Bacteria in Breeder Flocks. **Avian Diseases**, Minnesota, v. 39, p. 355-359, 1995.

JORGENSEN, F.; BAILEY, R.; WILLIAMS, S.; HENDERSON, P.; WAREING, D.; BOLTON, F. J.; FROST, J. A.; WARD, L.; HUMPHREY, T. J. Prevalence and numbers of *Salmonella* and *Campylobacter* on raw whole chickens at retail sale in England. **International journal food microbiology**, v. 76, p.151–164, 2002.

KAPPERUD, G.; SKJERVE, E.; VILK, 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**, Cambridge, v. 111, p. 245-255, 1993.

KARMALI, M. A.; SIMOR, A. E.; ROSCOE, M.; FLEMMING, P. C.; SMITH, S. S.; LANE, J. Evaluation of a blood-free, charcoal based, selective medium for the isolation of *campylobacter* organisms from feces. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 23, p. 456-459, 1986.

KING, V.; BAVETSIA, A.; BUMSTEAD, N. Effect of host lineage on the virulence of *Campylobacter jejuni* in the chicken embryo model. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 106, p. 271-274, 1993.

KUANA, S. L.; SANTOS, I. R.; RODRIGUES, L. B.; BORSOI, A.; MORAIS, H. I. S.; SALLE, C. T. P.; NASCIMENTO, V. P. Occurrence and Characterization of *Campylobacter* in the Brazilian Production and Processing of Broilers. **Avian Diseases**, Porto Alegre, v. 52, p. 680-684, 2008.

LAM, K. M.; DaMASSA, A. J.; MORISHITA, T. Y. SHIVAPRASAD, H. L.; BICKFORD, A. A. Pathogenicity of *Campylobacter jejuni* for Turkeys and Chickens. **Avian Diseases**, Minnesota, v. 36, p. 359-363, 1992.

LILJA, L., HINNINEN, M. L.; Evaluation of a commercial automated ELISA and PCR method for rapid detection and identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in poultry products. **Food Microbiology**, London, v. 18, p. 205-209, 2001.

MACHADO, R. A.; TOSIN, I.; LEITÃO, M. F. F. Occurrence of *Salmonella* sp. e *Campylobacter* sp. in chickens during industrial processing. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 25, p. 239-244, 1994.

MARUYAMA, S.; KATSUBE, Y. Isolation of *Campylobacter jejuni* from eggs and organs in experimentally infected laying Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*). **The Japanese Journal of Veterinary Science**, Tokio, v. 52, p. 671-674, 1990.

MELO, R. T.; SILVA, D. S.; FONSECA, B. B.; ROSSI, D. A. Ocorrência de *Campylobacter* sp em suaves cloacais de frango. In: **XX Semana Científica de Medicina veterinária de Uberlândia V mostra de pós-graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de medicina Veterinária – UFU**. 2008.

MODELO, J. R.; FILHO, A. O.; PINTO, J. P. A. N. *Campylobacter* em carcaças resfriadas de frangos: Análise espacial do fator de risco para a saúde pública. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 135, p. 40-46, 2005.

MOORE, J. E.; CORCORAN, D.; DOOLEY, J. S.; FANNIG, S.; LUCEY, B.; MATSUDA, M.; McDOWEL, D. A.; MEGRAUD, F.; MILLER, H. C. *Campylobacter*. **Veterinary Research**, v.36, p.351-382, 2005.

NEWELL, I.; WAGENAAR, J. A. Poultry infections and their control at the farm level. In: NACHAMKIN, I.; BLASER, M. J. **Campylobacter**. 2. ed. Washington, D. C: American Society for Microbiology Press, 2000. p. 121-138.

PAULA, A. T.; FONSECA, B. B.; SILVA, M. S.; ROSSI, D. A. Viability of *Campylobacter jejuni* in Commercial Eggs. **Bioscience Journal** (UFU), v. 25, p. 143-148, 2009.

PEARSON, A. D.; GREENWOOD, M. H.; FELTHAM, R. K. A.; HEALING, T. D.; DONALDSON, J.; JONES, D. M.; COLWELL, R. R. Microbial Ecology of *Campylobacter jejuni* in a United Kingdom Chicken Supply Chain: Intermittent Common Source, Vertical Transmission, and Amplification by Flock Propagation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 12, p. 4614-4620, 1996.

REFRÉGIER-PETERSONON, J.; ROSE, N.; DENIS, M.; SALVAT, G. Risk factors for *Campylobacter* spp. contamination in French broiler-chicken flocks at the end of therearing period. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 50, p. 89-100, 2001.

ROSEF, O., GONDROSEN, B., KAPPERUD, G., UNDERDAL, B. Isolation and characterization of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from domestic and wild mammals in Norway. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 46. p. 855-8 59, 1993.

SAHIN, O.; ZHANG, Q.; MEITZLER, J. C; HARR, B. S. Prevalence, Antigenic Specificity, and Bactericidal Activity of Poultry Anti *Campylobacter* Maternal Antibodies. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 67, n. 9, p. 3951-3957, 2001.

SAHIN, O.; KOBALKA, P.; ZHANG, Q. Detection and survival of *Campylobacter* in chickens eggs, **Journal of Clinical Microbiology**, v. 95, n. 5, p. 1070-1074, 2003.

SAKUMA, H.; FRANCO, B. D. G. M.; FERNANDEZ, H. Occurrence of *C. jejuni* and *C. coli* in retail raw chicken meat and giblets in São Paulo, Brasil. **Revista de Microbiologia**, v. 23, n. 1, p. 13-16, 1992.

SANDBERG, M.; ALVSEIKE, O.; NESBASKKEN, T.; SKJERVE, E. The agreement in the isolation of *Salmonella enterica* IIIb 61:k: 1,5,(7) from rectal swabs, faecal samples and ileo-caecal lymph nodes from sheep. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 60, p. 167-174, 2003.

SHANKER, S.; LEE, A.; SORREL, T. C. Horizontal transmission of *Campylobacter jejuni* amongst broiler chicks: experimental studies. **Epidemiology and infection**, Cambridge, v. 104, p. 101-110, 1990.

SILVA Jr., E. A. Agentes de doenças transmitidas por alimentos. In: **Manual de Controle Higiênico Sanitário em alimentos**. 5. ed. São Paulo: Varela, 1995. cap. 35.

STERN, N. J. Reservoirs for *C. jejuni* and approaches for intervention in poultry, p. 49–60. In I. Nachamkin, M. J. Blaser, and L. S. Tompkins (ed.), *Campylobacter jejuni: current status and future trends*. 1992. **American Society for Microbiology, Washington, D.C.**

TAM, C. C.; O'BRIEN, S. J.; ADAK, C. K.; MEAKINS, S. M.; PROST, J. A. *Campylobacter coli* – an important foodborne pathogen. **Journal of Infection**, v. 47, p. 28-32, 2003.

USER'S GUIDE. BAX®System PCR assay with automated detection for bacterial screening. DuPont Qualicon, Wilmington, D.E, 121p., 2007.

YOUNG, C. R.; ZIPRIN, R. L.; HUME, M. E.; STANKER, L. H. Dose response and organ invasion of day-of-hatch leghorn chicks by different isolates of *Campylobacter jejuni*. **Avian Diseases**, Minnesota, v. 43, p. 763-767, 1999.

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

ZAKI, M. M.; REDA, W. W. *Campylobacter* in poultry. **Veterinary Medical Journal**, Giza, n. 1, v. 43, p. 71-76, 1995.

ZIMMER, M.; BARNHART, H.; IDRIS, U.; D. LEE, M. Detection of *Campylobacter jejuni* Strains in the Water Lines of a Commercial Broiler House and Their relationship to the Strains That Colonized the Chickens. **Avian Diseases**, Minnesota, v. 47, p. 101-107, 2003.

ZOONOSSES Report, UK 2000, Departament of Environmental. **Food and Rural Affairs**, Toronto, p. 7-9, 2002.