

## Detecção dos genes da toxina citoletal distensiva em estirpes de *Campylobacter jejuni* isoladas de carcaças de frangos

[Detection of cytolethal distending toxin genes in strains of *Campylobacter jejuni* isolated from broiler carcasses]

A.F. Carvalho<sup>1,4,5</sup>, D.M. Silva<sup>2,4</sup>, S.S. Azevedo<sup>3</sup>, R.M. Piatti<sup>2</sup>, M.E. Genovez<sup>2</sup>, E. Scarcelli<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Aluna de pós-graduação - Instituto Biológico - São Paulo, SP

<sup>2</sup>Instituto Biológico

Av. Conselheiro Rodrigues Alves, 1252

04014-002 - São Paulo, SP

<sup>3</sup>Universidade Federal de Campina Grande - Patos, PB

<sup>4</sup>Bolsista da FAPESP (TT3)

<sup>5</sup>Bolsista da FUNDAG

### RESUMO

Foram analisadas 80 amostras de sobrecoxas de frangos de corte resfriados provenientes de feiras livres e hipermercados do município de São Paulo, SP. Treze estirpes de *Campylobacter* spp. foram isoladas em 10 (12,5%) sobrecoxas, sendo cinco amostras originárias de feiras livres e cinco de hipermercados. Onze estirpes foram identificadas como *Campylobacter jejuni* e duas como *Campylobacter coli*. As 11 estirpes foram confirmadas como *C. jejuni* pela PCR do gene da hipuricase (*hip*), e destas, quatro (36,4%) apresentaram os três genes (*cdtA*, *cdtB* e *cdtC*) codificantes da toxina citoletal distensiva pela multiplex-PCR, sendo três estirpes provenientes de hipermercados e uma de feira livre. Observou-se a presença de estirpes virulentas de *C. jejuni*, portadoras do complexo de genes *cdt*, nas amostras de frango resfriado, não só na linha de abate, mas até o ponto final da cadeia de distribuição, nos dois principais centros de venda a varejo.

Palavras-chave: frango de corte, *Campylobacter jejuni*, toxina citoletal distensiva, PCR

### ABSTRACT

Eighty samples of refrigerated broiler thighs purchased in street markets and supermarkets in the city of São Paulo, SP, were analyzed. Thirteen *Campylobacter* spp. strains were isolated in 10 (12.5%) thighs, five of them from street market samples and other five from supermarkets. Eleven strains were identified as *Campylobacter jejuni* and two of them as *Campylobacter coli*. The 11 strains were confirmed to be *C. jejuni* using PCR for hippuricase (*hip*) gene. From these, multiplex-PCR showed that four (36.4%) strains presented the three genes (*cdtA*, *cdtB*, and *cdtC*) encoding cytolethal distending toxin: three strains from supermarket and one from street market samples. These results are important, because they demonstrate the presence of virulent *C. jejuni* strains in refrigerated broiler thigh samples, not only in the slaughterhouse but in the final point of the distribution chain, at the two most important food retail commences.

Keywords: broiler, *Campylobacter jejuni*, cytolethal distending toxin, PCR

---

Recebido em 3 de março de 2009

Aceito em 30 de agosto de 2010

\*Autor para correspondência (corresponding author)

E-mail: pinheiro@biologico.sp.gov.br

Apoio financeiro: FAPESP

## INTRODUÇÃO

A campilobacteriose é uma zoonose de distribuição mundial, e seu principal representante, *Campylobacter jejuni*, é considerado um microrganismo extremamente ubiqüitário, que se encontra tanto disperso no ambiente quanto no trato gastrointestinal de animais domésticos e selvagens (Scarcelli et al., 2005b). Atribui-se como via de transmissão para o ser humano a ingestão de carnes de aves cruas ou mal cozidas, bem como de leite não pasteurizado, o consumo de água e alimentos de origem animal e vegetal contaminados e o contato direto com animais portadores (Kumar et al., 2001; Scarcelli et al., 2005a). A contaminação de carcaças de frangos em abatedouros é considerada o principal fator de risco para infecções humanas (Rozynek et al., 2005).

*Campylobacter jejuni* destaca-se nos países desenvolvidos como o principal agente etiológico de diarreia humana, especialmente em crianças (Carvalho et al., 2001). Nos Estados Unidos, estimam-se anualmente mais de dois milhões e quinhentos mil casos de enterite humana por *C. jejuni*, índice que já superou os casos de salmonelose e shigelose (Fitzgerald et al., 2001). Nos últimos anos, também tem sido demonstrada associação entre a infecção por *C. jejuni* e duas doenças neurológicas emergentes: a síndrome de Guillain-Barré (GBS) e a síndrome de Muller - Fisher (MFS), uma rara variante da GBS (Endtz et al., 2000).

Nos Estados Unidos, o isolamento de *C. jejuni* e *C. coli* de carcaças de frango varia de 30 a 100% de positividade (Stern et al., 1985). Whyte et al. (2003) isolaram 49,9% de *Campylobacter* spp. em 444 frangos de três diferentes cidades da Irlanda. Rozynek et al. (2005) pesquisaram *Campylobacter* spp. na Polônia e encontraram 53/92 (57,6%) estirpes de *C. jejuni* e 39/92 (42,4%) de *C. coli* isoladas de carcaças de frango. Mena et al. (2008) identificaram 99 (60,3%) estirpes de *Campylobacter* spp. em 164 amostras de frangos obtidas a partir de estabelecimentos varejistas de Portugal.

No Brasil, estudos demonstraram diferentes percentuais de isolamentos de *C. jejuni* e *C. coli* a partir de fezes de frangos, que oscilaram de 22

a 25,8% (Castro et al., 1997; Cortez et al., 2006), destacando-se o processo de evisceração como ponto crítico da linha de abate para a contaminação de carcaças (Castro et al., 1997). Com relação à análise de carcaças e miúdos de frangos resfriados prontos para o consumo, Machado et al. (1994) relataram a frequência de 15 (50%) estirpes de *Campylobacter* spp. em Santa Catarina, Castro et al. (1997) isolaram 33 (23,6%) e Cortez et al. (2006) 14 (4,9%) estirpes de *C. jejuni* de diferentes abatedouros do estado de São Paulo.

Talvez a forma mais importante para o alimento cárneo tornar-se fonte de transmissão da campilobacteriose intestinal seja a transferência passiva do agente para outros alimentos durante o descongelamento e o processamento em locais comuns (Skirrow, 1991). Neste aspecto, a carcaça de frango assume capital importância, pois a água de degelo em contato com alimentos ingeridos *in natura* poderia explicar a origem dos frequentes surtos (Scarcelli et al., 1998). Outro dado relevante que poderia explicar a grande frequência dos surtos de campilobacteriose é o fato de a dose infectante de *Campylobacter* ser baixa. A ingestão de apenas 500 microrganismos, facilmente presentes em uma gota de água de degelo de frango cru, pode resultar em enterite no homem (Outbreak ..., 1998).

Atualmente, 11 fatores de virulência têm sido relacionados à patogênese de *C. jejuni* em infecções humanas e animais (Datta et al., 2003), dentre elas a toxina citolética distensiva (CDT), que afeta as camadas das células epiteliais, causando progressiva distensão e morte em várias linhagens celulares (CHO, Vero, HeLa e HEp-2) pelo acúmulo intracelular dos níveis de cAMP (Martinez et al., 2006). A atividade da toxina CDT é codificada pelos genes *cdt*, que, no caso de *C. jejuni*, consistem em três genes adjacentes denominados *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* (Martinez et al., 2006), sendo que a presença dos três genes é requerida para a plena atividade da toxina (Asakura et al., 2007). Mutações nos genes *cdt* que possam causar perda da função em alguma das três subunidades impedem a célula bacteriana de induzir a citotoxicidade (Smith e Bayles, 2006).

No Brasil, são escassos os estudos sobre a ecologia, transmissibilidade e patogenicidade de

*C. jejuni* isolados de alimentos. Para tanto, os objetivos do presente estudo foram isolar e identificar estirpes de *Campylobacter* spp., a partir de frangos de corte resfriados colhidos em feiras livres e hipermercados; detectar, pela técnica da multiplex-PCR, a presença do complexo de genes *cdt*, responsáveis pela expressão do fator de virulência da produção da toxina citotética distensiva (CDT) nas estirpes de *C. jejuni*; e verificar a inter-relação entre estirpes de *Campylobacter* spp. isoladas de feiras livres e hipermercados.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 80 amostras de sobrecoxas de frango de corte resfriados, originárias de diferentes pontos comerciais – feiras livres A e B e hipermercados A e B – do município de São Paulo, SP, no período de abril a outubro de 2008, sendo colhidas 20 amostras de cada ponto de venda. Na ocasião de cada colheita, as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis descartáveis e transportadas ao laboratório em caixa isotérmica, com gelo reciclável, à temperatura de até 8°C.

As amostras de sobrecoxa foram submetidas ao procedimento bacteriológico (no mesmo dia da colheita), para isolamento e identificação bioquímica de *Campylobacter* spp. e posterior seleção de estirpes de *C. jejuni*, segundo Castro et al. (1997) e Bacteriological Analytical Manual (Hunt et al., 2001), com algumas modificações: para cada 25g de sobrecoxa (composto por músculo e pele), foram adicionados 100mL de caldo infusão cérebro coração (BHI; Difco) dentro de bolsas plásticas estéreis (Nasco), e homogeneizadas por até quatro minutos em homogeneizador mecânico (Stomacher 80-Lab System). Visando à eliminação de grandes partículas em suspensão, que pudessem interferir no futuro processo de filtração (Modolo, 2000), o homogenato obtido pós-homogeneização foi submetido a duas centrifugações sucessivas, a segunda com o objetivo de obter a concentração do agente: 1º) 50mL do homogenato centrifugados a 3.000 x g por 15 minutos; 2º) 3mL do sobrenadante centrifugados a 14.000 x g por 15 minutos.

Após a segunda centrifugação, 2mL do sobrenadante mais o pélete foram filtrados em membrana de éster de celulose (Millipore) com

poro de 0,65µm, utilizando-se suporte plástico (*swinex*; Millipore) e seringas estéreis, sendo que 100µL do filtrado foram semeados em meio de ágar brucella (Difco) acrescido de 10% de sangue desfibrinado de carneiro (ABS) e 100µL (sem filtração) foram semeados em meio seletivo (ABS-ATB), constituído por ágar brucella sangue e suplementado com mistura antibiótica (Dufty, 1967), composta por polimixina B (1.000UI/L), cicloheximida (20mg/L), novobiocina (5mg/L) e bacitracina (15.000UI/L). As placas foram incubadas em estufa por 48-72 horas, a 37°C, sob atmosfera de microaerofilia (5% de CO<sub>2</sub>).

Após o período de incubação, as colônias suspeitas foram identificadas por métodos presuntivos: coloração de Gram, observação de mobilidade em microscópio de campo escuro e teste de oxidase; e, uma vez caracterizado o gênero *Campylobacter*, foram determinadas as espécies e as subespécies pelas provas bioquímicas: catalase, formação de H<sub>2</sub>S em TSI (meio de tríplice açúcar ferro; Difco), hidrólise do hipurato, tolerância às temperaturas de 25°C e 42°C, susceptibilidade ao ácido nalidíxico (30µg) e à cefalotina (30µg) (Hunt et al., 2001).

Como estirpe-controle, foi empregada a cepa padrão de *C. jejuni* ATCC 33291.

Para confirmação da espécie *C. jejuni*, as estirpes previamente caracterizadas pelos testes fenotípicos foram submetidas à PCR para detecção do gene *hip*, codificante da enzima hipuricase, específica para a espécie *C. jejuni*. As suspensões das estirpes de *Campylobacter* spp. isoladas tiveram seu DNA extraído pelo kit comercial Ilustra Bacterial Genomic PREP Mini Spin (GE Healthcare), segundo especificações do fabricante. O DNA extraído foi submetido à amplificação pela PCR utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores da região conservada do gene *hip*, que corresponde a um fragmento de 735 pares de bases (pb), segundo Linton et al. (1997): HIP400F 5'-GAA GAG GGT TTG GGT GGT G-3' e HIP1134R 5'-AGC TAG CTT CGC ATA ATA ACT TG-3'.

Para o volume final de reação de 50µL, foi empregado tampão PCR 10 X (500mM de KCl, 15mM de MgCl<sub>2</sub>, 100mM de TRIS-HCl, pH 9,0); 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>; 200mM de dNTPs (200mM de cada nucleotídeo dCTP, dATP,

### Detecção dos genes da toxina...

dGTP, dTTP); 40pmol de cada *primer* (HIP400F e HIP1134R); 2,5U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e 10µL do DNA extraído. No termociclador PT 200 (MJ Research), o ciclo de amplificação foi precedido de desnaturação inicial a 94°C por 5min, seguidos de 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 1min, hibridização a 66°C por 1min, extensão a 72°C por 1min, e extensão final a 72°C por 10min. Como controle positivo foi utilizada a estirpe padrão de *C. jejuni* ATCC 33291

A análise do produto amplificado do gene *hip* foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 2,0%. O gel foi corado por brometo de etídeo (0,5µg/mL) e posteriormente fotografado sob luz ultravioleta (300-320nm) pelo sistema de fotodocumentação, Câmera Kodak Digital DC/120 Zoom, e analisado com o *software* 1D Image Analysis (Kodak Digital Science).

A partir do mesmo DNA das estirpes de *C. jejuni* confirmadas pela PCR, foi realizada a técnica de multiplex-PCR com os *primers* (Tab. 1) descritos por Martinez et al. (2006), para detecção simultânea dos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* que amplificam fragmentos de 422pb, 531pb e 339pb, respectivamente. Para o volume final de

reação de 50µL, foi empregado tampão PCR 10 X (500mM de KCl, 15mM de MgCl<sub>2</sub>, 100mM de TRIS-HCl, pH 9,0); 3,0mM de MgCl<sub>2</sub>; 200mM de dNTPs (200mM de cada nucleotídeo dCTP, dATP, dGTP, dTTP); 20 pmol de cada *primer* (*cdtAF*, *cdtAR*, *cdtBF*, *cdtBR*, *cdtCF* e *cdtCR*); 2,0U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e 10µL do DNA extraído. No termociclador PT 200 (MJ Research), o ciclo de amplificação foi precedido de desnaturação inicial a 94°C por 5min, seguidos de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1min, hibridização a 57°C por 1min, extensão a 72°C por 1min, e extensão final a 72°C por 5min.

A análise do produto amplificado seguiu os mesmos procedimentos empregados para o gene *hip*.

Para verificar a inter-relação entre estirpes de *Campylobacter* spp. isoladas de feiras livres e hipermercados, utilizou-se o teste do qui-quadrado, considerando-se o nível de significância P<0,05, segundo Callegari-Jacques (2003). Os cálculos estatísticos foram realizados pelo programa EpiInfo versão 6.04 (Dean, 1994).

Tabela 1. Sequência nucleotídica dos *primers cdt*<sup>1</sup> para estirpes de *Campylobacter jejuni*.

<i>Primers</i>	Sequência 5' → 3'
<i>cdtA</i> F	CTA TTA CTC CTA TTA CCC CAC C
<i>cdtA</i> R	AAT TTG AAC CGC TGT ATT GCT C
<i>cdtB</i> F	AGG AAC TTT ACC AAG AAC AGC C
<i>cdtB</i> R	GGT GGA GTA TAG GTT TGT TGT C
<i>cdtC</i> F	ACT CCT ACT GGA GAT TTG AAA G
<i>cdtC</i> R	CAC AGC TGA AGT TGT TGT TGG C

<sup>1</sup>Martinez et al. (2006).

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isoladas 13 estirpes de *Campylobacter* spp. em 10 (12,5%) sobrecoxas de frangos resfriados, sendo cinco amostras de frango originárias de feiras livres e cinco de hipermercados. Onze estirpes foram identificadas como *C. jejuni* e duas como *C. coli*, verificando-se, portanto, que em três amostras foi possível isolar mais de uma espécie ou estirpe de *Campylobacter* spp. (Tab. 2). As estirpes provenientes da mesma amostra foram diferenciadas pelas características bioquímicas e/ou morfológicas das colônias isoladas.

As 11 estirpes de *C. jejuni* foram confirmadas pela PCR como portadoras do gene da hipuricase (*hip*). O uso exclusivo de testes bioquímicos para identificação da espécie de *Campylobacter* é limitado pela ocorrência de estirpes com reações atípicas. Pequenas alterações na quantidade do inóculo, excessivos subcultivos, deleções no gene *hip* ou até mesmo a presença deste gene, mas ausência de sua transcrição, podem interferir na correta identificação da espécie (Linton et al., 1997; Kolackova e Karpiskova, 2005).

Tabela 2. Identificação genotípica das estirpes de *Campylobacter* spp., por meio da pesquisa do gene *hip* e do complexo de genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* nas estirpes de *C. jejuni* isoladas

Denominação da estirpe	Presença do gene <i>hip</i> (735pb)	Espécie identificada	Presença do gene <i>cdtA</i> (422pb)	Presença do gene <i>cdtB</i> (531pb)	Presença do gene <i>cdtC</i> (339pb)
F5	+	<i>C. jejuni</i>	-	-	-
F21	-	<i>C. coli</i>	-	-	-
F22	+	<i>C. jejuni</i>	-	-	-
F23	+	<i>C. jejuni</i>	-	-	-
F24-1'	-	<i>C. coli</i>	-	-	-
F24-2'	+	<i>C. jejuni</i>	-	-	-
F36	+	<i>C. jejuni</i>	+	+	+
F55	+	<i>C. jejuni</i>	-	-	-
F56-1'	+	<i>C. jejuni</i>	+	+	+
F 56-2'	+	<i>C. jejuni</i>	+	+	+
F 57-1'	+	<i>C. jejuni</i>	+	+	+
F 57-2'	+	<i>C. jejuni</i>	-	-	-
F 58	+	<i>C. jejuni</i>	-	-	-
ATCC 33291 (controle)	+	<i>C. jejuni</i>	+	+	+

O percentual observado no presente estudo para *Campylobacter* spp. (12,5%) foi mais alto que o verificado por Scarcelli et al. (2005a), que analisaram frangos congelados e obtiveram cinco (5/74; 6,8%) amostras positivas pela PCR para *C. jejuni* e nenhuma positiva pelo exame bacteriológico, indicando a susceptibilidade do microrganismo às condições adversas como congelamento, aditivos, excessiva contaminação, alta tensão de oxigênio ou ressecamento (Scarcelli et al., 2005a).

Segundo Franchin et al. (2005), a ocorrência de patógenos – *Campylobacter* spp. – de origem alimentar em carcaças e produtos de frangos importados de países da União Europeia e vendidos em supermercados foi: 21,9% de 247 amostras da Bélgica, 30,2% de 427 amostras da França, 15,4% de 13 amostras da Itália e 54,5% de 44 amostras do Reino Unido.

Hussain et al. (2007) isolaram *Campylobacter* spp. em 236 (236/492; 48%) frangos coletados em pontos do comércio varejista do Paquistão, e Prencipe et al. (2007), em 178 (178/392; 45,4%)

carcaças de frango de supermercados e açougues da Itália. Esses últimos isolaram mais de uma espécie de *Campylobacter* em 23,1% das amostras positivas.

A contaminação da carne de frango pode ocorrer durante o abate, sendo mais comum no escaldamento e na evisceração, quando há a possibilidade da transmissão de microrganismos dos intestinos para a superfície das carcaças (Castro et al., 1997; Cortez et al., 2006; Prencipe et al., 2007). Mead et al. (1995) relataram que o aumento nos níveis de cloro na água de processamento das aves, aliado à melhora das condições de higiene do abatedouro, promove significativa diminuição na contaminação das carcaças. Porém, Peyrat et al. (2008) demonstraram que algumas estirpes de *Campylobacter* spp. podem sobreviver à limpeza e desinfecção nos abatedouros de aves e podem contaminar as carcaças durante o processamento.

Com relação ao ponto de venda, não foi observada diferença significativa ( $\chi^2=0,11$ ;  $P=0,735$ ) quanto ao número de estirpes de

### Detecção dos genes da toxina...

*Campylobacter* spp., entre hipermercados (5/40; 12,5%) e feiras livres (5/40; 12,5%). Prencipe et al. (2007) também observaram que não há diferença quanto à frequência de contaminação por *Campylobacter* spp. em frangos provenientes de supermercados ou de açougues das regiões de Abruzzo e Molise, Itália.

Recentemente, tem aumentado o número de estudos que visam à detecção dos genes *cdt* em estirpes de *C. jejuni* de diferentes fontes,

entretanto a prevalência desses genes nesta espécie, isolada de reservatórios e potenciais fontes de infecção, ainda não está plenamente investigada (Martinez et al., 2006), principalmente no Brasil. No presente estudo, quatro (4/11; 36,4%) estirpes de *C. jejuni* apresentaram os três genes (*cdtA*, *cdtB* e *cdtC*) codificantes da toxina citotética distensiva (CDT) na multiplex-PCR, sendo três estirpes provenientes de frangos de hipermercados e uma de feira livre (Fig. 1).

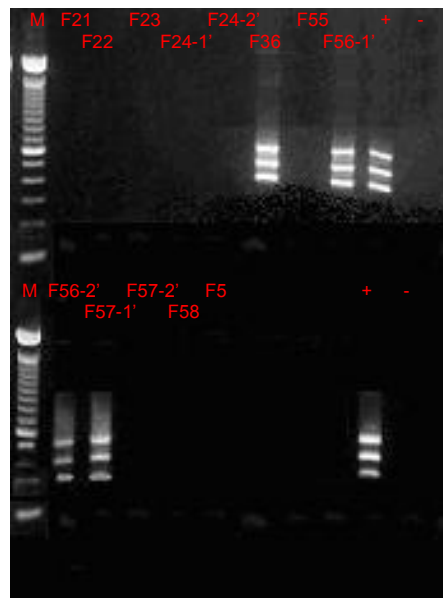


Figura 1. Resultados obtidos na amplificação por multiplex-PCR para detecção dos genes da toxina CDT (*cdtA*, *cdtB* e *cdtC*) das 13 estirpes *Campylobacter* spp. M: marcador de peso molecular (100bp DNA Ladder – Invitrogen); linhas F21 a F5: estirpes de *Campylobacter* spp.; + controle positivo (*C. jejuni* ATCC 33291); - controle negativo.

Na Polônia, Rozynek et al. (2005) isolaram 53 estirpes de *C. jejuni* em carcaças de frangos de supermercados e abatedouros, sendo que 100% apresentaram os três genes *cdt*. Samosornsuk et al. (2007) isolaram, na Tailândia, 20 estirpes de *C. jejuni* provenientes de frangos, sendo que destas, 19 (95%) apresentavam o gene *cdtA*, 20 (100%) o gene *cdtB* e 19 (95%) o *cdtC*. Martinez et al. (2006), ao aplicarem a multiplex-PCR para pesquisa dos genes *cdt* em 100 estirpes de *C. jejuni* isolados de diferentes fontes e países, observaram os três genes, *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*, em 98 (98%) das estirpes isoladas. Wardak e Szych (2006) isolaram, na Polônia, 102 estirpes de *C. jejuni* a partir de fezes diarreicas humanas e identificaram prevalência do gene *cdtA* em 100 (98%) das estirpes, *cdtB* em 98 (96%) e *cdtC* em

94 (92%), determinando que a alta prevalência do complexo de genes *cdt* indica que estes genes são importantes fatores de virulência desta bactéria. Semelhantemente, Van Deun et al. (2007) afirmaram que a produção da toxina CDT está associada a estirpes causadoras de enterites em humanos. Talukder et al. (2008) também identificaram *C. jejuni* de pacientes com diarreia em Bangladesh e detectaram os genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* em 39/40 (97,5%) das estirpes.

No presente estudo, os percentuais de estirpes de *C. jejuni* portadoras do complexo *cdt* foram mais baixos que os relatados por outros autores em diferentes países, e a ocorrência de linhagens de estirpes de *C. jejuni* negativas na multiplex-PCR (63,6%) foi mais elevada que a de amostras

positivas (36,4%). Segundo Martinez et al. (2006), essencialmente todas as estirpes de *C. jejuni* apresentam os genes *cdt*, e a maioria tem atividade da toxina. Porém, há exceções de isolamentos que sofrem mutação e não expressam a atividade do gene. Asakura et al. (2007) também observaram que alguns genes *cdt* não são identificados devido a mutações como deleção, inserção ou substituição de nucleotídeos, e sugerem que essas mutações podem afetar a atividade da toxina. Bang et al. (2003) relataram que a produção da toxina é baixa ou negativa quando há mutações em regiões do gene *cdt*, porém, segundo Park (2002), mesmo algumas estirpes sendo CDT negativas mutantes, ainda mantêm alguma atividade toxigênica.

Os resultados do presente estudo são dignos de atenção, pois demonstraram em frangos de corte a presença de estirpes virulentas de *C. jejuni*, portadoras do complexo de genes *cdt*, e que *Campylobacter* spp. continua viável nas amostras de frango resfriado, não só na linha de abate, mas até o ponto final da cadeia de distribuição, ou seja, nos dois principais centros de venda a varejo, que dão acesso direto à mesa do consumidor.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASAKURA, M.; SAMOSORNSUK, W.; TAGUCHI, M. et al. Comparative analysis of cytotoxic distending toxin (*cdt*) genes among *Campylobacter jejuni*, *C. coli* and *C. fetus* strains. *Microb. Pathog.*, v.42, p.174-183, 2007.
- BANG, D.D.; NIELSEN, E.M.; SCHEUTZ, F. et al. PCR detection of seven virulence and toxin genes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from Danish pigs and cattle and cytotoxic distending toxin production of the isolates. *J. Appl. Microbiol.*, v.94, p.1003-1014, 2003.
- CALLEGARI-JACQUES, S.M. *Bioestatística: princípios e aplicações*. São Paulo: Artmed, 2003. 256p.
- CARVALHO, A.C.; RUIZ-PALACIOS, G.M.; RAMOS-CERVANTES, P. et al. Molecular characterization of invasive and noninvasive *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates. *J. Clin. Microbiol.*, v.39, p.1353-1359, 2001.
- CASTRO, A.G. M.; GENOVEZ, M.E.; SCARCELLI, E. et al. Monitoramento de *Campylobacter* spp ao longo da linha de abate de frangos de corte. *Arq. Inst. Biol.*, v.64, p.21-26, 1997.
- CORTEZ, A.L.L.; CARVALHO, A.C.F.B.; SCARCELLI, E. et al. Survey of chicken abattoir for the presence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, v.48, p.307-310, 2006.
- DATTA, S.; NIWA, H.; ITOH, K. Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler and bovine faeces. *J. Med. Microbiol.*, v.52, p.345-348, 2003.
- DEAN, A.G. EpiInfo version 6: a word-processing, database, and statistic program for public health on IBM-compatible microcomputers. Atlanta: CDC, 1994. 601p.
- ENDTZ, H.P.; ANG, C.W.; VAN DEN BRAAK, N. et al. Molecular characterization of *Campylobacter jejuni* from patients with Guillain-Barre and Miller Fisher syndromes. *J. Clin. Microbiol.*, v.38, p.2297-2301, 2000.
- FITZGERALD, C.; HELSEL, L.O.; NICHOLSON, M.A. et al. Evaluation of methods for subtyping *Campylobacter jejuni* during an outbreak involving a food handler. *J. Clin. Microbiol.*, v.39, p.2386-2390, 2001.
- FRANCHIN P.R.; AIDOO, K.E.; BATISTA, C.R.V. Sources of poultry meat contamination with thermophilic *Campylobacter* before slaughter. *Braz. J. Microbiol.*, v.36, p.157-162, 2005.
- HUNT, J.M.; ABEYTA, C.; TRAN, T. *Campylobacter. Bacteriological analytical manual*. 8.ed. Rev. A, 2001. chap.7. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-7.html>>. Acessado em: 22 fev. 2007.
- HUSSAIN, I.; SHAHID MAHMOOD, M.; AKHTAR, M. et al. Prevalence of *Campylobacter* species in meat, milk and other food commodities in Pakistan. *Food Microbiol.*, v.24, p.219-222, 2007.
- KOLACKOVA, I.; KARPISKOVA, R. Species level identification of thermotolerant campylobacteres. *Vet. Med.*, v.12, p.543-547, 2005.
- KUMAR, A.; AGARWAL, R.K.; BHILEGAONKAR, K.N. et al. Occurrence of *Campylobacter jejuni* in vegetables. *Int. J. Med. Microbiol.*, v.67, p.153-155, 2001.
- LINTON, D.; LAWSON, A.J.; OWEN, R.J. et al. PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. *J. Clin. Microbiol.*, v.35, p.2568-2572, 1997.
- MACHADO, R.A.; TOSIN, I.; LEITÃO, M.F.F. Occurrence of *Salmonella* sp. and *Campylobacter* sp. in chickens during industrial processing. *Rev. Microbiol.*, v.25, p.239-244, 1994.

### Detecção dos genes da toxina...

- MARTINEZ, I.; MATEO, E.; CHURRUCA, E. et al. Detection of *cdtA*, *cdtB*, and *cdtC* genes in *Campylobacter jejuni* by multiplex PCR. *Int. J. Med. Microbiol.*, v.296, p.45-48, 2006.
- MEAD, C.G.; HUDSON, W.R.; HINTON, M.H. Effects of changes in processing to improve hygiene control on contamination of poultry carcasses with *Campylobacter*. *Epidemiol. Infect.*, v.115, p.495-500, 1995.
- MENA, C.; RODRIGUES, D.; SILVA, J. et al. Occurrence, identification, and characterization of *Campylobacter* species isolated from portuguese poultry samples collected from retail establishments. *Poult. Sci.*, v.87, p.187-190, 2008.
- MODOLO, J.R. Comparação do meio Butzler, técnica de filtração e sua associação para o isolamento de *Campylobacter* spp. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.33, p.1-3, 2000.
- OUTBREAK of *Campylobacter enteritis* associated with cross-contamination of food – Oklahoma. *Morb. Mort. Weekly Rep.*, v.27, p.129-131, 1998.
- PARK, S.F. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. *Int. J. Food Microbiol.*, v.74, p.177-188, 2002.
- PEYRAT, M.B.; SOUMET, C.; MARIS, P. et al. Recovery of *Campylobacter jejuni* from surfaces of poultry slaughterhouses after cleaning and disinfection procedures: Analysis of a potential source of carcass contamination. *Int. J. Food Microbiol.*, v.124, p.188-194, 2008.
- PRENCIPE, V.; PARISCIANI, G; CALISTRI, P. et al. Thermotolerant *Campylobacter* in poultry meat marketed in the Abruzzo and Molise regions of Italy: prevalence and contaminations levels. *Vet. Ital.*, v.43, p.157-165, 2007.
- ROZYNEK, E.; DZIERZANOWSKA-FRANGAT, K.; JOZWIAK, P. et al. Prevalence of potential virulence markers in Polish *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates obtained from hospitalized children and from chicken carcasses. *J. Med. Microbiol.*, v.54, p.615-619, 2005.
- SAMOSORNSUK, W.; ASAKURA, M.; YOSHIDA, E. et al. Evaluation of a Cytolethal Distending Toxin (*cdt*) gene-based species-specific Multiplex-PCR assay for the identification of *Campylobacter* strains isolated from poultry in Thailand. *Microbiol. Immunol.*, v.51, p.909-917, 2007.
- SCARCELLI, E.; GENOVEZ, M.E.; CARDOSO, M.V. et al. Avaliação do potencial de disseminação de *Campylobacter* spp por diferentes espécies animais. *Arq. Inst. Biol.*, v.65, p.55-61, 1998.
- SCARCELLI, E.; MIYASHIRO, S.; CAMPOS, F.R. et al. Detecção de *Campylobacter jejuni* em carcaças e cortes de frangos pela reação da polimerase em cadeia. *Rev. Hig. Alimentar*, v.19, p.71-76, 2005a.
- SCARCELLI, E.; PIATTI, R.M.; HAKAKAVA, R. et al. Molecular subtyping of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* strains isolated from different animal species in the state of São Paulo, Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, v.36, p.378-382, 2005b.
- SKIRROW, M.B. Epidemiology of *Campylobacter enteritis*. *Int. J. Food Microbiol.*, v.12, p.9-16, 1991.
- SMITH, J.L.; BAYLES, D.O. The contribution of cytolethal distending toxin to bacterial pathogenesis. *Crit. Rev. Microbiol.*, v.32, p.227-248, 2006.
- STERN, N.J.; HERNANDEZ, M.P., BLANKENSHIP, L. et al. Prevalence and distribution of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in retail meats. *J. Food Prot.*, v.48, p.595-599, 1985.
- TALUKDER, K.A.; ASLAM, M.; ISLAM, Z. et al. Prevalence of virulence genes and cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* isolates from diarrheal patients in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.*, v.46, p.1485-1488, 2008.
- VAN DEUN, K.; HAESBROUCK, F.; HEYNDRIKX, M. et al. Virulence properties of *Campylobacter jejuni* isolates of poultry and human origin. *J. Med. Microbiol.*, v.56, p.1284-1289, 2007.
- WARDAK, S.; SZYCH, J. Prevalence of pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* isolated from humans in Poland between 2003-2005. *Med. Dosw. Mikrobiol.*, v.58, p.217-222, 2006.
- WHYTE, P.; MCGILL, K.; COWLEY, D. et al. Occurrence of *Campylobacter* in retail foods in Ireland. *Int. J. Food Microbiol.*, v.95, p.111-118, 2003.