

**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
VETERINÁRIAS**

***Campylobacter* spp. EM MATRIZES CÁRNEAS  
CONSUMIDAS NO BRASIL**

**HÉLIDA FERNANDES LEÃO**  
Médica Veterinária

**UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS - BRASIL  
JULHO - 2018**

HÉLIDA FERNANDES LEÃO

***Campylobacter* spp. EM MATRIZES CARNEAS CONSUMIDAS NO BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Uberlândia, como exigência parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Produção Animal

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daise Aparecida Rossi

UBERLÂNDIA - MINAS GERAIS - BRASIL

JULHO – 2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

L437c      Leão, Héli da Fernandes, 1985-  
2018      *Campylobacter spp.* em matrizes cárneas consumidas no Brasil  
[recurso eletrônico] / Héli da Fernandes Leão. - 2018.

Orientadora: Daise Aparecida Rossi.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa  
de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018.908>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Veterinária. 2. Infecções por *Campylobacter*. 3. Saúde pública.  
4. Virulência. I. Rossi, Daise Aparecida. II. Universidade Federal de  
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.  
III. Título.

CDU: 619



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



Ata da defesa de **TESE DE DOUTORADO** junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de: **TESE DE DOUTORADO Nº PPGCV/016/2018**

Data: 19/07/2018

Discente: **Hélida Fernandes Leão** – Matrícula – 11413MEV010

Título da Tese: **Campylobacter spp. EM MATRIZES CÁRNEAS CONSUMIDAS NO BRASIL**

Área de concentração: **PRODUÇÃO ANIMAL**

Linha de pesquisa: **MANEJO E EFICIÊNCIA DE PRODUÇÃO DOS ANIMAIS, SEUS DERIVADOS E SUBPRODUTOS.**

Projeto de Pesquisa de vinculação: **CONTROLE DE QUALIDADE, TECNOLOGIA E SEGURANÇA DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL.**

Aos 19 dias do mês de julho do ano de 2018 às 09:00 horas na sala 2D07 - Bloco 2D – Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Comissão Julgadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, composta pelos Professores/Doutores: **Eliane Pereira Mendonça** – INSTITUTO FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO; **Fernanda Raghianti** – INSTITUTO FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO; **Edson José Fragiorge** – INSTITUTO FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO; **Deborah Santesso Bonnas** – INSTITUTO FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO e **Daise Aparecida Rossi** orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da comissão Dr./Dra. Daise Aparecida Rossi concedeu a palavra ao(a) candidato(a) para a exposição do seu trabalho, contando com o tempo máximo de 50 minutos. A seguir o(a) senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o(a) candidato(a), durante o prazo máximo de (30) minutos, assegurando-se a mesma igual prazo para resposta. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Comissão Julgadora, em sessão secreta, considerou o(a) candidato(a) aprovado.

Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme Regulamento do Programa, Legislação e a Regulamentação Interna da UFU.

Os trabalhos foram encerrados às 12 horas e 45 minutos, e para constar, lavrou-se a presente ata que será assinada pelos membros da Comissão Examinadora. Uberlândia, 19 de julho de 2018.

Profa. Dra. **Fernanda Raghianti**

INSTITUTO FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

Profa. Dra. **Eliane Pereira Mendonça**

INSTITUTO FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

Prof. Dr. **Edson José Fragiorge**

INSTITUTO FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

Profa. Dra. **Deborah Santesso Bonnas**

INSTITUTO FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

Profa. Dra. **Daise Aparecida Rossi**

ORIENTADORA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS  
Rua Ceará, s/nº Bloco 2D – Sala 03 - Campus Umuarama - 38400-902 - Uberlândia – MG

Fone: +55 – 34 – 3218-2494

E-mail: [mesvet@ufu.br](mailto:mesvet@ufu.br)

Endereço Eletrônico: <http://www.portal.ppgcv.famev.ufu.br>

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

**HÉLIDA FERNANDES LEÃO** - Nascida em Catalão, Estado de Goiás, em 29 de março de 1985, filha de Helder José Leão e Sônia Maria Fernandes Leão. Médica Veterinária, graduada em dezembro de 2007 pela Universidade Federal de Goiás, durante toda a graduação foi bolsista de iniciação científica. Em 2009, iniciou o mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal na Engenharia Agrônômica pela Universidade Federal de Goiás, na qual foi bolsista pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), de março de 2009 a fevereiro de 2011. Em 2014, iniciou o doutorado na Universidade Federal de Uberlândia, no Programa de Pós-graduação em Ciência Animal. Atua como docente em Instituições de Ensino Superior desde o ano de 2009; com experiência na área de produção animal. Atualmente professora no Instituto Master de Ensino Presidente Antônio Carlos (IMEPAC/Araguari) e UNITRI – Uberlândia, nos cursos de Engenharia Agrônômica, Medicina Veterinária e Ciências Biológicas, com disciplinas da área básica e na produção animal.

Aos meus pais, meus irmãos e meus filhos  
pelo apoio que sempre me foi dado ao longo da minha  
vida acadêmica.  
Dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

Este estudo é fruto de muito esforço, o qual não foi só meu. Foi sim composto de várias etapas nas quais encontrei inúmeras dificuldades e superações. Foi com o apoio e ajuda da minha família, meu marido, dos meus filhos, de amigos e colegas, que contribuíram na execução do trabalho, que tornaram possível a finalização. Expresso, por isso, a todos minha mais profunda gratidão.

Gostaria primeiramente de agradecer a Deus por me amparar nos momentos difíceis, me ouvir chorar e me dar forças para superar os percalços; mostrando-me sempre o caminho que deveria seguir.

O maior amor do mundo é dirigido aos meus pais, pelo apoio de sempre, em tudo, ensinando-me, principalmente, a importância da construção e coerência de meus próprios atos. Agradeço ao meu pai, pelas palavras sempre sábias em todo e qualquer momento, bom ou ruim; pela ajuda financeira, sem a qual também nada seria possível; pai muito obrigado por toda sua sabedoria. Agradeço a minha mãe que sempre, sempre, me apoiou em tudo e se orgulha profundamente de mim, por cuidar dos meus filhos, por cuidar de mim e me ouvir. Te amo mãe. Aos meus irmãos Helton e Érica, as pessoas mais incríveis que já conheci, pessoas distintas que me apoiam e me fazem ter vontade de crescer, como sinto falta de vocês perto de mim, como eu amo vocês, como é bom poder contar com vocês.

Ao meu marido por me apoiar sempre, me ouvir e me ajudar em tudo que precisei, por cuidar das crianças enquanto eu estive fora todos esses anos, por me esperar a noite e por me dar seu amor.

A minha sogra Neusa, por ajudar tanto com as crianças, por dar tanto amor aos meus filhos, que as vezes tive que deixar mesmo estando com febre, com dor; muito obrigada.

À minha orientadora, Profa. Dra. Daise Aparecida Rossi, pelos importantes ensinamentos, pela paciência e compreensão, minha admiração e agradecimento.

Aos colegas do laboratório que me ajudaram e me ensinaram tanto. Aos meus amigos de trabalho em especial Mariela por me ouvir chorar várias vezes e compartilhar comigo suas experiências, a minha gestora Danielle por ser tão compreensiva.

Aos meus tantos alunos, que se orgulham tanto de mim e que me fazem sentir tão bem, amo o que faço e ao ver meus alunos formando e tão gratos a mim, sinto que estou no caminho certo.

Em especial a Eliane, Guilherme e Roberta pela paciência e por me ensinar tudo o que precisei, muito obrigada sem vocês não seria possível.

Muito obrigada de coração a todos.



## RESUMO

*Campylobacter* é um dos micro-organismos mais comumente associados a contaminações de carnes, incluindo a carne bovina, a suína, e principalmente a de aves. A tese foi organizada em três capítulos; o primeiro, intitulado “Considerações gerais”, aborda os aspectos gerais relacionados ao gênero *Campylobacter*, como espécies, características, epidemiologia e importância na cadeia avícola. O segundo capítulo diz respeito à presença de *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* e *Campylobacter* spp. em carne moída bovina, pernil suíno, fígado bovino e fígado de frango produzidas por marcas comerciais representativas às comercializadas no Brasil e coletadas no comércio. Determinou-se a prevalência nestas matrizes cárneas, e nos isolados, foram identificados a espécie, a presença de genes de virulência e a disseminação dos genótipos. Foram analisadas 660 amostras, sendo 138 de pernil suíno, 138 de fígado de frango, 138 de patinho moído bovino e 246 de fígado bovino. A confirmação da espécie e a presença dos genes *flaA*, *pldA*, *ciaB*, *cadF* e *cdtABC*, *luxS*, *danJ* e *sodB* foram realizadas por PCR e a homologia entre as cepas determinada por RAPD-PCR. A prevalência de *Campylobacter* não foi influenciada pelo tipo de matriz, inspeção, marca comercial, ano de isolamento e forma de comercialização (congelada ou resfriada). Apesar de não haver diferença estatística na prevalência entre as matrizes, a observada em pernil suíno foi similar à observada em carne de frango nos dados disponíveis literatura, e os isolados apresentaram maior número de genes ligados a virulência. O conjunto de resultados das demais matrizes indicam que o consumo destes alimentos não representam perigo para a aquisição de campilobacteriose. O terceiro capítulo objetivou avaliar a similaridade genética de espécies de *Campylobacter* previamente isolados de 246 carcaças de frango (23 *C. jejuni*, 9 *C. coli* e 8 *Campylobacter* spp.), de marcas comerciais representativas às comercializadas no Brasil. A similaridade entre as cepas foi determinada por RAPD-PCR e os resultados obtidos foram relacionados às suas características de virulência, data e local de isolamento e resistência aos antimicrobianos. A análise filogenética comprovou grande diversidade genotípica em *Campylobacter* spp., provavelmente, pela existência de diferentes espécies nesse grupo. Nos isolados de *C. jejuni* e *C. coli* observou-se elevada proximidade genética, indicando uma origem comum. O estudo mostra a complexidade observada no

gênero *Campylobacter*, e reforça a necessidade de constante acompanhamento de sua prevalência e características.

**Palavras-chave:** Campilobacteriose. Genes de Virulência. Saúde Pública. Similaridade Genética. Virulência.

## ABSTRACT

*Campylobacter* is one of the microorganisms most commonly associated with meat contamination, including beef, pork, and especially poultry. The thesis was organized in three chapters; the first, entitled "General considerations", addresses the general aspects related to the *Campylobacter* genus, such as species, characteristics, epidemiology and importance in the poultry chain. The second chapter concerns the presence of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter* spp. bovine liver and chicken liver produced by trademarks representative of those marketed in Brazil and collected commercially. The prevalence in these meat matrixes was determined, and in the isolates, the species, the presence of virulence genes and the dissemination of the genotypes were identified. A total of 660 samples were analyzed, 138 of pork leg, 138 of chicken liver, 138 of bovine ground duckling and 246 of bovine liver. Confirmation of the species and the presence of the *flaA*, *pldA*, *ciaB*, *cadF* and *cdtABC*, *luxS*, *dnaJ* and *sodB* genes were performed by PCR and the homology between the strains determined by RAPD-PCR. The prevalence of *Campylobacter* was not influenced by the type of matrix, inspection, trademark, year of isolation and form of commercialization (frozen or cooled). Although there is no statistical difference among the matrices, the prevalence in pork leg is similar to that observed in chicken meat in the literature, and the isolates presented a higher number of genes linked to virulence. The set of results of the other matrices indicates that the consumption of these foods do not present danger to the acquisition of Campylobacteriosis. The third chapter aimed to evaluate the genetic similarity of previously isolated *Campylobacter* species from 246 chicken carcasses (23 *C. jejuni*, 9 *C. coli* and 8 *Campylobacter* spp.), Of commercial brands representative of those commercialized in Brazil. The similarity between the strains was determined by RAPD-PCR and the results obtained were related to their characteristics of virulence, date and place of isolation and antimicrobial resistance. The phylogenetic analysis showed great genotypic diversity in *Campylobacter* spp., probably due to the existence of different species in this group. In the *C. jejuni* and *C. coli* isolates, a high genetic proximity was observed, indicating a common origin. The study shows the complexity observed in the genus *Campylobacter*, and reinforces the need for constant monitoring of its prevalence and characteristics.

**Keywords:** Campylobacteriosis. Genetic similarity. Public Health. Virulence Genes. Virulence.

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

<b>Tabela 1.</b>	Resumo dos procedimentos de preparo das amostras para análise de <i>Campylobacter</i> spp. nas diferentes matrizes cárneas.	<b>41</b>
<b>Tabela 2.</b>	<i>Primers</i> utilizados na identificação de <i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> e <i>Campylobacter</i> spp.	<b>42</b>
<b>Tabela 3.</b>	<i>Primers</i> , tamanho do amplicon, condições da reação e referência utilizadas para a identificação de genes em <i>Campylobacter</i> isolados de diferentes matrizes cárneas	<b>44</b>
<b>Tabela 4.</b>	Identificação de 35 isolados de <i>Campylobacter</i> de 660 matrizes cárneas comercializadas no Brasil no período de 2014 a 2016.	<b>46</b>
<b>Tabela 5.</b>	Prevalência de <i>Campylobacter</i> em diferentes tipos de carnes comercializadas congeladas ou resfriadas no Brasil (janeiro 2014 – maio 2016).	<b>46</b>
<b>Tabela 6.</b>	Número de amostras positivas nas diferentes matrizes cárneas em relação ao sistema de inspeção utilizado.	<b>49</b>
<b>Tabela 7.</b>	Número e porcentagem de genes de virulência em 11 e 14 cepas de <i>Campylobacter</i> isolados de fígado bovino, pernil suíno, respectivamente, no Brasil (março 2014- maio 2016)	<b>50</b>

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

- Figura 1.** Fontes de *Campylobacter* para o homem 27

### CAPÍTULO II

- Figura 1.** Dendograma comparativo de *Campylobacter* utilizando coeficiente de similaridade de Dice com tolerância de 1% e método UPGMA com otimização de 0,80%. 1a – Análise em *Campylobacter* spp.; 1b – Análise em *C. coli*; 1c – Análise em *C. jejuni*. A-I – Clusters formados com homologia superior a 80%. CM – patinho bovino moído; FB – fígado bovino; FF – fígado de frango; PS – pernil suíno. 59

### CAPÍTULO III

- Figura 1.** Dendograma dos 37 isolados de *Campylobacter* spp. oriundos de carcaças de frangos resfriados e congelados, pela técnica de RAPD-PCR com os *primers* 1290 e HLWL, utilizando a média de experimentos (*average from experiments*) e método UPGMA com otimização de 85%, pelo programa GelCompar. 1a – Resultados encontrados para *Campylobacter* spp. 1b – Resultados encontrados para *C. jejuni*: A – *cluster* com homologia de 90,1%; B – *cluster* com homologia de 85,9%; C – *cluster* com homologia de 85%. 1c – Resultados encontrados para *C. coli*: D – *cluster* com homologia de 91,7%; E – *cluster* com homologia de 92,4%. SP (São Paulo), MT (Mato Grosso), MG (Minas Gerais), SI (Serviço de Inspeção), SIF (Serviço de Inspeção Federal), SIM (Serviço de Inspeção Municipal), IMA (Instituto Mineiro Agropecuário), AMC (amoxicilina com clavulanato), CIP (ciprofloxacina), E (eritromicina), AZM (azitromicina), CN (gentamicina), TE (tetraciclina). 74

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPA: Associação Brasileira de Proteína Animal  
AMO: amoxicilina com clavulanato 10µg  
AMPs: peptídeos antimicrobianos  
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
CCDA: ágar *Campylobacter Blood-Free Selective Medium*  
CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*  
CDT: toxina citolética distensiva  
CLSI: *Clinical Laboratory Standards Institute*  
DNA: Ácido Desoxirribonucleico  
dNTPs: Desoxirribonucleotídeos Fosfatados  
DO: densidade óptica  
EFSA: *European Food Safety Authority*  
EPS: exopolissacarídeos  
ERI: eritromicina 15µg  
EUA: Estados Unidos da América  
FAO: *Food and Agriculture Organization*  
FDA: *Food and Drug Administration*  
FSA: *Food Standards Agency*  
GEN: gentamicina 10µg  
IAL: Instituto Adolfo Lutz  
ICMSF: *International Commission on Microbiological Specifications for Foods*  
ISO: *International Organization for Standardization*  
LOS: lipo-oligossacarídeos  
LPS: Lipopolissacarídeos  
Kb: Kilobase  
MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento  
MgCl<sub>2</sub>: Cloreto de Magnésio  
MH: caldo/ágar Mueller Hinton  
MLST: *Multilocus sequence typing*  
Mpb: milhões (mega) de pares de bases  
mm: Milímetro

mM: Milimolar  
NCTC: *National Collection of Types Cultures*  
ng: Nanograma  
nm: Nanômetro  
NPs: nanopartículas  
OMS: Organização Mundial da Saúde  
pb: pares de bases  
PBS: Tampão fosfato-salino  
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase  
PDIA: polineuropatia desmielinizante inflamatória aguda  
PFGE: *Pulsed Field Gel Electrophoresis*  
pH: Potencial Hidrogeniônico  
pmol: Picomol  
QS: *quorum-sensing*  
RAPD: *Random Amplified Polymorphic DNA*  
RNA: Ácido ribonucléico  
rpm: rotações por minuto  
SGB: Síndrome de Guillain-Barré  
SII: Síndrome do intestino irritado  
SOD: superóxido desmutase  
SPF: *specific pathogens free*  
TBE: Tris/Borato/EDTA  
TET: tetraciclina 30µg  
TGI: trato gatrointestinal  
U: Unidade  
UE: União Européia  
UFC: Unidades Formadoras de Colônias  
UPGMA: *Unweighted Pair Group Method With Arighmetic Mean*  
VNC: viáveis não cultiváveis  
WHO: *World Health Organization*  
ZnO: Óxido de zinco  
µg: Micrograma  
µl: Microlitro  
µm: Micrômetro



## SUMÁRIO

### CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS

#### 1 INTRODUÇÃO 19

#### 2 OBJETIVOS 22

##### 2.1 Objetivo Geral 22

##### 2.2 Objetivos Específicos 22

#### 3 REVISÃO DA LITERATURA 23

##### 3.1 Gênero *Campylobacter* 23

##### 3.2 Epidemiologia 25

##### 3.3 Manifestações clínicas 28

##### 3.4 Importância na produção avícola e formas de controle 33

### CAPÍTULO II - Prevalência, virulência e disseminação de *Campylobacter* spp. em diferentes matrizes cárneas. 36

### CAPÍTULO III – Homologia de *Campylobacter* Isoladas de carcaças de frango comercializadas no Brasil. 61

#### REFERENCIAS 75

#### ANEXOS 84

Normas para a publicação Food Microbiology

Normas para publicação Pesquisa Veterinária Brasileira

## **CAPÍTULO I**

### **CONSIDERAÇÕES GERAIS**

## 1. INTRODUÇÃO

A produção de proteína animal produzida pela agroindústria brasileira vem se destacando pelos seus índices de produção, produtividade e exportação. O sucesso deste setor alavanca a economia nacional, e cada vez mais, merece a atenção do cenário internacional.

A cadeia produtiva da carne de frango brasileira ocupa posição de destaque na economia brasileira e mundial, já que o país é o maior exportador de carne de frango desde 2004, e é o segundo maior produtor desde 2015, ficando atrás apenas dos EUA (ABPA, 2017). Em relação à carne bovina nosso país já está há alguns anos como maior exportador e segundo maior produtor do mundo (IBGE, 2017), e a carne suína também é importante, já que é a terceira mais consumida no Brasil e a primeira mais consumida no mundo (ABPA, 2017).

A produção de proteína animal no Brasil é importante para as divisas do país, porém, para a manutenção da posição de grande produtor e exportador, é necessário garantir também, a inocuidade dos alimentos produzidos, mantendo a segurança microbiológica dos alimentos. Isto tranquiliza o consumidor interno e atende às exigências dos países importadores.

Durante e após o abate, a carne dos animais de produção pode ser facilmente contaminada por micro-organismos patogênicos ou deteriorantes, dependendo de diferentes fatores, desde a produção primária até o beneficiamento. Relacionado à produção primária, animais colonizados por patógenos, durante o abate, dependendo das boas práticas e tecnologia empregada, podem ter seu conteúdo intestinal extravasado, aumentando as chances de contaminação das carcaças. Já a sua manipulação durante o abate e processamento podem propiciar a contaminação cruzada e multiplicação dos patógenos (MATSUBARA, 2005).

Dentre os patógenos que podem contaminar a carne e comprometer a sua inocuidade, temos os representantes do gênero *Campylobacter* (EFSA, 2014; ROSSI, 2016). A campilobacteriose humana se caracteriza por uma gastroenterite autolimitada, com presença de diarreia, febre e cólicas abdominais, com sintomas que geralmente desaparecem em quatro a sete

dias, geralmente, com recuperação espontânea. No entanto, em alguns pacientes, a diarreia pode ser mais grave, com a necessidade de hospitalização. Nesses pacientes, *C. jejuni* pode se espalhar do intestino para a corrente sanguínea, e depois para outros locais do corpo, com risco de morte. Complicações graves pós-infecção, tais como artrite reativa e síndrome de Guillian-Barré (SGB) podem ocorrer, sendo a última caracterizada por paralisia flácida e morte por insuficiência respiratória (CDC, 2013; SKARP et al., 2016).

Os agentes etiológicos da campilobacteriose são espécies termofílicas de *Campylobacter*, sendo *C. jejuni* e *C. coli* responsáveis por cerca de 95% de todas as campilobacterioses diagnosticadas em seres humanos na UE e nos EUA (EFSA, 2014; BOLTON, 2015). Estes micro-organismos são comumente encontrados no trato gastrointestinal de várias espécies animais, incluindo aves, bovinos e suínos (DUIM et al., 2000; BOLTON, 2015), entre outros, fazendo com que o consumo da carne destes animais sejam fontes potenciais de infecção aos humanos.

O consumo da carne de frango e seus derivados, quando contaminados, é considerada a principal fonte de infecção humana (EFSA, 2014), fazendo com que tenha destaque especial pelas autoridades sanitárias e também nas pesquisas.

Carnes de suínos e bovinos também podem ser contaminadas por *Campylobacter*, porém a incidência tem se mostrado menor que nas aves. Em um estudo de prevalência realizado em dez estados norte-americanos foram analisados pela técnica de rinsagem amostras de carne moída bovina (6171) e 6148 amostras de costelas de porco. Foi encontrada contaminação por *Campylobacter* inferior a 0,09%, com seis amostras de carne bovina positivas e 20 amostras de carne suína, sendo que as espécies mais prevalentes foram *C. jejuni* e *C. coli*, respectivamente (ZHAO et al., 2010).

É provável que diferentes fatores influenciem na alta prevalência mundial da campilobacteriose humana, incluindo a dose infectante, virulência das cepas e susceptibilidade dos hospedeiros. Isto instiga os pesquisadores e demonstra a necessidade de pesquisas constantes.

Estudos demonstram que um ponto importante na prevalência da campilobacteriose pode estar relacionada a baixa dose infectante, se comparado a outros micro-organismos (KARMALI; FLEMING, 1979; WHO, 2015). Além disso, o mecanismo com o qual *Campylobacter* causa a infecção ainda não está totalmente elucidado, apesar de a campilobacteriose, tanto em animais quanto em humanos, ter sido relacionada a fatores de virulência como: motilidade, quimiotaxia, capacidade de colonização, adesão às células intestinais, invasão e translocação epitelial, sobrevivência intracelular e produção de toxinas (FERNANDES et al., 2010).

Considerando a importância do Brasil como produtor mundial de proteína animal e a emergência da campilobacteriose como problema de saúde pública mundial, há necessidade de conhecer a real prevalência de *Campylobacter*, sua caracterização e disseminação em diferentes matrizes cárneas comercializadas no Brasil.

Os conhecimentos da prevalência das espécies de *Campylobacter* circulantes em possíveis fontes de infecção aos humanos, somadas ao seu potencial gênico de virulência e disseminação das estirpes, podem contribuir para a avaliação do risco que representam aos humanos, e ainda, auxiliar às autoridades sanitárias para a necessidade de implementar medidas para o seu controle ou obrigatoriedade de sua análise em produtos específicos.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo Geral

Determinar a prevalência de *Campylobacter* em amostras representativas às comercializadas no Brasil em pernil suíno, carne bovina moída, fígado bovino e de frangos, e determinar nos isolados, a espécie, presença de genes de virulência e a disseminação dos genótipos. Objetivou-se também, analisar filogeneticamente espécies destes mesmos micro-organismos previamente isolados de carcaças de frango de marcas representativas às comercializadas no Brasil e exportadas, relacionando os resultados às suas características de virulência, data e local de isolamento e resistência aos antimicrobianos.

### 2.2 Objetivos específicos

- determinar a prevalência de *Campylobacter* em pernil suíno, carne bovina moída, fígado de frango e fígado bovino em amostras representativas às marcas comercializadas no Brasil;
- identificar as espécies (*Campylobacter* spp., *Campylobacter jejuni* ou *Campylobacter coli*) nos isolados de pernil suíno, carne bovina moída, fígado de frango e fígado bovino;
- determinar a presença de genes de virulência nas cepas de *Campylobacter* isolados de pernil suíno, carne bovina moída, fígado de frango e fígado bovino;
- estabelecer a disseminação dos genótipos nas cepas de *Campylobacter* isolados de pernil suíno, carne bovina moída, fígado de frango e fígado bovino;
- avaliar a similaridade genética de espécies de *Campylobacter* previamente isoladas de carcaças de frango representativas às marcas comercializadas no Brasil e exportadas;
- relacionar a similaridade genética de espécies de *Campylobacter* previamente isoladas de carcaças de frango representativas às marcas comercializadas no

Brasil e exportadas com a resistência antimicrobiana, genes de virulência, data e local de isolamento.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Gênero *Campylobacter*

Em 1963, ao aplicar o teste de metabolismo fermentativo de Hugh e Leifson e analisar a base de DNA de bactérias classificadas como *Vibrio spp.*, Sebald e Véron observaram que havia diferenças entre o perfil de duas bactérias quando comparadas às “verdadeiras” *Vibrio spp.* Sugeriram então a classificação em um novo gênero, denominado *Campylobacter*, que foi primeiramente descrito compreendendo apenas duas espécies, *Campylobacter fetus* e *Campylobacter bubulus* (ON, 2001).

Bactérias do gênero *Campylobacter* são bacilos gram-negativos que possuem formas variadas, apresentando-se de forma curvada, designada como “asa de gaivota”, em forma de “S”, ou ainda, em forma de haste em espiral, variando entre 0,2 a 0,5  $\mu\text{m}$  de largura e 0,5 a 5  $\mu\text{m}$  de comprimento (NACHAMKIN, 1997). Assim, a palavra *Campylobacter*, derivada do grego e denota a sua morfologia microscópica, com haste curva, em forma de espiral ou “S” (BHAVSAR; KAPADNIS, 2007).

O gênero *Campylobacter* compreende 34 espécies e 14 subespécies (LPSN, 2015), sendo as espécies termofílicas as envolvidas na gastroenterite humana. Dentre estas espécies, *C. jejuni* e *C. coli* são as mais conhecidas (MAN, 2011) e as mais frequentemente envolvidas em infecções intestinais, sendo consideradas como de maior potencial patogênico do ponto de vista da segurança alimentar (EFSA, 2016). Porém, Horrocks et al. (2008) comentam que a espécie *C. lari* também é relevante nas gastroenterites humanas.

Man (2011) afirma que as bactérias deste gênero são capazes de colonizar aves, mariscos, répteis e mamíferos em geral. São consideradas a principal causa de gastroenterites nos Estados Unidos da América e em outros países industrializados.

Vandamme et al., (1991) caracterizam as espécies do gênero como organismos microaerófilos a anaeróbicos, sendo o hidrogênio um fator requerido ou estimulante, temperatura de crescimento ideal a 37°C, não crescendo em temperaturas iguais ou inferiores a 15°C. Já Garénaux et al. (2008) constataram que o crescimento ótimo de *C. jejuni* ocorreu na temperatura de 42°C, e que células desta espécie quando envelhecidas são capazes de sobreviver por mais tempo em temperaturas baixas. Estes mesmos autores concluíram que o pH ideal para o desenvolvimento destes micro-organismos é entre 6,5 a 7,5, sendo incapazes de sobreviver em pH inferior a 4,9 e superior a 9.

*Campylobacter* spp. possui um flagelo polar, que pode estar localizado em uma ou ambas as extremidades da célula, que é responsável por lhe conferir um movimento característico, que se assemelha a um saca-rolhas (VANDAMME et al., 1991). São oxidadase e catalase positivas e não são hemolíticas (ON, 2001). Outras características associadas a estes micro-organismos são a capacidade de reduzir nitrato em nitrito e a incapacidade de fermentar ou oxidar carboidratos (LEVIN, 2007). Assim, a forma de se obter energia é por meio de intermediários do ciclo tricarboxílico, ou ainda, de aminoácidos (GUNTHER; CHEN, 2009).

Mesmo sendo consideradas microaerófilas e incapazes de formar esporos, bactérias deste gênero, como *C. jejuni*, são capazes de mudar para um estado conhecido como “viável não cultivável” (VNC) quando expostas a ambientes não favoráveis ao seu desenvolvimento (como baixas temperaturas e meio aeróbico). Porém se submetida novamente a condições que lhe sejam favoráveis, principalmente no hospedeiro, são capazes de retornar à sua forma espiral, e até mesmo de se multiplicar (KEUM-IL et al., 2007).

O genoma de *Campylobacter jejuni* é composto por uma média de 1641481 pares de bases (bp), sendo que cada gene é formado por 948 bp, onde 94,3% de seu genoma codifica proteínas. Das 1654 sequências de códons preditas, 77,8% são de informações funcionais, sendo que 13,5% são genes de função desconhecida e 8,7% são desconhecidos no banco de dados ou sua informação funcional ainda não foi esclarecida (PARKHILL et al., 2010).



Devido ao seu genoma relativamente pequeno, proporcionalmente, existem muito mais genes essenciais e muito menos genes auxiliares ou dispensáveis, o que faz com que este seja um dos genomas mais densos já sequenciados (FRIIS et al., 2010). Biggs et al. (2011) associaram a possibilidade de se captar e de se inserir DNA no genoma do *C. jejuni* à sua capacidade de ser transmitido entre diferentes espécies hospedeiras e à capacidade de se adaptar a ambientes inóspitos.

O ferro apresenta influência direta sobre a transcrição gênica, sendo que em meios com limitação de ferro, bactérias da espécie *C. jejuni* diminuíram a transcrição de 30 genes e transcreveram 117 genes a mais quando comparadas com bactérias que não tiveram limitação de ferro (HOLMES et al., 2005). Estes autores mostram que a maioria dos genes a mais que foram transcritos são responsáveis por codificar proteínas de superfície celular e sistemas de transporte.

### **3.2 Epidemiologia**

*Campylobacter* é a principal causa de diarreia bacteriana humana em países desenvolvidos, porém, mesmo com os constantes avanços nas técnicas de biologia molecular, a epidemiologia deste agente etiológico ainda não está completamente esclarecida (CDC, 2017; EFSA, 2017).

Em um estudo que objetivou realizar um levantamento das principais causas de doenças intestinais infecciosas no Reino Unido, Tam et al. (2012) constataram que *Campylobacter* foi o agente mais frequentemente isolado, sendo responsável por mais de meio milhão de casos no ano em que o estudo foi realizado. Quando se analisa a incidência em toda a União Europeia, considera-se que um a cada 50 habitantes pode ser afetado pela campilobacteriose por ano (HAVELAAR et al., 2012). Na Estônia, no ano de 2017, 347 casos de infecção intestinal por *Campylobacter* foram relatados, com uma taxa de notificação de 26,4 por 100.000 habitantes (TERVISEAMET, 2018). Já nos Estados Unidos estima-se que ocorrem cerca de 1,3 milhões de casos de infecção por *Campylobacter* a cada ano (CDC, 2017).

A prevalência de *Campylobacter* varia com a estação do ano e região geográfica, uma vez que fatores como temperatura e índices médios de chuva e incidência solar irão influenciar no manejo dos lotes de aves, na sobrevivência destes micro-organismos, e ainda, na presença de vetores como moscas (JORGENSEN et al., 2011). Estes mesmos autores mostram que há um maior registro de infecções por esta bactéria nos meses mais quentes do ano, onde é mais viável a multiplicação desta bactéria e há uma maior presença de vetores.

Quanto à influência da região geográfica sobre a prevalência desses micro-organismos, tem-se que a campilobacteriose em países em desenvolvimento é mais comum em crianças, e em países desenvolvidos, atinge pessoas de todas as idades, uma vez que estes são menos expostos ao agente, não possuindo imunidade contra este (COKER et al., 2012). Já Kaakopush et al. (2015) afirmaram que em países industrializados, a infecção ocorre com maior prevalência em crianças de até quatro anos de idade e que a colonização assintomática por *Campylobacter* é uma característica comum em países em desenvolvimento, pouco se conhecendo sobre sua distribuição etária.

Giugno e Oderiz (2010), em um estudo realizado na Argentina, mostram resultados que corroboram com a maior incidência da campilobacteriose em crianças, já que determinaram que o grupo mais suscetível naquele país, apresentavam menos de 23 meses de idade. Este grupo pode ser infectado pelo simples fato de andar na cesta do carrinho de compras (hábito comum de mães ao levar os filhos ao supermercado), entrando em contato com carne crua ou produtos derivados da carne de frango (PARKHILL et al., 2010).

Gras et al., (2013) pesquisavam a presença de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* em proprietários e seus respectivos animais de estimação. Demonstraram que donos de cachorros são mais predispostos a desenvolver infecções por esta bactéria, o que não foi encontrado para donos de gatos. Os autores desenvolveram duas teorias para explicar este fato: i) que os humanos podem ter sido infectados pelos cachorros, ou ii) que humanos e cachorros se infectam de uma mesma fonte.

Young et al. (2007) descreveram as principais fontes de infecção humana por *Campylobacter* (Figura 1).

Estudos demonstraram que para a infecção humana, os reservatórios mais comuns são as aves, no entanto, bovinos, animais de estimação e até o ambiente podem estar envolvidos na cadeia de transmissão (Kovanen et al., 2016). Assim, a forma mais comum de se desenvolver infecção por *Campylobacter* é a partir do consumo de carne e produtos derivados da carne de aves domésticas (ABU-MADI, 2016; PRACHANTASENA et al., 2016).

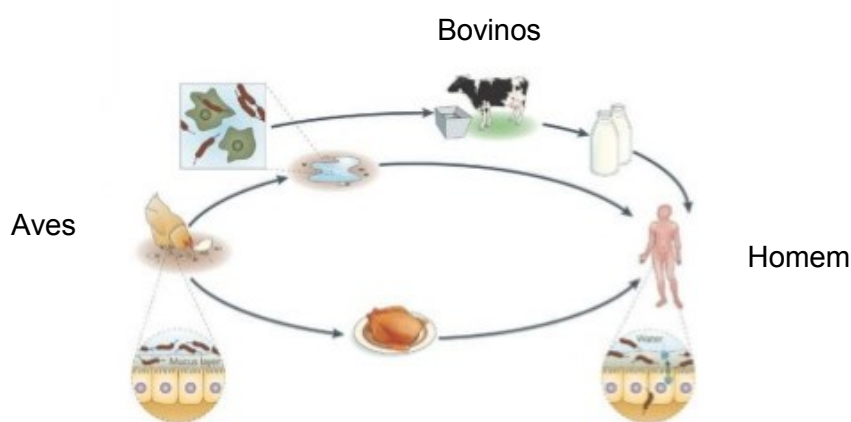


Figura 1: Fontes de contaminação de *Campylobacter* para o homem. Young et al., 2007.

Ailes et al. (2012) afirmaram que, provavelmente, a regularidade no consumo da carne de frango, e a consequente exposição contínua a este micro-organismo, pode conferir uma certa resistência à infecção, fazendo com que não se manifeste a forma sintomática da campilobacteriose.

O consumo de alimentos específicos também tem sido associado ao desenvolvimento de infecções por *Campylobacter*, entre eles, a ingestão de fígado de galinha mal cozido, como os utilizados na produção de patês. Neste alimento é comum o uso de temperaturas mais baixas no preparo para se obter o sabor e textura desejados, não sendo alcançadas a temperatura de 70°C por um período de 2 a 3 minutos, que é o binômio necessário para a eliminação de *Campylobacter* (TOMPKINS, 2013).

*Campylobacter* spp. é encontrado no intestino de suínos, tendo a espécie *C. coli* como a mais prevalente, sendo as carcaças de suínos mais comumente

contaminadas por esse micro-organismo do que bovinos e ovinos. As taxas de contaminação variam de 2,9% na Polônia a 95% na Suécia (NESBAKKEN et al., 2003). No Brasil, *C. coli* e *C. jejuni* e *C. fetus* subsp. *fetus* são isoladas de suínos sem sintomas clínicos (CAMPOS, 2007; GABRIEL et al., 2010), sendo a prevalência relacionada à carne crua (GODOI, 2010).

Um acompanhamento constante sobre a prevalência de *Campylobacter* em diferentes tipos de carne, assim como, estudos para identificar quais alimentos são as principais fontes de infecção humana são essenciais para basear medidas de controle.

*C. jejuni* é a espécie mais frequentemente isolada de aves (BOLTON, 2015; PRACHANTASENA et al., 2016) e bovinos, enquanto a espécie *coli* está associada principalmente ao suíno (BOLTON, 2015).

Outro fator considerado de importância em saúde pública é a dose infectante (DI) estabelecida para a infecção humana, em cerca de 500 UFC. Esta baixa DI é mais um complicador para o estabelecimento de metas para a diminuição dos episódios de infecção humana e envolve a redução da infecção/contaminação em todo o processo de produção (LEE; NEWELL, 2006).

### 3.3 Patogenicidade e fatores de virulência

A gastroenterite por *Campylobacter* em humanos é classificada como uma doença zoonótica de origem alimentar (WHO, 2013; EFSA, 2017; CDC, 2017). A *Campylobacteriose* é uma forma grave de diarreia, mas a maioria das pessoas infectadas se recuperam em um curto período, que vai de dois a cinco dias; podendo durar até 10 dias. A permanência da doença por períodos prolongados é rara (WHO, 2011).

A patogenicidade da *Campylobacter* está associada com a susceptibilidade do hospedeiro e a virulência da cepa infectante, tendo que em países subdesenvolvidos ela tende a provocar diarreias aquosas, ao passo que em países desenvolvidos, é mais comum a ocorrência de enterite (PARK, 2002). Devido à dependência dos fatores ligados ao hospedeiro e ao micro-organismo, a infecção por *Campylobacter* pode causar desde uma doença sem sintomas, até septicemia fulminante e morte do infectado.

A diarreia passa por uma fase aguda que geralmente perdura por até três dias, em alguns casos, concomitantes com dores abdominais, as quais podem persistir por até três semanas. O tratamento, só é indicado para os casos mais graves, quando se recomenda antimicrobianos. Nos casos brandos, apenas o repouso e a fluidoterapia são suficientes para resolver a sintomatologia desta doença, que na maioria dos casos se resolve sem uso de medicamentos (BUTZLER, 2004).

A infecção pela *Campylobacter* geralmente causa uma enterite inflamatória, afetando tanto o intestino delgado como o cólon, provocando um edema local, sendo possível identificar na microscopia a presença de neutrófilos e células mononucleares (ALLOS; BLASER, 1995; GUERRY, 2007). Allos; Blaser (1995) também relatam a importância da imunidade humoral na defesa a esta bactéria, já que de duas a quatro semanas após a infecção, os valores de IgG, IgA e IgM aumentam drasticamente, o que explica o desenvolvimento de uma doença muito mais severa em pacientes hipogamaglobulinêmicos.

O sintoma mais clássico da infecção por *Campylobacter* é sem dúvidas a diarreia, sendo que essa muitas vezes é acompanhada de febre, dores abdominais, náuseas e mal-estar (BRASIL, 2009; BESSEDE et al., 2014). Em alguns casos pode haver também infecção extra-intestinal, como artrite purulenta e pancreatite, e em casos mais graves, pode haver meningites, pneumonias e abortos (LEVIN, 2007).

*C. jejuni* também está associada ao desenvolvimento da Síndrome de Guillain-Barré (MISHU et al., 1993; LEVIN, 2007). A Síndrome de Guillain-Barré (SGB) é uma desordem autoimune que acomete o sistema nervoso periférico, ocasionando uma paralisia flácida, promovendo fraqueza dos músculos respiratórios e membros, além da perda de reflexo (KOOBATIAN et al., 1991; TAKAHASHI et al., 2005). A relação da *Campylobacter jejuni* com a SGB está na indução de uma resposta autoimune contra o tecido nervoso do hospedeiro, causada por características estruturais desta bactéria (NACHAMKIN et al., 1998; GUERRY e STYMANSKY, 2008).

*C. jejuni* desperta no organismo humano uma resposta imune, com produção de anticorpos específicos contra a estrutura dos lipo-oligossacarídeos

dos micro-organismos. Porém, o corpo humano possui estruturas, os gangliosídeos, que são constituídos exatamente com a mesma composição molecular da bactéria. Dessa forma, a resposta imune produzida vai reagir também contra a membrana das células nervosas humanas, que resulta em dano nervoso, que evolui para a paralisia característica da síndrome de Guillain-Barré (REES et al., 1995).

Outra síndrome resultante da campilobacteriose é a síndrome de Reiter, uma resposta auto-imune que provoca inflamação (artrite) em diferentes articulações em resposta à infecção por *C. jejuni* (MURRAY et al., 2007).

Outro fator que tem sido relacionado à patogenicidade das cepas é o aumento da resistência aos antimicrobianos. Segundo a World Health Organization (WHO, 2013), mais de 40% das cepas de *Campylobacter* apresentaram resistência a vários antimicrobianos, principalmente às tetraciclina, quinolonas e macrolídeos, limitando as opções de tratamento humano. Considerando que *Campylobacter* é um micro-organismo zoonótico, a resistência nos animais pode ser transferida aos humanos e resultar em maior dificuldade no tratamento da doença em humanos (MOORE et al., 2006).

Nos casos mais graves de campilobacteriose em humanos em que é necessário o uso da antibioticoterapia, as drogas mais indicadas são as do grupo das fluorquinolonas, sendo os macrolídeos as drogas de segunda escolha. No entanto, para ambas já foram relatadas resistência (CDC, 2013). Sabendo que a infecção por *Campylobacter* em humanos se dá principalmente via alimentação, o uso indiscriminado destes antibióticos na produção animal pode levar ao aparecimento frequente de cepas resistentes (SERICHANTALERGS et al., 2007).

Melo (2012) analisou *Campylobacter* isolados de carcaça de frangos resfriadas e congeladas produzidas nos estados de Minas Gerais, Distrito Federal e Goiás (Brasil) e encontrou 43,6% de resistência à norfloxacin (fluoroquinolona), 36,2% à eritromicina (macrolídeo) e tetraciclina (34,0%). Essa resistência crescente se tornou uma preocupação na saúde pública mundial, já que ao se isolar cepas resistentes tanto de animais quanto de humanos, dificulta o tratamento da infecção em humanos.

Para que se desenvolva a campilobacteriose é necessário que o micro-organismo se estabeleça no organismo do hospedeiro, para isso, *Campylobacter* adere ao intestino e produz toxinas, e então, invade e prolifera na mucosa intestinal (SCHWILLE-KIUNTKE et al., 2011). O desenvolvimento da doença também está relacionado com a competência imune do hospedeiro (NEWELL, 2002). A microbiota comensal também parece exercer uma barreira efetiva contra a colonização desta bactéria no intestino, sugerindo que enterites causadas por esse agente etiológico ocorrem preferencialmente, quando há algum tipo de distúrbio da microbiota do hospedeiro (FAUCHÉRE et al., 1985, BANG et al., 2003).

Uma vez no organismo do hospedeiro, a bactéria adentra as células epiteliais, principalmente no epitélio de superfície entre as microvilosidades, onde formarão vacúolos no citoplasma, fazendo com que estas inchem e fiquem arredondadas, ocorrendo também falhas no transporte de íons. Essa invasão é responsável por provocar uma lesão na mucosa, promovendo a perda de células da superfície luminal e diarreia (RUSSELL, 1993, WAGENAAR et al., 2013). Isso é diferente do que ocorre na infecção de frangos, onde a colonização ocorre de maneira mais significativa no intestino grosso, ceco e cloaca e colonização nas criptas do epitélio intestinal é bastante reduzida, o que explica o fato deste micro-organismo ser predominantemente assintomático nestes animais (PARK, 2002).

Porém, mesmo que aves colonizadas por *Campylobacter* não apresentam nenhum sintoma, a colonização é frequente, o que demonstra uma inefetividade do sistema imune destes animais contra o agente e a constante presença da bactéria no sistema de produção (NEWELL, 2002).

Vários são os fatores de virulência identificados, e de alguma forma associados, à capacidade de *Campylobacter* causar doença em seres humanos. Porém, a associação entre os fatores de virulência da cepa e a patogenicidade da mesma, ainda não está completamente elucidada (CROINÍN e STEFFEN, 2012). Os fatores mais citados como de importante associação com a patogenicidade são a motilidade, a aderência, a invasão da célula hospedeira e a produção de toxinas (JANSSEN et al., 2008). Os genes

relacionados a estes processos são *flaA*, *cadF*, *ciaB*, *pldA* e *cdtABC* (ZHENG et al., 2006).

O flagelo apresenta-se como um fator de patogenicidade importante para *Campylobacter*, pois além de ser responsável pela motilidade (que é indispensável na colonização intestinal) e quimiotaxia, seu papel na virulência desta bactéria é muito mais complexo, envolvendo inclusive, a resposta imune. O gene *flaA* codifica a proteína flagelina, principal componente do flagelo A. Cepas que não possuem o gene *flaA* são imóveis e o seu filamento é truncado (GUERRY, 2007). Porém, estudo antigo realizado por King et al. (1991), demonstrou que outro gene também está envolvido na tradução de flagelina em *C. jejuni*, sendo homólogo em 95% ao *flaA*. Isto demonstra, que esta espécie possui a capacidade de rearranjar genes, mediando a variação antigênica e obtendo uma vantagem em relação ao sistema imune do hospedeiro.

O gene *ciaB* codifica uma proteína envolvida na invasão celular (RIVERA-AMILL et al., 2001), enquanto *cadF* codifica uma proteína que interage com a fibronectina da matriz extracelular do hospedeiro, facilitando a colonização celular (MONTEVILLE et al., 2003). O gene *pldA* está diretamente relacionado com o processo de invasão celular e codifica uma proteína responsável pela síntese de fosfolipase da membrana externa (ZIPRIN et al., 2001).

Apenas a invasão já é suficiente para causar a doença, mas algumas cepas também possuem os genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*, que codificam a toxina citotelial distensiva (CDT). Há uma maior atividade citotóxica quando há presença dos três genes, podendo levar à morte celular em até quatro dias após a infecção (GE et al., 2008).

No aparato gênico de *Campylobacter*, aqueles relacionados ao mecanismo de *quórum-sensing* (QS), que é a capacidade de comunicação célula-célula são de extrema importância, já que são genes relacionados ao controle da regulação da expressão gênica (BANDARA et al., 2012). Neste aspecto, o gene mais importante é o *luxS*, que ao codificar a enzima luxS (reconhecimento e inclusão de micro-organismos), auxilia na estruturação e formação do biofilme bacteriano (HOLMES et al., 2009).



O gene *dnaJ* codifica uma proteína de proteção ao choque térmico, ou seja, permite a sobrevivência em temperaturas acima de 40°C, o que confere ao micro-organismo a termotolerância. Isso permite que *Campylobacter* resista a alterações bruscas de temperatura, e também, sua adaptação às mesmas (STINTZI, 2003).

A expressão do gene *sodB*, permite que *Campylobacter* sobreviva em situações de resfriamento e congelamento, já que esse gene protege a célula bacteriana da desidratação celular (STINTZI, WHITWORTH, 2003).

O grande número de populações bacterianas existentes dentro desse gênero, faz com que surjam cepas que são resistentes à fatores que normalmente seriam letais, como as altas ou reduzidas temperaturas, sendo necessário uma avaliação genética para que se possa constatar as mudanças que levaram à essa maior resistência (HUNTER et al., 2009).

### **3.4 Cadeia da produção avícola e formas de controle**

A intensificação e a globalização da indústria envolvida com a produção de carne de frango foram fatores determinantes para que essa se tornasse uma das carnes mais consumidas e baratas em todo o mundo, porém, tal fato dificulta o controle e/ou erradicação de micro-organismos importantes para a saúde pública como *Campylobacter* (LEE; NEWELL, 2006).

Um dos grandes desafios enfrentados pela indústria avícola é manter a inocuidade do alimento que será comercializado tanto no mercado interno quanto no externo, onde as pressões são consideravelmente maiores. Considerando as características dos representantes do gênero *Campylobacter*, as medidas de controle devem envolver toda a cadeia de produção, desde a produção primária até o seu preparo pelo consumidor (ROSSI et al., 2016).

Destacam-se nesse cenário, as falhas que podem ocorrer durante a higienização, que favorecem a permanência dos micro-organismos e a contaminação do produto final. Entre os micro-organismos mais comumente transmitidos por alimentos, destacam-se os do gênero *Campylobacter*, agentes etiológicos mais prevalentes nas infecções de origem alimentar em humanos

(WAGENAAR; FRENCH; HAVELAAR, 2013; ROSSI et al., 2016; CDC, 2017; EFSA, 2017).

Manter frangos livres de *Campylobacter* até a idade de abate é um objetivo praticamente impossível de alcançar e economicamente inviável. Isso faz com que as metas principais para garantir a inocuidade da carne produzida sejam: controlar o nível de infecção das aves nas granjas, aprimoramento dos procedimentos de abate com ações que previnam a o extravasamento do conteúdo intestinal e a contaminação cruzada, e ainda, informação do consumidor sobre os perigos da campilobacteriose e da manipulação incorreta. Desta forma, várias ações devem ser tomadas em toda a cadeia produtiva da carne de frango, envolvendo desde questões de manejo na criação de frangos, até medidas de higiene durante o abate e o processamento da carne e informações ao consumidor (SNELLING et al., 2005; WAGENAAR; FRENCH; HAVELAAR, 2013; ROSSI et al., 2016).

Em relação à produção primária nas granjas, fatores como a presença de outros animais na fazenda ou a criação de outros animais em fazendas próximas às granjas, principalmente “caipiras” predispõem a presença de *Campylobacter* em granjas de frango de corte (BOUWKNEGT et al., 2004). Aves silvestres, como os pardais, também podem servir de fonte de infecção para aves comerciais (CHUMA; HASHIMOTO; OKAMOTO, 2000). Uma única ave infectada pode rapidamente disseminar o patógeno, de modo que todas as aves da granja se tornem positivas em curto período de tempo (LEE; NEWELL, 2006).

Como medidas de controle na infecção de aves, vacinação, tratamento com bacteriófagos, bacteriocinas ou agentes de exclusão competitiva, se aplicadas em conjunto, já demonstraram serem capazes de diminuir a incidência deste agente, porém, é necessário que haja um maior desenvolvimento destas técnicas para que sua aplicação a campo se torne viável (LEE; NEWELL, 2006).

Já no frigorífico, é necessário que se entenda o modo como *Campylobacter* é disseminada e contamina as carcaças durante o processamento, para que medidas efetivas sejam implementadas, considerando que ao final do processamento são encontradas carcaças

infectadas por essa bactéria, que não apresentaram contaminação no início do processo de abate (HUNTER et al., 2009).

Já está estabelecido que o aumento nas medidas de biossegurança nos frigoríficos como as que previnam a contaminação cruzada (FRANCO, 1998), congelamento (AILES et al., 2012; CODEX, 2016) e todas ações que previnam a formação de biofilmes (ROSSI et al., 2016) são capazes de reduzir a presença ou o número de *Campylobacter* em carcaças de frango, porém, não suficientes para prevenir a sua presença ou níveis seguros na totalidade das carcaças beneficiadas. Atualmente, para exportação, a contagem de *Campylobacter* em 25g de carcaças de frango está estabelecida em 1000UFCg<sup>-1</sup> (UE, 2017).

As condições nas quais as carcaças de frango são submetidas durante a criação, abate, armazenamento e exposição para os consumidores podem favorecer ou inibir a presença e multiplicação de *Campylobacter*, sendo que, a umidade pode criar um ambiente que permite a sobrevivência desta bactéria por várias semanas em baixas temperaturas (ABU-MADI, 2016).

Mesmo que a carne de frango seja adequadamente cozida, a manipulação das carcaças e cortes crus podem manter e disseminar *Campylobacter* para outros alimentos que são consumidos crus (LEE; NEWELL, 2006). Assim, medidas adotadas durante a preparação dos alimentos são capazes de reduzir os riscos de infecção por *Campylobacter*. Dentre essas medidas pode-se destacar a lavagem das mãos com sabão antes do preparo e consumo de alimentos, a utilização de um termômetro para que se certifique de que o alimento atingiu a temperatura desejada (temperatura interna de pelo menos 73°C), durante o cozimento, e a lavagem adequada de facas e utensílios que entraram em contato com a carne crua, e que posteriormente, entrarão em contato com alimentos que serão consumidos sem processamento térmico (ACHESON; ALLOS, 2001).

Sumariamente, para se reduzir o número de casos de infecção de humanos por *Campylobacter* proveniente de carne contaminada, é necessário a tomada de atitudes que previnam a entrada desta bactéria dentro da granja, bem como medidas que previnam a contaminação entre carcaças e higiene nos processos de industrialização e preparo da carne (LEE; NEWELL, 2006).

## **CAPÍTULO II**

### **PREVALÊNCIA, VIRULÊNCIA E DISSEMINAÇÃO DE *Campylobacter* spp. EM DIFERENTES MATRIZES CÁRNEAS**

Artigo submetido ao periódico

**Food Microbiology**

## **Prevalência, virulência e disseminação de *Campylobacter* spp. em diferentes matrizes cárneas**

Hélida F. Leão<sup>1a</sup>, Roberta T. Melo<sup>a</sup>, Marcela F. Timoteo<sup>a</sup>, Jocasta R. Iasbeck<sup>a</sup>,  
Eliane P. Mendonça, Guilherme P. Monteiro, Phelipe Augusto B. M. Peres,  
Daise A. Rossi<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Epidemiologia Molecular, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Rua Ceará s/n, Bloco 2D Sala 44, Bairro Umuarama, Uberlândia, MG – 38402-018, Brasil

### **RESUMO**

Objetivou-se determinar a prevalência de *Campylobacter* em fígado de frango e bovino, pernil suíno e carne moída bovina, determinando se marca comercial, tipo de inspeção, ano de isolamento e tipo de conservação influenciaram na positividade. Nos isolados, determinou-se a espécie, a presença de genes de virulência e a similaridade genotípica. Foram analisadas 660 amostras representativas das comercializadas no Brasil, compostas por: pernil suíno resfriado (138), fígado de frango (138), patinho bovino moído (138) e fígado bovino (246), provenientes de 53 marcas e sob diferentes serviços de inspeção durante o período de março de 2014 a maio de 2016. A identificação da espécie e a presença dos genes *flaA*, *pldA*, *ciaB*, *cadF* e *cdtABC*, *luxS*, *dnaJ* e *sodB* foram realizadas por PCR. A homologia entre as cepas foi determinada por RAPD-PCR. Das amostras, 35/660 (5,3%) foram positivas para o gênero *Campylobacter*, sendo 9/35 (25,71%) identificadas como *C. jejuni* e 6/35 (17,14%) como *C. coli*. A similaridade foi superior a 80% entre as cepas. Os resultados indicam que, provavelmente, o consumo destes alimentos produzidos no Brasil oferecem perigo para a aquisição de campilobacteriose.

**Palavras-chave:** Carnes. Campilobacteriose. Tipagem molecular. Virulência.

## 1. Introdução

A produção de carnes eleva o Brasil a uma posição de destaque no cenário mundial. O país ocupa a posição de primeiro exportador de carne bovina e de frango do mundo e o segundo maior produtor de ambas, em relação a carne suína é o quarto produtor e exportador (ABPA, 2017). A busca pela melhoria dos parâmetros sanitários foi fundamental para este ranking e possibilitou a inserção de produtos frente ao mercado externo, porém tornou também, a prevenção e o controle de patógenos um desafio permanente (Vaz et al., 2012).

O alto consumo mundial de carnes, seus derivados e miúdos expõe a população a doenças de origem alimentar como a campilobacteriose. Os casos da doença humana em países europeus e nos Estados Unidos ultrapassaram os casos de salmonelose e shigelose documentados (Cover et al., 2014). De acordo com o CDC (*Center for Disease Control and Prevention*), essa bactéria afetou mais de 2,4 milhões de pessoas no ano de 2013, e o número de infecções diagnosticadas pelo CIDT (*Foodborne Illness and Culture-Independent Diagnostic Tests*) determinou aumento de 114% em 2016 em comparação com a média de 2013-2015 (CDC, 2016).

A maioria dos casos de campilobacteriose ocorre isoladamente, apresentando quadros de diarreia, cólicas abdominais e febre, podendo agravar e levar à complicações como a Síndrome de Guillain-Barré, que ocorre em um a cada mil casos da doença (Who, 2011).

*Campylobacter* spp. coloniza o trato gastrointestinal de várias espécies animais domésticas e selvagens, principalmente aquelas destinadas ao consumo humano (Malakauskas et al., 2005). Entre os alimentos de origem animal, as carcaças de frango e suas vísceras têm sido motivo de alerta, devido à possível ocorrência de contaminação com as fezes durante as operações da linha de abate, sendo uma via potencial de transmissão desse patógeno para humanos. Nos abatedouros, observa-se uma oscilação da contaminação das carcaças em relação aos processos convencionais de evisceração, dependendo da planta de processamento industrial (Horrocks et al., 2009).

No ano de 2017, se antecipando às exigências internacionais, a análise de *Campylobacter* passou a ser realizada em laboratórios oficiais no sul do Brasil, por meio de quantificação em carcaças de frangos. Neste mesmo ano, a União Européia recomendou o monitoramento desta bactéria nas carcaças de frango exportadas a partir de janeiro de 2018, estabelecendo como limite máximo  $10^3$  UFC.g<sup>-1</sup>. Porém, além de carcaças de frangos, o consumo de outros alimentos de origem animal também pode ser fonte de campilobacteriose humana e o risco de seu consumo deve ser avaliado para determinar se devem ser incluídos em programas de controle nacional e internacional.

Assim, objetivou-se determinar a prevalência de *Campylobacter* em pernil suíno, carne bovina moída e fígados bovino e de frangos, e determinar nos isolados, a espécie, presença de genes de virulência e a disseminação dos genótipos.

## **2. Material e métodos**

### **Amostras e amostragem**

O número de amostras coletadas foi estabelecido conforme a fórmula seguinte descrita por Thrusfield (2004) e Brasil (2008).

$$n = \frac{1,96^2 P_{esp}(1-P_{esp})}{d^2}$$

Onde: n= tamanho necessário da amostra

P esp= prevalência esperada

d = margem de erro admitida

Como não existem estudos sistemáticos prévios sobre a prevalência, foi utilizado como P esp, a média observada em estudos prévios. A prevalência esperada para fígado bovino é de 80%, o número de amostras desta matriz foi de 246 (FAO, 2009). Para fígado de frango, pernil suíno e carne bovina moída, o número de amostras foi 138 para cada um, levando em conta a prevalência

esperada de 90%, 10% e 10%, respectivamente, conforme Whyte et al. (2006) em fígado de frango e Zhao et al. (2010) para pernil suíno e carne bovina moída.

A pesquisa foi baseada na análise de 660 amostras, sendo 546 resfriadas e 114 congeladas, representativas das marcas comerciais produzidas no Brasil, destinadas ao comércio externo e exportação. Foram coletadas 138 amostras de pernil suíno resfriadas, 138 amostras de fígado de frango (24 resfriadas e 114 congeladas), 138 amostras de patinho bovino moído resfriadas e 246 amostras de fígado bovino (24 resfriadas e 114 congeladas).

As matrizes cárneas foram coletadas em estabelecimentos comerciais sob diferentes 53 marcas comerciais, submetidos à fiscalização federal, municipal e estadual. As coletas foram realizadas durante o período de março de 2014 a maio de 2016.

## **2.2. Isolamento das cepas**

Para o isolamento de *Campylobacter* spp. foi utilizado o protocolo descrito na ISO 10272-1:2006, com modificações no pré-enriquecimento.

A tabela 1 demonstra o processamento inicial das diferentes matrizes cárneas. Nas amostras onde foi realizada a técnica da rinsagem, (pernil suíno, fígado bovino), uma alíquota de 30 mL do produto da lavagem de cada amostra foi pipetada e adicionada a 30 mL de caldo Bolton (Oxoid®) em dupla concentração com 5% de sangue de carneiro desfibrilado e antibióticos (10,0 mg de cefoperazona, 10,0 mg de vancomicina, 10,0 mg de trimetoprim e 25,0 mg de cicloheximida.). Para as amostras de carne bovina moída e fígado de frango, 10g foram adicionados diretamente no caldo Bolton em concentração simples, também acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrilado e mistura antibiótica. Todas as amostras foram incubadas em atmosfera de microaerofilia (Probac do Brasil®) a 37°C por 44±4 horas, e após, homogeneizadas e semeadas em ágar CCDA-Preston - *Campylobacter* Blood-Free Selective Medium (Oxoid®) suplementado com antibióticos (16mg cefoperazona e 32mg anfotericina B) (Oxoid®).



Na tentativa de reduzir a contaminação, as placas foram recobertas com membrana filtrante de celulose com poros de 0,65µm (Milipore®) e sobre a mesmas, pipetado 300µL da amostra enriquecida. As placas foram mantidas em repouso e retirada as membranas, seguido de incubação a 37°C por 44±4 horas em atmosfera de microaerofilia (Probac do Brasil®). Colônias suspeitas pela sua morfologia, foram subcultivadas e submetidas à coloração de Gram para confirmação da morfologia típica e posterior confirmação do gênero.

Tabela 1: Resumo dos procedimentos de preparo das amostras para análise de *Campylobacter* spp. nas diferentes matrizes

Matriz cárnea	Porção matriz	Enriquecimento	Técnica
Fígado de frango	10g	30mL Bolton	Homogeneização
Fígado bovino	150g	100mL AP + 30mL Bolton	Rinsagem
Pernil suíno	150g	100mL AP + 30mL Bolton	Rinsagem
Patinho moído	10g	90mL Bolton	Homogeneização

AP=água peptonada 0,1% (Oxoid®).

### 2.3. Identificação de *C. jejuni*, *C. coli* e confirmação quanto ao gênero

A confirmação do gênero *Campylobacter* e espécies *C. jejuni* e *C. coli* foi identificada por PCR. As análises foram conduzidas em paralelo com cepas controle de *C. jejuni* (ATCC 33291) e de *C. coli* (ATCC 43478).

A extração do DNA das colônias suspeitas após confirmação morfológica pela coloração de Gram foi realizada utilizando o kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification (Promega), conforme recomendações do fabricante.

Para confirmação do gênero, a reação foi realizada em um volume final de 30µL, composto por 30ng do DNA, 10mM de Tris-HCL; 50mM de KCl; 2,5mM de MgCl<sub>2</sub> e 0,25U de Taq DNA Polimerase; 200µM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dNTP) e 40 picomoles do *primer* (tabela 2) (Invitrogen®).

A amplificação foi realizada em termociclador (Eppendorff®) nas condições: 1 ciclo inicial a 94°C por 5 minutos; 25 ciclos das 3 etapas:

desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 60°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto; e 1 ciclo de extensão final a 72°C por 7 minutos (Linton et al., 1997).

Quando o gênero era confirmado, a identificação das espécies *C. coli* e *C. jejuni* foi realizada pela técnica de PCR multiplex. Os *primers* utilizados estão descritos na tabela 2.

O preparo da reação PCR foi realizado com o Kit GoTaq Green Master Mix (Promega) com inclusão de 20 picomoles do *primer* C1 e C4 (Invitrogen®) e 40 picomoles de pg3 e pg50 (Invitrogen®) (Tabela 2) e 2µL (20ng) do DNA extraído.

O protocolo de amplificação e de visualização em gel de eletroforese foi realizado de acordo com Harmon et al. (1997). Os produtos amplificados (8µL) foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5%, tampão de corrida TBE 0,5 vezes (Invitrogen®) e como padrão de peso molecular, o marcador de 100 pb (Invitrogen®).

Para a identificação das espécies *C. coli* e *C. jejuni* a reação foi realizada em um volume final de 25µL: 30ng do DNA extraído, 10mM de Tris-HCL; 50mM de KCl; 2,5mM de MgCl<sub>2</sub> e 0,25U de Taq DNA polimerase; 200µM de cada deoxinucleotideo trifosfato (DNTP) e 20 picomoles de cada um dos *primers*. Para amplificação; 1 ciclo inicial a 95°C por 15 minutos; 25 ciclos das 3 etapas: desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 1,5 minutos, extensão a 72°C por 1 minuto; e 1 ciclo de extensão final a 72°C por 7 minutos (Yamazaki-Matsune et al., 2007).

Tabela 2: *Primers* utilizados na identificação de *C. jejuni*, *C. coli* e *Campylobacter* spp.

Gene	<i>Primers</i>	Sequência 5' -> 3'	Peso molecular	Referencia
<i>flaA</i>	Pg3	GAACCTGAACCGATTG	460	Harmon et al. (1997)
	Pg 50	ATGGGATTTTCGTATTAAC	( <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> )	
I	C1	CAAATAAAGTTAGAGGTAGAATGT	160	Harmon et al. (1997)
	C4	GGATAAGCACTAGCTAGCTGAT	( <i>C. jejuni</i> )	
16S rRna	16S rRNA-F	ATCTAATGGTTAACCATTAAAC	857	Linton et al. (1997)
	16S rRna-r	GGACGGTAAGTAGTTTAGTATT	( <i>Campylobacter</i> spp.)	

## 2.4. Genes de Virulência

Foi avaliado em cada um dos isolados a presença dos genes de virulência *flaA* (motilidade), *pldA* (adesão e colonização), *ciaB* (invasão), *cadF* (colonização), *cdtABC* (citotoxinas), *luxS* (mecanismo *quórum-sensing*), *dnaJ* (termotolerância), *sodB* (tolerância ao estresse oxidativo).

A cepa padrão *C. jejuni* NCTC 11351 foi utilizada como controle positivo em todas as reações, bem como um controle negativo composto por água ultrapura estéril, adicionada à mistura de reação, em substituição ao DNA.

O mesmo DNA utilizado para a identificação do gênero foi utilizado para verificar a presença dos genes. Para os genes *flaA*, *pldA*, *cadF* e *ciaB*, o volume final para a reação de amplificação (50µL) foi composto por 20ng de DNA bacteriano e 30 picomoles para cada *primer* (tabela 3). Cada gene foi estudado separadamente nas reações. Para os genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* foi realizada a PCR-multiplex em um volume final de 25µL, composto por 80ng de DNA bacteriano e 20 picomoles para cada *primer* e para *dnaJ* e *sodB* o volume final de 25µL, composto por 20ng de DNA bacteriano e 20 picomoles de cada *primer* (tabela 3); e por fim para o *luxS* usou-se o volume final de 25µL, composto por 50ng e 10 picomoles do *primer* (tabela 3).

A amplificação dos genes *flaA*, *pldA*, *cadF* e *ciaB* foi realizada em termociclador (Eppendorff®), obedecendo aos seguintes ciclos: 1 ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos; 35 ciclos de amplificação constituídos de 3 etapas: desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 45°C por 1 minuto e extensão 72°C por 2 minutos, completando com mais um ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos (ZHENG et al., 2006; HANEL et al., 2004). Para os genes do complexo CDT o protocolo de amplificação compreendeu as seguintes etapas: 1 ciclo a 94°C por 5 minutos; 30 ciclos de amplificação, constituídos de 3 etapas: desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 57°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; completando com mais 1 ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos.

Para os genes *dnaJ* e *sodB* o protocolo foi composto por: um ciclo inicial a 95°C por 2 minutos; 30 ciclos de amplificação, sendo um de desnaturação a 94°C por um minuto; um ciclo de anelamento a 50°C por um minuto e um de

extensão a 72°C por um minuto; e um ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos. Por fim para o gene *luxS* o protocolo foi composto por um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos e mais 30 ciclos, sendo um de desnaturação a 94°C por 30 segundos, um de anelamento a 55°C por um minuto e um de extensão a 72°C por um minuto; seguido de um ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos.

**Tabela 3:** *Primers*, tamanho do amplicon, condições da reação e referência utilizados para a identificação de genes em *Campylobacter* isolados de diferentes matrizes cárneas

Genes	Primers	Sequência 5' → 3'	Tamanho (pb)	Volume/DNA/Anelamento	Referência
<i>flaA</i>	<i>flaA-F</i> <i>flaA-R</i>	ATGGGATTTTGTATTAAACAC CTGTAGTAATCTTAAACATTTTG	1728	50uL/20ng/45°C1 min.	Hänel et al. (2004)
<i>pldA</i>	<i>pldA-361</i> <i>pldA-726</i>	AAGAGTGAGGCGAAATTCCA GCAAGATGGCAGGATTATCA	385		
<i>cadF</i>	<i>cadFI-F2B</i> <i>cadFI-R1B</i>	TTGAAGGTAATTTAGATATG CTAATACCTAAAGTTGAAAC	400	50uL/20ng/45°C1 min.	Zheng et al. (2006)
<i>ciaB</i>	<i>ciaBI-652</i> <i>ciaBI-1159</i>	TGCGAGATTTTTCGAGAATG TGCCCGCCTTAGAACTTACA	527		
<i>cdtA</i>	<i>cdtA-F</i> <i>cdtA-R</i>	CTATTACTCCTATTACCCCACC AATTTGAACCGCTGTATTGCTC	420		
<i>cdtB</i>	<i>cdtB-F</i> <i>cdtB-R</i>	AGGAACTTTACCAAGAACAGCC GGTGGAGTATAGGTTTGTGTGTC	531	25uL/80ng/57°C1 min.	Martinez et al. (2006)
<i>cdtC</i>	<i>cdtC-F</i> <i>cdtC-R</i>	ACTCCTACTGGAGATTTGAAAG CACAGCTGAAGTTGTTGTTGGC	339		
<i>luxS</i>	<i>luxS-1</i> <i>luxS-2</i>	AGGCAAAGCTCCTGGTAAGGCCAA GGATCCGTATAGGTAAGTTCATTTT TGCTCC	1080	25uL/50ng/55°C1 min	Elvers, Park (2002)
<i>dnaJ</i>	<i>dnaJ F</i> <i>dnaJ R</i>	AAGGCTTTGGCTCATC CTTTTGTTCATCGTT	720	25uL/20ng/46°C1 min.	Datta et al. (2003)
<i>sodB</i>	<i>sodB F</i> <i>sodB R</i>	ATGATACCAATGCTTTTGGTGATT TAATACGACTCACTATAGGGCATT GCATAAAAGCTAACTGATCC	638	25uL/20ng/50°C1 min.	Biswas et al. (2011)

A visualização e resolução dos produtos amplificados foi realizada em gel de agarose a 1,5%(Affymetrix®) de solução TBE a 0,5 vezes, corados com *sybr safe* DNA stain (Invitrogen®), usando marcador com peso 100pb. As bandas formadas foram visualizadas através do transluminador (Loccus Biotecnologia®).

## 2.5 Tipagem Molecular por RAPD-PCR

A diversidade genética entre os isolados foi determinada pela técnica de RAPD-PCR (*Random Amplification of Polymorphic DNA*), conforme o protocolo descrito por Akopyanz et al. (1992), utilizando os *primers* HLWL85 (5'ACGTATCTGC3') e 1290 (5'GTGGATGCGA3').

Foi utilizado o mesmo DNA previamente extraído. O volume final para a reação de amplificação foi de 20µL, composto por 10ng do DNA bacteriano e pelos reagentes: 10mM de Tris-HCL; 50mM de KCl; 2,0mM de MgCl<sub>2</sub> e 1U Taq DNA polimerase; 200µM de cada deoxinucleotídeos (DNTP) e 30 picomols de cada *primer* (Invitrogen®). A amplificação obedeceu os seguintes ciclos: 1 ciclo inicial a 92°C por 2 minutos; 35 ciclos das 3 etapas: desnaturação a 92°C por 15 segundos, anelamento a 36°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto; e 1 ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos.

Os resultados foram avaliados usando o programa GelCompar II (*Comparative Analysis of Electrophoresis Patterns*, version 1.50, Applied Maths Korthrijk, Belgium) com o coeficiente de similaridade de Dice, com 1% de tolerância para cada *primer* separadamente. Para a construção do dendrograma foi utilizada a média de experimentos (*average from experiments*) pelo método UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic mean*).

## 2.6. Análise dos resultados

Os dados foram tabulados e submetidos à análise estatística descritiva. O teste exato de Fisher foi utilizado para comparar a positividade de *Campylobacter* entre as diferentes matrizes, influência da forma de conservação (congelada/resfriada), sistema de inspeção, marcas comerciais e ano de isolamento. Os cálculos foram realizados no programa GraphpadPrism 6.0.

### 3. Resultados e discussão

Das 660 matrizes cárneas analisadas 35 (5,3%) foram positivas para o gênero *Campylobacter*. Os isolados foram identificados como: *C. jejuni* (9/35-25,7%), *C. coli* (6/35-17,14%) e as demais (20/35-57,1%) não identificadas quanto à espécie, sendo classificadas como *Campylobacter* spp. (tabela 4).

Em relação às amostras positivas, aquelas não pertencentes às espécies *C. jejuni* e *C. coli* foram predominantes, indicando que existem outras espécies contaminando estes alimentos.

Não houve diferença ( $p>0,05$ ) na prevalência entre as diferentes matrizes cárneas analisadas e entre amostras fígado de frango congelado e resfriado pelo teste exato de Fisher (Tabela 5).

Tabela 4. Identificação de 35 isolados de *Campylobacter* de 660 matrizes cárneas comercializadas no Brasil no período de 2014 a 2016.

Matriz (N)	<i>Campylobacter</i> spp. n (%)	<i>C. coli</i> n (%)	<i>C. jejuni</i> n (%)	Total n (%)
Fígado de frango (5)	2 (10,0)	2 (22,2)	1 (16,7)	5 (14,2%) <sup>a</sup>
Fígado bovino (11)	7 (35,0)	2 (22,2)	2 (33,3)	11 (31,4%) <sup>a</sup>
Carne moída (5)	5 (25,0)	0	0	5 (14,2%) <sup>a</sup>
Pernil suíno (14)	6 (30,0)	5 (55,6)	3 (50,0)	14 (40%) <sup>a</sup>
<b>Total</b>	<b>20</b>	<b>9</b>	<b>6</b>	<b>35 (100%)</b>

N= número de amostras positivas por matriz; n (%) = número de amostras positivas por espécie e porcentagem em cada matriz. Letras diferentes na mesma coluna indica que não houve diferença estatística significativa.

Tabela 5: Prevalência de *Campylobacter* em diferentes tipos de carnes comercializadas congeladas ou resfriadas no Brasil (janeiro 2014-maio 2016).

MATRIZ	N	POSITIVAS		NEGATIVAS		PREVALÊNCIA (%)
		CONG	RESF	CONG	RESF	
Fígado de frango	138	3*	2*	111	22	3,62 <sup>a</sup>
Fígado bovino	246	--	11	--	235	4,47 <sup>a</sup>
Carne moida	138	--	5	--	133	3,62 <sup>a</sup>
Pernil suíno	138	--	14	--	124	10,14 <sup>a</sup>

N=número de amostras analisadas; CONG=congelada; RESF=resfriadas; a: letras iguais nas linhas indicam que não houve diferença significativa; \*: sem diferença significativa. Teste de Fisher ( $p<0,05$ ).

A prevalência de *Campylobacter* em fígado de frango e bovino, de 3,62% e 4,48%, respectivamente, foi inferior à esperada, considerando os dados de pesquisas realizadas em outros países.

No Chile, a positividade em fígados de frango disponíveis no comércio foi de 117/126 (92,86%) (Fernandez; Pisón, 1996). Já Whyte et al. (2006) encontraram em 30 amostras na Nova Zelândia, 100% de positividade, sendo *C. jejuni* a espécie mais prevalente. Na Dinamarca, um surto causado pelo consumo de patê de fígado de frango demonstrou que 22/49 comensais avaliados manifestaram a doença (Edwards et al., 2014). Em outro surto, na cidade de Liverpool em 2011, entre as 26 pessoas expostas por se alimentar em um mesmo restaurante, 11 apresentaram sintomas consistentes da infecção por *Campylobacter* spp. O alimento envolvido foi *parfait* de fígado de frango, e como causas foram incriminadas problemas no preparo e associado à contaminação cruzada (Farner et al., 2012). Nos EUA, Noormohamed e Fakhr (2013) avaliaram 50 amostras de fígado bovino e determinaram positividade em 39/50 (78%), sendo *C. Jejuni* a espécie mais identificada. No Reino Unido, a positividade em amostras de fígado bovino foi de 54,2%, sendo identificadas as espécies *C. jejuni* e *C. fetus* (Kramer et al., 2000).

A baixa prevalência pode estar associada à condição de injúria da bactéria, que as torna VNC (viáveis não cultiváveis), o que gera resultados falsos negativos, que mesmo não detectáveis são infectantes para o hospedeiro (Keum-il et al., 2007).

Nas amostras de patinho bovino moído e pernil suíno, a baixa prevalência de *Campylobacter* pode ser atribuída à menor predileção do micro-organismo por estas matrizes. Logo, a positividade encontrada pode estar ligada a processos de contaminação cruzada durante processamento.

Carnes de suínos e bovinos apresentam menor incidência de *Campylobacter* quando comparada com a carne de aves. Acredita-se que animais das espécies bovina, ovina e suína adquiram *Campylobacter* pela exposição a um ambiente externo contaminado, onde, sistemas extensivos de criação animal, contribuem para o contato frequente dos animais com o agente

infeccioso. *C. fetus* subsp. *fetus* e *C. jejuni* infectam ovinos, caprinos e bovinos geralmente por via oral (Humphrey; O'Brien; Madsen, 2007).

Apesar de baixa, a prevalência encontrada em carne bovina e suína foi relativamente maior do que a encontrada em estudo anterior. Zhao et al. (2010) realizaram um trabalho em 10 estados norte-americanos utilizando a técnica da rinsagem para a coleta de 6171 amostras de carne moída bovina e 6148 amostras de costela de porco entre os anos de 2002 e 2007. Os autores constataram contaminação por *Campylobacter* inferior a 0,5%, com seis amostras positivas em carne de origem bovina e 20 nas de origem suína. As espécies mais prevalentes foram *C. jejuni* e *C. coli*, respectivamente.

A condição da amostra (resfriada ou congelada) também não foi determinante para o isolamento de *Campylobacter* nas amostras de fígado de frango (Tabela 5).

O Codex Alimentarius (2016) considera o congelamento como capaz de reduzir as contagens de *Campylobacter* spp. Segundo estudo realizado pela FSA (2001) no Reino Unido há uma redução da prevalência de *Campylobacter* spp. em amostras congeladas. O trabalho baseou-se na investigação de 4866 carcaças, e obteve 50% de positividade para *Campylobacter*; dos quais 56% (2289) das amostras frescas apresentaram resultado positivo para este micro-organismo em comparação a 31% (408) de positividade em amostras de frango congeladas. Dimitraki and Velonakis (2007) salientam que o congelamento inibe o crescimento do micro-organismo, mas não o elimina completamente, podendo o mesmo assumir a forma VNC (viável, mas não cultivável) em condições ambientais adversas.

Quanto ao tipo de sistema de inspeção utilizado, das 652 amostras analisadas 380 (57,57%) eram inspecionada pelo SIF; 255 (38,6%) pelo SIM e 17 (4%) pelo IMA. Nas matrizes cárneas positivas, não foi detectada diferença ( $p>0,05$ ) em relação ao tipo de sistema de inspeção (Tabela 6).



Tabela 6: Número de amostras positivas nas diferentes matrizes cárneas em relação ao sistema de inspeção utilizado.

Matriz	SIF (N = 380)	IMA (N = 17)	SIM (N = 255)
Fígado de frango	5	0	0
Carne moída	3	0	2
Pernil suíno	5	1	8
Fígado bovino	7	0	4
<b>Total</b>	<b>20 (5,3%)<sup>a</sup></b>	<b>1 (5,9%)<sup>a</sup></b>	<b>14 (5,5%)<sup>a</sup></b>

N: número total de amostras em cada sistema de inspeção. SIF: Sistema de Inspeção Federal. IMA=Instituto Mineiro de Agropecuária. SIM= Serviço de Inspeção Municipal. a: Não houve diferença pelo teste exato de Fisher ( $p>0,05$ ).

Das 53 marcas avaliadas, a presença de *Campylobacter* foi detectada em 12 delas (22,6%), sendo que três marcas foram predominantes e responsáveis por 60,0% (21/35) das amostras positivas.

Ao considerar o ano de fabricação das amostras observou-se que, independente da matriz, 300 (45,45%) corresponderam ao ano de 2014, 215 (32,57%) ao ano de 2015 e 145 (21,96%) ao ano de 2016. Não houve diferença ( $p>0,05$ ) ao avaliar o percentual de positividade ao longo dos anos, sendo equivalentes a 3,0% (9/300) em 2014, 9,3% (20/215) em 2015 e 4,1% (6/145) em 2016.

Além da determinação da prevalência, conhecer o potencial virulento de *Campylobacter* para causar infecção humana é de grande importância para o conhecimento da epidemiologia e patogenia da campilobacteriose (Martinez et al., 2006).

Nos cinco isolados de fígado de frango, uma cepa identificada como *C. jejuni* possuía os genes *pdIA*, *cdtA*, *cdtB* e *luxS*; duas identificadas como *C. coli* possuíam os genes *flaA*, *ciaB* e *luxS* e outra *flaA*, *cadF* e *dnaJ*; as outras duas, identificadas duas *Campylobacter* spp. possuíam os genes *flaA* e *cadF* ou somente o gene *luxS*.

As cepas isoladas de carne moída possuíam características gênicas de virulência diversas, sendo eles: somente gene *luxS* ou *dnaJ* (em duas cepas); *ciaB* e *luxS* (uma cepa); *luxS* e *dnaJ* (uma cepa); *cdtA*, *cdtB*, *cdtC* e *dnaJ* (uma cepa).

Não houve diferença entre a presença de genes de virulência entre as cepas isoladas de fígado bovino e pernil suíno (Tabela 7), com exceção do gene *ciaB*.

Tabela 7. Número e porcentagem de genes de virulência em 11 e 14 cepas de *Campylobacter* isolados de fígado bovino e pernil suíno, respectivamente, no Brasil (março/2014 a maio/2016).

GENE	ESPÉCIES						TOTAL	
	<i>C. jejuni</i>		<i>C. coli</i>		<i>Campylobacter</i> spp.			
	FB	PS	FB	PS	FB	PS	FB	PS
<i>ciaB</i>	1 (50,0%)	3 (100%)	0	4 (80,0%)	1 (14,3%)	2 (33,3%)	2 (18,2%) <sup>a</sup>	9 (64,3%) <sup>b</sup>
<i>pldA</i>	1 (50,0%)	1 (33,3%)	0	2 (40,0%)	3 (42,8%)	3 (50,0%)	4 (36,4%) <sup>a</sup>	6 (42,8%) <sup>a</sup>
<i>flaA</i>	1 (50,0%)	1 (33,3%)	0	2 (40,0%)	1 (14,3%)	0	2 (18,2%) <sup>a</sup>	3 (21,4%) <sup>a</sup>
<i>cadF</i>	1 (50,0%)	2 (66,6%)	1 (50,0%)	4 (80,0%)	5 (71,4%)	3 (50,0%)	7 (63,6%) <sup>a</sup>	9 (64,3%) <sup>a</sup>
<i>cdtABC</i>	0	1 (33,3%)	0	0	0	0	0	1 (7,1%)
<i>luxS</i>	2 (100%)	3 (100%)	1 (50,0%)	3 (60,0%)	4 (57,1%)	6 (100%)	7 (63,6%) <sup>a</sup>	12 (85,7%) <sup>a</sup>
<i>dnaJ</i>	0	1 (33,3%)	1 (50,0%)	3 (60,0%)	2 (28,6%)	2 (33,3%)	3 (27,3%) <sup>a</sup>	6 (42,8%) <sup>a</sup>
<i>sodB</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	2 (18,3%)	3 (21,4%)	2 (18,3%)	5 (35,7%)	7 (63,6%)	6 (42,8%)	11 (100%)	14 (100%)

FB: fígado bovino; PS: pernil suíno. a,b: Letras diferentes na mesma linha indica diferença significativa no teste exato de Fisher ( $p < 0,05$ ).

Para ambas as matrizes, observou-se que os genes mais prevalentes nas cepas foram *luxS* e *cadF*, demonstrando que, provavelmente, são cepas mais adaptadas ao ambiente pela capacidade de formar biofilmes e pelo potencial de colonização, respectivamente.

Cabe destacar que as cepas de pernil suíno apresentaram maior potencial para invasão ( $p = 0,0419$ ), identificado pela presença do gene *ciaB*. Além disso, os maiores percentuais para os genes *pldA*, *cadF* e *luxS* foram identificados nessas cepas, o que mostra uma possível emergência de cepas virulentas nessa matriz.

De maneira geral, *C. jejuni* foi a espécie mais virulenta, uma vez que a presença dos perfis com cinco ou mais genes só foram detectados nessa espécie. Esse fato concorda com a literatura que afirma que *C. jejuni* apresenta

mais características de virulência e por isso é a mais envolvida em casos de campilobacteriose (Hirsh, 2003).

A ausência do gene *sodB* em todas as cepas, mostra a menor capacidade de adaptação às condições relacionadas à presença de oxigênio em situações de estresse pelo frio. Esse fato também pode explicar a baixa prevalência por se tratar de amostras congeladas e resfriadas.

O gene *flaA* codifica a proteína flagelina, que dá motilidade (Poly et al., 2007). O gene *ciaB* secreta proteínas que atuam na invasão e colonização de células epiteliais do intestino (Cróinín e Steffen, 2012; Eucker e Konkel, 2012) e *pldA* é responsável pela adesão e colonização. O gene *cadF* codifica uma proteína que está envolvida na ligação interna com células epiteliais do intestino, portanto, é importante para a colonização interna (Pickett e Whitehouse., 1999).

O complexo CDT está relacionado a citotoxicidade na célula hospedeira, causando interrupção do ciclo celular e consequente apoptose (Pickett et al., 1999; Martinez et al., 2006; Ripabelli et al., 2010; Martinez et al., 2006).

A similaridade genética analisada através do dendrograma mostrou que não foram detectados clones e que há alta diversidade genética entre as cepas pertencentes à mesma espécie, com a formação de nove *clusters* com similaridade superior a 80% para os 35 isolados.

Para cepas de *Campylobacter* spp., a similaridade identificada entre os *clusters* sugere que, provavelmente, trata-se de isolados de uma mesma espécie (*clusters* A, B, C e D – Figura 1a). Além disso, observou-se que não houve distinção das cepas em relação à matriz cárnea de origem, assim como do tipo de sistema de inspeção. Todavia, vale ressaltar que os *clusters* formados contemplavam cepas pertencentes a um mesmo ano de produção. Como exemplo, cabe citar o *cluster* B com similaridade de 92,0%, composto por cepas de *Campylobacter* spp. oriundas de pernil suíno e fígado de frango do ano de 2015, de marcas comerciais produzidas em Minas Gerais e Goiás, em sistemas de inspeção municipal, estadual e federal, que apresentaram em comum a presença do gene *luxS*, que caracteriza a capacidade das cepas em formar biofilmes.

A Figura 1b ilustra a homologia dos isolados de *C. coli*. Foram identificados três *clusters*, que agruparam cepas de acordo com a matriz cárnea de origem, de anos diferentes de produção, com sistemas de inspeção distintos. A presença comum dos genes *flaA* e *cadF* para os *clusters* E e F, respectivamente, ilustra a virulência compartilhada entre as cepas. Além dos aspectos supramencionados, o *cluster* E agrupou duas cepas de fígado de frango, com 99,2% de similaridade, provenientes de amostras armazenadas de sob refrigeração e congelamento, de marcas produzidas de diferentes estados (MT e GO), o que indica a disseminação do genótipo entre diferentes estabelecimentos.

O mesmo padrão identificado em *C. coli* também foi detectado para *C. jejuni*, com a formação de dois *clusters* discriminados de acordo com a matriz cárnea de origem, produzida em anos diferentes e com sistemas de inspeção municipal (SIM) e federal (SIF). A exceção cabe ao *cluster* H, composto por três cepas provenientes de pernil suíno e uma de fígado de frango, com similaridade de 81,8%, que demonstra que há genótipos comuns circulantes nas diferentes cadeias produtivas. Foi identificada a presença comum dos genes *ciaB* e *luxS* para os *clusters* H e I, respectivamente, que indica capacidade de invasão e de estabelecer a forma de vida séssil.

A elevada heterogeneidade entre as cepas se deve, provavelmente, à capacidade natural de *Campylobacter* realizar recombinação gênica por transformação e de sofrer rearranjos genômicos (Ridley et al., 2008). Porém, constatou-se que para *C. jejuni* e *C. coli* houve persistência de genótipos específicos para cada matriz cárnea ao longo dos anos. A evidência de linhagens altamente similares circulantes no território nacional ao longo do tempo pode indicar a capacidade de *Campylobacter* em agir de forma difundida. Aliado a isso, seu elevado potencial de formar biofilme, torna o micro-organismo resistente às condições adversas (Sheppard e Maiden, 2015).

#### 4. Conclusão

A identificação de *Campylobacter* nas matrizes alimentares foi independente de sua origem (bovina, suína e avícola), tipo de inspeção, ano de isolamento e forma de comercialização (congelada ou resfriada).

A maior prevalência de *Campylobacter* spp. nas matrizes carneas estudadas e a análise filogenética sugerem que há pelo menos mais quatro espécies, além de *C. jejuni* e *C. coli*, envolvidas na contaminação destes alimentos.

Para as cepas de origem suína foram identificados os maiores percentuais de prevalência e de virulência para *ciaB*, *pldA*, *luxS* e *cadF*, o que indica possível emergência do patógeno nessa matriz.

#### Agradecimentos

À ANVISA e ao CNPq pelo fornecimento de amostras e pelo auxílio financeiro, respectivamente, para a execução do estudo.

#### Referências

- ABPA, Associação Brasileira de Proteína Animal, 2017. Relatórios Anuais. <http://abpabr.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais>. (accessed 10.17.20)
- AKOPYANZ, N. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD finger-printing. *Nucleic Acid. Res.*, 20, 5137, 1992.
- BISWAS, D.; HANNON, S. J.; TOWNSEND, H. G.; POTTER, A.; ALLAN, B. J. Genes coding for virulence determinants of *Campylobacter jejuni* in human clinical and cattle isolates from Alberta, Canada, and their potential role in colonization of poultry. *Int Microbiol.*, v. 14, n. 1, p. 25-32, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Relatório do Monitoramento da Prevalência e do Perfil de Suscetibilidade aos Antimicrobianos em Enterococos e Salmonelas

- Isolados de Carcaças de Frango Congeladas Comercializadas no Brasil. Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango (PREBAF). Brasília, jan. 2008. 186p.
- CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Foodborne Germs and Illnesses, 2016. Disponível em: <  
<http://www.cdc.gov/foodsafety/foodborne-germs.html>>. Acesso em 12 set. 2017.
- COVER, K.E.; RUIZ, S.A.; CHAPMAN A.S. Reported gastrointestinal infections in the U.S. Air Force, 2000-2012. Medical Surveillance Monthly Report, 21(6):2-7, 2014.
- CODEX Guidelines For The Control of *Campylobacter* and *Salmonella* in Chicken Meat Associated with Food Inspection and Certification Systems (CAC/GL 78-2016).
- CRÓINÍN TÓ, STEFFEN B, Host epithelial cell invasion by *Campylobacter jejuni*: trigger or zipper mechanism. Cellular Infection Microbiology 2012; 2:1-13.
- DATTA S, NIWA H, ITOH K (2003) Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler and bovine faeces. Journal Medical Microbiology 52:345-348
- DIMITRAKI, P.; VELONAKIS, E. The survival of pathogens in frozen food as a health risk. Archives of Hellenic Medicine, v. 24, n. 5, p. 432 - 439, 2007.
- EDWARDS, D. S.; MILNE, L. M.; MORROW, K.; SHERIDAN, P.; VERLANDER, N. Q.; MULLA, R.; RICHARDSON, J. F.; PENDER, A.; LILLEY, M.; REACHER, M. *Campylobacteriosis* outbreak associated with consumption of undercooked chicken liver pâté in the East of England, September 2011: identification of a dose-response risk. Epidemiology Infection, v. 142, p. 352 – 357, 2014.
- EUCKER TP, KONKEL ME. The cooperative action of bacterial fibronectin binding proteins and secreted proteins promote maximal *Campylobacter jejuni* invasion of host cells by stimulating membrane ruffling. Cellular Microbiology 2012; 14:226–238.

- ELVERSI, K. T., and PARK, S.F. Quorum sensingin *Campylobacter jejuni*: detection of a lux S encoded signaling molecule. *Microbiology* 148, 1475–1481, (2002)..
- FARMER, S.; KEENAN, A.; VIVANCOS, R.. Food-borne *Campylobacter* outbreak in Liverpool associated with cross-contamination from chicken liver parfait: Implications for investigation of similar outbreaks. *Public Health*, v. 126, n. 8, p. 657-659, 2012.
- FAO/WHO- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/WORD HEALTH ORGANIZATION. *Salmonella and Campylobacter in chicken meat: Meeting. Microbiological risk assessment series* n. 19. Rome, Italy, 2009.
- FERNANDÉZ, H.; PISÓN, V. Isolation of thermotolerant species of *Campylobacter* from commercial chicken livers. *International Journal of Food Microbiology*, v. 29, n. 1, p. 75 – 80, 1996.
- FSA (FOOD STANDARDS AGENCY). Advisory committee on the microbiological safety of food: second report on *Campylobacter* advises the food standards agency on the microbiological safety of food. Published by Food Standards Agency March 2005 FSA/0986/0605 p. 185, 2001.
- HARMON, K.M., RAMSOM, G. M., WESLEY, I.V., 1997. Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Probes*. 11,195-200. doi: 10.1006/mcpr.1997.0104
- HANEL, I.; MULLER, J.; MULLER, W.; SCHULZE, E. Correlation between invasion of Caco-2 eukaryotic cells and colonization ability in the chick gut in *Campylobacter jejuni*. *Veterinary Microbiology*, v. 101, n. 2, p. 75 – 82, 2004.
- HIRSH, D. C. Organismos espiralados I: *Campylobacter* – *Aerobacter* – *Lawsonia* (Trato Digestivo). In: HIRSH, D. C.; CHUNG ZEE, Y. *Microbiologia Veterinária*. 2. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2003. p. 83-86.
- HORROCKS, S.M.; ANDERSON, R.C.; NISBET, D.J. Incidence and ecology of *Campylobacter jejuni* and *coli* in animals. *Anaerobe*, v.15, p.18-25, 2009.

- HUMPHREY, T.; O'BRIEN, S.; MADSEN, M. *Campylobacters as zoonotic pathogens: a food production perspective*. International Journal of Food Microbiology, v.117, p. 237 - 257, 2007.
- KEUM-IL, J. Morphology and adhesion of *Campylobacter jejuni* to chicken skin under varying conditions. Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 17, n. 2, p. 202-206, 2007.
- KONKEL, M. E.; KIM, B. J.; RIVERA-AMILL, V., GARVIS, S. G. Bacterial secreted proteins are required for the internalization of *Campylobacter jejuni* into cultured mammalian cells. Molecular Microbiology., v.32, p. 691-701, 1999.
- KRAMER, J. M.; FROST, J. A.; BOLTON, F. J.; WAREING, D. R. A. *Campylobacter* contamination of meat and poultry at retail sale: identification of multiple types and comparasion with isolates from human infections. Journal of Food Protection, [online], Ames, v. 63, n. 12, p. 1654 – 1659, 2000. Disponivel em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11131886>. Acesso em: 28 de out de 2017.
- LI, Y. P.; INGMER, H.; MADSEN, M.; BANG, D. D. Cytokine responses in primary chicken embryo intestinal cells infected with *Campylobacter jejuni* strains of human and chicken origin and the expression of bacterial virulence-associated genes. BMC Microbiology Reading, v.8, n. 107, 2008.
- LINTON, D.; LAWSON, A. J.; OWEN, R. J.; STANLEY, J. PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. Journal of Clinical Microbiology, v. 35, n. 10, p. 2568 – 2572, 1997.
- MALAKAUSKAS, M.; JORGENSEN, K.; NIELSEN, E.M. *et al.* Isolation of *Campylobacter* spp. from a pig slaughterhouse and analysis of cross-contamination. *International Journal Medical Microbiology*. v.108, p.295-300, 2005.
- MARTINEZ, I. ,MATEO, E., CHURRUCA, E., GIRBAU, C., ALONSO, R., FERNANDEZ-ASTORGA, A., 2006. Detection of *cdtA*, *cdtB*, and *cdtC* genes in *Campylobacter jejuni*by multiplex PCR. International Journal Medical Microbiology 296, 45-48. doi: 10.1016/j.ijmm.2005.08.003



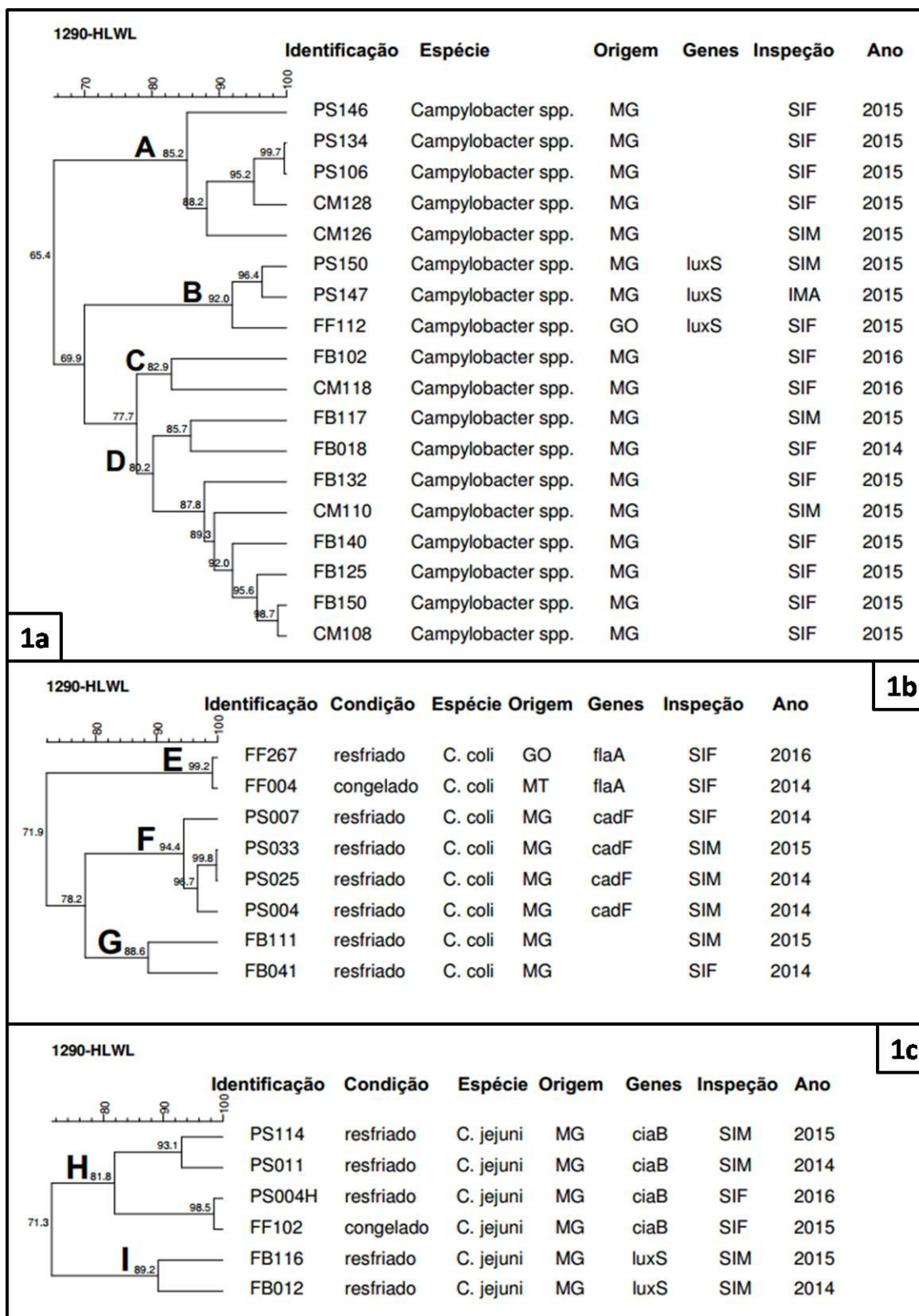
- NOORMOHAMED A.; FAKHR, M. K. A Higher Prevalence Rate of *Campylobacter* in Retail Beef Livers Compared to Other Beef and Pork Meat Cuts. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 10, p. 2058 – 2068, 2013.
- POLY, F., EWING, C., GOON, S., HICKEY, T.E., ROCKABRAND, D., MAJAM, G., LEE, L., PHAN, J., SAVARINO, N.J., GUERRY, P., 2007. Heterogeneity of a *Campylobacter jejuni* protein that is secreted through the flagellar filament. *Infection and Immunity*. 75, 3859–3867. doi: 10.1128/IAI.00159-07
- PICKETT, C.L., WHITEHOUSE, C.A., 1999. The cytolethal distending toxin family. *Trends Microbiology* 7, 292–297. doi: S0966-842X(99)01531-0
- POWELL, L.F.; LAWES, J.R. ; CLIFTON-HADLEY, F.A. The prevalence of *Campylobacter* spp. in broiler flocks and on broiler carcasses, and the risks associated with highly contaminated carcasses. *Epidemiology Infection*, v.16, p.1-14, 2012.
- RIPABELLI, G., TAMBURRO, M., MINELLI, F., LEONE, A., SAMMARCO, M.L., 2010. Prevalence of virulence-associated genes and cytolethal distending toxin production in *Campylobacter* spp. Isolated in Italy. *Comparative immunology, microbiology and Infection diseases*. 33, 355–364. doi: 10.1016/j.cimid.2008.12.001
- RIDLEY, A. M. Genetic instability is associated with changes in the colonization potential of *Campylobacter jejuni* in the avian intestine. *Journal of Applied Microbiology*, v. 105, n. 1, p. 95-104, 2008.
- SILVA, G.O. ,CARVALHO, A.F., MIYASHIRO, S. ,NASSAR A.F.C. ,PIATTI, R.M. ,SCARCELLI, E. Detecção de fatores de virulência em estirpes de *Campylobacter*spp. isoladas de carcaças de suínos abatidos em frigoríficos Arquivo. Brasileiro. Medicina. Veterinária. Zootecnia., v.64, n.5, p.1209-1215, 2012
- SHEPPARD, S.K, MAIDEN, M.C., 2015. The evolution of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Cold Spring Harb Perspect Biology* 7, 8. doi: 10.1101/cshperspect.a018119.
- THAKUR, S., ZHAO, S., MCDERMOTT, P.F., HARBOTTLE, H., ABBOTT, J., ENGLISH, L., GEBREYES, W. A., WHITE, D. G., 2010. Antimicrobial

- resistance, virulence, and genotypic profile comparison of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from humans and retail meats. *Foodborne Pathogens and Disease*. 7, 835-844. doi: 10.1089/fpd.2009.0487.
- THRUSFIELD, M. *Epidemiologia Veterinária*. 2 ed. São Paulo: Rocca, 2004.
- VAN DEUN, K.; HAESEBROUCK, F.; HEYNDRICKX, M. *et al.* Virulence properties of *Campylobacter jejuni* isolates of poultry and human origin. *Journal Medical Microbiology*, v.56, p.1284-1289, 2007.
- VAZ, C. S. L.; VOSS-RECH, D.; POZZA, J. S.; SANTOS, F. B. O.; COLDEBELLA, A.; SILVA, V. S. Dynamics of thermophilic *Campylobacter* colonization in broiler flocks reared on reused litter. *World's Poultry Science Journal*, v. 68, n. 1, 2012.
- WHYTE, R.; HUDSON, J. A.; GRAHAM, C. *Campylobacter* in chicken livers and their destruction by pan frying. *Letters in Applied Microbiology*, v. 43, n. 6, p. 591 – 595, 2006.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION- WHO. Water-related diseases. 2011. Disponível em: [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/diseases/Campylobacteriosis/en](http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/Campylobacteriosis/en) /Acesso em 22 de outubro de 2017.
- WISESSOMBAT, S.; KITTINIYOM, K.; SRIMANOTE, P.; WONGLUMSOM, W.; VORAVUTHIKUNCHAI, S. P. A novel method and simple apparatus for the detection of thermophilic *Campylobacter* spp. in chicken meat products. *Journal of Microbiological Methods*, [online], v. 76, p. 169–173. 2009. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701208003576>. Acesso em: 7 de nov de 2017.
- YAMAZAKI-MATSUNE, W.; TAGUCHI, M.; SETO, K.; KAWAHARA, R.; KAWATSU, K.; KUMEDA, Y.; KITAZATO, M.; NUKINA, M.; MISAWA, N.; TSUKAMOTO, T. Development of a multiplex PCR assay for identification of *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari* and *Campylobacter upsaliensis*. *Journal of Medical Microbiology*, v. 56, p. 1467 – 1473, 2007.

- ZHAO, S.; YOUNG, S. R.; TONG, E.; ABBOTT, J. W.; WOMACK, N.; FRIEDMAN, S. L.; McDERMOTT, P. F. Antimicrobial Resistance of *Campylobacter* Isolates from Retail Meat in the United States between 2002 and 2007. *Applied and Environmental Microbiology*, v.76, n.24, p. 7949–7956, 2010.
- ZHENG, J., MENG, J.H., ZHAO, S.H., SINGH, R., SONG, W.X., 2006. Adherence to and invasion of human intestinal epithelial cells by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from retail meat products. *Journal Food Protection*.69, 768–774.

## LEGENDA DAS FIGURAS

**Figura 1:** Dendrograma comparativo de *Campylobacter* utilizando coeficiente de similaridade de Dice com tolerância de 1% e método UPGMA com otimização de 80%. 1a – Análise em *Campylobacter* spp; 1b – Análise em *C. coli*; 1c – Análise em *C. jejuni*. A-I – *clusters* formados com homologia superior a 80%. CM – patinho bovino moído; FB – fígado bovino; FF – fígado de frango; PS – pernil suíno.



### **CAPÍTULO III**

#### **HOMOLOGIA DE *Campylobacter* ISOLADAS DE CARCAÇAS DE FRANGO COMERCIALIZADAS NO BRASIL**

Artigo a ser publicado no periódico

**Pesquisa Veterinária Brasileira**

## HOMOLOGIA DE *Campylobacter* ISOLADAS DE CARÇAÇAS DE FRANGO COMERCIALIZADAS NO BRASIL

Hélida F. Leão<sup>1</sup>, Roberta T. Melo<sup>a</sup>, Eliane Pereira Mendonça<sup>a</sup>, Guilherme Paz Monteiro<sup>a</sup>, Edson Campos Valadares Júnior<sup>a</sup>, Daise Aparecida Rossi<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Epidemiologia Molecular, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Rua Ceará s/n, Bloco 2D sala 44, Bairro Umuarama, Uberlândia, MG, 38402-018, Brasil.

**Resumo** – Objetivou-se avaliar a similaridade genética de *Campylobacter* isolados de carcaças de frango de marcas comerciais representativas às comercializadas no Brasil por meio de análise filogenética, relacionando os resultados às suas características de virulência, data e local de isolamento e resistência aos antimicrobianos. Foram avaliadas 37 cepas de *Campylobacter* previamente isoladas de carcaças de frango representativas das marcas comercializadas no Brasil, nos mercados interno e exportadas. A identificação da espécie, a presença dos genes *ciaB*, *pldA*, *flaA*, *cadF*, *cdtABC*, *dnaJ*, *luxS* e *sodB* e ainda a produção dos transcritos *ciaB*, *dnaJ*, *p19* e *sodB* foram realizadas por PCR. A resistência antimicrobiana foi avaliada pelo método de disco difusão. A homologia entre as cepas foi determinada por RAPD-PCR. Não foram identificados clones entre as espécies. Para *Campylobacter* spp. não observamos similaridade superior a 80%, indicando a provável presença de mais de uma espécie. Para *C. jejuni* a união das cepas em clusters, mostra a possibilidade de serem de mesma origem. A variabilidade genética leva a pensar em várias fontes de infecção. Para *C. coli* também foram observados alta homologia, estando sete das nove cepas em dois clusters. O estudo mostra a complexidade do gênero *Campylobacter*, e reforça a necessidade de constante acompanhamento das suas características, especialmente as relacionadas à patogenicidade.

**Palavras chave:** Disseminação, Campilobacteriose, Saúde Pública, Genes, Resistência antimicrobiana.

**Abstract** - The objective of this study was to evaluate the genetic similarity of *Campylobacter* isolated from chicken carcasses of commercial brands representative of those commercialized in Brazil through phylogenetic analysis, relating the results to their characteristics of virulence, date and place of isolation and antimicrobial resistance. We evaluated 37 *Campylobacter* isolates previously isolated from chicken carcasses representative of brands sold in Brazil, in domestic and export markets. Identification of the species, presence of the *ciaB*, *pldA*, *flaA*, *cadF*, *cdtABC*, *dnaJ*, *luxS* and *sodB* genes and the production of *ciaB*, *dnaJ*, *p19* and *sodB* transcripts were performed by PCR. The antimicrobial resistance was evaluated by the disc diffusion method. Homology between strains was determined by RAPD-PCR. No clones were identified among the species. For *Campylobacter* spp. we did not observe similarity superior to 80%, indicating the probable presence of more than one species. For *C. jejuni* the union of the strains in clusters, shows the possibility of being of the same origin. Genetic variability leads one to think of several sources of infection. For *C. coli* high homology was also observed, with seven of the nine strains in two clusters. The study shows the complexity of the *Campylobacter* genus, and reinforces the need for constant monitoring of its characteristics, especially those related to pathogenicity.

**Key words:** Dissemination, Campilobacteriosis, Public Health, Genes, Antimicrobial Resistance.

## Introdução

*Campylobacter* spp. é considerado um dos principais agentes causadores de gastroenterite bacteriana aguda de origem alimentar em humanos em países industrializados e desenvolvidos, sendo responsável por 400 a 500 milhões de casos de gastroenterite em todo o mundo (Kaakoush et al., 2015; Abulreesh et al., 2017).

A maioria dos surtos associados a *Campylobacter* surgem como casos esporádicos ligados principalmente ao consumo de carne frango mal cozida. O frango representa o principal reservatório pelo fato de albergar o micro-organismo de forma comensal, e é transmitido via fecal-oral, de maneira que as aves colonizadas mantêm o agente até o abate (Saint-Cyr et al., 2016).

Os elevados níveis de contaminação em amostras de frangos determinados em estudos realizados em diversos países mostraram a necessidade de programas de vigilância para monitorar a presença desse micro-organismo em carne de frangos (Berghaus et al., 2013; Melo et al., 2013; Skarp et al., 2016; Melo et al., 2017).

No Brasil, os dados de prevalência em amostras de frangos e casos de campilobacteriose em humanos são subnotificados. Porém, a posição de destaque do país na produção e exportação de carne de frango, sendo o maior exportador e o segundo maior produtor desde 2015 (ABPA, 2017) aliado aos recentes embargos que impediram temporariamente a exportação aumentaram a preocupação dos compradores.

Diante disso, a União Europeia passou a exigir o monitoramento de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango produzidas no Brasil destinadas àquele continente a partir de 2018, permitindo uma contagem máxima de  $10^3$  UFC/g para o gênero em carcaças de frangos (CE, 2017)

Os registros no Brasil com relação a doença em humanos mostram que não há notificação oficial de surtos/casos desde 2011 nos dados disponibilizados pelo Serviço de Vigilância e Saúde do Ministério da Saúde. Em 2011, os dados oficiais mostravam que de 2000-2011, foram registrados três casos da enfermidade (SVS, MS, 2011), e a partir deste ano, a campilobacteriose não foi mais reportada nos dados oficiais (SVS, MS, 2011) devido à subnotificação e/ou precariedade no diagnóstico.



As espécies de *Campylobacter* responsáveis pela gastroenterite humana são classificadas como termofílicas, sendo *C. jejuni* e *C. coli* consideradas as mais importantes, já que são responsáveis por até 95% dos episódios (Saint-Cyr et al., 2016). Porém, além da espécie, outros fatores interferem na infecção e gravidade da enfermidade, incluindo a relação hospedeiro vs parasita, aparato gênico relacionado à virulência e resistência antimicrobiana.

Devido ao elevado número de casos de campilobacteriose em países desenvolvidos, tornou-se necessária a utilização de métodos moleculares para tipagem epidemiológica pelos órgãos de vigilância de saúde pública na identificação das causas de surtos alimentares e na compreensão dos riscos à saúde pública (Nakari, 2011).

Assim, estudos sobre cepas de *Campylobacter* isoladas de carcaças de frango no Brasil, principalmente de amostras representativas, podem contribuir no entendimento da epidemiologia deste agente. Particularmente, o conhecimento da homologia de perfis gênicos associados a características relacionadas à patogenicidade pode auxiliar nos fatores que contribuem para sua manutenção ou disseminação.

Objetivou-se avaliar a similaridade genética de *Campylobacter* isolados de carcaças de frango de marcas comerciais representativas às comercializadas no Brasil por meio de análise filogenética, relacionando os resultados às suas características de virulência, data e local de isolamento e resistência aos antimicrobianos.

### Material e métodos

**Desenho do estudo.** Foram utilizadas para o estudo, 37 cepas de *Campylobacter* previamente isoladas de carcaças de frango representativas das marcas comercializadas no Brasil, nos mercados interno e exportadores.

Os isolados foram identificados quanto a espécie (*Campylobacter* spp., *C. jejuni* e *C. coli*) e caracterizadas quanto a produção de genes de virulência e de adaptação. O gene *ciaB* possui, importante função na invasão celular; *pldA* importante na invasão celular e ainda codifica um a proteína envolvida na síntese de fosfolipase da membrana externa; o gene *flaA*, codifica a flagelina, importante na motilidade da cepa, *cadF* responsável pela capacidade da

*Campylobacter* aderir à fibronectina, *cdtABC* que codifica toxina com ação citotóxica; *dnaJ* que codifica a proteína do choque térmico, a qual permite o crescimento em temperaturas superiores a 40°C; *luxS* gene mais importante no mecanismo de *quórum-sensing*; e *sodB* auxilia a sobrevivência de *Campylobacter* em situações de alteração de temperatura.

Foram avaliadas ainda a produção de transcritos (*ciaB*, *danJ*, *p19* e *sodB*) e resistência aos antimicrobianos: amoxicilina e ácido clavulânico (10µg), azitromicina (15µg), ciprofloxacina (5µg), eritromicina (15µg), gentamicina (10µg) e tetraciclina (30µg) (Oxoid). A identificação e caracterização das cepas foram realizadas nos anos de 2014 e 2015 por IASBECK (2016) e FRANCO (2016)

A análise de prevalência partiu de uma amostragem de 246 carcaças de frangos que foram processadas conforme método ISO10272-1:2006 (ISO, 2006). A identificação das espécies *C. jejuni* e *C. coli* e do gênero *Campylobacter* spp. foi realizada por PCR, conforme Harmon et al. (1997) e Linton et al. (1997), respectivamente.

A avaliação da presença e transcrição dos genes foi realizada conforme protocolo descrito por Zheng et al. (2006) e Li et al. (2008), respectivamente. E o teste de susceptibilidade antimicrobiana foi realizado conforme CLSI (2010).

**Reativação das cepas e extração do DNA.** As 37 cepas utilizadas no estudo estavam depositadas no Banco de cepas do Laboratório de Epidemiologia Molecular da Universidade Federal de Uberlândia, mantidas sob congelamento a -80°C em crioprotetor.

As cepas foram reativadas em caldo Bolton (Oxoid®) suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrilado (Laborclin), que foi incubado em atmosfera de microaerofilia (Probac do Brasil®) a 37°C por 44 horas ± 4 horas. Após, uma alíquota de 300µL foi semeada na superfície do ágar *Campylobacter Blood-Free Selective Medium* (Modified CCDA- Preston) (Oxoid®) e novamente incubado a 37°C por 44 horas ± 4 horas em condições de microaerofilia (Probac do Brasil®).

A extração do DNA das colônias foi realizada utilizando o kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification (Promega), conforme recomendações do fabricante. A quantificação do DNA foi realizada em equipamento Nanodrop®.

**Random Amplification of Polymorphic DNA - RAPD-PCR.** A diversidade genética entre os isolados foi determinada pela técnica de RAPD-PCR (*Random Amplification of Polymorphic DNA*), conforme o protocolo descrito por Akopyanz et al. (1992), utilizando os *primers* HLWL85 (5'ACGTATCTGC3') e 1290 (5'GTGGATGCGA3').

O volume final para a reação de amplificação foi de 20µL, composto por 10ng do DNA bacteriano e pelos reagentes: tampão 1x; 10mM de Tris-HCL; 50mM de KCl; 2,0mM de MgCl<sub>2</sub> e 1U Taq DNA polimerase; 200µM de cada deoxinucleotídeotrifosfatado (DNTP) e 30 picomols do *primer* (Invitrogen®). Os protocolos de amplificação e eletroforese seguiram as recomendações de Akopyanz et al. (1992) e Mazurier et al. (1992).

A amplificação obedeceu aos ciclos: 1 ciclo inicial a 92°C por 2 minutos; 35 ciclos das 3 etapas: desnaturação a 92°C por 15 segundos, anelamento a 36°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto; e 1 ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos.

A separação dos produtos amplificados (8µL) foi feita por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Affymetrix®), utilizando o tampão de corrida TBE 0,5x (Invitrogen®) e como padrão de peso molecular o marcador de 100pb (Invitrogen®).

**Análise dos resultados.** Os resultados foram avaliados usando o programa GelCompar II (*Comparative Analysis of Electrophoresis Patterns*), version 1.50, Applied Maths Korthrijk, Belgium. A matriz de similaridade foi obtida por comparação entre pares de cepas usando o coeficiente de similaridade de Dice, com 1% de tolerância para cada *primer* separadamente. Para a construção do dendrograma foi utilizada a média de experimentos (*average from experiments*) obtida pelos dois *primers* pelo método UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic mean*).

## Resultados e Discussão

A análise de similaridade genética foi realizada separadamente para cada espécie, conforme demonstrado na Figura 1. Foram discriminados três dendrogramas, sendo um para *Campylobacter* spp. (Figura 1a), um para *C. jejuni* (Figura 1b) e um para *C. coli* (Figura 1c).

A análise dos dendrogramas demonstrou que para todas as espécies não foram detectados clones com 100% de homologia. Porém, a identificação de clusters com similaridade superior a 85% foram considerados como pertencentes a um mesmo genótipo.

Para cada espécie foi identificado os genótipos distintos e os *clusters*, sendo que estes foram comparados considerando o local de isolamento, a data da coleta, as características fenotípicas relacionadas à resistência antimicrobiana e genotípicas, relacionadas aos genes de virulência e adaptação.

Para *Campylobacter* spp. (Figura 1a), não foram identificados *clusters* compostos por cepas com similaridade superior a 85%. É provável que essa diversidade esteja relacionada à existência de mais de uma espécie compondo o grupo devido às grandes diferenças no material genético. A atual emergência das espécies *C. lari* e *C. upsaliensis*, demonstrado em trabalhos anteriores (Osimani et al., 2017; Schets et al., 2017) podem justificar o perfil diversificado identificado nesse grupo.

Apesar da diversidade genética relacionada à provável existência de diferentes espécies, o grupo, composto por oito estirpes de *Campylobacter* spp., alberga cepas oriundas, em sua maioria, de amostras congeladas, provenientes do estado de Minas Gerais no ano de 2015, sob sistema de inspeção federal, com resistência comum aos antimicrobianos ciprofloxacina e tetraciclina, e presença dos genes *cadF*, *ciaB* e *pldA*.

Foram identificados três *clusters* em *C. jejuni* correspondentes aos perfis de A, B e C com similaridade filogenética superior a 85%, conforme consta na Figura 1b. Também foram detectados oito genótipos distintos nesse grupo. Esse grupo contempla um total de 23 cepas e o fato de a maioria delas (15/23 – 65,2%) estar reunida em *clusters*, mostra a possibilidade de uma origem comum entre elas.

Para o *cluster* A foram agrupadas duas cepas com similaridade de 90,1%, provenientes de Minas Gerais, de amostras congeladas, que apresentaram em comum os genes *ciaB*, *cadF* e *pldA* e resistência a gentamicina e eritromicina, isoladas de amostras produzidas nos meses de agosto e setembro de 2015. A elevada proximidade genética pode estar relacionada à persistência da cepa no ambiente, pela formação de biofilmes, estruturas que garantem a sobrevivência do agente por longos períodos dentro do estabelecimento (Rossi et al., 2017).

Foram discriminadas oito cepas no *cluster* B, com 85,9% de homologia, de diferentes origens (MG, MT e GO), de amostras resfriadas e congeladas produzidas nos anos de 2014 e 2015, sob diferentes sistemas de inspeção e distintos perfis de virulência e resistência antimicrobiana. A presença de cepas próximas filogeneticamente em regiões distintas evidencia a capacidade de disseminação dessa espécie e as divergências relacionadas às características fenotípicas e genotípicas são provavelmente devido às adaptações às diferentes condições, além de aquisição de genes plasmidiais, que podem conferir características distintas.

A variação genotípica pode ser devido à exposição a mais de uma fonte de infecção durante o processo produtivo de frangos ou a alterações genéticas na população bacteriana após a colonização (Lee et al., 2017). Além disso, *Campylobacter* spp. tem uma capacidade natural de realizar transformação e de sofrer rearranjos genômicos que também podem explicar este aumento na diversidade genética (Kruger et al., 2016).

As cinco cepas de *C. jejuni* que compõem o grupo C apresentam em comum o fato de serem provenientes de amostras de carcaças de frangos congeladas, a presença dos genes *flaA*, *ciaB*, *cdt*, *cadF*, *pldA* e a resistência à ciprofloxacina. Esse último surge como característica relevante também para saúde pública, uma vez que esse antibiótico é recomendado para tratamento da campilobacteriose humana (Masaar et al., 2018).

Assim como o observado para *C. jejuni*, *C. coli* também apresentou elevada homologia entre as cepas, uma vez que 77,8% (7/9) das cepas foram agrupadas em dois *clusters* (C e D) (Figura 1c).

Para o *cluster* C foram agrupadas três cepas de diferentes regiões, que

apresentaram em comum a presença dos genes *flaA*, *pldA* e *cadF* e a resistência à ciprofloxacina. Já o *cluster* D, contemplou quatro cepas que apresentaram o gene *cadF* em comum. As divergências relacionadas às demais características identificadas provavelmente se devem a adaptações sofridas/adquiridas pelo micro-organismo às regiões onde foram isolados.

### Conclusão

A análise filogenética comprovou grande diversidade genotípica em *Campylobacter* spp., provavelmente pela existência de diferentes espécies presentes nesse grupo. Já em *C. jejuni* e *C. coli* observou-se elevada proximidade genética o que indica uma origem comum, que, devido às adaptações adquiridas nas diferentes regiões de isolamento, gerou diferenças relacionadas às características avaliadas.

O estudo mostra a complexidade observada no gênero *Campylobacter*, e reforça a necessidade de constante acompanhamento das variações em suas características.

### Referências Bibliográficas

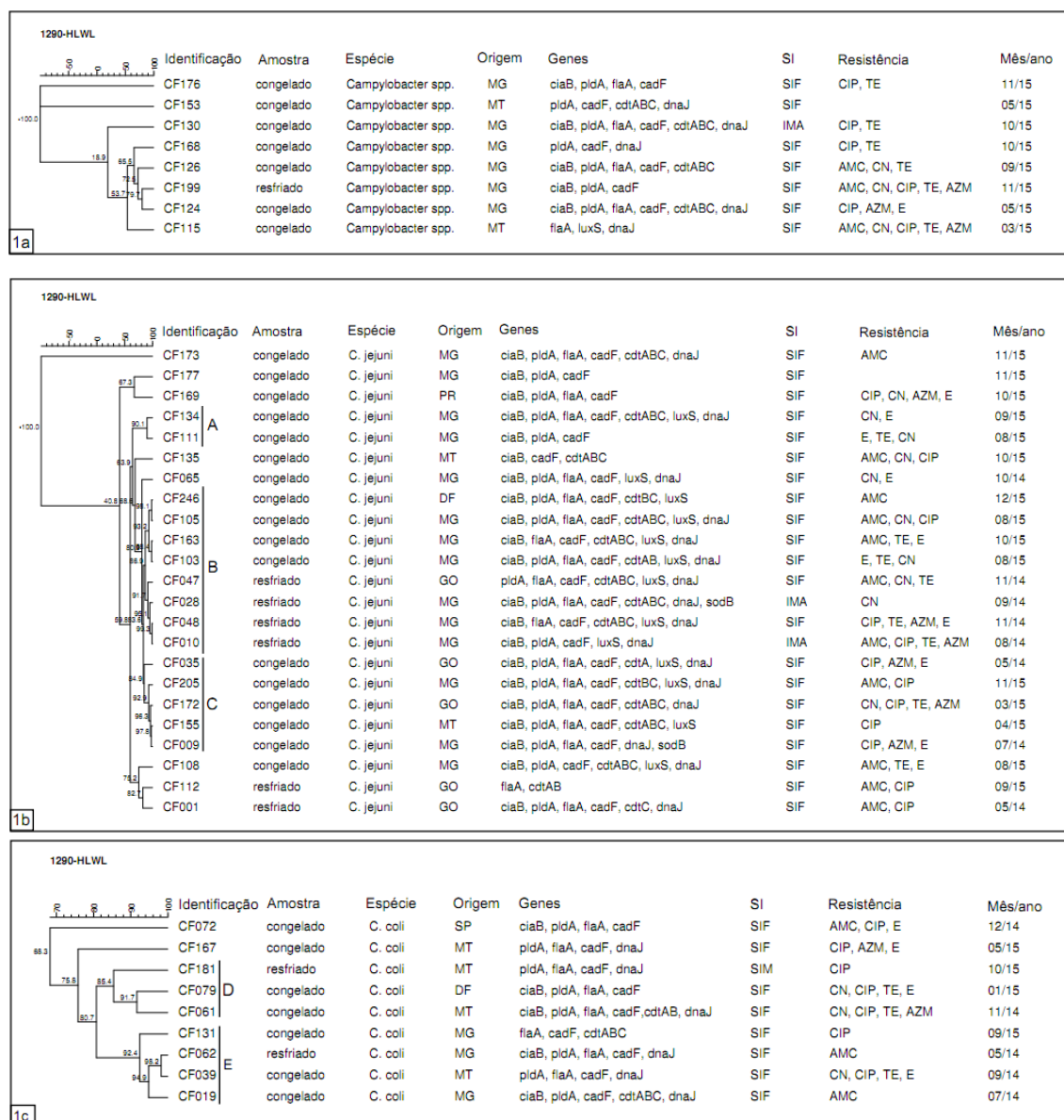
- ABPA – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. Relatório anual 2016. Disponível em: [http://abpa-br.com.br/storage/files/versao\\_final\\_para\\_envio\\_digital\\_1925a\\_final\\_abpa\\_relatorio\\_anual\\_2016\\_portugues\\_web1.pdf](http://abpa-br.com.br/storage/files/versao_final_para_envio_digital_1925a_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web1.pdf). Acesso em: 05/03/2018
- ABULREESH H. H., ORGANJI S. R., ELBANNA K., OSMAN G. E. H., ALMALKI M. H. K., AHMAD I. *Campylobacter* in the environment: A major threat to public health. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 2017; 7: 374–384.
- AKOPYANZ, N.; BUKANOV, N. O.; WESTBLOM, T. U.; KRESOVICH, S.; BERG, D. E. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v. 20, n. 19, p. 5137-5142, 1992.
- BERGHAUS R. D., THAYER S. G., LAW B. F., MILD R. M., HOFACRE C. L., SINGER R. S. Enumeration of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in environmental farm samples and processing plant carcass rinses from

- commercial broiler chicken flocks. *Applied Environmental Microbiology*; 2013;79:4106–4114.
- COMUNIDADE EUROPEIA. EU. REGULAMENTO (UE) 2017/1495 DA COMISSÃO de 23 de agosto de 2017 que altera o Regulamento (CE) n.º 2073/2005 no que diz respeito à *Campylobacter* em carcaças de frangos de carne. *Jornal Oficial da União Europeia*.
- HARMON, K. M.; RAMSOM, G. M.; WESLEY, I. V. Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes*, London, v. 11, n. 3, p. 195-200, 1997.
- KÜGER, NORA-JOHAMNNA; KNÜVER, MARIE-THERES; ZAWILAK-PAWLIK, ANNA; APPEL, BERND; STINGL, KERSTIN. Genetic Diversity as Consequence of a Microaerobic and Neutrophilic Lifestyle. *PLoS Pathogenes*; 12(5): e1005626, 2016 May.
- KAAKOUSH N. O., CASTANO-ROFRIGUEZ N., MITCHELL H. M., MAN S. M. Global epidemiology of *Campylobacter* infection. *Clinical Microbiology Revista* 2015;28:687–720.
- LEE, JEEYEON; JEONG, JIYEON; LEE, HEEYOUNG; HA, IMYEONG; KIM, SEJEONG; CHOI, YUKYUNG; OH, HYEMIN; SEO, KUNHO; YOON, YOHAN; LEE, SOOMIN. Antibiotic Susceptibility, Genetic Diversity, and the Presence of Toxin Producing Genes in *Campylobacter* Isolates from Poultry. *International Journal Environmental Research Public and Health*; 14(11)2017 Nov 17.
- LI, Y. P.; INGMER, H.; MADSEN, M.; BANG, D. D. Cytokine responses in primary chicken embryo intestinal cells infected with *Campylobacter jejuni* strains of human and chicken origin and the expression of bacterial virulence-associated genes. **BMC Microbiology**, Reading, v. 8, n. 107, 2008.
- LINTON,D; LAWON, A.J; OWEN, R.J; STANLEY,J. PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. *Journal of Clinical Microbiology* v. 35, 1997.

- MÄSAAR, MIHKEL; MEREMÄE, KADRIN; IVANOVA, MARINA; ROASTO, MATI. Antimicrobial resistance and multilocus sequence types of *Campylobacter jejuni* isolated from Baltic broiler chicken meat and Estonian human patients. *Poultry Science*; 2018 May 30.
- MAZURIER, S.; VAN DER GIESSEN, A.; HEUVELMAN, K.; WERNARS, K. RAPD analysis of *Campylobacter* isolates: DNA fingerprinting without the need to purify DNA. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, v. 14, n. 6, p. 260-262, 1992.
- MELO, R. T., NALEVAIKO, P. C., MENDONÇA, E. P., BORGES, L. W., FONSECA, B. B., BELETTI, M. E., ROSSI, D. A. *Campylobacter jejuni* strains isolated from chicken meat harbour several virulence factors and represent a potential risk to humans. *Food Control*, v. 33, p. 227 – 231, 2013.
- MELO, R. T.; MENDONÇA, E. P.; MONTEIRO, G. P.; SIQUEIRA, C. M.; PEREIRA, C.B.; PERES, P. A. B.M.; FERNANDEZ, H.; ROSSI, D. A. Intrinsic and Extrinsic Aspects on *Campylobacter jejuni* Biofilms. [Front Microbiol](#)oly. V. 8, article 1332. July 2017.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Uma Análise da Situação de Saúde e a Vigilância da Saúde da Mulher. Saúde Brasil 2011. Brasília, 2011.
- NAKARI, U. M. Identification and epidemiological typing of *Campylobacter* strains isolated from patients in Finland. Helsinki, Finland: National Institute for Health and Welfare (THL). 126 pages. 2011. ISBN 978-952-245-465-2 (printed); ISBN 978-952-245-466-9 (pdf)
- OSIMANI, ANDREA; AQUILANTI, LUCIA; PASQUINI, MARINA; CLEMENTI, FRANCESCA. Prevalence and risk factors for thermotolerant species of *Campylobacter* in poultry meat at retail in Europe. *Poultry Science*; 96(9): 3382-3391, 2017 Sep 01.
- [ROSSI, D. A.](#) ; MELO, R. T.; MENDONÇA, E. P.; MONTEIRO, G. P. . Biofilms of Salmonella and Campylobacter in the poultry industry. *Poultry Science*. 1ed.: , 2017, v. , p. 1-22.
- SCHETS, FRANCISKA M.; JACOBS-REITSMA, WILMA F.; VAN DER PLAATS, ROZEMARIJIN Q. J.; HEER, LIANNE KERKHOF-DE; VAN HOEK, ANGELA H. A. M.; HAMIDJAJA, RADITIJO A.; DE RODA



- HUSMAN, ANA MARIA; BLAAK, HETTY. Prevalence and types of *Campylobacter* on poultry farms and in their direct environment. *Journal Water and Health*; 15(6): 849-862, 2017 Oct.
- SAINT-CYR M. J.; GUYARD-NICODEME M.; MESSAOUDI S.; CHEMALY M., CAPPELIER M. J.; DOUSSET X.; HADDAD N. Recent advances in screening of anti *Campylobacter* activity in probiotic for use in poultry. *Front Microbiology* 2016;7:Article 553.
- SKARP C. P. A.; HAˆNNINEN M. L.; RAUTELIN H. I. K. *Campylobacteriosis*: The role of poultry meat. *Clinical Microbiology Infection*. 2016;22:103–109.
- ZHENG, J.; MENG, J. H.; ZHAO, S. H.; SINGH, R.; SONG, W. X. Adherence to and invasion of human intestinal epithelial cells by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from retail meat products. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 69, n. 4, p. 768–774, 2006.



**Figura 1:** Dendrograma dos 37 isolados de *Campylobacter* spp. oriundos de carcaças de frangos resfriados e congelados, pela técnica de RAPD-PCR com os *primers* 1290 e HLWL, utilizando a média de experimentos (*average from experiments*) e método UPGMA com otimização de 85%, pelo programa GelCompar. 1a – Resultados encontrados para *Campylobacter* spp. 1b – Resultados encontrados para *C. jejuni*: A – *cluster* com homologia de 90,1%; B – *cluster* com homologia de 85,9%; C – *cluster* com homologia de 85%. 1c – Resultados encontrados para *C. coli*: D – *cluster* com homologia de 91,7%; E – *cluster* com homologia de 92,4%. SP (São Paulo), MT (Mato Grosso), MG (Minas Gerais), SI (Serviço de Inspeção), SIF (Serviço de Inspeção Federal), SIM (Serviço de Inspeção Municipal), IMA (Instituto Mineiro Agropecuário), AMC (amoxicilina com clavulanato), CIP (ciprofloxacina), E (eritromicina), AZM (azitromicina), CN (gentamicina), TE (tetraciclina).

## Referências Bibliográficas

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

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156938>

PMid:27258021 PMCID:PMC4892673

ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal 2015) Relatório anual ABPA 2017. São Paulo,. 248 p. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/files/publicacoes/c59411a243d6dab1da8e605be58348ac.pdf>>. Acesso em: 15 maio 2018.

ACHESON, D.; ALLOS, B. M. *Campylobacter jejuni* Infections: Update on Emerging Issues and Trends. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 8, p. 1201-1206, 2001. <https://doi.org/10.1086/319760>

PMid:11283810

AILES, E.; SCALLAN, E.; BERKELMAN, R. L.; KLEINBAUM, D. G.; TAUXE, R. V.; MOE, C. L. Do Differences in Risk Factors, Medical Care Seeking, or Medical Practices Explains the Geographical Variations in Campylobacteriosis in Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet) Sites? **CID**, v. 54, n. 5, p. S464-S471, 2012. <https://doi.org/10.1093/cid/cis050>

PMid:22572671

ALLOS, B. M.; BLASER, M. J. *Campylobacter jejuni* and the Expanding Spectrum of Related Infections. **Clinical Infectious Disease**, v. 20, n. 5, p. 1092-1099, 1995. <https://doi.org/10.1093/clinids/20.5.1092>

PMid:7619982

BANDARA, H. M. H. N.; LAM, O. L. T.; JIN, L. J.; SAMARANAYAKE, L. Microbial chemical signaling: a current perspective. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 217 – 249, 2012.

<https://doi.org/10.3109/1040841X.2011.652065>

PMid:22300377

BANG, D.D., NIELSEN, E.M., SCHEUTZ, F., PEDERSEN, K., HANDBERG, K. e MADSEN, M. PCR detection of seven virulence and toxin genes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from Danish pigs and cattle and cytolethal distending toxin production of the isolates. **Journal Of Applied Microbiology**. 94, 1003-1014. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01926.x>

PMid:12752808

BIGGS, P. J.; FEARNHEAD, P.; HOTTER, G.; MOHAN, V.; EMERSON, J. C.; KWAN, E.; BESSER, T. E.; COOKSON, A.; CARTER, P. E.; FRENCH, N. P. Whole-Genome Comparison of Two *Campylobacter jejuni* Isolates of the Same Sequence Type Reveals Multiple Loci of Different Ancestral Lineage. **PLoS One**, v. 6, n. 11, e27121, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027121>

PMid:22096527 PMCID:PMC3214069

BHAVSAR, S.; KAPADNIS, B. Virulence factors of *Campylobacter*. **The Internet Journal of Microbiology**, [online] v. 3, n. 2, 2007. Disponível em: [http://www.ispub.com/journal/the\\_internet\\_journal\\_of\\_microbiology/volume\\_3\\_number\\_2\\_27/article/virulence\\_factors\\_of\\_Campylobacter.html](http://www.ispub.com/journal/the_internet_journal_of_microbiology/volume_3_number_2_27/article/virulence_factors_of_Campylobacter.html). Acesso em: 22 ago 2017.

BOLTON, D. J. *Campylobacter* virulence and survival factors. **Food Microbiology**, v. 48, p. 99–108, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.017> PMID:25790997

BOUWKNEGT, M.; GIESSEN, A. W.; DAM-DEISZ, W. D. C.; HAVELAAR, A. H.; NAGELKERKE, N. J. D.; HENKEN, A. M. Risk Factors for the presence of *Campylobacter* spp. In Dutch broiler flocks. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 62, n. 1, p. 35-49, 2004.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas. Síndrome de Guillain-Barré**. Portaria SAS/MS nº 497, de 23 de dezembro de 2009.

BUTZLER, J. P. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, [online] v. 10, p. 868-876, 2004.

CAMPOS, F.R. *Isolamento e caracterização de Campylobacter spp. em amostras de fezes e carcaças de suínos provenientes de abatedouros do Estado de São Paulo*. 2007. 47f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Center for Disease Control and Prevention - CDC. National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Foodborne, Waterborne, and Environmental Diseases (DFWED) –*Campylobacter*. 2013. Disponível em: <http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/Campylobacter/technical.html> Acesso em: 02 abr. 2018.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. **Foodborne Illness A-Z: Campylobacter**. 2017. Disponível em: <https://www.cdc.gov/Campylobacter/faq.html>>. Acesso em 30 de abril de 2017.

CHUMA, T.; HASHIMOTO, S.; OKAMOTO, K. Detection of Thermophilic *Campylobacter* from Sparrows by Multiplex PCR: The Role of Sparrows AS A Source of Contamination of Broilers with *Campylobacter*. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 62, n. 12, p. 1291-1295, 2000.

COKER, A. O.; ISOKPEHI, R. D.; THOMAS, B. N.; AMISU, K. O.; OBI, C. L. Human *Campylobacteriosis* in developing countries. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, n.1, p. 237-244, 2012.

CRÓININ, T. Ó., STEFFEN, B., 2012. Host epithelial cell invasion by *Campylobacter jejuni*: trigger or zipper mechanism?. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2, 1-13.

DUIM, B.; WIN, A. C.; VAN BELLKUM, A.; RIGTER, A.; VAN LEEUWEN, N. W. J.; ENDTZ, H. P.; WAGENAAR, J. A. Amplified fragment length polymorphism analysis of *Campylobacter jejuni* strains isolated from chickens and patients with gastroenteritis or Guillian- Barré or Miller Fisher syndrome. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 3, p. 3917- 3923, 2000.

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

European Food Safety Authority (EFSA) (2014) The European Union Summary Report 392 on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. 393 **The EFSA Journal**. Italy, 35-47.

EFSA, European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. 2017. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy, European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), Stockholm, Sweden. **EFSA Journal** 15:5077.

FAUCHÉRE, J. L.; VÉRON, M.; TUBIANA, A. L.; PFISTER, A. Experimental infection of gnotobiotic mice with *Campylobacter jejuni*: colonization of intestine and spread to lymphoid and reticulo-endothelial organs. **Journal of Medical Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 215-224, 1985.

FERNANDES, M.; MENA, C.; SILVA, J.; TEIXEIRA, P. Study of Cytotelial Distending Toxin (cdt) in *Campylobacter coli* using a Multiplex Polymerase Chain Reaction assay and its distribution among clinical and food Strains. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.7, n.1, p. 103 – 106, 2010.

FRANCO, D. A. *Campylobacter* Species: Considerations For Controlling A Foodborne Pathogen. **Journal of Food Protection**, v. 51, n. 2, p. 145-153, 1988.

FRIIS, C.; WASSENAAR, T. M.; JAVED, M. A.; SNIPEN, L.; LAGESEN, K.; HALLIN, P. F.; NEWELL, D. G.; TOSZEGHY, M.; RIDLEY, A.; MANNING, G.; USSERY, D. W. Genomic Characterization of *Campylobacter jejuni* Strain M1. **PLoS One**, v. 5, n. 8, e12253, 2010.

GABRIEL, M.R.; MELO, R.T.; ROSSI, D.A. *et al.* *Campylobacter* spp. em linfonodos mesentéricos de suínos abatidos. **PUBVET**, Londrina, v.4, n.19, Ed. 124, Art. 840, 2010.

GARÉNAUX, A.; JUGIAU, F.; ROMA, F.; JONGE, R.; DENIS, M.; FEDERIGHI, M.; RITZ, M. Survival of *Campylobacter jejuni* Strains from Different Origins Under Oxidative Stress Conditions: Effect of Temperature. **Current Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 293-297, 2008.

Ge, Z; Schauer, D; Fox, J. 2008. **In vivo virulence properties of bacterial cytolethal- distending toxin**. Cellular Microbiology 10, (8): 1599-1607.

GIUGNO, S.; ODERIZ, S. Etiología bacteriana de la diarrea aguda em pacientes pediátricos. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, v. 44, n. 1, p. 63-69, 2010.

GRAS, L. M.; SMID, J. H.; WAGENAAR, J. A.; KOENE, M. G. J.; HAVELAAR, A. H.; FRIESEMA, I. H. M.; FRENCH, N. P.; FLEMMING, C.; GALSON, J. D.; GRAZIANI, C.; BUSANI, S.; VAN PELT, W. Increased risk for *Campylobacter jejuni* and *C. coli* infection of pet origin in dog owners and evidence for genetic association between strains causing infection in humans and their pets. **Epidemiology & Infection**, v. 141, n. 1, p. 2526-2535, 2013.

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

GUERRY, P. *Campylobacter* flagella: not just for motility. **Trends in Microbiology**, v. 15, n. 10, p. 456-461, 2007.

GUERRY, P.; SZYMANSKI, C.M. (2008). *Campylobacter* sugars sticking out. Trends in Microbiology. p. 428-435.

GUNTHER, N.; CHEN, C. The biofilm forming potencial of bacterial species in the genus *Campylobacter*. **Food Microbiology**, v. 26, n. 1, p. 44-51, 2009.

HAVELAAR, A. H.; IVARSSON, S.; LOFDAHL, M.; NAUTA, M. J. Estimating the true incidence of Campylobacteriosis and salmonellosis in the European Union, 2009. **Epidemiology & Infection**, v. 141, n. 1, p. 293-302, 2012.

HOLMES, K.; MULHOLLAND, F.; PEARSON, B. M.; PIN, C.; KENNEDY, J. M.; KETLEY, J. M.; WELLS, J. M. *Campylobacter jejuni* gene expression in response to iron limitation and de role of Fur. **Microbiology**, v. 151, n. 1, p. 243-257, 2005.

HOLMES, K.,TAVENDER, T. J.,WINZER, K., WELLS, J. M.,and HARDIE, K. R. (2009). Al-2 doesnotfunction asaquorumsensingmolecule in *Campylobacterjejuni* during exponentialgrowth *in vitro*.**BMC Microbiology**. 9, 214.

HORROCKS, S. M.; ANDERSON, R. C.; NISBET, D. J.; RICKE, S. C. Incidence and ecology of *Campylobacter jejuni* and *coli* in animals. **Anaerobe Food Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 15-25, 2008.

HUNTER, S. M.; BERRANG, E.; MEINERSMANN, R. J.; HARRISON, M. A. Genetic Diversity of *Campylobacter* on Broiler Carcasses Collected Preevisceration and Postchill in 17 U.S. Poultry Processing Plants. **Journal of Food Protection**, v.72, n. 1, p. 49-54, 2009.

JANSSEN R.;KROGFELT K.;CAWTHRAW S.; VAN PELT W.; WAGENAAR J.; OWEN R. 2008. Host-pathogen interactions in *Campylobacter* infections: the host perspective. **Clinical Microbiology Review**. 21(3):505-18.

JORGENSEN, F.; ELLIS-IVERSEN, J.; RUSHTON, S.; BULL, S. A.; HARRIS, S. A.; BRYAN, S. J.; GONZALEZ, A.; HUMPHREY, T. J. Influence of Season and Geography on *Campylobacter jejuni* and *C.coli* Subtypes in Housed Broiler Flocks Reared in Great Britain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 11, p. 3741-3748, 2011.

KAAKOPUSH N. O., CASTAÑO-RODRIGUEZ N., MITCHELL H. M., MAN S. M. Global epidemiology of *Campylobacter* infection. **Clinical Microbiology revista** 2015; 28:687-720.

KARMALI, M. A.; FLEMING, P. C.. *Campylobacter* enteritis. **Canadian Medical Association Journal**, v. 120, p. 1525-1532, 1979.

KEUM-IL, J.; KIM, M. G.; HA, S. D.; KIM, K. S.; LEE, K. H.; CHUNG, D. C. H.; KIM, C. H.; KIM, K. Y. Morphology and Adhesion of *Campylobacter jejuni* to Chicken Skin Under Varying Conditions. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 202-206, 2007.

KING, V.; WASSENAAR, T.; VAN DER ZEIJST, B. A. M.; NEWELL, D. G. Variations in *Campylobacter jejuni* Flagellin, and Flagellin Genes, During In Vivo and In Vitro Passage. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 4, n. 3, p. 135-140, 1991.

KOOBATIAN, T. J.; BIRKHEAD, G. S.; SCHRAMM, M. M.; VOGT, R. L. The use of hospital discharge data for public health surveillance of Guillain-Barré syndrome. **Annals of Neurology**, v. 30, n. 4, p. 618-621, 1991.

KOVANEN, S., R. KIVISTO, A.-K. LLARENA, J. ZHANG, U.-M. K<sup>o</sup>ArRKK<sup>o</sup>AINEN, T. TUUMINEN, J. UKSILA, M. HAKKINEN, and M.-L. HANNINEN. 2016. Tracing isolates from domestic human *Campylobacter jejuni* infections to chicken slaughter batches and swimming water using whole-genome multilocus sequence typing. **International Journal Food Microbiology** 226:53–60.

LAURENTI, E. Impacto das anomalias suínas na indústria. **Revista Nacional da Carne**. São Paulo, ano 33, n. 384, p. 20-32, 2009.

LEE, M. D.; NEWELL, D. G. *Campylobacter* in Poultry: Filling and Ecological Niche. **Bio One**, v. 50, n. 1, p. 1-9, 2006.

LEVIN, R. E. *Campylobacter jejuni*: A Review of its Characteristics, Pathogenicity, Ecology, Distribution, Subspecies, Characterization and Molecular Methods of Detection. **Food Biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 271-347, 2007.

LPSN – **List of Prokaryotic Names with standing in nomenclature**, 2015. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/Campylobacter.html>> Acesso em: 12 MAI. 2018.

MAN, S. M. The clinical importance of emerging *Campylobacter* species. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 8, n. 1, p. 152-168, 2011.

MATSUBARA, E.N. **Condição higiênico – sanitária de meias carcaças de suínos após o abate e depois do resfriamento e análise de utilização de Lista de Verificação para avaliar boas práticas no abate de suínos**. 152p. Dissertação (Mestrado) Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia, São Paulo, 2005.

MELO, R.T. (2012). Fatores de patogenicidade e potencial de risco à saúde em *Campylobacter* spp, isolados de carcaças de frangos. Universidade Federal de Uberlândia. Dissertação de mestrado.

MISHU, B.; ILYAS, A. A.; KOSKI, C. L.; VRIESENDORP, F.; COOK, S. D.; MITHEN, F. A.; BLASER, M. J. Serologic Evidence of Previous *Campylobacter jejuni* Infection in Patients with the Guillain-Barré Syndrome. **Annals of Internal Medicine**, v.118, n. 1, p. 947-953, 1993.

MONTEVILLE, M. R.; YOON, J. E.; KONKEL, M. E. Maximal adherence and invasion of INT 407 cells by *Campylobacter jejuni* requires the CadF outer membrane protein and microfilament reorganization. **Microbiology**. v. 149, p. 153 – 165, 2003.

MOORE J. E., BARTON M. D., BLAIR I. D. (2006) The epidemiology of antibiotic resistance in *Campylobacter*. **Microbes Infection** 8:1955–1966.

MURRAY, P.R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J.H.; LANDRY M. L.; PFALLER, M. A. **Manual of Clinical Microbiology**, 9 ed, Washington, 2007.

NACHAMKIN, I. Microbiologic Approaches for Studying *Campylobacter* Species in Patients with Guillain-Barré Syndrome. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 176, n. 2, p. 106-114, 1997.

NACHAMKIN, I.; ALLOS, B. M.; HO, T. *Campylobacter* Species and Guillain-Barré Syndrome. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 555-567, 1998.

NESBAKKEN, T.; ECKNER, K.; HOIDAL, H.K. *et al.* Occurrence of *Yersinia enterocolitica* and *Campylobacter* spp. in slaughter pigs and consequences for



meat inspection slaughtering, and dressing procedures. **International Journal Food Microbiology**, v.80, p.231-240, 2003.

NEWELL, D. G. The ecology of *Campylobacter jejuni* in avian and human hosts and in the environment. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 6, n. 3, p. S16-S21, 2002.

ON, S. L. W. Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter*, and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n. 1, p. 1S-15S, 2001.

PARK, S. F. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, n. 1, p. 177-188, 2002.

PARKHILL, J.; WREN, W. B.; MUNGALL, K.; KETLEY, J. M.; CHURCHER, C.; BASHAM, D.; CHILLINGWORTH, T.; DAVIES, R. M.; FELTWELL, T.; HOLROYD, S.; JAGELS, K.; KARLYSHEV, A. V.; MOULE, S.; PALLAN, M. J.; PATRICK, M. E.; MAHON, B. E.; ZANSKY, S. M.; HURD, S.; SCALLAN, E. Riding in Shop Carts and Exposure to Raw Meat and Poultry Products: Prevalence of, and Factors Associated with, This Risk Factor for *Salmonella* and *Campylobacter* Infection in Children Younger Than 3 Years. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 6, p. 1097-1100, 2010.

PRACHANTASENA, S. Distribution and genetic profiles of *Campylobacter* in commercial broiler production from breeder to slaughter in Thailand. **PLoS One**, v. 11, n. 2, p. 1–16, 2016

REES, J. H.; SOUDAIN, S. E.; GREGSON N. A.; HUGHES, R. A. C. *Campylobacter jejuni* infection and Guillain- Barré syndrome. **The New England Journal of Medicine**, England, [online], v. 333, p. 1374-1379, 1995. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM199511233332102>. Acesso em: 9 setembro de 2017.

RIVERA-AMILL, V.; KIM, B. J.; SESHU, J.; KONKEL, M. E. Secretion of the virulence associated *Campylobacter* invasion antigens from *Campylobacter jejuni* requires a stimulatory signal. **Journal of Infectious Diseases**, v. 183, n. 11, p. 1607 – 1616, 2001.

ROSSI, D. A. ; MELO, R. T.; MENDONÇA, E. P.; MONTEIRO, G. P. . Biofilms of *Salmonella* and *Campylobacter* in the poultry industry. **Poultry Science**. 1ed.: , 2017, v. , p. 1-22.  
ROSSI, D. A. et al. Biofilms of *Salmonella* and *Campylobacter* in the poultry industry. In: MANAFI, M. **Poultry Science**, 2016.

RUSSELL, R. G.; O'DONNOGHUE, M.; BLAKE, D. C.; ZULTY, J.; DETOLLA, L. J. Early Colonic Damage and Invasion of *Campylobacter jejuni* in

Experimentally Challenge Infant *Macaca mulatta*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 168, n. 1; p. 210-215, 1993.

SERICHANTALERGS, O.; DALSGAARD, A.; BODHIDATTA, L.; KRASAESUB, S.; PITARANGSI, C.; SRIJAN, A.; MASON, C. J. Emerging fluoroquinolone and macrolide resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates and their serotypes in Thai children from 1991 to 2000. **Epidemiology and Infection**, v. 135, n. 8, p. 1299 – 1306, 2007. SOULSBY, L. Antimicrobials and animal health: a fascinating nexus. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.60 Suppl 1: i77–8, 2007.

SCHWILLE-KIUNTKE, J. et al. Postinfectious irritable bowel syndrome: follow-up of a patient cohort of confirmed cases of bacterial infection with *Salmonella* or *Campylobacter*. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 23, n. 11, p. e479–e488, 2011.

SNELLING, W. J.; MATSUDA, M.; MOORE, J. E.; DOOLEY, J. S. G. Under the Microscope *Campylobacter jejuni*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 297-302, 2005.

SKARP C. P., HANNINEN M. L., RAUTELIN H. I. (2016). Campylobacteriosis: the role of poultry meat. *Clin. Microbiology. Infection* 22 103–109. 10.1016/j.cmi.2015.11.019

STINZI, A.; WHITWORTH, L. Investigation of the *Campylobacter jejuni* Cold-Shock response by global transcript profiling. **Genome Letters**, v. 3, p. 18-27, 2003.

TAKAHASHI, M.; KOGA, M.; YOKOYAMA, K.; YUKI, N. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* Isolated from Patients with Guillain-Barré and Fisher Syndromes in Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, Japan, [online] v. 43, n. 1, p. 335-339, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC540119>. Acesso em: 8 ago 2016.

TAM, C. C.; RODRIGUES, L. C.; VIVIANI, L.; DODDS, J. P.; EVANS, M. R.; HUNTER, P. R.; GRAY, J. J.; LETTLEY, L. H.; RAIT, G.; TOMPKINS, D. S.; O'BRIEN, S. J. Longitudinal study of infectious intestinal disease in the UK (IID2 study): incidence in the community and presenting to general practice. **Gut**, v. 61, n. 1, p. 69-77, 2012.

TERVISEAMET, **Estonian Health Board**. 2018. Kampylobakterenteriid Eestis, 2017a. Accessed 25 Jan. 2018. [http://www.terviseamet.ee/fileadmin/dok/Nakkushaigused/statistika/2017/Kampylobakterenteriid Eestis 2017a.pdf](http://www.terviseamet.ee/fileadmin/dok/Nakkushaigused/statistika/2017/Kampylobakterenteriid_Eestis_2017a.pdf).

UNIÃO EUROPEIA. Regulamento (UE) 2017/1495 da Comissão de 23 de agosto de 2017 que altera o Regulamento (CE) número 2073/2005 no que diz respeito à *Campylobacter* em carcaças de frango de carne.

TOMPKINS, B. J.; WIRSING, E.; DELVIN, V.; KAMBI, L.; TEMPLE, B.; WEENING, K.; CAVALLO, S.; ALLEN, L.; BRINIG, A.; GOODE, B.; FITZGERALD, C.; HEIMAN, K.; STROIKA, S.; MAHON, B. Multistate Outbreak of *Campylobacter jejuni* Infections Associated with Undercooked Chicken Livers. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 62, n. 44, p. 874-876, 2013.

VANDAMME, P.; FALSEN, E.; ROSSAU, R.; HOSTE, B.; SEGERS, P.; TYTGAT, R.; DE LEY, J. Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* Taxonomy: Emendation of Generic Descriptions and Proposal of *Arcobacter* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 41, n. 1, p. 88-103, 1991.

WAGENAAR, J. A.; FRENCH, N. P.; HAVELAAR, A. H.; Preventing *Campylobacter* at the Source: Why Is It So Difficult? **Food Safety**, v. 57, n. 1, p. 1600-1606, 2013.

WHYTE, R.; HUDSON, J. A.; GRAHAM, C. ***Campylobacter* in chicken livers and their destruction by pan frying**. Letters in Applied Microbiology, v. 43, n. 6, p. 591 – 595, 2006.

WHO, World Health Organization. **Health topics**. Diarrhoea. Geneva, 2015. Disponível em: < <http://www.who.int/topics/diarrhoea/en/> > Acesso em: 30 de abril de 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO/FAO. Report of the Fourth Session of the Codex Ad Hoc Intergovernmental Task Force on Antimicrobial Resistance, p. 18-22, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. The global view of Campylobacteriosis. 2013 Disponível em: <[https://extranet.who.int/iris/restricted/bitstream/10665/80751/1/9789241564601\\_eng.pdf](https://extranet.who.int/iris/restricted/bitstream/10665/80751/1/9789241564601_eng.pdf)> Acesso em: 29 mar. 2017

ZHAO, S. et al. Antimicrobial resistance of ***Campylobacter*** isolates from retail meat in United States between 2002-2007. **Applied and Environmental Microbiology**, n.76, p.7949- 7956, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3008252/pdf/1297-10.pdf>>. Acesso em: 03 mai. 2018. doi: 10.1128/AEM.01297-10.

ZHENG J., MENG J. H., ZHAO S. H., SINGH R., SONG W. X. (2006) Adherence to and invasion of human intestinal epithelial cells by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from retail meat products. **Journal Food Protection**, 69:768-774.

ZIPPRIN R. L., YOUNG C. R., BYRD J. A., STANKER L. H., HUME M. E., GRAY S. A., KIM B. J., KONKEL M. E. (2001). Role of *Campylobacter jejuni* potential virulence genes in cecal colonization. **Avian Diseases**., 45:549-557.

YOUNG, K. T.; DAVIS, L. M.; DIRITA, V.J. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 665-

679, 2007.

## **ANEXOS**

I – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA Food Microbiology –

CAPÍTULO II

2 - NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA Pesquisa Veterinária

Brasileira – CAPÍTULO II