

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**FATORES DE PATOGENICIDADE E POTENCIAL RISCO
À SAÚDE EM *Campylobacter* spp. ISOLADOS DE
CARCAÇAS DE FRANGOS**

Roberta Torres de Melo

Bióloga

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL

Agosto de 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

FATORES DE PATOGENICIDADE E POTENCIAL RISCO
À SAÚDE EM *Campylobacter* spp. ISOLADOS DE
CARCAÇAS DE FRANGOS

Roberta Torres de Melo

Orientadora: Dra. Daise Aparecida Rossi

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

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL

Agosto de 2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

M528f

2012

Melo, Roberta Torres de, 1987-
Fatores de patogenicidade e potencial risco à saúde em *Campylobacter* SPP. isolados de carcaças de frangos / Roberta Torres de Melo. -- 2012.
133 f. : il.

Orientadora: Daise Aparecida Rossi.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Inclui bibliografia.

1. 1. Veterinária - Teses. 2. *Campylobacter* - Teses. 3. *Campylobacteriose* - Teses. I. Rossi, Daise Aparecida. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.
- 4.

CDU: 619

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

ROBERTA TORRES DE MELO – Nascida em Araguari, Estado de Minas Gerais, em 17 de dezembro de 1987, filha de Roberto Nunes de Melo e Vera Márcia Torres de Melo. Bióloga, graduada em dezembro de 2009 pelo Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia. Durante a graduação foi bolsista do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) por um período de dois anos 2008-2010. Em 2010 iniciou no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias na Universidade Federal de Uberlândia, área de concentração em Saúde Animal, na qual foi bolsista pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), de março de 2011 a fevereiro de 2012.

*“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência
em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo
o alvo, quem busca e vence obstáculos,
no mínimo fará coisas admiráveis.”*
José de Alencar

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus pais e minha irmã,
pelo apoio que sempre me foi dado ao longo da
minha vida acadêmica, e ao meu marido por seu
companheirismo e suporte.

AGRADECIMENTOS

O presente estudo resultou de um esforço mútuo, composto de várias etapas nas quais encontrei algumas dificuldades, principalmente no início. Porém, com auxílio da família, dos amigos e colegas, que contribuíram de forma direta e indireta na execução do trabalho, foi que tornou 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 dar força interior para superar as dificuldades, mostrar o caminho nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades, enfim pela sua presença constante na minha vida.

À minha orientadora, Professora Doutora Daise Aparecida Rossi, pelos importantes ensinamentos tanto científicos quanto pessoais, pela amizade e apoio. Além disso, por ser meu exemplo de pessoa e profissional a qual sempre fará parte da minha vida. Sou muito grata a esta pessoa que reconhece meu esforço e me dá ainda mais força e segurança para alcançar meus objetivos.

Aos meus amigos em geral do laboratório tanto aos velhos e queridos quanto aos que se revelaram ao longo desse tempo, que me auxiliaram durante esses dois anos, compartilhando as dificuldades e experiências e por serem tão companheiros.

Devo fazer um agradecimento especial à Priscila e à Eliane que estiveram comigo durante praticamente todo experimento, por ficarem sempre comigo durante as noites em que tive que processar as amostras, correr géis, etc. Obrigada pela solidariedade e pelo afeto que sempre tiveram comigo, pelo entusiasmo em me ajudar, pelo estímulo e pela valiosa parceria que criei junto a vocês. E me desculpem se em alguns momentos não pude ser tão especial

com vocês, quanto vocês sempre foram comigo.

À minha amiga e co-orientadora, Dra. Belchiolina, pelo incentivo que sempre dedicou aos meus experimentos, pelas idéias geniais, pela atenção zelosa comigo, pela paciência nos seus ensinamentos, por ser exigente e tornar o trabalho mais dinâmico.

À minha amiguinha do curso de mestrado Letícia, por compartilhar todos os momentos comigo, principalmente os difíceis, que incluem a escolha do tema, o desenvolvimento do projeto, a execução e análise dos resultados. Passamos por isso juntas, e conseguimos desenvolver nossos objetivos juntas, uma dando força pra outra. Muito obrigada florzinha.

Aos alunos de iniciação científica, Eduardo e Leandro, que me ajudaram durante a parte molecular de meu experimento. Obrigada por serem tão prestativos e pró-ativos, além da dedicação que tiveram em todos os momentos.

Aos meus amiguinhos do coração Raquel, Guilherme, Filipe e Carol, que me ajudaram tanto durante as coletas no final da tarde, e sempre demonstraram satisfação em estar me ajudando. À Isabela, por me ajudar durante o trabalho com as células. Muito obrigada, gente.

Aos meus companheiros e técnicos do Lábio, Francesca e Marcelo, pela compreensão e por me ajudarem o tempo todo nos serviços do laboratório. Obrigada por tudo, tenho extremo carinho por vocês.

Ao Professor Belleti, por me coorientar na elaboração do projeto e por ceder seu espaço para a execução do trabalho com as células.

Ao Daniel Mohallen, por sempre me ajudar e se mostrar tão prestativo em minhas dúvidas durante as coletas. Por ceder informações importantes que complementaram meu trabalho.

Meu maior agradecimento é dirigido a meus pais, pelo contínuo apoio em todos estes anos, ensinando-me, principalmente, a importância da construção e coerência de meus próprios valores. Agradeço em especial a meu pai, pelas horas que passou comigo, por sua infinita paciência, por ter me proporcionado a fundamentação básica, por ter guiado meu caminho. Agradeço, de forma muito carinhosa, a atuação de minha mãe que sempre se orgulhou do meu esforço e pela sua crença absoluta na capacidade de realização a mim atribuída foram, indubitavelmente, os elementos propulsores desta dissertação. À minha irmã, que apesar de sempre trabalhar muito, esteve ao meu lado, e sempre sentiu orgulho da minha luta nos estudos.

Ao meu marido, Vinícius, meu companheiro nesta trajetória, soube compreender, como ninguém, a fase pela qual eu estava passando. Durante a realização deste trabalho, sempre tentou entender minhas dificuldades e minhas ausências, procurando se aproximar de mim através da própria dissertação. Por discutir as idéias e me fornecer sugestões durante a discussão deste estudo. Agradeço-lhe, carinhosamente, pelo amor e pela paciência.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1.Objetivos.....	3
1.1.1.Geral.....	3
1.1.2. Específicos.....	3
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	5
2.1. Caracterização de <i>Campylobacter</i> spp.....	5
2.2. Resistência a antimicrobianos.....	7
2.3. Fatores de Virulência.....	9
2.4. Invasividade em células Caco-2.....	12
2.5. Manifestações Clínicas.....	13
2.6. Epidemiologia.....	15
2.6.1. <i>Campylobacter jejuni</i> em carcaças de frangos.....	15
2.6.2. Saúde Pública.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1. Desenho do estudo.....	20
3.2. Processamento das amostras e isolamento de <i>Campylobacter</i> spp.....	21
3.3. Identificação de <i>Campylobacter jejuni</i> e <i>C. coli</i>	22
3.4. Identificação de <i>Campylobacter</i> spp.....	24
3.5. Antibiograma.....	24
3.6. Fatores de virulência.....	26
3.7. Detecção dos genes <i>cdtA</i> , <i>cdtB</i> e <i>cdtC</i> associados a toxina de distensão celular.....	27
3.8. Expressão dos transcritos.....	28

3.9. Capacidade de expressão de virulência em células Caco-2.....	30
3.10. Alterações morfológicas em células Caco-2 por <i>C. jejuni</i>	31
3.11. Similaridade entre os isolados pela técnica de amplificação aleatória do DNA polimórfico (RAPD-PCR).....	32
3.12. Análise dos resultados.....	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1. Ocorrência de <i>Campylobacter</i> spp.....	34
4.2. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana.....	37
4.3. Fatores de Virulência.....	44
4.4. Expressão de genes associados à virulência.....	54
4.5. Transcrição de genes de virulência em <i>C. jejuni</i> após infecção em células Caco-2.....	59
4.6. Alterações morfológicas em células Caco-2.....	64
4.7. Similaridade entre os isolados.....	68
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	78
REFERÊNCIAS.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS

AMO – amoxicilina 10µg
APPCC – Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
ATCC – American Type Culture Collection
BCRJ – Banco de células de Rio de Janeiro
cAMP – Adenosina Mono-Fosfato cíclica
CCDA – agar *Campylobacter Blood-Free Selective Medium*
CDC – Centers for Disease Control
cDNA – Ácido desoxirribonucléico (complementar)
CDT – toxina citoletal distensiva
CEICs – células intestinais de embriões de frangos
CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute
DEPC – dietilpirocarbonato
DF – Distrito Federal
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA – Ácido desoxirribonucléico
dNTPs – Desoxirribonucleotídeos tri-fosfatados
EFSA – European Food Safety Authority
ERI – eritromicina 15µg
ERIC – Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Elements
EUA – Estados Unidos da América
FAO – Food and Agriculture Organization
FDA – Food and Drug Administration
GEN – gentamicina 10µg
GO – Goiás
IAL – Instituto Adolfo Lutz
ICBIM-UFU – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia
ISO – International Organization for Standardization
LPS – Lipopolissacarídeos
MEM – Meio Mínimo de Eagle
MG – Minas Gerais

MH – ágar Mueller Hinton
MMLV-RT - Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
NARMS – Sistema Nacional de Monitoramento da Resistência Antimicrobiana
NCTC – National Collection of Types Cultures
NEO – neomicina 30µg
NOR – norfloxacin 10µg
OMS – Organização Mundial da Saúde
pb – par de bases
PCR – reação da polimerase em cadeia
RAPD – Random Amplification of Polymorphic DNA
RNA – Ácido ribonucleico
rRNA – Ácido ribonucleico (ribossômico)
RT-PCR - Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
SFT – Soro Fetal Bovino
SGB – Síndrome de Guillain-Barré
SUT – sulfazotrim 25µg
TBE – Tris/Borate/EDTA
TET – tetraciclina 30µg
UE – União Européia
UFC – Unidades Formadoras de Colônias
UPGMA - Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
UV – ultra-violeta
VNC – viáveis não cultiváveis
WHO – World Health Organization

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Processamento das amostras nas placas. 1a- Membrana filtrante na placa de CCDA. 1b- Amostra sendo filtrada. 1c- Crescimento de colônias típicas de <i>Campylobacter</i> spp. após incubação.....	22
Figura 2. Halos de inibição apresentados por quatro diferentes estirpes de <i>Campylobacter</i> spp. isoladas de frangos. As setas indicam o diâmetro dos halos formados na placa.....	25
Figura 3. 3a- Resultado da PCR-multiplex para identificação de <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> em amostras de carcaças de frangos. M (marcador de 100pb), C+1 (controle positivo para <i>C. jejuni</i>), C+2 (controle positivo para <i>C. coli</i>), 1 (amostra positiva para <i>C. coli</i>), 2-4 (amostras positivas para <i>C. jejuni</i>), C- (controle negativo composto de água ultrapura). 3b- Resultado da PCR para identificação de <i>Campylobacter</i> spp. M (marcador de 100pb), C+ (controle positivo para <i>C. jejuni</i>), C- (controle negativo composto de água ultrapura), 1-9 (amostras positivas para <i>Campylobacter</i> spp.).....	34
Figura 4. Gráfico da porcentagem de resistência antimicrobiana nas três regiões – MG (Minas Gerais), DF (Distrito Federal) e GO (Goiás) – de isolamento das cepas de <i>Campylobacter</i> spp. de frangos. AMO (amoxicilina), ERI (eritromicina), GEN (gentamicina), NEO (neomicina), NOR (norfloxacin), SUT (sulfazotrim) e TET (tetraciclina).....	41
Figura 5. Distribuição das cepas de <i>Campylobacter</i> spp. isoladas de carcaças de frangos de acordo com o número de antibióticos a que é resistente.....	42
Figura 6. Gel de PCR demonstrando a presença dos genes <i>flaA</i> , <i>pldA</i> , <i>cadF</i> e <i>ciaB</i> . M (marcador de peso molecular de 100pb), C- (controle negativo, composto por água ultrapura em substituição ao DNA alvo); <i>flaA1</i> , <i>pldA1</i> , <i>cadF1</i> e <i>ciaB1</i> (presença dos genes no controle positivo	

– *C. jejuni* NCTC 11351) e *flaA2*, *pldA2*, *cadF2* e *ciaB2* (presença dos genes em uma amostra de *C. jejuni* isolada de frango resfriado)..... 44

Figura 7. Gel de PCR demonstrando a presença dos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*. M (marcador de peso molecular de 100pb); C+ (controle positivo de *C. jejuni* NCTC 11351); C- (controle negativo, composto por água ultrapura em substituição ao DNA alvo); 1, 4-9 (cepas de *C. jejuni* isolados de frangos positivas para o complexo CDT); 2-3 (cepas de *C. jejuni* isolados de frangos negativas para o complexo CDT)..... 45

Figura 8. Gel de PCR demonstrando a presença da expressão de transcritos de virulência de *ciaB* em cepas de *C. jejuni* isoladas de carcaças de frangos. M (marcador de peso molecular de 50pb, Invitrogen); C+ (controle positivo de *C. jejuni* NCTC 11351); 1-10 (estirpes de *C. jejuni* isoladas de frangos positivas para a expressão do gene *ciaB*)..... 55

Figura 9. Gel de PCR demonstrando a presença da expressão de transcritos de virulência de *dnaJ* em cepas de *C. jejuni* isoladas de carcaças de frangos. M (marcador de peso molecular de 50 pb, Invitrogen); C+ (controle positivo de *C. jejuni* NCTC 11351); 1-10 (estirpes de *C. jejuni* isoladas de frangos positivas para a expressão do gene *dnaJ*)..... 55

Figura 10. Gel de RT-PCR para expressão de *ciaB* das cepas de *C. jejuni* após inoculação em células Caco-2. M (marcador de peso molecular de 50pb, Invitrogen); C+ (controle positivo de *C. jejuni* NCTC 11351); 13 e 46 (estirpes de *C. jejuni* positivas para a transcrição do gene *ciaB*); 7-11 e 17-45 (estirpes de *C. jejuni* negativas para a transcrição do gene *ciaB*)..... 61

Figura 11. Gel de RT-PCR para expressão de *dnaJ* das cepas de *C. jejuni* após inoculação em células Caco-2. M (marcador de peso molecular de 50pb, Invitrogen); C+ (controle positivo de *C. jejuni* NCTC 11351); 7-46 (estirpes de *C. jejuni* positivas para a transcrição do gene *dnaJ*)..... 62

Figura 12. Dendrograma das cepas de *C. jejuni* que mais apresentaram caracteres de virulência, pela técnica de RAPD-PCR

com os <i>primers</i> 1290 e HLWL, utilizando a média de experimentos (<i>average from experiments</i>) com tolerância de 1,5% e método UPGMA com otimização de 80%, pelo programa GelCompar.....	65
Figura 13. Fotomicrografia em microscopia óptica de luz em objetiva de 100x, ilustrando a atuação de <i>C. jejuni</i> nas células Caco-2. 13a – Controle negativo, contendo somente as células do epitélio intestinal humano. 13b – Controle positivo composto pelas células inoculadas com <i>C. jejuni</i> NCTC 11351. 13c e 13d – Células inoculadas com as cepas de <i>C. jejuni</i> , correspondentes aos números 08 e 36, respectivamente.....	66
Figura 14. Fotomicrografia em microscopia óptica de luz em objetiva de 100x com aglomerações de <i>C. jejuni</i> (cepa de número 25) nas células Caco-2, demonstrando sua propriedade invasiva, conforme evidenciado nas setas.....	66
Figura 15. Fotomicrografia em microscopia óptica de luz em objetiva de 40x de <i>C. jejuni</i> (cepa de número 25) em células Caco-2 com evidência de total perda da confluência intercelular.....	67
Figura 16. Dendrograma dos 55 isolados de <i>C. jejuni</i> oriundos de frangos resfriados e congelados, pela técnica de RAPD-PCR com os <i>primers</i> 1290 e HLWL, utilizando a média de experimentos (<i>average from experiments</i>) com tolerância de 1,5% e método UPGMA com otimização de 80%, pelo programa GelCompar. Perfil A – <i>cluster</i> com 81,8% de homologia, composto por um subgrupo com 94,2% de similaridade. Perfil B – <i>cluster</i> com 89,6% de homologia, composto por um subgrupo com 92,8% de similaridade. Perfil C – <i>cluster</i> com 93,0% de homologia. Perfil D – <i>cluster</i> com 81,0% de homologia, composto de dois subgrupos com 88,8% e 85,5% de similaridade. Perfil E – <i>cluster</i> com 84,8% de homologia, composto de dois subgrupos com 92,7% e 90,0% de similaridade. Perfil F – <i>cluster</i> com 92,5% de homologia. Perfil G – <i>cluster</i> com 90,7% de homologia. Perfil H – <i>cluster</i> com 86,5% de homologia. Perfil I – <i>cluster</i> com 85,9% de homologia. Perfil J – <i>cluster</i> com 94,4% de homologia. Perfil K – <i>cluster</i> com 81,3% de homologia. Perfil L – <i>cluster</i> com 89,2% de	

homologia, composto por um subgrupo com 97,1% de similaridade. Perfil M – *cluster* com 93,7% de homologia. Perfil N – *cluster* com 81,1% de homologia. Perfil O – *cluster* com 98,7% de homologia..... 70

Figura 17. Dendrograma dos 19 isolados de *C. coli* oriundos de frangos resfriados e congelados, pela técnica de RAPD-PCR com os *primers* 1290 e HLWL, utilizando a média de experimentos (*average from experiments*) com tolerância de 1,5% e método UPGMA com otimização de 80%, pelo programa GelCompar. Perfil A – *cluster* com 83,5% de homologia. Perfil B – *cluster* com 83,6% de homologia, composto por um subgrupo com 95,4% de similaridade. Perfil C – *cluster* com 86,5% de homologia..... 73

Figura 18. Dendrograma dos 20 isolados de *Campylobacter* spp. oriundos de frangos resfriados e congelados, pela técnica de RAPD-PCR com os *primers* 1290 e HLWL, utilizando a média de experimentos (*average from experiments*) com tolerância de 1,5% e método UPGMA com otimização de 80%, pelo programa GelCompar. Perfil A – *cluster* com homologia de 85,8%. Perfil B – *cluster* com homologia de 87,1%, composto de quatro subgrupos maiores com similaridade de 93,2%, 94,2%, 98,3% e 92,7%. Perfil C – *cluster* com homologia de 92,2%..... 74

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. <i>Primers</i> utilizados na identificação de <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>	21
Tabela 2. <i>Primer</i> utilizados na identificação de <i>Campylobacter</i> spp.....	24
Tabela 3. <i>Primers</i> para identificação dos genes de virulência <i>flaA</i> , <i>pldA</i> , <i>cadF</i> e <i>ciaB</i> em <i>Campylobacter</i> spp.....	26
Tabela 4. <i>Primers</i> para detecção dos genes <i>cdtA</i> , <i>cdtB</i> e <i>cdtC</i> em <i>Campylobacter</i> spp.....	27
Tabela 5. <i>Primers</i> para verificar a expressão dos transcritos <i>ciaB</i> e <i>dnaJ</i> entre os isolados de <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> que possuem genes de virulência.....	28
Tabela 6. <i>Primers</i> utilizados no RAPD-PCR dos isolados de <i>Campylobacter</i> spp.....	32
Tabela 7. Número e porcentagem de espécies de <i>Campylobacter</i> spp. isoladas de três regiões de origem dos frangos.....	35
Tabela 8. Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de <i>Campylobacter</i> spp. isolados de carcaças de frangos refrigerados e congelados.....	38
Tabela 9. Número e porcentagem de resistência antimicrobiana nas diferentes espécies de <i>Campylobacter</i> isoladas de frangos embalados.....	39
Tabela 10. Distribuição das estirpes de <i>Campylobacter</i> spp. isoladas de frangos quanto a resistência aos grupos de antimicrobianos.....	43
Tabela 11. Porcentagem de genes de virulência em <i>Campylobacter</i> spp. isolados de carcaças de frangos.....	45
Tabela 12. Porcentagem de cepas de <i>Campylobacter</i> isoladas de frangos que possuem de um a cinco genes de virulência testados.....	52
Tabela 13. Porcentagem de cepas de <i>Campylobacter</i> spp. isoladas de carcaças de frangos que possuem os genes de virulência pesquisados distribuídas conforme o local de origem.....	53
Tabela 14. Presença e porcentagem de transcritos de virulência em	

<i>Campylobacter</i> spp. isolados de amostras de frangos.....	56
Tabela 15. Distribuição por local de origem da frequência e porcentagem de transcritos de virulência de <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> isolados de carcaças de frangos congeladas e resfriadas.....	58
Tabela 16. Caracterização, quanto à origem e à presença de genes de virulência, das cepas de <i>C. jejuni</i> isoladas de frangos, que não apresentaram transcritos de virulência, inoculadas em células Caco-2..	61
Tabela 17: Caracterização, quanto a resistência antimicrobiana e à presença e expressão de genes de virulência, das cinco cepas de <i>C. jejuni</i> mais virulentas selecionadas para inoculação em células Caco-2.	65

FATORES DE PATOGENICIDADE E POTENCIAL RISCO À SAÚDE EM *Campylobacter* spp. ISOLADOS DE CARCAÇAS DE FRANGOS

RESUMO – Este estudo avaliou a incidência de *Campylobacter* spp. em carcaças de frangos de três estados do Brasil, a resistência aos antibióticos, a presença de genes de virulência e sua transcrição, a expressão e as alterações provocadas após inoculação em células Caco-2 e a relação filogenética entre as espécies. Foram isoladas 94/420 *Campylobacter* spp., sendo 55 *C. jejuni*, 19 *C. coli* e 20 *Campylobacter* spp. Houve resistência à amoxicilina (74,5%), norfloxacin (43,6%) e eritromicina (36,2%) e sensibilidade à neomicina (97,9%) e gentamicina (95,7%), sendo *C. coli* a mais resistente. Quanto aos genes de virulência 45/94 (47,9%) possuíam o gene *flaA*, 42/94 (44,7%) *pldA*, 43/94 (45,7%) *cadF*, 42/94 (44,7%) *ciaB* e 37/94 (39,4%) *cdtABC*, com *C. jejuni* mais virulenta. A análise de transcritos incluiu as 56 cepas com genes de virulência, sendo 32/56 (57,1%) cepas positivas, com maior evidência para *C. jejuni*. Das 46 *C. jejuni* com genes de virulência, 18 (39,1%) não transcreveram *ciaB* e *dnaJ*. Assim, 14/18 estirpes foram inoculadas em células Caco-2, e observou-se que 2/14 (14,3%) expressaram *ciaB*, e todas, *dnaJ*. Cinco *C. jejuni*, as mais virulentas, promoveram a perda de confluência intercelular e causaram alterações nas células Caco-2. A análise de similaridade demonstrou elevada diversidade em *C. jejuni* e *C. coli*. Em *Campylobacter* spp., a proximidade genética indica que podem pertencer a mesma espécie. Este estudo destacou os caracteres fenotípicos e genotípicos de *Campylobacter* spp. e a potencial atuação na patogênese da doença em humanos, enfatizando a necessidade de controles rígidos na produção para garantir a saúde do consumidor.

Palavras-chave: Campilobacteriose, Resistência, Virulência, Caco-2, Patogênese.

PATHOGENIC FACTORS AND POTENTIAL HEALTH RISK IN *Campylobacter* spp. ISOLATED FROM CHICKEN CARCASS

ABSTRACT – This study evaluated the incidence of *Campylobacter* spp. in chicken carcasses in three states in Brazil, antibiotic resistance, the presence of virulence genes and their transcription, the expression and the changes brought about after inoculation in Caco-2 cells and the phylogenetic relationship among species. Were isolated 94/420 *Campylobacter* spp., being 55 *C. jejuni*, 19 *C. coli* and 20 *Campylobacter* spp. There was resistance to amoxicillin (74.5%), norfloxacin (43.6%) and erythromycin (36.2%) and sensitivity to neomycin (97.9%) and gentamicin (95.7%), and *C. coli* was the most resistant. Regarding the virulence genes 45/94 (47.9%) had the *flaA* gene, 42/94 (44.7%) *plda*, 43/94 (45.7%) *cadF*, 42/94 (44.7%) *ciaB* and 37/94 (39.4%) *cdtABC* with *C. jejuni* more virulent. The analysis of transcripts included the 56 strains with virulence genes, 32/56 (57.1%) strains positive, with stronger evidence for *C. jejuni*. Of the 46 *C. jejuni* strains with virulence genes, 18 (39.1%) did not transcribed *ciaB* and *dnaJ*. Thus, 14/18 strains were inoculated into Caco-2 cells, and found that 2/14 (14.3%) expressed *ciaB*, and all, *dnaJ*. Five *C. jejuni*, the most virulents, promoted the loss of intercellular confluency and caused changes in Caco-2 cells. The similarity analysis showed a high diversity in *C. jejuni* and *C. coli*. In *Campylobacter* spp., the genetic proximity indicates that they may belong to the same species. This study highlighted the phenotypic and genotypic characters of *Campylobacter* spp. and potential role in pathogenesis of human disease, emphasizing the need for tight controls on production to ensure the health of consumers.

Keywords: Campylobacteriosis, Resistance, Virulence, Caco-2, Pathogenesis.

1. INTRODUÇÃO

A qualidade microbiológica dos alimentos produzidos em um país, ou importados de outros, é um dos pilares para garantir a saúde das populações. Surto de toxinfecções alimentares causam prejuízos diretos e indiretos, colocando em risco a saúde do consumidor e causando impacto na economia. Dentre os microrganismos mais incriminados em surtos alimentares, destacam-se representantes do gênero *Campylobacter* (EFSA, 2009; SCIENTIFIC STATUS SUMMARY, 2004).

Campylobacter spp. é reconhecida mundialmente como a bactéria que mais causa diarreia em humanos, sendo relatada como a mais frequente infecção zoonótica (MOORE et al., 2005; EFSA, 2009). Das espécies implicadas em doenças gastroentéricas a *C. jejuni* é a mais prevalente (HIRSH, 2003). Embora seja autolimitante em adultos saudáveis, em crianças, idosos ou indivíduos imunossuprimidos pode se tornar uma doença severa requerendo terapia antibiótica. Porém, na maioria dos casos ocorrem infecções individuais esporádicas (COX, 2002). Os humanos infectam-se por contato direto com animais portadores ou pela ingestão de carne crua ou mal processada de aves, suínos e bovinos ou, ainda, pela ingestão de leite não pasteurizado e água (FDA, 2008).

A gastroenterite provocada por *Campylobacter* spp. em humanos é caracterizada por diarreia abundante, dor abdominal aguda e febre. Em uma pequena porcentagem dos casos, essa infecção pode levar a complicações potencialmente graves (LASTOVICA, 2006), como a síndrome de Guillain-Barré (SGB), uma perturbação que resulta em paralisia neuromuscular aguda. Estima-se que cerca de uma em cada 1000 infecções por *Campylobacter* leva a SGB (POPE et al., 2007; RABINSTEIN, 2007).

O Painel dos Riscos Biológicos apresentados pela EFSA (2010) revelou elevada prevalência de *Campylobacter* spp. em lotes de frangos, com estimativa alarmante e equivalente a oito carcaças contaminadas em cada 10 frangos analisados na Europa. Diante desses dados, a carne de frango apresenta-se como um importante veículo de transmissão de campilobacteriose ao consumidor europeu.

Dados quantitativos indicam elevadas contaminações por *Campylobacter*

spp. em carcaças de frangos, representando o risco potencial à saúde dos consumidores (VERHOEFF-BAKKENES et al., 2008). Outros trabalhos mostram que a redução na contagem de *Campylobacter* spp. no produto final pode efetivamente reduzir o número de casos de campilobacteriose humana (NAUTA et al., 2009; BRONZWAER et al., 2009).

Estudos de tipagem molecular relataram uma sobreposição entre genótipos de *Campylobacter* em humanos e oriundos de produtos cárneos (HÄNNINEN et al., 2000; WILSON et al., 2008). Além disso, a utilização de marcadores de fatores de virulência associados à doença diarreica humana e às síndromes neurológicas e a análise dos perfis de resistência antimicrobiana têm demonstrado o grau de patogenicidade de estirpes presentes em carcaças de frangos e, conseqüentemente, os riscos ao consumidor (ZHENG et al., 2006; HABIB et al., 2009).

A capacidade de *Campylobacter* estabelecer-se no trato gastrointestinal de frangos e seres humanos é evidenciada pela existência de ligação e colonização das células na superfície intestinal (VAN DEUN et al., 2008). Os mecanismos com os quais *Campylobacter* pode induzir a doença são inicialmente a aderência intestinal com produção da enterotoxina e a invasão bacteriana com proliferação dentro da mucosa intestinal levando ao dano celular (HU; KOPECKO, 2000). Vários fatores de virulência relacionados com a capacidade de aderir e invadir células epiteliais têm sido identificados em estudos anteriores, como os encontrados em genes *flaA*, *cadF*, *ciaB*, *pldA* e *cdtABC* (RIVERA-AMILL et al., 2001; HÄNEL et al., 2004; ZHENG et al., 2006). Além disso, estudos fisiológicos indicam também a importância da influência da fase de crescimento sobre o efeito causado em células Caco-2. (GANAN et al., 2010).

Diversos modelos têm sido usados para estudar a capacidade de *Campylobacter* colonizar e invadir o trato gastrointestinal (FRIIS et al., 2005; POLY; GUERRY, 2008). Entre eles, as células Caco-2 são mais comumente usados, sendo úteis para imitar o comportamento de *Campylobacter* no intestino humano e de frangos (HÄNEL et al., 2004; GILBERT; SLAVIK, 2005), a fim de se determinar o nível de patogenicidade de diferentes cepas.

A expressiva participação do Brasil no concorrido mercado externo de produtos cárneos associada aos poucos estudos desenvolvidos no país relacionados

à incidência de *Campylobacter* nesses produtos leva ao questionamento na segurança dos alimentos e no gerenciamento do risco que representa esse microrganismo. Isso implica na necessidade de debates junto às indústrias e órgãos oficiais sobre o tema, a fim de antever o problema e garantir a qualidade do produto ofertado (EMBRAPA, 2008).

Diante disso, é importante determinar em *Campylobacter* spp. isoladas de alimentos, como os de origem avícola, os níveis de resistência aos antimicrobianos e a presença e transcrição de genes associados à virulência. Aliado a isso, a avaliação dos danos causados em células intestinais também se caracteriza como uma ferramenta importante para se estabelecer a patogenicidade das diferentes estirpes. O conjunto destes resultados é de grande valia no entendimento do potencial de virulência de cada cepa e da importância destes microrganismos na saúde pública.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. GERAL

Estimar em *Campylobacter* spp. isoladas de carcaças de frangos de corte, o risco que representam para a saúde humana com base na presença e na transcrição de genes de virulência, capacidade de invadir células intestinais e resistência aos antimicrobianos.

1.1.2. ESPECÍFICOS

- Conhecer a ocorrência de *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* e *Campylobacter* spp. em carcaças de aves disponíveis aos consumidores no Brasil;
- Determinar o perfil de resistência dos isolados frente aos antimicrobianos;
- Identificar fatores de virulência das cepas associadas aos genes de invasão, aderência e produção de enterotoxinas utilizando a técnica de PCR;
- Verificar a presença de transcritos dos genes de virulência identificados por meio da técnica de RT-PCR, e após inoculação em células Caco-2;

- Analisar *in vitro* as alterações morfológicas causadas pelas cepas de *C. jejuni* em células Caco-2;
- Investigar a similaridade genética das espécies isoladas por meio da técnica de RAPD-PCR e correlacionar caracteres fenotípicos e genotípicos com os *clusters* formados.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. CARACTERIZAÇÃO DE *Campylobacter* spp.

O gênero *Campylobacter* pertence à família *Campylobacteriaceae*. As principais espécies implicadas em doenças gastroentéricas no homem são: *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari*. Trata-se de bacilos gram-negativos, não produtores de esporos, microaerófilos, algumas cepas são termofílicas, possuem oxidase e catalase positivos podendo ter catalase negativa. O formato é vibrióide parecendo ser em forma de S ou em asa de gaivota ou formato de vírgula (CRUSHELL et al., 2004). A estrutura é delgada com 0,2-0,5 µm de largura e 0,5-5 µm de comprimento (NACHAMKIN, 1997) e pode ter mais de uma volta em torno de seu eixo chegando a 8 µm (HOLT et al., 1994). Este microrganismo se locomove por meio de flagelos podendo estar localizado na região polar ou em ambas as extremidades (NACHAMKIN, 1997).

As colônias de *Campylobacter* spp. usualmente são planas, com coloração acinzentada ou translúcidas e formato irregular, arredondadas ou convexas. Possuem tanto aspecto de secas como de úmidas. Podem apresentar brilho d'água ao refletir a luz ambiental. Existe uma tendência das colônias apresentarem crescimento confluyente ao longo da linha de semeadura nos meio sólidos. Reações hemolíticas não são observadas em ágar sangue (QUINN et al., 2005).

Das 17 espécies do gênero *Campylobacter*, as mais importantes associadas a doenças transmitidas por alimentos são *C. jejuni* e *C. coli* (CDC, 2005). HORROCKS et al., (2008) incluem também a *C. lari* como agente etiológico de gastroenterite humana. Estas espécies constituem um grupo distinto denominado termotolerantes, com temperatura ótima de crescimento entre 42-43°C (PEARSON & HEALING, 1992) e 35-37°C (VANDAMME et al., 2005), mas incapazes de multiplicar abaixo dos 30°C (STANLEY & JONES, 2003).

Em cultivos de vários dias (mais de três), as células de *Campylobacter* degeneram em formas esféricas ou ovóides com perda de sua capacidade de multiplicação em meios de cultura, o que torna difícil seu cultivo em laboratório (DEBRUYNE et al., 2008). Segundo HAZELEGER et al. (1994), quando perdem sua capacidade de multiplicação em meios de cultivos inertes são consideradas formas

viáveis e não cultiváveis (VNC). ROWE et al. (1998) citam que formas VNC de *Campylobacter* spp. são induzidas pelo estresse causado pela escassez de nutrientes no meio, dentre outros fatores, e representa uma estratégia de sobrevivência do organismo no ambiente natural como, por exemplo, o ambiente aquático.

DEBRUYNE et al. (2008) afirmam que esta bactéria não fermenta ou oxida os carboidratos, não produz as enzimas lipase e lecitinase, há ausência de formação de produtos finais ácidos ou neutros, não produz indol e acetoina ou qualquer tipo de pigmento. A energia é obtida pelos aminoácidos ou ciclo intermediário do ácido tricarboxílico. A maioria das espécies reduz nitratos. *Campylobacter* spp. não hidrolisam gelatina, caseína, tirosina e hipurato, sendo este último somente hidrolisado pela *C. jejuni*. O teste é negativo para vermelho de metila ou o teste de Voges-Proskauer. A oxidase é positiva para praticamente todas as cepas, com exceção do *C. gracilis*. O teste da urease também é negativo para a maioria das espécies de *Campylobacter* com exceção de algumas cepas de *C. lari*.

As espécies responsáveis por doenças gastroentéricas são termotolerantes, com crescimento ótimo em temperaturas entre 37°C e 42°C e o meio ideal para seu crescimento deve ser composto por altos níveis de proteína (HAZELEGER et al., 1994).

Campylobacter spp. é inativada em temperatura de congelamento de -15°C em 3 dias (STERN & KOTULA, 1982), contudo, o congelamento não elimina o patógeno de alimentos contaminados (LEE et al., 1998). Existem estudos indicando que o congelamento reduz o número destas bactérias presentes nas carnes cruas, dada sua característica de sensibilidade a baixas temperaturas (SILVA & AMSTALDEN, 1997). Entretanto alguns autores constataram que não houve diferença significativa na incidência de *C. jejuni* nas amostras frescas e naquelas submetidas a baixas temperaturas, mesmo após enriquecimento seletivo, comprovando que este microrganismo é capaz de sobreviver nas condições de resfriamento e congelamento testadas (MAZIERO, 2007). HAZELEGER et al. (1994) afirmam que células de *Campylobacter* spp. sobrevivem por um longo período a 4°C, mas não são viáveis em pH abaixo de 4,9. O microrganismo é capaz de crescer em pH de 4,9 a 9,0, sendo ótimo valores entre 6,5 a 7,5.

Campylobacter normalmente não é capaz de se multiplicar em alimentos durante o processamento ou armazenamento e são muito sensíveis à dessecação. Assim, não sobrevivem em superfícies secas e também, não crescem em concentrações de cloreto de sódio iguais ou maiores que 2% (PARK, 2002).

2.2. RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

A toxicidade seletiva de agentes antimicrobianos tem assegurado a sua utilização para combater infecções, no entanto, paradoxalmente, resultou no surgimento e difusão da multirresistência de patógenos zoonóticos devido ao uso difundido de antibióticos como suplementos para a profilaxia e promoção de crescimento na produção avícola (RAHIMI et al., 2010). A resistência aos antimicrobianos em medicina e na agricultura é reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS), juntamente com várias outras autoridades como um dos principais problemas emergentes de importância para a saúde pública (MOORE et al., 2006).

A crescente atenção internacional para o risco do uso de antibióticos na produção animal ajudou a impulsionar o desenvolvimento de sistemas de vigilância (ZHAO et al., 2006). Nos Estados Unidos, o Sistema Nacional de Monitoramento da Resistência Antimicrobiana (NARMS) monitora a resistência antimicrobiana de patógenos de origem alimentar e identifica a origem e magnitude do seu potencial de multirresistência (ZHAO et al., 2010).

Embora a maioria das infecções por *Campylobacter* geralmente ser autolimitantes e tratada com reposição de líquido, a terapia antimicrobiana pode ser essencial para pacientes com infecções sistêmicas severas ou prolongadas e para controle de infecções em grupos de alto risco (LUANGTONGKUM et al., 2009). Como *Campylobacter* spp. é considerado um patógeno zoonótico, a resistência aos antimicrobianos entre isolados no reservatório animal tem graves implicações para o tratamento de campilobacteriose em seres humanos (MOORE et al., 2006).

Macrolídeos e fluorquinolonas são os antimicrobianos de escolha quando a intervenção terapêutica é justificada em humanos (MOORE et al., 2005). As tetraciclinas têm sido sugeridas como uma escolha alternativa no tratamento de

campilobacterioses clínica (AERESTRUP & ENGBERG, 2001).

O desenvolvimento de resistência aos macrolídeos e fluorquinolonas é particularmente preocupante uma vez que o uso destes antimicrobianos é defendido como terapia de primeira e de segunda linha para o tratamento de infecções de *Campylobacter*. Uma vez que a campilobacteriose é transmitida pelo consumo de alimentos, o papel do uso indiscriminado desses antibióticos nas diferentes etapas da cadeia produtiva de frangos pode promover a disseminação de cepas resistentes. Vários relatórios em todo o mundo associam infecções por *Campylobacter* resistentes a fluorquinolonas com a aprovação do uso desse antimicrobiano na produção de aves (ENGBERG et al., 2001; GE et al., 2003; GUPTA et al., 2004; KINANA et al., 2006; SERICHANTALERGS et al., 2007). Para combater o surgimento de cepas resistentes a fluorquinolonas nos Estados Unidos, a *Food and Drug Administration* retirou a aprovação para o uso de fluorquinolonas em aves desde 2005 (ZHAO et al., 2010).

De uma forma geral, os resultados de resistência precisam ser melhor investigados. A prevalência crescente da resistência de *Campylobacter* às quinolonas pode ameaçar o uso no futuro deste grupo de drogas na terapêutica devido a sua indiscriminada utilização. A resistência de cepas de *C. jejuni* às diversas drogas tem se apresentado como um problema de saúde pública no mundo todo, fato este demonstrado por TAREMI et al. (2006), HAN et al. (2007) e SÁNCHEZ et al. (1994) e uma constante preocupação da *World Health Organization* (WHO).

A maioria das infecções clínicas por *Campylobacter* resultam em uma doença auto-limitada. Casos mais graves, tais como a doença invasiva em pessoas imunodeprimidas, são menos comuns. Porém, estudos epidemiológicos têm examinado o impacto clínico da resistência aos antibióticos em infecções por *Campylobacter*. Um estudo desenvolvido em Minnesota, em 1997, demonstrou que pacientes com *C. jejuni* quinolona-resistentes tiveram uma duração média de diarreia de 10 dias, em comparação com pacientes com cepas sensíveis que tiveram duração de sete dias (SMITH et al., 1999).

KOROLIK et al. (1996) estudaram 88 cepas isoladas de frangos (79 *C. jejuni* e 9 *C. coli*). Dessas, 31% *C. jejuni* e 22% de *C. coli* eram resistentes à eritromicina e

10% de *C. jejuni* e 33% de *C. coli* eram resistentes à doxiciclina. Nenhum isolado foi resistente a enrofloxacin. Em outro estudo, 216 estirpes (142 *C. jejuni*, 74 *C. coli*) foram isoladas de amostras de frango isoladas de três lotes diferentes (BARTON & WILKINS, 2001). Houve diferenças significativas nas taxas de resistência entre os três lotes, provavelmente refletindo diferenças nas práticas de uso de antibióticos. A resistência à ampicilina em *C. jejuni* variou entre 50% e 61%, à lincomicina e tilosina de 4% a 28%, à tetraciclina de 15% a 37%, à eritromicina de 0% a 11%. A resistência à neomicina e à gentamicina foi insignificante e um isolado foi resistente à ciprofloxacina. No caso de *C. coli*, a resistência à ampicilina foi de cerca de 35% para os três lotes, à tetraciclina variou de 16% a 36%, à lincomicina de 4% a 30%, à eritromicina de 0% a 17% e à tilosina de 1% a 17%. A resistência à neomicina e à gentamicina foi insignificante e dois isolados de um dos lotes foram resistentes à ciprofloxacina.

O uso de técnicas moleculares oferece um meio alternativo para a detecção de resistência aos antimicrobianos entre isolados, porém, isso depende de um conhecimento prévio da base genética para essa resistência (ZIRNSTEIN et al., 1999). Uma das vantagens da utilização desses métodos inclui a possibilidade de detecção direta de uma amostra sem a cultura do microrganismo (COCKERILL III, 1999). Todavia, essas técnicas não podem detectar a presença de um novo mecanismo de resistência inesperado (NACHAMKIN et al., 2000), nem medir a resistência separadamente para cada um dos agentes antimicrobianos. Por estas razões, é mais benéfico combinar métodos fenotípicos e genotípicos para os testes de susceptibilidade (MOORE et al., 2006).

2.3. FATORES DE VIRULÊNCIA

A caracterização genética de *Campylobacter* aliada a tipagem molecular tem fornecido importantes informações a respeito das fontes de contaminação, fato este que contribui na aplicação de medidas de controle (COLLES et al., 2008; HUNTER et al., 2009). Além disso, essas informações genéticas são importantes na determinação das habilidades de genótipos específicos para colonizar, causar a doença e sobreviver em condições adversas (HUNTER et al., 2009).

Os três principais mecanismos de produção de doenças das espécies de *Campylobacter* spp. que causam gastroenterite são: adesão, invasão e produção de toxinas (BABAKRANI & JONES, 1993).

Segundo JAWETS et al. (1998), as espécies de *Campylobacter* possuem lipopolissacarídeos (LPS) e flagelos que atuam como estruturas de aderência e invasão sendo capazes de produzir citotoxinas e enterotoxinas. Os microrganismos multiplicam-se no intestino delgado, invadem o epitélio e provocam inflamação, resultando no aparecimento de leucócitos e eritrócitos nas fezes. Eventualmente, a corrente sanguínea é invadida e se observa desenvolvimento de febre entérica. A invasão tecidual localizada associada à atividade tóxica parece ser responsável pela enterite.

Havendo sucesso da fixação e internalização, *Campylobacter* spp. coloniza as células epiteliais por alguns mecanismos que incluem: invasão (RUSSEL et al., 1993), produção de toxinas (WHITEHOUSE et al., 1998) e apoptose (RUSSEL et al., 1993). Algumas bactérias podem translocar o epitélio e se mover para a lâmina própria. Nesse ambiente, a *Campylobacter* spp. pode evitar o ataque pelos fagócitos e entrar no sistema circulatório em pacientes imunodeprimidos (WALLIS, 1994). O ataque pelos fagócitos pode envolver fagocitose, liberação de reações intermediárias e liberação de citotoxinas (JONES et al., 1999).

Campylobacter spp. não possui fímbrias, porém, foi demonstrado que o flagelo e o lipopolissacarídeo (LPS) atuam como adesinas, que permitem a adesão da bactéria à célula epitelial e ao muco intestinal. A forma curva-espiralada e o movimento típico em “saca-rolha” da *Campylobacter jejuni*, assim como, a atração quimiotática que o muco intestinal exerce sobre a bactéria, facilitam o contato desta com o epitélio do intestino. A adesão pode ser inibida experimentalmente por anticorpos específicos antflagelos (FERNANDEZ, 2002).

A habilidade de invasão parece ser cepa dependente e cepas isoladas do ambiente são muito menos invasivas em células HeLa que cepas isoladas de pessoas ou animais (EVEREST et al., 1993).

Vários estudos têm revelado que tanto a adesão quanto a invasão de *Campylobacter* na porção intestinal são dependentes de múltiplos fatores (FRIIS et al., 2005; GILBERT; SLAVIK, 2005; HÄNEL et al., 2004; VAN DEUN et al., 2008),

que envolvem a motilidade, a quimiotaxia, a colonização, a aquisição de ferro e a formação de toxinas (KETLEY, 1997; WASSENAAR; BLASER, 1999). Dados de sequenciamento genômico de várias estirpes revelaram que *Campylobacter* não possui mecanismos homólogos aos clássicos encontrados em bactérias entéricas, como: os de enterotoxinas, adesinas, invasinas e sistemas de secreção de proteínas do tipo III (HU & KOPECKO, 2008). No entanto, vários fatores de virulência foram identificados, como genes associados à aderência e à invasão (HU & KOPECKO, 2008; HÄNEL et al., 2004; ZHENG et al., 2006), além de diferenças na capacidade de aderência e de invasão nas diferentes fases de crescimento (GANAN et al., 2010).

Os genes *flaA*, *ciaB*, *cadF* e *pldA* são classificados como referência no estudo dos mecanismos de patogenicidade de *Campylobacter* (HÄNEL et al., 2004; ZHENG et al., 2006). Esses genes codificam proteínas envolvidas na adesão e na capacidade invasiva de *Campylobacter jejuni* e podem, portanto, ser considerados como possíveis fatores de virulência desta espécie. O gene *flaA*, que codifica flagelina, é necessário para a adesão e invasão de *Campylobacter jejuni* nas células epiteliais (WASSENAAR et al., 1991). 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, participando da colonização da superfície celular (MONTEVILLE et al., 2003). O gene *pldA* está relacionado à invasão celular e codifica uma proteína envolvida na síntese de fosfolipase da membrana externa (ZIPRIN et al., 2001). Vários estudos relataram a presença desses genes em cepas de *Campylobacter jejuni* isoladas de humanos independentemente da origem e da capacidade de adesão e invasão em células Caco-2 (GANAN et al., 2010; ZHENG et al., 2006).

Além desses, a toxina citoletal distensiva tem sido relacionada à patogênese de *Campylobacter jejuni* em infecções humanas e animais (DATTA et al., 2003). Esta toxina afeta as camadas das células epiteliais, causando progressiva distensão e morte em várias linhagens celulares pelo acúmulo intracelular de adenosina monofosfato cíclica (cAMP) (MARTINEZ et al., 2006).

Apesar disso, o processo de colonização, virulência e citotoxicidade não é totalmente compreendido, já que está relacionado com um esforço conjunto de

vários genes sendo expressos por uma complexa rede de genes altamente reguladas (ATACK & KELLY, 2009). Portanto, cuidado deve ser tomado quando se inferir as habilidades de virulência e colonização de *Campylobacter* spp. baseadas na detecção pela reação da polimerase em cadeia (PCR) (HANNING et al., 2010).

A PCR é o método mais conveniente para a determinação de prevalência de genes de virulência, mas a variação evolutiva dos genes, as mutações no local de ligação dos *primers*, bem como a utilização de iniciadores de PCR diferentes, podem contribuir para gerar resultados diferentes a partir de diversos estudos (RIPABELLI et al., 2010).

Além disso, o fenótipo de uma estirpe não pode ser inferido apenas pela presença ou ausência de um gene, já que os níveis de expressão podem variar muito de estirpe para estirpe incluindo fatores importantes, tais como virulência e colonização (PICKETT et al., 1996; GILBERT e SLAVIK, 2004; DEUN et al., 2007).

A capacidade de um microrganismo causar doença é denominada patogenicidade. A diferença entre microrganismos patogênicos e não patogênicos é que os primeiros expressam genes que codificam fatores de virulência responsáveis por colonizar e desencadear eventos que alteram a fisiologia do hospedeiro aparecendo assim, a doença (BONITA et al., 2010).

A presença dos transcritos do gene *dnaJ* indica que a cepa codifica uma proteína do choque térmico, que permite à bactéria crescimento em temperatura superiores a 40°C e seja termotolerante (KONKEL et al., 1998). A presença dos transcritos do gene *ciaB* é importante já que a secreção da proteína *ciaB* é de grande relevância para invasão tanto em células epiteliais como na mucosa intestinal (KONKEL et al., 1999; ZIPRIN et al., 2001).

2.4. INVASIVIDADE EM CÉLULAS Caco-2

A linhagem de células Caco-2 corresponde a um adenocarcinoma de cólon humano que tem sido bem caracterizada para utilização como um sistema modelo para o transporte do epitélio intestinal. Essas células desenvolvem morfologia enterocítica após seis dias de cultura, caracterizada pela formação de uma borda em escova contendo numerosas microvilosidades e a presença de oclusão na superfície

apical. Uma monocamada de células colunares, totalmente diferenciadas, é observada entre o 16º e 22º dia de cultura (HIDALGO et al., 1989).

C. jejuni são capazes de invadir o trato gastrointestinal e danificar grande parte das células epiteliais colunares do cólon em condições *in vivo* (RUSSELL et al., 1993). As células invadidas ficam inchadas e arredondadas, indicando mudanças na regulação do transporte de íons, provavelmente devido à produção de citotoxina ou enterotoxina e hemolisina. Os resultados das biópsias intestinais em humanos e modelos animais experimentais mostram invasão similar, característica de *C. jejuni*, resultando em necrose do epitélio e infiltração de neutrófilos e monócitos (BLACK et al., 1988; RUSSELL et al., 1989). Esses modelos experimentais têm sido muito úteis na definição da natureza das interações patógeno-hospedeiro durante a infecção bacteriana (FRIIS et al., 2005).

Estudos sobre interações patógeno-hospedeiro *in vitro* geralmente usam as culturas de origem epitelial que não são polarizadas. Em contrapartida, o epitélio da mucosa é altamente polarizado com membranas apicais e membrana basolateral de interface com as células da lâmina própria. As membranas apicais e basolateral também são bioquimicamente distintas no que diz respeito às funções de transporte e localização celular de componentes de superfície, como os receptores *like-tool* (BACKHED & HORNEF, 2003; GEWIRTZ et al., 2001; MOSTOV et al., 2000). Assim, o uso de modelos de células polarizadas, como as Caco-2, é essencial para estudar os efeitos sobre a permeabilidade microbiana da membrana celular, os mecanismos transcitose e a invasão celular (MCCORMICK, 2003), o que facilita a comparação das características de invasão de diferentes estirpes de *Campylobacter* e mutantes (FRIIS et al., 2005).

2.5. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2000), *Campylobacter* pode provocar uma série de doenças no homem, como gastroenterite, sepse, aborto, meningite, abscessos e complicações como a Síndrome de Guillain-Barré.

O principal sintoma da campilobacteriose é uma diarreia líquida, com muco, contendo sangue (geralmente oculto) e leucócitos fecais. Outros sintomas são:

febre, dor abdominal, náusea, dor de cabeça e dores musculares. A maior parte das infecções são autolimitantes e não necessita de tratamento com antibiótico (WHO, 2000). Casos fatais são raros em indivíduos saudáveis, mas costumam ocorrer em pacientes com sistema imunológico comprometido como aqueles acometidos com câncer, ou outras doenças debilitantes (MOORE et al., 2005).

A SGB é uma paralisia aguda ascendente, simétrica, levando a uma paresia flácida, que ocorre aproximadamente 30 vezes em cada 100.000 casos de campilobacteriose e a taxa de letalidade aproxima-se de 10% (NACHANKIN et al., 1998; McCARTHY & GIESECKE, 2001). Segundo KUITWAARD et al. (2008) a SGB é uma poliradiculoneurite aguda que conduz a uma paresia flácida e ainda uma doença heterogênea na qual aproximadamente dois terços dos pacientes relatam uma infecção precedente, como diarreia ou uma infecção do trato respiratório.

Estudos mostram a associação entre *C. jejuni* e a Síndrome Paralítica Chinesa, mais recentemente denominada de neuropatia axonal motora. Segundo NACHANKIN et al. (1998) outra possível doença auto-imune humana decorrente da infecção por *Campylobacter jejuni* é a síndrome de Fisher (MFS) e síndrome de Reiter's ou artrite reativa.

Segundo REINA (1993), estudos epidemiológicos comprovaram a existência de cepas de *Campylobacter* com graus distintos de patogenicidade e diferentes respostas do hospedeiro à infecção. Muitas cepas podem invadir as células epiteliais, provocando reações inflamatórias (infiltrados) na lâmina própria e abscessos nas criptas intestinais com aparecimento de leucócitos e eritrócitos nas fezes. Podem atravessar a mucosa e proliferar na lâmina própria e gânglios (infecções extra-intestinais) sendo que na maioria dos casos a ação inibitória do soro impede bacteremias.

Campylobacter jejuni tem sido isolada das fezes de pacientes humanos com quadros agudos de diarreia, e também contribui com aparecimento de uma pós-infecção traumática que evolui para uma neuropatia imunomediada como a SGB, entre outras (LAMHONWAH et al., 2005). MARIDOR et al. (2008) descreve este microrganismo como importante agente de gastroenterites em humanos. Crianças menores de cinco anos e adultos jovens entre 15 e 29 anos são mais afetados (WHO, 2000; FRIEDMAN et al., 2004; SILVA et al., 2007). FRIEDMAN et al. (2004)

ressaltam também que os indivíduos com imunossupressão podem desenvolver sintomas severos e prolongados da doença.

2.6. EPIDEMIOLOGIA

2.6.1. *Campylobacter jejuni* em carcaças de frangos

O consumo de alimentos de origem animal contaminados é a principal fonte de doenças gastrointestinais em humanos. Nos Estados Unidos, estima-se que anualmente 76 milhões de pessoas sejam acometidas por algum tipo de doença de origem alimentar, levando a 325.000 hospitalizações e 5.200 mortes (FDA, 2002).

Na Europa, a prevalência de *Campylobacter* spp. foi de 75,8%, o que significa que em média cerca de oito de cada 10 carcaças de frangos de corte estavam contaminadas. A nível de espécie, as mais prevalentes foram *C. jejuni* e *C. coli*, com 51,0% e 35,5%, respectivamente. A proporção de amostras consideradas negativas quantitativamente, ou seja, abaixo do limiar de 10 UFC/g, variaram de 3,8% para 98,6% entre os países europeus, enquanto a proporção de amostras com contagens muito altas, acima de 10.000 UFC/g variaram de 0% a 31,9% (EFSA, 2010).

No Brasil, os poucos estudos presentes demonstram elevada prevalência de *Campylobacter* sp. AQUINO et al. (2002) isolaram *C. jejuni* e *C. coli* em 60% das amostras de carcaça de frango analisadas e KUANA et al. (2008), em 99% das carcaças estudadas. FRANCHI et al. (2007) avaliaram 335 amostras de carcaças de frangos, água e equipamentos de diferentes pontos da linha de abate, e encontraram positividade em 71,3% das amostras.

C. jejuni e *C. coli* são reconhecidas como os primeiros agentes de diarreia nos países industrializados e segundo ou terceiro nos subdesenvolvidos, sendo sua transmissão principalmente associada ao consumo de alimentos de origem animal (FERNANDEZ et al., 2005). A relevância aplicada nesse contexto está relacionada à prevalência de *Campylobacter* spp. no trato gastrointestinal de frangos e suas carcaças (JORGENSEN et al., 2002), cuja frequência e os níveis de contaminação têm sido correlacionados com casos de gastroenterites em humanos (KRAMER et al., 2000). Esta correlação decorre da colonização de *Campylobacter* de forma

assintomática nesses animais, sendo esta a origem mais importante de contaminação das carcaças (BUHR et al., 2002).

As elevadas taxas de isolamento de *Campylobacter* spp. em carne de frangos caracterizam este alimento como uma importante fonte de infecção aos humanos (HUMPHREY et al., 2007). Segundo ABU-RUWAIDA (1994), os níveis de contaminação por *Campylobacter* em carcaças de frango variam durante o processo industrial de abate e os maiores níveis são detectados durante a escaldagem e retirada das penas, não se alterando após a evisceração. Este mesmo autor relatou que o número de carcaças contaminadas por *Campylobacter* spp. aumentou durante a escaldagem (1,5 log10), o que indica possível contaminação cruzada nesta etapa. A aspersão de água subsequente reduziu as contagens de *Campylobacter* em 1,0 log10, contudo, altas contagens foram encontradas nas carcaças ou produtos finais, representando risco para a saúde dos consumidores.

Quando um lote de frangos abatidos contaminados por *Campylobacter* entra na planta processadora, é provável que uma grande quantidade do agente já esteja aderida, ou seja, transferida para a pele durante a retirada das penas. Entretanto, a probabilidade de as células de *Campylobacter* sobreviverem a uma temperatura de 58°C por dois minutos é questionável. Os autores sugeriram que o aumento de *Campylobacter* na pele do peito do frango ocorre no momento da retiradas das penas, em virtude da eliminação das bactérias pela cloaca, a qual é facilitada pela insensibilização elétrica das aves (BERRANG et al., 2010).

De acordo com YANG et al. (2001), as carcaças e os produtos de aves são freqüentemente veículos de *Campylobacter*, sendo que a incidência em carcaças é afetada principalmente pelas condições do processo da escalda e do *chiller*. Nesse sentido, WEMPE et al. (1983) isolaram *C. jejuni* em 94,4% das amostras de água na escalda e na depenadeira, onde a contaminação cruzada ocorreu também pelos dedos de borracha, passando o agente de ave para ave. A despeito disso, esses mesmos autores reforçam que os processos da escaldagem e depenagem podem remover o microrganismo e reduzir seu número nas partes comestíveis do frango.

A redução da colonização de *Campylobacter* em lotes de frangos de corte é de suma importância para a qualidade microbiológica da carcaça fresca ou refrigerada para consumo (HALD et al., 2000). Há a necessidade de medidas

específicas de controle, tanto na granja como na indústria, para se obter uma maior redução da contaminação nas carcaças por *Campylobacter* (STERN, 2001).

WEMPE et al. (1983) obtiveram resultados que variaram entre 0% a 100% de colonização por *Campylobacter* em conteúdo cecal, indicando que há um considerável grau de variabilidade entre os lotes abatidos. WHYTE et al. (2001) demonstraram a necessidade de segregação física entre a área suja e limpa dentro de plantas de abate. Os autores encontraram *Campylobacter* em amostras de ar numa frequência que variou de 46,7% a 70% na área de escalda e depenadeira e 6,7% a 70% nas áreas de evisceração.

Uma avaliação de carcaças procedentes de lotes monitorados na granja um dia antes do abate comparou os resultados obtidos em 1995 e 2001, obtendo contagens de *Campylobacter* menores nas coletas de 2001, o que foi atribuído à implantação na indústria do Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC/HACCP) (STERN & RO BACH, 2003). Citam-se o aumento do volume de água utilizado por carcaça (de 20 L para 36 L) e a imersão no *chiller* contendo 40 a 50 ppm de cloro, o que em 1995 não era praticado. O benefício dessas intervenções no processamento das aves foi associado aos dados de redução de casos de campilobacteriose em humanos, encontrados pelo *Centers for Disease Control* (CDC), nos EUA (ALTEKRUSE et al., 1999).

MODOLO et al. (2005) pesquisaram a presença de *Campylobacter* spp. em carcaças de frangos comercializadas nas regiões central e periférica de Botucatu – São Paulo, Brasil. Os autores encontraram 72% de positividade nas amostras coletadas em estabelecimentos de regiões centrais daquela cidade. Nas regiões periféricas, o índice foi de 22%. As proporções de isolamento nas carcaças foram respectivamente 38% e 12,5% nas regiões centrais e periféricas. Também no Brasil, AQUINO et al. (2002) pesquisaram a presença de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango e a frequência de isolamento foi 60% (37/62), sendo as prevalências de *C. jejuni* e *C. coli* praticamente iguais (aproximadamente 30% cada).

2.6.2. Saúde Pública

Em países desenvolvidos, *Campylobacter* spp. é reconhecida como a causa

mais comum de diarreia em humanos (MALAKAUSKAS et al., 2005; EFSA, 2009). Segundo MALAKAUSKAS et al. (2005), na Dinamarca, o número de casos mais que quadruplicou nos últimos anos com registros de 82 casos de infecção por 100.000 habitantes em 2002, e a mesma tendência é observada em outros países industrializados. *C. jejuni* é responsável por 80-90% das infecções em humanos, enquanto *C. coli* é observada em 7% e *C. lari*, *C. hyointestinalis* e *C. upsaliensis* somente em 1% dos casos humanos (NESBAKKEN et al., 2003). Porcentagens de 90% para *C. jejuni* e 10% de *C. coli* como agentes etiológicos são relatadas por GILLESPIE et al. (2002).

A infecção por *Campylobacter* causadoras de gastroenterite acontece por via oral e por contato com animais infectados (KAPPERUD et al., 2003). São considerados fontes de infecção para o ser humano, o contato direto com animais portadores e o consumo de água e alimentos de origem animal contaminados, principalmente a ingestão de carnes cruas ou mal processadas de aves, suínos e bovinos, e de leite não pasteurizado (MARIDOR et al., 2008). A dose infectante é baixa, estimando-se que a ingestão de 400-500 células possa provocar a doença (ANON, 1993). Em humanos a doença provocada por *Campylobacter* é chamada campilobacteriose e possui período de incubação de dois a cinco dias, com duração de sete a 10 dias (ANON, 1993).

REIERSEN et al. (2002) citam que na Islândia, a incidência de *Campylobacter* spp. em humanos atingiu proporções epidêmicas entre junho de 1998 e março de 2000. Entre 1990 a 1995, a incidência foi de 14,6 casos/100.000 indivíduos/ano. A partir de 1996, os casos começaram a aumentar chegando a 157 casos/100.000 indivíduos no ano de 1999. Em 2000 e 2001, houve uma queda (87,1 e 75,4 casos/100.000 indivíduos, respectivamente). Os autores sugerem que a maior positividade de 1996 a 1999 pode ser atribuída à mudança na legislação do país no ano de 1996, quando a carne de frango passou a ser comercializada “fresca”, juntamente com o aumento do consumo *per capita*. Com a alta incidência em 1999, no ano de 2000 o país implantou medidas de controle e com isso, os índices diminuíram.

O índice de infecção em humanos por *Campylobacter* spp. nos Estados Unidos, é estimado em 2,1 e 2,4 milhões de pessoas por ano, com a infecção

relacionada principalmente, à ingestão de carne de frango (MEAD, 1995). Segundo o CDC (2012), naquele país, *Campylobacter* é a maior causa de diarreia bacteriana, com um milhão de casos documentados anualmente ocorrendo como eventos isolados, na sua maioria, e esporádicos.

Em 2007, a campilobacteriose foi a doença zoonótica mais freqüente relatada em humanos na União Européia com 200.507 casos confirmados, sendo que a maioria dos países europeus apontam ainda, aumento nestes números (EFSA, 2009).

Há uma resistência à infecção por *Campylobacter* spp. em grupos de indivíduos com hábitos alimentares de alto risco, que se expõem ao agente várias vezes, como o que ocorre em países em desenvolvimento. Nestas condições, em que as oportunidades de infecção e reinfecção são maiores, há altos títulos de imunoglobulinas anti-*Campylobacter* em indivíduos portadores e não portadores (BLASER et al., 1987).

Em um estudo realizado no Egito, um país endêmico para a campilobacteriose, onde os moradores são repetidamente expostos, foram encontradas altas taxas de diarreia e grande produção de anticorpos contra vários sorotipos de *Campylobacter* nos pacientes, principalmente em crianças (WIERZBA et al., 2008).

O intestino de mamíferos e aves domésticas ou silvestres é caracterizado como o maior reservatório de *Campylobacter* spp. Porém, é difícil associar este agente como causa de enfermidade diarreica em animais, já que se encontram também altas taxas de isolamento em animais clinicamente sadios (MALBRAN, 2001).

FERNANDEZ et al. (2005) sorotipificaram 50 espécimes de *C. jejuni* subsp. *jejuni* isoladas de carcaças de frango e 50 espécimes isolados de fezes de crianças e encontraram 17 sorotipos diferentes e seis idênticos. A alta percentagem de sorotipos sem nenhuma similaridade sugere que no sul do Chile, não somente a carne de ave é veículo de *C. jejuni* subs. *jejuni* em humanos, mas outras fontes ou reservatórios não identificados estão envolvidos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Desenho do estudo

Foram realizadas 21 coletas de carcaças de frangos resfriadas e congeladas nos períodos de junho de 2011 a fevereiro de 2012. Em cada coleta foram amostrados 20 animais criados e abatidos em três regiões distintas, correspondentes aos estados de Minas Gerais, Distrito Federal e Goiás, totalizando 420 amostras. As amostras foram adquiridas de frigoríficos sob inspeção federal cujos produtos são comercializados em todo território brasileiro, tanto para o consumidor final quanto para empresas, na forma de produtos institucionais. A carne produzida também é exportada para países como Arábia Saudita, China, Emirados Árabes e Malásia, além da África do Sul e Oriente Médio.

Todas as amostras foram identificadas quanto à data, local de isolamento e condição da amostra (resfriada ou congelada). Nas amostras que possuíam colônias típicas confirmadas no método de coloração de Gram foram identificadas as espécies *C. jejuni* e *C. coli* por PCR-multiplex. Ambas as espécies, assim como as identificadas somente como *Campylobacter* spp. foram comparados quanto à similaridade por meio da técnica de RAPD-PCR e verificada sua sensibilidade aos antimicrobianos pelo teste de difusão em discos. Todas as estirpes foram avaliadas quanto à presença de genes de virulência.

Em *C. jejuni* e *C. coli* que possuíam genes de virulência foi verificada a expressão de transcritos associados à virulência. A transcrição dos genes de virulência foi verificada por meio da RT-PCR (*reverse transcription-polymerase chain reaction*).

Por fim, foram selecionadas estirpes de *C. jejuni* que possuíam genes de virulência, mas não expressaram na RT-PCR, para inoculação em células intestinais de origem humana (Caco-2) para verificar a possível capacidade de transcrição. Além disso, as cepas que apresentaram o maior somatório de fatores de patogenicidade foram testadas quanto à capacidade de promover alterações morfológicas, como a perda de confluência e a distensão das células Caco-2.

3.2. Processamento das amostras e isolamento de *Campylobacter* spp.

O processamento das amostras foi conduzido no Laboratório de Epidemiologia Molecular da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia. Todos os procedimentos foram conduzidos em paralelo com cepas controle de *Campylobacter jejuni* (ATCC 33291; IAL 2383; NCTC 11351), e de *C. coli* (ATCC 43478).

As carcaças amostradas foram selecionadas aleatoriamente e recolhidas manualmente usando luvas de látex. As carcaças inteiras foram colocadas individualmente em sacos de plástico estéreis contendo 400 mL de água peptonada 0,1% (Difco®) estéril. Após, as amostras foram submetidas a um processo de agitação e massageamento durante 60 segundos, sendo a massagem mais vigorosa no pescoço, axila, peito e virilha do animal. Após a retirada das carcaças, o produto das lavagens foi acondicionado em caixas de isopor e transportado ao laboratório para posterior processamento.

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

De cada amostra (produto da lavagem da carcaça em água peptonada) foi pipetado um volume de 30 mL e adicionado a 30 mL de caldo Bolton (Oxoid®) em dupla concentração suplementado com 5% de sangue eqüino hemolisado e mistura antibiótica (10,0mg de cefoperazona, 10,0mg de vancomicina, 10,0mg de trimetoprim e 25,0mg de cicloheximida). Após incubação em atmosfera de microaerofilia (5% a 15% de oxigênio e 10% de gás carbônico) (Probac do Brasil®) a 37°C por 44 horas $\pm$ 4 horas, as amostras foram semeadas em ágar *Campylobacter Blood-Free Selective Medium (Modified CCDA- Preston)* (Oxoid®) adicionado do seu suplemento antibiótico (16mg de cefoperazona e 32mg de anfotericina B) (Oxoid®).

Para reduzir a contaminação, as placas foram encobertas por membrana filtrante de celulose com poros de 0,45 μ m (Millipore®) e sobre ela foi pipetada uma alíquota de 300 μ L da amostra pré-enriquecida. As placas ficaram em repouso por 30 minutos ou até que todo conteúdo da membrana fosse filtrado. Após a retirada da membrana as placas foram incubadas a 37° C por 44 horas $\pm$ 4 horas em atmosfera microaerofilia (Figura 1).

Colônias com morfologia suspeita de pertencerem ao gênero *Campylobacter* foram subcultivadas para isolamento e confirmadas por coloração de Gram modificada (uso da carboxifuccina substituindo a safranina).

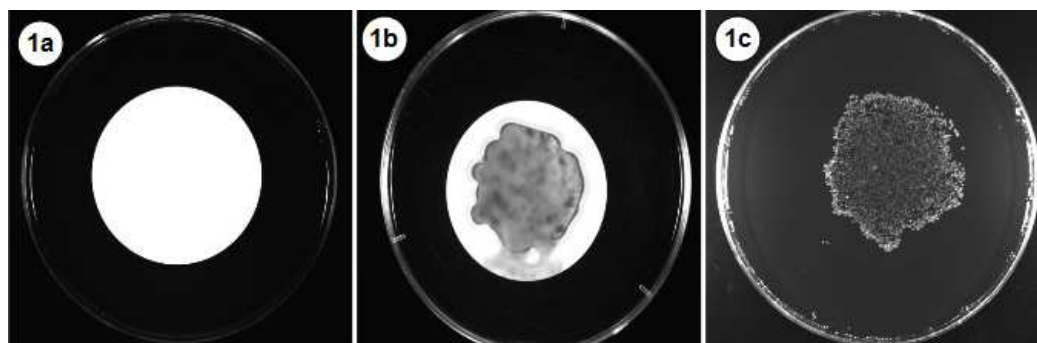


Figura 1: Processamento das amostras nas placas. 1a- Membrana filtrante na placa de CCDA. 1b- Amostra sendo filtrada. 1c- Crescimento de colônias típicas de *Campylobacter* spp. após incubação.

3.3. Identificação de *Campylobacter jejuni* e *C. coli*

A identificação genotípica das espécies *C. jejuni* e *C. coli* foi realizada por PCR multiplex.

Para a extração do DNA e a realização do PCR foi utilizado o kit DuPont™ PCR Reagent, que contém reagentes para extração do DNA (tampão fosfato e protease) e para a amplificação da sequência alvo do DNA (microtubos contendo tabletes com o $MgCl_2$, DNTPs e Taq-DNA polimerase) utilizados para qualquer reação de PCR. Os procedimentos foram realizados de acordo as orientações do fabricante.

Após o isolamento das cepas, retirou-se dez colônias de cada amostra e estas foram colocadas em tubos contendo 2mL de solução de NaCl 0,85% (Synth®). Após homogeneização em vortex (Phoenix®) por dois minutos, uma alíquota de 5µL da amostra foi transferida para microtubos (Bioexpress, USA), adicionado 200µL de solução de protease em tampão fosfato (DuPont™ PCR Reagent) e a mistura foi aquecida a 37°C por 20 minutos. Posteriormente, a mistura foi aquecida a 95°C por 10 minutos em termociclador (Eppendorff®) transferida para bloco de resfriamento (2°C a 8°C) durante 5 minutos, para obtenção do DNA.

O preparo da reação PCR constou de 19µL do tampão fosfato (DuPont™

PCR Reagent); 20 picomoles do *primer* C1 e C4 (Invitrogen®) e 40 picomoles de pg3 e pg50 (Invitrogen®) (Tabela 1) e 25µL do DNA foram transferidos para os tubos de PCR contendo dNTPs, a Taq-DNA polimerase e demais reagentes necessários para a PCR (DuPont™ PCR Reagent).

Tabela 1: *Primers* utilizados na identificação de *C. jejuni* e *C. coli*.

Gene	Primers	Sequência 5' → 3'	Peso molecular (pb)	Referência
<i>flaA</i>	pg 3	GAACCTGAACCGATTTG	460 (<i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>)	Harmon et al. (1997)
	pg 50	ATGGGATTTCGTATTAAC		
I	C1	CAAATAAAGTTAGAGGTAGAATGT	160 (<i>C. jejuni</i>)	Harmon et al. (1997)
	C4	GGATAAGCACTAGCTAGCTGAT		

I: indeterminado.

Os tubos foram transferidos para o termociclador (*Eppendorf*®) para amplificação, obedecendo aos seguintes ciclos: 1 ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 4 minutos; 25 ciclos de amplificação, constituídos de 3 etapas: desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 47°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; completando com mais 1 ciclo de extensão final a 72°C por 7 minutos (HARMON et al., 1997).

Os produtos amplificados (8µL) foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5%, utilizando o tampão de corrida TBE 0,5x (Invitrogen®) e como padrão de peso molecular o marcador de 100pb (Invitrogen®). Os géis de agarose (Afllymetrix®) foram corados pela solução de SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen®) e visualizados sob luz UV, no transiluminador (Loccus Biotecnologia) após 90 minutos de corrida do gel à 100W de potência, 100V de voltagem e 100A de corrente elétrica.

Em paralelo à prova genotípica, foi realizada a confirmação fenotípica de *Campylobacter jejuni* por meio da prova da hidrólise do hipurato de sódio (SILVA et al., 2007). Uma alçada com inóculo pesado da cultura foi adicionada a 0,4 mL de solução de hipurato de sódio (Inlab®) e a mistura incubada a 37°C por 4 horas em estufa e depois adicionada de 0,2 mL de solução de ninidrina (Nuclear®). Após reincubação por 10 minutos foi realizada a leitura. *C. jejuni* é capaz de hidrolisar o

hipurato.

3.4. Identificação de *Campylobacter* spp.

As cepas isoladas que não foram identificadas como *C. jejuni* ou *C. coli* foram submetidas a PCR a fim de confirmar se pertenciam ao gênero *Campylobacter* spp. A técnica foi realizada conforme descrito por LINTON et al., 1997. A Tabela 2 indica a sequência do *primer* utilizado.

Tabela 2: *Primer* utilizados na identificação de *Campylobacter* spp.

Gene	<i>Primer</i>	Sequência 5' → 3'	Peso molecular (pb)	Referência
16S rRNA	16S rRNA-F	ATCTAATGGCTTAACCATTAAAC	857	Linton et al. (1997)
	16S rRNA-R	GGACGGTAACTAGTTTAGTATT		

A reação foi feita com um volume final de 30μL, sendo composta por 30ng do DNA extraído, 10mM de Tris-HCL; 50mM de KCl; 2,5mM de MgCl₂ e 0,25U de Taq DNA polimerase; 200μM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (DNTP) e 40 picomoles do *primer* (Invitrogen®).

A amplificação foi realizada em termociclador (Eppendorff®) conforme os ciclos: 1 ciclo inicial a 94°C por 1 minuto; 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).

A visualização dos produtos amplificados (8μL) foi feita nas mesmas condições do item 5.3. com utilização de 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®).

3.5. Antibiograma

As cepas isoladas foram submetidas ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos pelo método de difusão em disco, utilizando protocolo recomendado

pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2010). A preparação e padronização dos inóculos foram realizadas seguindo o método de suspensão direta das colônias. Foram selecionadas 10 a 15 colônias puras e transferidas para tubos contendo 2mL de solução de NaCl 0,85% (Synth®). A turbidez foi ajustada e comparada à da solução padrão de MacFarland a 0,5, correspondente a aproximadamente de 10^8 UFC/mL. Em seguida, os inóculos foram semeados com auxílio de suabes estéreis em toda a superfície do ágar Mueller Hinton (MH) (Difco®) acrescido de 5% de sangue equino. As placas permaneceram no fluxo laminar por 5 a 15 minutos, à temperatura ambiente, para que o inóculo fosse completamente absorvido pelo ágar antes da aplicação dos discos. Após absorção, foram adicionados os seguintes discos de antimicrobianos: amoxicilina (10µg), eritromicina (15µg), gentamicina (10µg), neomicina (30µg), norfloxacin (10µg), sulfazotrim (25µg) e tetraciclina (30µg) (Laborclin®).

A incubação foi feita em atmosfera de microaerofilia (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂) (Probac do Brasil®) a 37°C por 48 horas, em seguida foram medidos os diâmetros dos halos de inibição (em milímetros). Seguindo os critérios de interpretação dos diâmetros dos halos foram liberados os resultados da classificação do microrganismo como sensível (S), intermediário (I) ou resistente (R) ao antimicrobiano testado (Figura 2).

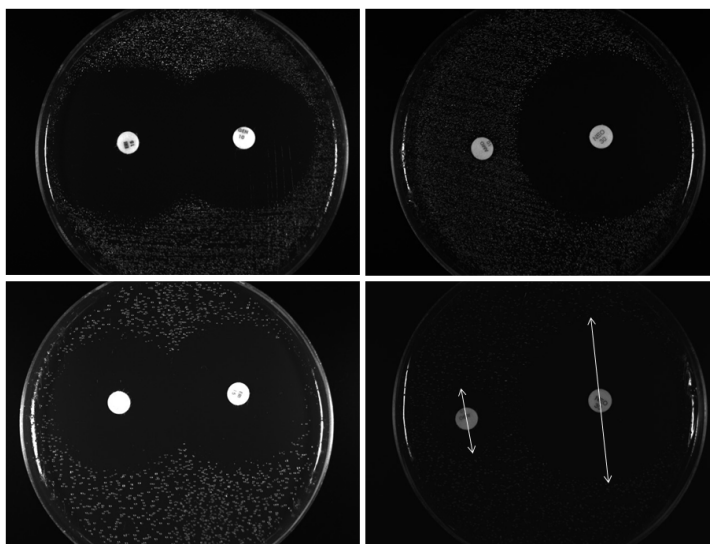


Figura 2: Halos de inibição apresentados por quatro diferentes estirpes de *Campylobacter* spp. isoladas de frangos. As setas indicam o diâmetro dos halos formados na placa.

3.6. Fatores de virulência

Os pares de iniciadores descritos na Tabela 3 foram utilizados na análise dos fatores de virulência relacionados à aderência e à invasão celular. O protocolo utilizado foi o descrito por (ZHENG et al., 2006).

O DNA extraído para a realização da PCR-multiplex também foi utilizado para a análise dos fatores de virulência. O volume final para a reação de amplificação (50µL) foi composto por 20ng da solução de DNA bacteriano e pelos reagentes: 10mM de Tris-HCL; 50mM de KCl; 200µM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (dNTP); 5,5mM de MgCl₂; 30 picomoles para cada *primer* e 1,25U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®). Cada gene foi estudado separadamente nas reações.

Tabela 3: *Primers* para identificação dos genes de virulência *flaA*, *pldA*, *cadF* e *ciaB* em *Campylobacter* spp.

Genes	Primers	Sequência 5' → 3'	Tamanho (pb)	Referência
<i>flaA</i>	<i>flaA</i> -F	ATGGGATTTCGTATTAACAC	1728	Hänel et al. (2004)
	<i>flaA</i> -R	CTGTAGTAATCTTAAACATTTTG		
<i>pldA</i>	<i>pldA</i> -361	AAGAGTGAGGCGAAATTCCA	385	Zheng et al. (2006)
	<i>pldA</i> -726	GCAAGATGGCAGGATTATCA		
<i>cadF</i>	<i>cadF</i> I-F2B	TTGAAGGTAATTTAGATATG	400	Zheng et al. (2006)
	<i>cadF</i> I-R1B	CTAATACCTAAAGTTGAAAC		
<i>ciaB</i>	<i>ciaB</i> I-652	TGCGAGATTTTTCGAGAATG	527	Zheng et al. (2006)
	<i>ciaB</i> I-1159	TGCCCGCCTTAGAACTTACA		

O controle positivo de *C. jejuni* (NCTC 11351) foi usado em todas as reações de amplificação, bem como um controle negativo, composto por água ultrapura estéril, adicionada à mistura de reação, em substituição ao DNA.

A amplificação foi realizada em termociclador (Eppendorff®), obedecendo aos seguintes ciclos: 1 ciclo 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 a 72°C por 2 minutos; completando com mais 1 ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos (ZHENG et al., 2006). A separação e a visualização dos produtos amplificados foi realizada utilizando a mesma técnica

descrita para a PCR-multiplex.

3.7. Detecção dos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* associados a toxina de distensão celular

A partir do DNA das estirpes de *Campylobacter* spp., foi realizada a técnica de Multiplex-PCR com os *primers* descritos na Tabela 4, conforme descrito por MARTÍNEZ et al. (2006).

O volume final para a reação de amplificação foi de 25µL, sendo composto por 80ng da solução de DNA bacteriano e pelos reagentes: 10mM de Tris-HCL; 50mM de KCl; 200µM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (DNTP); 3,0mM de MgCl₂; 20 picomoles para cada primer e 2U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®). A cada reação foi acrescentado 1 µL de óleo mineral (Farmax®) a fim de evitar a perda de reagentes durante a amplificação. A PCR-Multiplex permitiu a análise de todos os genes de forma conjunta.

Tabela 4: *Primers* para detecção dos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* em *Campylobacter* spp.

Genes	Primers	Sequência 5' → 3'	Tamanho (pb)	Referência
<i>cdtA</i>	cdtA-F	CTATTACTCCTATTACCCACC	422	Martinez et al. (2006)
	cdtA-R	AATTGAACCGCTGTATTGCTC		
<i>cdtB</i>	cdtB-F	AGGAACCTTACCAAGAACAGCC	531	Martinez et al. (2006)
	cdtB-R	GGTGGAGTATAGGTTTGTGTC		
<i>cdtC</i>	cdtC-F	ACTCCTACTGGAGATTTGAAAG	339	Martinez et al. (2006)
	cdtC-R	CACAGCTGAAGTTGTTGTTGGC		

A amplificação foi feita em termociclador (Eppendorff®), com as seguintes etapas: 1 ciclo inicial 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.

A separação e a visualização dos produtos amplificados foi realizada em gel de agarose a 1,5% (Affymetrix®) de solução TBE a 0,5 vezes (Invitrogen®) e corados com sybr safe DNA stain (Invitrogen®), utilizando marcador de peso

molecular de 100pb (Invitrogen®). A visualização das bandas formadas foi possível através de transiluminador (Loccus Biotecnologia®), conforme o item 5.3.

As análises foram realizadas com controle positivo de *Campylobacter jejuni* (NCTC 11351) e controle negativo composto por água ultrapura no lugar do DNA.

3.8. Expressão dos transcritos

A verificação da expressão dos genes de virulência foi realizada nas cepas de *Campylobacter* spp. que possuíam pelo menos um gene de virulência. Para esta análise, foram utilizados os pares de iniciadores descritos na Tabela 5 e o protocolo de acordo com Li et al. (2008).

Para a obtenção do RNA, cada um dos isolados foi semeado em quatro placas de CCDA (Oxoid®) pelo método de preenchimento. Após o crescimento em atmosfera de microaerofilia por 48 horas a 37°C, todas as colônias formadas nas placas foram transferidas para microtubos contendo 2mL de solução NaCl 0,85% (Synth®) e realizados os procedimentos para a extração do RNA. A mistura foi centrifugada (Cientec®) a 12.000g por dez minutos a 4°C. O *pellet* resultante foi acrescido de 1mL de Trizol (Invitrogen®) e homogeneizada em *vortex* (Phoenix®) até que o *pellet* fosse dispersado na solução. Posteriormente, adicionou-se 200µL de clorofórmio (Isofar®) e repetiu-se o mesmo procedimento de homogeneização em *vortex* (Phoenix®).

Tabela 5: Primers para verificar a expressão dos transcritos *ciaB* e *dnaJ* entre os isolados de *C. jejuni* e *C. coli* que possuem genes de virulência.

Genes	Sequência 5' → 3'	Peso molecular (pb)	Referência
<i>ciaB</i>	ATATTTGCTAGCAGCGAAGAG GATGTCCCACTTGTAAGGTG	157	Li et al. (2008)
<i>dnaJ</i>	AGTGTGCGAGCTTAATATCCC GGCGATGATCTTAACATACA	117	Li et al. (2008)

Em seguida, a solução foi centrifugada (Cientec®) a 12.000g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa de cada microtubo foi então transferida para novo microtubo, seguida pela adição de 500µL de isopropanol (Dinâmica®) e homogeneização em

vortex (Phoenix®). Os microtubos foram centrifugados a 12.000g por 10 minutos a 4°C e removidos os sobrenadantes.

Foi adicionado 1mL de etanol 75% (Dinâmica®) ao *pellet* formado e homogeneizado através do *vortex* (Phoenix®), posteriormente as amostras foram centrifugadas (Cientec®) a 7.500g por 5 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram removidos e os *pellets* de RNA foram secados por 5 minutos a temperatura ambiente e diluídos em 20µL de água DEPC (Invitrogen®).

A quantificação do RNA foi feita através do aparelho Nanodrop (Thermo Scientific®) em comprimento de onda de 230nm, observando sempre a relação 260/280 a fim de verificar a integridade do RNA (relação entre 1,8-2,0).

A transcrição reversa foi realizada para cada amostra, utilizando 1µg de RNA total (200ng/µL), 10 U de inibidor de RNase, 40 U de MMLV-RT (*Amersham Biosciences*), 1X de Tampão da MMLV-RT (*Amersham Biosciences*), 200 µM de dNTPs (dGTP, dATP, dTTP e dCTP) e 126 pmoles de oligonucleotídeos hexâmeros como *primers* randômicos (Invitrogen®). O volume final de cada reação foi completado para 20 µL com água tratada com DEPC (Invitrogen®). A solução foi colocada em termociclador (Eppendorf®) a 37°C por uma hora. Reações controle foram realizadas para a verificação de possíveis contaminantes exógenos. O cDNA foi estocado a -20°C para posterior amplificação.

Após a transcrição do RNA, 3 µL do cDNA foi utilizado em um volume final para a reação de amplificação de 25µL, composto por: 0,625U de Taq DNA polimerase, 5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs e 4 picomoles de cada *primer* (Invitrogen®). Cada gene foi estudado separadamente nas reações.

O controle positivo de *C. jejuni* (NCTC 11351) foi usado em todas as reações de amplificação, bem como um controle negativo, composto por água ultrapura estéril, adicionada à mistura de reação, em substituição ao DNA alvo.

A amplificação foi realizada em termociclador (Eppendorf®), obedecendo aos ciclos: 1 ciclo inicial a 94°C por 3 minutos; 45 ciclos de amplificação em 3 etapas: desnaturação a 94°C por 15 segundos, anelamento a 51°C por 20 segundos e extensão a 72°C por 20 segundos; completando com mais 1 ciclo de extensão final a 72°C por 3 minutos.

A separação dos produtos amplificados (8µL) foi feita em 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 50pb (Invitrogen®). Os géis de agarose foram corados e visualizados conforme o previsto no item 5.3.

3.9. Capacidade de expressão de virulência em células Caco-2

Após a verificação da expressão da virulência das estirpes, analisou-se 14 cepas de *C. jejuni* que possuíam pelo menos três genes de virulência, mas que não foram capazes de transcrever pela RT-PCR. Dessa forma, para verificar a possível expressão *in vitro*, estas cepas foram inoculadas em culturas de células Caco-2 (BCRJ:CR069) do banco de células do Rio de Janeiro.

As células Caco-2 são oriundas de adenocarcinoma de cólon humano primeiramente isoladas e cultivadas *in vitro* em 1977 por PINTO et al. (1983). Essa célula apresenta capacidade de diferenciação espontânea em cultivo *in vitro* expressando muitas características morfológicas e bioquímicas presentes no intestino humano (ARTURSON & BORCHARD, 1997).

Durante o crescimento, as células Caco-2 formam uma monocamada de células cilíndricas. Após um período, as células se polarizam, com microvilosidades na borda apical, apresentando, ainda, as junções oclusivas entre células adjacentes e expressando atividades enzimáticas de hidrolases (PINTO et al., 1983).

As células Caco-2 polarizadas crescidas em garrafas (BD Falcon™) foram utilizadas para avaliação com 24 horas após a inoculação. Havia um controle negativo composto de NaCl 0,85% (Synth®) e um controle positivo da cepa NCTC 11351 de *C. jejuni*. Para a infecção, uma alíquota de 100µL da solução de NaCl 0,85% contendo 10⁶ UFC de cada estirpe foi colocada em uma garrafa (BD Falcon™) com aproximadamente 80% de confluência, contendo 5mL de DMEM (Invitrogen®) puro. Após a incubação, as células foram retiradas com auxílio *cell scraper* (BD Falcon™) do interior das garrafas (BD Falcon™) e o conteúdo foi retirado e transferido para microtubos de 2mL contendo as células, as bactérias e o meio DMEM (Invitrogen®).

O conteúdo foi centrifugado a 12.000g (Cientec®) por dez minutos a 4°C. Ao *pellet* foi acrescentado 1mL de trizol (Invitrogen®) e as demais etapas foram

realizadas conforme a extração de RNA e a RT-PCR descritas no item 5.8.

3.10. Alterações morfológicas em células Caco-2 por *C. jejuni*

Cinco cepas de *C. jejuni* que apresentaram o maior somatório de fatores de patogenicidade (presença dos cinco genes de virulência testados, expressão de virulência, multirresistência antimicrobiana e menor proximidade genética) foram testadas quanto à capacidade de provocar distensão celular nas células Caco-2 e a perda de confluência intercelular.

O cultivo das células Caco-2, a inoculação e as análises microscópicas foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia (ICBIM-UFU).

O cultivo das células foi feito em suplemento MEM (Meio Mínimo de Eagle) (Invitrogen®) com 2mM de glutamato, 1% de aminoácidos não essenciais e 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Vitrocell®). Um total de 10^4 células por lamínula foi cultivada em placas de cultura com 24 poços contendo lamínula circular (BD Falcon™), a 37°C em 5% de CO₂.

Depois de diferenciadas, as células foram infectadas em triplicada com 10^6 UFC em cada poço, além do controle positivo (NCTC 11351 – *C. jejuni*) e do controle negativo composto de solução de NaCl 0,85% (Synth®). As monocamadas inoculadas foram incubadas por 72 horas a 37°C em 5% de CO₂ em atmosfera umedecida (MACCALLUM et al., 2006).

Posteriormente, as lamínulas (BD Falcon™) foram avaliadas por análise computacional de imagens digitalizadas obtidas em microscópio Olympus BX 40 com uma objetiva de 100X, acoplada a uma câmera Olympus Oly 200 conectado a um microcomputador PC através da placa digitalizadora Datatranslation 3153.

De cada lamínula (BD Falcon™), foram medidas aproximadamente 36 células epiteliais de seis a oito diferentes campos aleatórios e de cada célula foram medidos o maior eixo e o eixo perpendicular, utilizando-se o software HL Image (Western Vision Software).

3.11. Similaridade entre os isolados pela técnica de amplificação aleatória do DNA polimórfico (RAPD-PCR)

A avaliação da proximidade genética entre os isolados foi realizada pela técnica de RAPD-PCR (*Random Amplification of Polymorphic DNA*), conforme o protocolo descrito por AKOPYANZ et al. (1992).

O DNA extraído para a realização da PCR-multiplex foi utilizado para o RAPD-PCR. A quantificação do DNA foi feita pelo aparelho Nanodrop (Thermo Scientific®) sob comprimento de onda de 260nm, observando sempre a relação 260/280 a fim de verificar a integridade do DNA (relação entre 1,8-2,0).

Os iniciadores (*primers*) descritos na Tabela 6 foram usados na determinação do nível de similaridade entre e dentro das espécies identificadas.

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 MgCl₂ e 1U de Ultratools DNA polimerase; 200µM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (dNTP) e 30 picomoles do *primer* (Invitrogen®). Cada *primer* foi analisado separadamente e para cada reação foi acrescido 1µL de óleo mineral a fim de evitar a evaporação dos reagentes durante a amplificação.

Tabela 6: *Primers* utilizados no RAPD-PCR dos isolados de *Campylobacter* spp.

Primers	Sequência 5' → 3'	Referência
HLWL 85	ACGTATCTGC	Mazurier et al., 1992
1290	GTGGATGCGA	Akopyanz et al., 1992

Os controles positivos de *C. jejuni* (ATCC 33291) e de *C. coli* (ATCC 43478) foram usados em todas as reações de amplificação, bem como um controle negativo, composto por água ultrapura estéril, adicionada à mistura da reação, em substituição ao DNA alvo.

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®). Os géis de agarose foram corados e visualizados conforme o item 5.3.

Para verificar a similaridade entre as cepas, os géis com os produtos amplificados foram levados ao aparelho de captação de imagens (Loccus Biotecnologia) a análise computacional foi realizada no Programa GelCompar II (*Comparative Analysis of Electrophoresis Patterns*), versão 1.50, *Applied Maths Korthrijk, Belgium*. As bandas de fraca, média e forte intensidade captadas pelo programa foram consideradas na análise e a matriz de similaridade foi obtida por comparação entre pares de cepas usando o coeficiente de similaridade de Dice, adotando-se 1% de tolerância, para cada *primer* separadamente. A análise final foi baseada na média de experimentos (*average from experiments*). Foi utilizado o método UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic mean*) para a construção do dendrograma, englobando todas as cepas estudadas (MADDEN et al., 2007).

3.12. Análise dos Resultados

Todos os resultados foram tabulados e submetidos à estatística descritiva, com o cálculo dos percentuais de isolamento, resistência aos antimicrobianos, presença e expressão de genes de virulência das estirpes de *Campylobacter* spp. Para correlacionar a presença de genes de virulência entre *C. jejuni* e *C. coli* foi utilizado o Teste Exato de Fisher com significância de 5% (AYRES, 2000).

Todos os cálculos foram realizados utilizando o programa Graphpad Prism 5.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Ocorrência de *Campylobacter* spp.

Dos 420 frangos congelados e resfriados amostrados, 94 (22,38%) foram positivos para *Campylobacter* spp. Destes, 55 (58,5%) foram identificadas como *Campylobacter jejuni*, 19 (20,2%) como *C. coli* e 20 (21,3%) como *Campylobacter* spp., tanto pelo teste fenotípico, quanto pela análise molecular (Figura 3).

Os resultados de ocorrência de *Campylobacter* spp. foram relativamente menores aos encontrados na literatura. Estudo realizado na Irlanda, no ano de 2008, constatou-se que de 394 carcaças de frangos resfriadas estudadas, 98% estavam contaminados com *C. jejuni* (EFSA, 2010). Em alguns países membros da União Européia (EU) em 2007, a prevalência em carnes de frango frescas foi equivalente a 83%. No Irã, a prevalência foi de 63% e no Japão 45,8% (FAO, 2009).

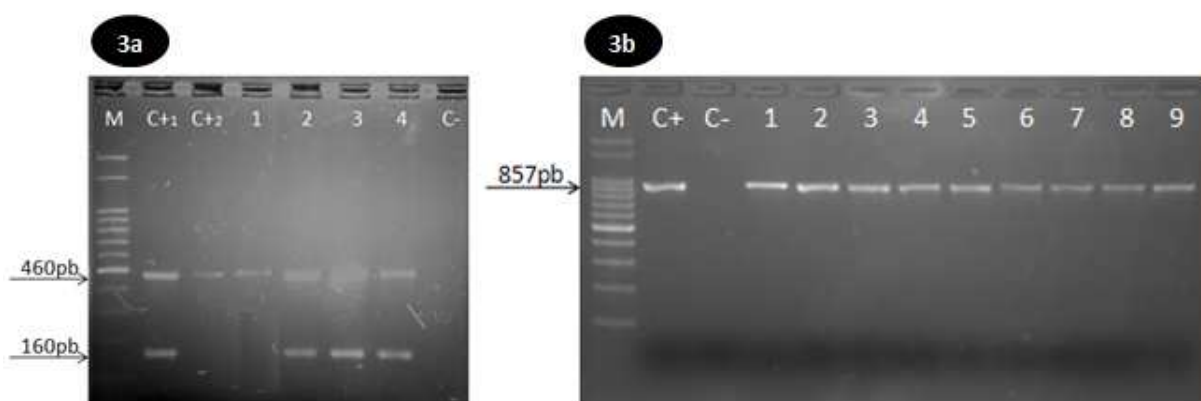


Figura 3: 3a- PCR-multiplex para identificação de *Campylobacter jejuni* e *C. coli* em amostras de carcaças de frangos. M (marcador de 100pb), C+1 (controle positivo para *C. jejuni*), C+2 (controle positivo para *C. coli*), 1 (amostra positiva para *C. coli*), 2-4 (amostras positivas para *C. jejuni*), C- (controle negativo composto de água ultrapura). 3b- Resultado da PCR para identificação de *Campylobacter* spp. M (marcador de 100pb), C+ (controle positivo para *C. jejuni*), C- (controle negativo composto de água ultrapura), 1-9 (amostras positivas para *Campylobacter* spp.).

No Brasil, AQUINO et al. (2002) isolaram *C. jejuni* e *C. coli* de 60% das carcaças de frango resfriadas analisadas, índice de contaminação menor do que o obtido por KUANA et al. (2008), que obtiveram resultados equivalente a 99% das carcaças resfriadas contaminadas com *Campylobacter* spp. FRANCHIN et al. (2007)

ao analisarem 335 amostras de carcaças resfriadas, água e equipamentos coletados em diferentes pontos dentro da linha de abate de frangos de corte e observaram positividade para *Campylobacter* em 71,3% das amostras.

A Tabela 7 mostra os resultados de isolamentos por região de origem dos frangos. A positividade nas amostras provenientes dos estados de Goiás e Distrito Federal foram relativamente menores, provavelmente devido aos frangos chegarem congelados para a análise.

Tabela 7. Número e porcentagem de espécies de *Campylobacter* spp. isoladas de três regiões de origem dos frangos.

Espécie	Frangos resfriados	Frangos congelados		Total
	Minas Gerais	Distrito Federal	Goiás	
<i>C. jejuni</i>	41	12	2	55 (58,5%)
<i>C. coli</i>	13	4	2	19 (20,2%)
<i>Campylobacter</i> spp.	14	3	3	20 (21,3%)
Total	68 (72,3%)	19 (20,2%)	7 (7,5%)	94 (100%)

Estudo realizado por BOUFLEUR (2009) em Santa Maria (RS), com 36 amostras frescas de fígado, coração, moela e drumete de frangos obteve 22 (61,1%) amostras positivas para *Campylobacter* spp. Após congelamento dos miúdos por sete dias o autor conseguiu recuperar *Campylobacter* spp. em apenas três amostras. DIMITRAKI & VELONAKIS (2007) salientam que o congelamento inibe o crescimento de *Campylobacter*, reduz seus números, mas não os elimina completamente das carnes congeladas, podendo a bactéria assumir a forma VNC (viável, mas não cultivável) em condições ambientais adversas (HUMPHREY et al., 2007). SAMPERS et al. (2009) analisaram o risco do consumo de carne de frango e seus subprodutos para infecção de humanos por *C. jejuni*. Os autores observaram que quando os alimentos eram preparados com o uso de carne de frango congelada o risco da infecção era menor, porém, o uso de pele de frango nas receitas aumentava o risco de infecção em 2,2 vezes.

A porcentagem de positividade encontrada neste estudo em amostras congeladas (26/94 – 27,7%) indica a tolerância de *Campylobacter* às temperaturas muito baixas. HÄNEL & ATANASSOVA (2007) isolaram *C. jejuni* em 68% das amostras de frangos, as quais foram inoculadas com o agente e congeladas após

duas semanas e, em 24% das amostras congeladas por quatro semanas a -20°C. GEORGSSON et al. (2006), avaliaram o efeito do congelamento sobre a população de *C. jejuni* em carcaças de frango e observaram uma redução de 2,37 ciclos Log na contagem do agente após 31 dias de congelamento, e de aproximadamente 1 ciclo Logo após o congelamento das carcaças. Apesar da redução, sabe-se que a dose para causar doença em humanos é muito baixa (500UFC) (FONSECA, 2006) e assim, nem sempre a diminuição em número da bactéria implica em menor número de casos de doentes.

A capacidade de sobrevivência de *Campylobacter* spp. em condições extremas durante o processo produtivo de frangos pode estar associado à habilidade de fixação nas fendas profundas da pele da ave. Esses recessos oferecem condições ideais para a bactéria aderir e suportar as variações de condições no processamento (LEE et al., 1998). JANG et al. (2007) demonstraram que as células de *Campylobacter* não só poderiam persistir nos folículos das penas como também seriam capazes de penetrar na pele e se manter protegida por ter o formato espiral.

Embora *Campylobacter* reduza seu crescimento em temperaturas abaixo de 30°C, é capaz de sobreviver em superfícies de carne crua a temperaturas de refrigeração e assim constitui um risco para o consumidor. LIGOWSKA et al. (2011) destacaram que a constituição da superfície da carne de frango prolonga a sobrevivência de *C. jejuni* a 5°C, em comparação com meios de cultura em laboratório, sugerindo que os compostos presentes na carne de frango influenciam na adaptação do microrganismo a baixas temperaturas, assim como a transcrição de genes associados à sobrevivência prolongada de *C. jejuni*.

Os resultados obtidos neste estudo mostram que houve um aumento relativo na prevalência de *Campylobacter* spp. nos meses de julho, setembro e novembro de 2011 e fevereiro de 2012. Não há justificativa para tal achado, e com base nele não se pode concluir uma tendência sazonal, já que as coletas não ocorreram durante todo ano e as temperaturas ambientais não foram aferidas, mas pode-se inferir a presença de picos mensais. A presença de picos mensais também foi detectada por HABIB et al. (2012) que obtiveram maiores prevalências nos meses de julho e setembro. Estudos realizados em outras partes do mundo, como no Reino Unido e na América do Norte, também não mostraram qualquer evidência de sazonalidade

(NADEAU et al., 2002). No entanto, outros estudos mostraram uma tendência crescente de prevalência de *Campylobacter* em carnes de frango, em associação com os períodos de verão (GUÉRIN et al., 2008; HABIB et al., 2008; JORE et al., 2010).

4.2. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana

O uso desequilibrado de antimicrobianos na medicina humana e em animais de produção carrega riscos pela seleção de bactérias resistentes aos mesmos, o que enfraquece, gradativamente, o emprego da antibioticoterapia. Assim, o uso de antibióticos na avicultura com objetivos profiláticos e de promoção de crescimento, proporcionam a liberação de resíduos no ambiente que por sua vez acabam aumentando a pressão de seleção e favorece a emergência de microrganismos resistentes (PALERMO NETO, 2011).

O surgimento de resistência antimicrobiana em *Campylobacter* spp. tem sido uma preocupação crescente na saúde pública mundial. O isolamento em humanos e animais, de cepas de *Campylobacter* resistentes aos antimicrobianos, aumenta a dificuldade de tratamento das infecções humanas. Alguns autores associam a resistência de *Campylobacter* aos antimicrobianos ao uso indevido destes na produção animal de aves para a terapia e prevenção de doenças (DECKERT et al., 2010; BARDON et al., 2011). Além disso, estudos também têm mostrado que os seres humanos infectados com *Campylobacter* spp. resistentes a antimicrobianos têm uma maior duração da diarreia quando comparadas com as cepas suscetíveis (NELSON et al., 2004; HELMS et al., 2005).

Neste estudo foi determinado o perfil de resistência antimicrobiana para sete antimicrobianos pertencentes a seis classes: β -lactâmicos (amoxicilina), aminoglicosídeos (gentamicina e neomicina), fluoroquinolonas (norfloxacin), macrolídeos (eritromicina), tetraciclina (tetraciclina) e sulfonamidas (sulfazotrim). Entre as drogas testadas, os isolados apresentaram maior resistência à amoxicilina (74,5%), norfloxacin (43,6%), eritromicina (36,2%), tetraciclina (34,0%) e sulfazotrim (33,0%) e maior sensibilidade à neomicina (97,9%) e gentamicina (95,7%) (Tabela 8).

Tabela 8. Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de *Campylobacter* spp. isolados de carcaças de frangos refrigerados e congelados.

Antibiótico	Resistente	Intermediário	Sensível
	N (%)	N (%)	N (%)
Amoxicilina	70 (74,5)	10 (10,6)	14 (14,9)
Eritromicina	34 (36,2)	18 (19,1)	42 (44,7)
Gentamicina	4 (4,3)	0	90 (95,7)
Neomicina	2 (2,1)	0	92 (97,9)
Norfloxacin	41 (43,6)	6 (6,4)	47 (50,0)
Sulfazotrim	31 (33,0)	6 (6,4)	57 (60,6)
Tetraciclina	32 (34,0)	0	62 (66,0)

N – número de cepas; % - porcentagem de resistência antimicrobiana.

Devido à natureza autolimitante de campilobacteriose, antimicrobianos geralmente não são recomendados para o tratamento, exceto em casos graves, onde fluoroquinolonas e macrolídeos são as opções de tratamento de escolha (BUTZLER, 2004; YATES, 2005). Apesar disso, a frequência de resistência a estas classes é comprovada no presente trabalho, já que representam o segundo e terceiro antibióticos com maior porcentagem de resistência (norfloxacin – 43,6%; eritromicina – 36,2%). Outros estudos realizados nos Estados Unidos, na Polônia e demais países da União Européia também confirmam essa tendência (GUPTA et al., 2004; ROZYNEK et al., 2008; NARMS, 2007). *European Food Safety Authority* (EFSA, 2010) publicou que 20-64% dos isolados de *Campylobacter* provenientes de carnes de aves eram resistentes a fluoroquinolona.

Diferentemente, ZHAO et al. (2010) encontrou resistência mais comum a tetraciclina (46,6%), com baixa porcentagem para eritromicina (2,8%) em isolados de *Campylobacter* de amostras de frangos resfriados. Assim como, DECKERT et al. (2010) e BARDON et al. (2011) que afirmaram que a resistência a eritromicina é normalmente baixa em *Campylobacter* spp.

No presente trabalho, os baixos níveis de resistência apresentados pelos isolados para os antibióticos da classe dos aminoglicosídeos (gentamicina e neomicina) podem ser justificados pelo fato destes antibióticos não serem utilizados rotineiramente na produção de frangos. Assim, a rara utilização destes antibióticos

permite que a pressão seletiva seja reduzida nestes tipos de bactérias conferindo menores frequências de resistência a estas drogas (BORGES, 2009).

A Tabela 9 demonstra o número e a frequência das estirpes de *C. jejuni*, *C. coli* e *Campylobacter* spp. resistentes aos antibióticos testados. Os resultados denotam que as porcentagens de resistência em *C. coli* foram maiores que em *C. jejuni*, com exceção apenas da gentamicina, antimicrobiano da classe dos aminoglicosídeos, para o qual todos os isolados de *C. coli* foram sensíveis.

Tabela 9: Número e porcentagem de resistência antimicrobiana nas diferentes espécies de *Campylobacter* isoladas de frangos embalados.

Antibiótico	<i>C. jejuni</i> N/55 (%)	<i>C. coli</i> N/19 (%)	<i>Campylobacter</i> spp. N/20 (%)
Amoxicilina	34 (61,8)	16 (84,2)	20 (100,0)
Eritromicina	14 (25,5)	7 (36,8)	13 (65,0)
Gentamicina	2 (3,6)	0	2 (10,0)
Neomicina	0	1 (5,3)	1 (5,0)
Norfloxacina	26 (47,3)	9 (47,4)	6 (30,0)
Sulfazotrim	12 (21,8)	7 (36,8)	12 (60,0)
Tetraciclina	18 (32,7)	10 (52,6)	4 (20,0)

N- número de cepas resistentes. %- porcentagem em relação ao total de cepas isoladas por espécie.

Estes resultados são comparáveis a outros que mostram que a resistência é geralmente mais comum em *C. coli* do que em *C. jejuni*, incluindo a resistência às fluoroquinolonas e macrolídeos (GE et al., 2003; PEZZOTTI et al., 2003; THAKUR & GEBREYES, 2005; THAKUR et al., 2006; LITTLE et al., 2008; BORGES, 2009; FRAQUEZA, 2009).

O nível de resistência à amoxicilina observado nas cepas foi elevado, com 61,8% em *C. jejuni*, 84,2% em *C. coli* e 100,0% em *Campylobacter* spp. Resultados similares a estes foram também observados em isolados de outros países (ANDERSEN et al., 2006; ENGBERG et al., 2001; FALLON et al., 2003; RÖNER et al., 2004). A resistência de estirpes de *Campylobacter* spp. a este antibiótico está relacionada com a produção de β -lactamases, no entanto, outros mecanismos de resistência à amoxicilina podem ocorrer de forma simultânea como a modificação das proteínas de ligação de penicilinas e cefalosporinas e, conseqüentemente, a

impermeabilidade da bactéria a este antibiótico. A existência de uma bomba de efluxo de antibióticos para o exterior das bactérias pode ser considerado uma outra forma de resistência aos antibióticos β -lactâmicos (FALLON et al., 2003; YAN et al., 2005).

O padrão de resistência observado para sulfazotrim foi de 21,8% para *C. jejuni*, 36,8% para *C. coli* e 60,0% para *Campylobacter* spp. A resistência às sulfonamidas em bactérias Gram-negativas é, normalmente, devida à aquisição de um plasmídeo que permite a resistência a fármacos por transferência horizontal entre bactérias, resultando na diminuição da afinidade para este tipo de antibiótico (AARESTRUP & ENGBERG, 2001; YAN et al., 2005). Já a atuação do trimetoprim baseia-se na ligação e inibição da enzima dihidrofolato redutase. A resistência a este antibiótico é devida à aquisição do gene *dhfr* originário de transferência horizontal que não são inibidos pelo trimetoprim (AARESTRUP & ENGBERG, 2001).

As tetraciclinas eram referidas no passado como uma alternativa terapêutica para o tratamento de infecções por *Campylobacter* spp. em humanos. Vários autores referem que eram também utilizadas em escala mundial, tanto em doses terapêuticas como em doses subterapêuticas, em alimentos para animais de produção (WHO, 2001; AARESTRUP & ENGBERG, 2001, ALLOS, 2001; FALLON et al., 2003). Neste estudo, foram detectados níveis de resistência à tetraciclina na ordem de 32,7% em *C. jejuni*, 52,6% em *C. coli* e 20,0% em *Campylobacter* spp.

Ao analisar a resistência antimicrobiana sob uma perspectiva da origem da amostra (Figura 4) observou-se que houve semelhança nas porcentagens de resistência antimicrobiana das estirpes isoladas das três regiões para os antimicrobianos: amoxicilina (75%, 68,4% e 85,7%), gentamicina (4,4%, 0% e 14,3%), neomicina (2,9%, 0% e 0%) e tetraciclina (39,7%, 21,1% e 14,3%), respectivamente, para amostras provenientes de Minas Gerais, Distrito Federal e Goiás.

No Distrito Federal e em Goiás, os isolados apresentaram maiores porcentagens de resistência ao macrolídeo eritromicina, com valores de 52,6% e 71,4%, respectivamente. Já as cepas oriundas de frangos resfriados, de Minas Gerais, apresentaram resistência de 27,9% ao mesmo antibiótico (Figura 4). A elevada resistência aos macrolídeos de estirpes oriundas de frangos congelados

caracteriza mais um importante fator de virulência para estas cepas, já que trata-se de uma droga de escolha no tratamento de campilobacteriose.

O estabelecimento da relação entre o uso de antibióticos na medicina veterinária e a resistência aos antimicrobianos em bactérias contaminantes de alimentos é um assunto complexo e controverso. Apesar disso, alguns estudos evidenciam que o uso de antibióticos em animais, tanto como agentes terapêuticos como promotores de crescimento, leva a um aumento do risco de ocorrerem transferências de bactérias resistentes aos antibióticos ao homem (LUANGTONGKUM, 2006; MSFFG, 2008).

As estirpes isoladas das carcaças oriundas de Goiás apresentaram resistência aos antibióticos norfloxacin e sulfazotrim equivalentes a 71,4% e 57,1%, respectivamente. Esses valores encontraram uma disparidade quando comparadas às de Minas Gerais (42,6% e 32,4%, respectivamente) e às do Distrito Federal (36,8% e 26,3%, respectivamente) (Figura 4).

As diferenças nas porcentagens observadas nas três regiões podem estar relacionadas a múltiplos fatores, como sazonalidade, o ambiente de criação, as formas de manejo e a característica da própria cepa (EFSA, 2009).

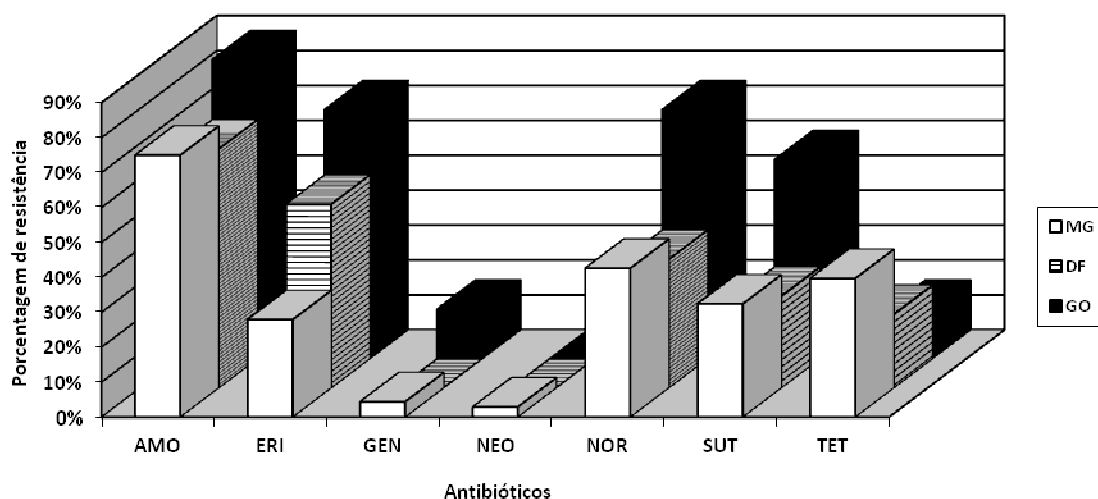


Figura 4: Porcentagem de resistência aos antimicrobianos de cepas de *Campylobacter* spp. isoladas de carcaças de frangos provenientes das regiões de: MG (Minas Gerais), DF (Distrito Federal) e GO (Goiás). AMO (amoxacilina), ERI (eritromicina), GEN (gentamicina), NEO (neomicina), NOR

(norfloxacin), SUT (sulfazotrim) e TET (tetraciclina).

O aparecimento de estirpes multirresistentes, principalmente em bactérias Gram negativas, constitui atualmente um problema muito discutido em medicina humana. A apresentação de multirresistência intrínseca e/ou adquirida nestes microrganismos pode ser considerada quando há resistência a pelo menos três classes de antimicrobianos (POOLE, 2004). A Figura 5 demonstra a frequência de resistência antimicrobiana levando-se em consideração o número de antibióticos. Pode-se observar que 19/94 (20,2%) das cepas isoladas apresentaram padrão de multirresistência (pelo menos três classes de antimicrobianos). A resistência em simultâneo a vários tipos de antibiótico é considerada relativamente rara. Quando ocorre, acredita-se que esteja relacionada com a presença de uma bomba não seletiva que permite o fluxo dos antibióticos para o exterior da bactéria e aumenta o padrão de resistência de duas a quatro vezes (FALLON et al., 2003).

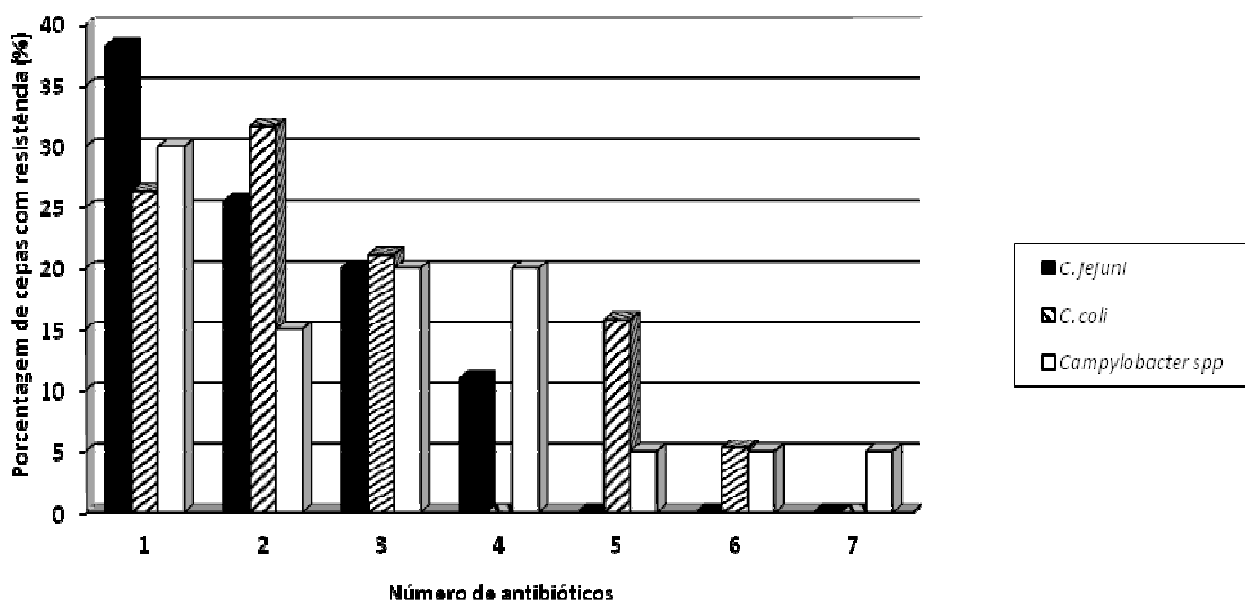


Figura 5: Distribuição das cepas de *Campylobacter* spp. isoladas de carcaças de frangos de acordo com o número de antibióticos a que é resistente.

A Tabela 10 evidencia a existência de estirpes de *Campylobacter* spp. com resistência múltipla a antibióticos. A resistência ao β -lactâmico amoxicilina e à fluoroquinolona norfloxacin foi comum a 28,7% (27/94) dos isolados. Por outro lado, a resistência conjunta ao macrolídeo e à fluoroquinolona, antibióticos utilizados no tratamento de infecções humanas é uma característica partilhada por 19,1% (18/94)

das cepas, sendo seis *C. jejuni*, seis *C. coli* e seis *Campylobacter* spp. Apenas uma estirpe de *Campylobacter* spp. apresentou resistência a todos os antibióticos testados. Além desta, sete cepas (quatro *C. coli* e três *Campylobacter* spp.) apresentaram resistência a todos os antimicrobianos com exceção dos aminoglicosídeos (gentamicina e neomicina).

Tabela 10: Distribuição das estirpes de *Campylobacter* spp. isoladas de carcaças de frangos quanto a resistência aos grupos de antimicrobianos.

Antibióticos – Resistência	Espécie – n (%)			Total – N=94 n (%)
	<i>C. jejuni</i> N=55	<i>C. coli</i> N=19	<i>Campylobacter</i> spp. N=20	
AMO	34 (61,8)	16 (84,2)	20 (100,0)	70 (74,5)
AMO NOR	14 (25,4)	7 (36,8)	6 (30,0)	27 (28,7)
NOR ERI	6 (10,9)	6 (31,6)	6 (30,0)	18 (19,1)
AMO NOR ERI	3 (5,4)	5 (26,3)	6 (30,0)	14 (14,9)
AMO ERI SUT	6 (10,9)	5 (26,3)	11 (55,0)	22 (23,4)
AMO NOR ERI TET	1 (1,8)	4 (21,1)	3 (15,0)	8 (8,5)
AMO NOR ERI SUT	1 (1,8)	4 (21,1)	6 (30,0)	11 (11,7)
AMO NOR ERI SUT TET	0	4 (21,1)	3 (15,0)	7 (7,4)
AMO NOR ERI SUT TET GEN	0	0	2 (10,0)	2 (2,1)
AMO NOR ERI SUT TET GEN NEO	0	0	1 (5,0)	1 (1,1)

N – número total de cepas; n – número de cepas resistentes; % - porcentagem de cepas resistentes.

AMO (amoxacilina), ERI (eritromicina), GEN (gentamicina), NEO (neomicina), NOR (norfloxacina), SUT (sulfazotrim) e TET (tetraciclina).

Ao comparar os padrões de multirresistência entre *C. jejuni* e *C. coli*, verifica-se que *C. jejuni* tende a ter porcentagens menores aos da *C. coli* (Tabela 10). Esse fato também foi observado por THAKUR et al. (2006), MENA et al. (2008), POINTON et al. (2008) e BORGES (2009) que avaliaram que para qualquer combinação grupos de antibióticos testada a porcentagem de multirresistência das estirpes de *C. coli* foi sempre superior à das *C. jejuni*. Esse padrão de multirresistência de *C. coli* pode estar relacionado com a pressão seletiva exercida sob a população (LUNGTONGKUM et al., 2006).

4.3. Fatores de Virulência

Recentemente, tem aumentado o número de estudos objetivando a detecção de genes de virulência em estirpes de *Campylobacter* spp., principalmente em *C. jejuni* e em *C. coli*. O conhecimento dos mecanismos de infecção, de virulência e os fatores de risco para a infecção pelo microrganismo é de grande importância no conhecimento da epidemiologia e patogenia da campibacteriose (MARTINEZ et al., 2006).

O presente estudo detectou a presença dos genes: *flaA*, *pldA*, *cadF*, *ciaB* e o complexo CDT, conforme observado nas Figuras 6 e 7.

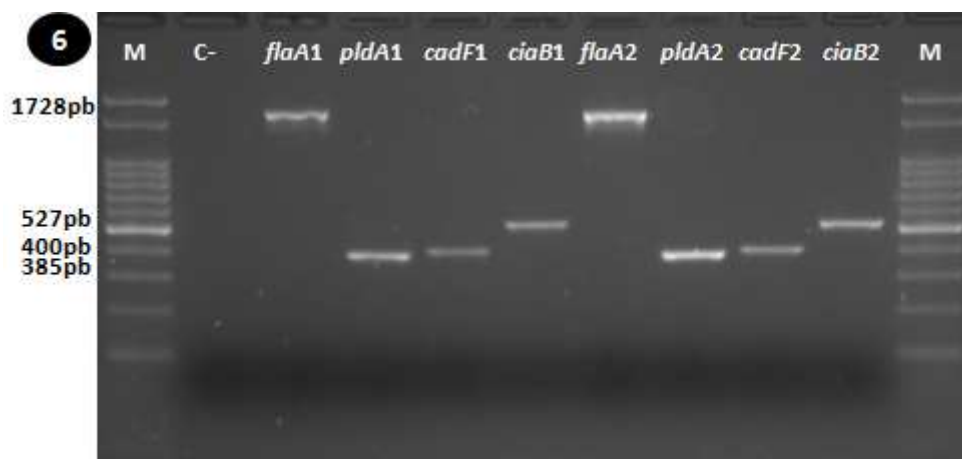


Figura 6: Gel de PCR demonstrando a presença dos genes *flaA*, *pldA*, *cadF* e *ciaB*. M (marcador de peso molecular de 100pb), C- (controle negativo, composto por água ultrapura em substituição ao DNA alvo); *flaA*1, *pldA*1, *cadF*1 e *ciaB*1 (presença dos genes no controle positivo – *C. jejuni* NCTC 11351) e *flaA*2, *pldA*2, *cadF*2 e *ciaB*2 (presença dos genes em uma amostra de *C. jejuni* isolada de frango resfriado).

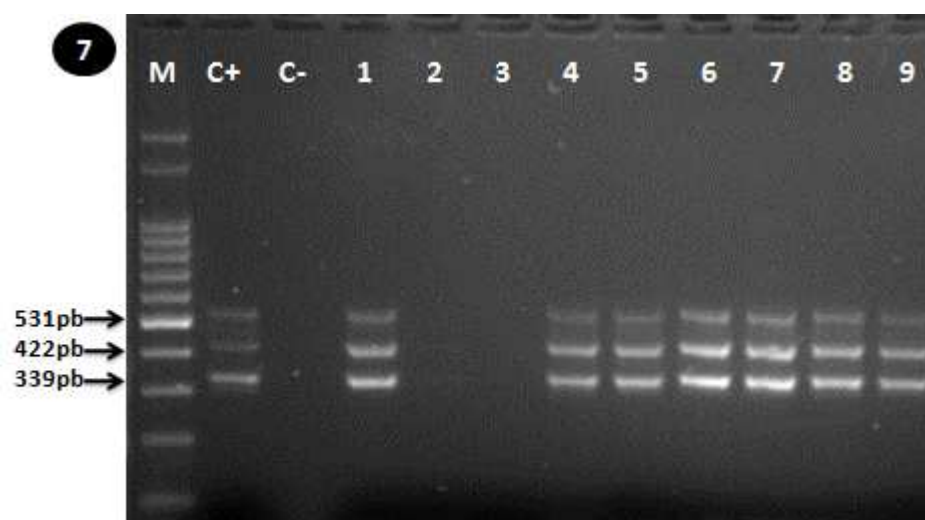


Figura 7: Gel de PCR demonstrando a presença dos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*. M (marcador de peso molecular de 100pb); C+ (controle positivo de *C. jejuni* NCTC 11351); C- (controle negativo, composto por água ultrapura em substituição ao DNA alvo); 1, 4-9 (cepas de *C. jejuni* isolados de frangos, positivas para o complexo CDT); 2-3 (cepas de *C. jejuni* isolados de frangos, negativas para o complexo CDT).

A Tabela 11 demonstra a frequência de cada um dos genes estudados. Das 94 cepas isoladas, incluindo *C. jejuni*, *C. coli* e *Campylobacter* spp., 45 (47,9%) apresentaram o gene *flaA*, 42 (44,7%) o gene *pldA*, 43 (45,7%) o gene *cadF*, 42 (44,7%) o gene *ciaB* e 37 (39,4%) os genes responsáveis pela CDT. Em nível de espécie foi possível constatar que *C. jejuni* foi significativamente ($p < 0,05$) mais virulenta que *C. coli* para todos os genes estudados.

Tabela 11: Porcentagem de genes de virulência em *Campylobacter* spp. isolados de carcaças de frangos

Gene	Espécie			Total (N=94) n (%)
	<i>C. jejuni</i> (N=55) n (%)	<i>C. coli</i> (N=19) n (%)	<i>Campylobacter</i> spp. (N=20) n (%)	
<i>flaA</i>	41 (74,5) ^a	4 (21,1) ^f	0	45 (47,9)
<i>pldA</i>	35 (63,6) ^b	5 (26,3) ^g	2 (10,0)	42 (44,7)
<i>cadF</i>	37 (67,3) ^c	6 (31,6) ^h	0	43 (45,7)
<i>ciaB</i>	37 (67,3) ^d	4 (21,1) ⁱ	1 (5,0)	42 (44,7)
CDT	36 (65,5) ^e	1 (5,3) ^{*j}	0	37 (39,4)

N – número total de cepas; n – número de cepas que possuem o gene de virulência; % - porcentagem de cepas com gene de virulência; * cepa de *C. coli* que apresentou os genes *cdtA* e *cdtB*, mas não o *cdtC*; letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Fisher.

A presença de diferentes combinações de determinantes de genes de virulência indica que cepas de *Campylobacter* com potencial patogênico diversificado estão presentes na carne de frangos (THAKUR et al., 2010).

Diante dos dados, é evidente constatar que *C. jejuni* tem uma vantagem sobre *C. coli* e *Campylobacter* spp. em causar casos clínicos em seres humanos principalmente devido à presença de determinantes de virulência importantes que são essenciais para executar a sua patogenia. Estatisticamente ($p < 0,05$), *C. jejuni* apresentou-se superior a *C. coli* em relação a todos os genes estudados (Tabela 11). THAKUR et al. (2010) afirmaram que informações como estas podem ajudar a explicar o fato de *C. jejuni* ser muito mais comum como causa de infecções humanas (90% -95%) do que *C. coli* (5% -10%).

Em geral, as diferenças marcantes na prevalência dos genes de virulência entre *C. jejuni* e *C. coli* sugere que nem todas as cepas de *Campylobacter* provenientes de frangos resfriados e congelados são capazes de causar doenças em seres humanos. Essas variações nas características de patogenicidade dos isolados observados neste estudo, incluindo a adesão, motilidade, invasão e genes de produção de toxinas, também foram relatadas previamente por COOTE et al. (2007), FEARNLEY et al. (2008) e THAKUR et al. (2010).

A presença do gene *flaA* foi detectada em 45/55 (74,5%) das cepas de *C. jejuni*, em 4/19 (21,1%) das *C. coli* e em nenhuma *Campylobacter* spp. Este gene é responsável pela motilidade flagelar da bactéria e caracteriza um importante fator de virulência em *Campylobacter* na invasão e adesão celular (MALIK-KALE et al., 2007). As variações observadas em cepas com ausência dessa característica indicam redução severa na motilidade, que pode reduzir a colonização da mucosa intestinal de humanos e frangos (KONKEL et al., 2004).

THAKUR et al. (2010) obteve valores semelhantes aos observados neste estudo, com porcentagens entre 50-95% para o gene *flaA* em 262 *C. jejuni* e 98 *C. coli*. As cepas estudadas pelos autores foram isoladas de humanos, peito de frango e carne de peru moída em Iowa, Estados Unidos. Em constraste, HANNING et al. (2010) encontraram uma positividade de 100% para o gene *flaA* em 105 isolados de carcaças de frangos, sendo 65 *C. jejuni*, 31 *C. coli* e 9 *Campylobacter* spp.

RIPABELLI et al. (2010) estudaram 29 *C. jejuni* e 36 *C. coli* isolados de alimentos, animais e humanos e todas as cepas apresentaram o gene *flaA* pela análise por PCR, assim como DATTA et al. (2003) e ZHENG et al. (2006) em amostras de carnes de frangos.

A baixa porcentagem encontrada em comparação com a maior parte dos estudos indica que provavelmente há variações na composição do flagelo nas estirpes *flaA*-negativas. O flagelo em *Campylobacter* é composto por um corpo basal, gancho, e filamento. O filamento flagelar é composto de duas proteínas: FlaA e FlaB, sendo FlaA a subunidade mais importante (ALM et al., 1993), já que a motilidade e a expressão do FlaA (codificada pelo gene *flaA*) são claramente necessários para a invasão máxima de células eucarióticas e para a translocação de *Campylobacter* em células polarizadas (WASSENAAR et al., 1991; GRANT et al., 1993). Porém, HENDRIXSON et al. (2001) observaram que uma cepa deficiente em FlaA é capaz de montar um filamento incompleto composto exclusivamente da proteína flagelina oriunda de FlaB. Além disso, o gene *flaB* possui um papel importante na variação antigênica com influência no aumento da motilidade sob diferentes condições ambientais (WASSENAAR et al. 1994). GRANT et al. (1993) constataram que a estrutura flagelar desempenha um papel importante na interiorização que é independente da motilidade. Portanto, a baixa motilidade, determinada pela ausência do gene *flaA* em algumas cepas, não reduz totalmente o potencial invasivo do microrganismo.

O uso de PCR na determinação da presença/ausência de genes é um método eficiente e econômico e utilizado rotineiramente (BANG et al., 2003; DATTA et al., 2003; MULLER et al., 2006; TALDUKER et al., 2008; RIPABELLIA et al., 2010). No entanto, a presença ou ausência de um gene não deve ser interpretada somente pela PCR. A metodologia *Southern Blot* pode ser utilizada em conjunto com a PCR para confirmar resultados. Portanto, os resultados deste estudo só permitem inferir que o gene estava ausente, ou que algumas cepas são PCR-negativas, ou que os iniciadores não hibridaram devido a alterações de nucleotídeos na sequência alvo. Além disso, o fenótipo não pode ser determinado pela presença ou ausência de um gene porque os níveis de expressão podem variar muito de estirpe para estirpe (PICKETT et al., 1996; GILBERT & SLAVIK, 2004; DEUN et al., 2007). Dessa forma,

o processo de colonização e virulência não é totalmente compreendido, mas pode ser caracterizado pela atuação conjunta de vários genes sendo expressos em uma complexa rede de genes altamente reguladas (ATACK & KELLY, 2009).

Em *C. jejuni* houve proximidade entre as porcentagens de positividade para os genes *pldA* (63,6%), *cadF* (67,3%), *ciaB* (67,3%) e o complexo CDT (65,5%). *C. coli* apresentou 26,3% das cepas positivas para *pldA*, 31,6% para *cadF*, 21,1% para *ciaB* e 5,3% para CDT. Os isolados de *Campylobacter* spp. exibiram apenas os genes *pldA* e *ciaB*, nas porcentagens de 10% e 5%, respectivamente (Tabela 11).

No presente estudo, a porcentagem de positividade para o gene *pldA* foi de 44,7% (42/94). Valores semelhantes também foram encontrados por HANNING et al. (2010) com prevalência de 56% do gene *pldA* em *C. jejuni* oriundas de amostras ambientais e de carcaças de frangos na Etiópia. THAKUR et al. (2010) obtiveram porcentagens entre 5-75% de positividade para o gene *pldA* em isolados humanos e de carne de frangos, com maiores valores em *C. jejuni* isolados de humanos. Entretanto, BISWAS et al. (2011) encontraram *pldA* em 94,23% dos 52 *C. jejuni* isolados de pacientes clínicos no Canadá. De maneira similar, TALUKDER et al. (2008) e ZHENG et al. (2006) detectaram a presença de *pldA* em 300 isolados de *C. jejuni* e *C. coli* obtidos a partir de pacientes com enterite em Bangladesh, no primeiro estudo, e em diferentes isolados de *C. jejuni* e *C. coli* obtidos a partir de frangos, perus, suínos e bovinos, no segundo.

O gene *pldA* está relacionado à invasão celular e à codificação de uma proteína envolvida na síntese de fosfolipase da membrana externa (ZIPRIN et al., 2001). Fosfolipases constituem um subgrupo de enzimas lipolíticas que têm a capacidade de hidrolisar uma ou mais ligações éster em fosfolípidos promovendo ruptura da membrana celular em eucariotos (WAITE, 1996; SONGER, 1997). A proteína oriunda do gene *pldA* está localizada na membrana externa da bactéria e possui propriedade hemolítica, podendo ser responsável por danos nos tecidos durante a infecção por *C. jejuni* ou *C. coli* (SONGER, 1997; WASSENAAR, 1997; MATOBA et al., 2002). Estudos desenvolvidos por GRANT et al. (1997) e ZIPRIN et al. (2001) demonstraram que a ausência de *pldA* em *C. coli* mostrou uma redução significativa na atividade hemolítica e em *C. jejuni* promoveu uma diminuição na capacidade de colonização cecal em frangos.

Observou-se que 45,7% das 94 cepas apresentaram o gene *cadF*. Em *C. jejuni*, a positividade foi de 67,3% (37/55). RIZAL et al. (2010) detectaram 88,33% de positividade em 60 *C. jejuni* isolados de intestinos de frangos nos estados de Meghalaya e Assam, na Índia. Assim como THAKUR et al. (2010), nos Estados Unidos (EUA), que observaram que entre 60-100% dos isolados possuíam o gene *cadF* com superioridade para *C. jejuni* em relação a *C. coli*. Diferentemente, BISWAS et al. (2011) no Canadá, HANNING et al. (2010) na Etiópia, e RIPABELLI et al. (2010) na Itália, que comprovaram a presença de *cadF* em todas as cepas de *Campylobacter* spp. estudadas.

O gene *cadF* codifica uma proteína que interage com a fibronectina da matriz extracelular do hospedeiro, participando da colonização da superfície celular. A adesina CadF é uma proteína de membrana externa de 37kDa encontrada principalmente em *C. jejuni* que se liga a receptores específicos da superfície basolateral da célula hospedeira maximizando a invasão. Essa interação permite a translocação da bactéria mantendo a barreira epitelial intacta (MONTEVILLE et al., 2003).

A positividade para o gene *ciaB* foi de 44,7% (42/94), para *C. jejuni* a porcentagem foi de 67,3% (37/55). De maneira semelhante ao encontrado no presente trabalho, HANNING et al. (2010) observaram 40% de positividade para o gene *ciaB* nos 105 isolados de *Campylobacter* spp. oriundos de amostras ambientais e de carcaças de frangos na Etiópia. Em Portugal, SANTOS (2011) obteve 87% de cepas de *C. jejuni* com *ciaB* provenientes de 87 amostras de frangos e de fezes humanas. Contudo, foram detectadas maiores porcentagens de *ciaB* por BISWAS et al. (2011) e TALUKDER et al. (2008) em amostras de pacientes clínicos e por ZHENG et al. (2006) em amostras de aves, com valores de 92,31%, 95% e 91%, respectivamente.

O gene *ciaB* codifica a proteína CiaB de 73-kD que está associada ao mecanismo de exportação da flagelina. Essa proteína está ligada à destruição de microtúbulos promovendo a entrada e permitindo a mobilidade da bactéria no interior da célula hospedeira. O mecanismo de invasão produzido por CiaB induz a desestruturação de microtúbulos motores e microfilamentos celulares, além da fosforilação de proteínas tirosina citoplasmáticas, que são sinalizadoras de reações

em cascata, promovendo distúrbios celulares de forma a potencializar a motilidade intracitoplasmática sem restrições (RIVERA-AMILL et al., 2001).

O complexo CDT foi identificado por BANG et al. (2004) ao avaliar 117 estirpes de *C. jejuni* oriundas de carcaças de perus em proporções diferentes, com 101 (86,3%) positivas para o gene *cdtA*, 102 (87,2%) para o gene *cdtB* e 110 (94%) para o gene *cdtC*, valores estes maiores ao encontrado no presentes estudo, que foi de 44,7% (42/94) em relação a todas as cepas e de 67,3% (37/55) para *C. jejuni*. Porcentagens menores foram observadas por CARVALHO (2009) no Brasil em 13 estirpes de *C. jejuni*, provenientes de frangos de corte e hortaliças, com positividade de 38,46% (5/13) para todos os genes do complexo CDT. Assim como, HANEL et al. (2007b) que pesquisaram na Alemanha a toxina citoletal distensiva em perus e encontraram os três genes *cdt* em 9/13 (53%) das estirpes de *C. jejuni* isoladas. KRUTKIEWICZ & KLIMUSZKO (2010) avaliaram a presença dos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* em 63 isolados de *C. jejuni* e *C. coli* de fezes de frangos e de cães com porcentagens de 75%, 87,5% e 75%, respectivamente, na Polônia.

Resultados superiores para o complexo CDT foram encontrados por HANNING et al. (2010) em 48 cepas de *C. jejuni* isoladas de carcaças de frangos na Etiópia, em que todas possuíam todos os genes *cdt*. Assim como, EYIGOR et al. (1999) que detectaram os genes *cdt* em 69/70 (99%) das estirpes de *C. jejuni* isoladas de carcaças de frango de quatro diferentes supermercados dos EUA. Na Dinamarca, BANG et al. (2001) detectaram o gene *cdtB* em 111/114 (97,3%) das estirpes de *Campylobacter* spp. isoladas de fezes de frangos. No Japão, DATTA et al. (2003) identificaram os três genes *cdt* em 100% das 111 estirpes de *C. jejuni* isoladas de amostras clínicas humanas, carnes de frango e fezes de frangos e bovinos.

A atividade da toxina CDT codificada pelos genes *cdt* (*cdtA*, *cdtB* e *cdtC*) ocorre por meio da potencialização do bloqueio do ciclo celular por meio de *cdtA* com o auxílio da proteínas dos genes *cdtA* e *cdtC*, que funcionam como subunidades diméricas que transportam a proteína do *cdtB* e a interiorizam na célula hospedeira. Uma vez dentro da célula, a proteína CdtB entra no núcleo e exibe uma atividade semelhante à DNase-I, resultando em cortes na fita dupla do DNA. As células eucarióticas respondem aos cortes no DNA, bloqueando a fase G2/M da

divisão celular, inibindo a divisão mitótica e induzindo uma distensão citoplasmática que leva à morte da célula. A presença dos três genes *cdt* é requerida para uma plena atividade da toxina. Mutações nos genes *cdtA*, *cdtB* ou *cdtC* que possam causar perda da função em alguma das três subunidades, impedem a célula bacteriana de induzir uma citotoxicidade (MARTINEZ et al., 2006; SMITH & BAYLES, 2006; JEON et al., 2005; ASAKURA et al., 2007).

Segundo MARTINEZ et al. (2006), essencialmente todas as estirpes de *C. jejuni* apresentam os genes *cdt*, e a maioria tem atividade da toxina. Porém, há exceções de raros isolamentos que sofrem mutação e não expressam a atividade do gene. Estes mesmos autores sequenciaram e caracterizaram cepas-*cdt* negativas em seu estudo, e constataram a presença de pseudogenes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*, que apresentavam deleções em seu código sequencial. Com este resultado, os autores afirmaram que é provável que essas deleções sejam mais comuns do que o esperado. ASAKURA et al. (2007) também observaram que alguns genes *cdt* não são identificados devido a mutações como deleção, inserção ou substituição de nucleotídeos, e sugerem que essas mutações podem afetar a atividade da toxina. BANG et al. (2003) relatam que a produção da toxina é baixa ou negativa quando há mutações em regiões do gene *cdt*, porém, segundo PARK (2002), mesmo algumas estirpes sendo mutantes *cdt*-negativas, ainda mantém alguma atividade toxigênica.

No entanto, é importante mencionar que a presença ou ausência de alguns genes não pode ser utilizada para prever se uma espécie particular de *Campylobacter* é virulenta ou não, e que mais estudos precisam ser realizados para se chegar a conclusões válidas. Além disso, um resultado negativo por PCR pode ser causado por variação de sequência no local de ligação do *primer* e não indica necessariamente a ausência de um gene. Isto é uma limitação do método de PCR para detectar regiões alvo e pode ter um impacto sobre os dados que devem ser interpretados cuidadosamente (THAKUR et al., 2010).

Ao avaliar de forma descritiva a relação entre a resistência antimicrobiana a macrolídeos e fluoroquinolonas com a presença de genes de virulência em *C. jejuni* observou-se que de 34/55 (61,8%) cepas que possuíam resistência antimicrobiana a um ou ambos antibióticos, 28/34 (82,4%) possuíam pelo menos um gene de virulência além do *flaA*, e 21/34 (61,8%) possuíam quatro ou todos os genes

estudados. Porém, estatisticamente, não foi encontrada nenhuma ligação entre essas variáveis ($p > 0,05$). Da mesma forma, um estudo relatou a ausência de qualquer associação entre a resistência antimicrobiana, as propriedades de virulência e o perfil genotípico de *C. jejuni* isoladas de humanos e de aves (VAN DEUN et al., 2007). Porém, THAKUR et al. (2010) observaram associações significativas entre a virulência, o perfil de resistência para doxaciclina e o genótipo de *Campylobacter*, este mesmo padrão não foi observado para ciprofloxacina. Estes mesmos autores evidenciaram a importância em mencionar que a associação entre virulência e resistência antimicrobiana pode ser dependente da população bacteriana, da estirpe, da origem, e outros fatores importantes que devem ser levados em conta antes de fazer interpretações válidas.

Das 94 cepas testadas para a presença de genes de virulência, 56 (59,6%) apresentaram pelo menos um gene de virulência, sendo *C. jejuni* com 46/55 (83,6%) cepas, *C. coli* com 8/19 (42,1%) e em *Campylobacter* spp. 2/20 (10,0%). A Tabela 12 mostra detalhes relacionados ao número de genes encontrados por estirpe em cada uma das espécies.

Tabela 12: Porcentagem de cepas de *Campylobacter* isoladas de frangos que possuem de um a cinco genes de virulência testados.

Quantidade de genes	Espécie			Total (N=56) n (%)
	<i>C. jejuni</i> (N=46) n (%)	<i>C. coli</i> (N=8) n (%)	<i>Campylobacter</i> spp. (N=2) n (%)	
1	8 (17,4)	3 (37,5)	1 (50,0)	12 (21,4)
2	2 (4,3)	1 (12,5)	1 (50,0)	4 (7,1)
3	6 (13,0)	3 (37,5)	0	9 (16,1)
4	10 (21,7)	0	0	10 (17,9)
5	20 (43,6)	1 (12,5)	0	21 (37,5)
Total	46	8	2	56

N – número total de cepas com pelo menos um gene de virulência; n – número de cepas que possuem diferentes quantidades de genes de virulência; % - porcentagem de cepas com os genes de virulência.

Os dados apresentados evidenciam que 20/46 (43,6%) das cepas de *C. jejuni* possuem todos os genes de virulência estudados, o que não é observado nas mesmas proporções em *C. coli* (1/8 – 12,5%) nem em *Campylobacter* spp. (0). Trata-

se de mais um fato que comprova o maior poder patogênico de *C. jejuni* sobre as demais espécies em causar casos clínicos em seres humanos, devido às importantes propriedades de virulência que são essenciais para eliciar a sua patogenicidade (THAKUR et al., 2010).

Ao analisar a presença dos genes entre os isolados de *Campylobacter* spp. levando-se em consideração o local de isolamento (Minas Gerais, Distrito Federal e Goiás) e a condição da amostra (proveniente de frango congelado ou resfriado) observa-se que das 56 cepas de *Campylobacter* spp. que possuíam genes associados à virulência 40 (71,4%) eram provenientes de amostras de frangos resfriados e 16 (28,6%) oriundas de frangos congelados.

Devido à quantidade de estirpes isoladas de amostras congeladas (26) em relação ao identificado em amostras resfriadas (68), é possível constatar que foi detectada uma porcentagem equivalente a 61,5% (16/26) de cepas que apresentaram genes de virulência em amostras de frangos congelados, sendo que em carcaças de frangos resfriados foi de 58,8% (40/68). A Tabela 13 mostra a distribuição dos genes de virulência das cepas isoladas de carcaças de frango conforme o local de origem das amostras.

Tabela 13: Porcentagem de cepas de *Campylobacter* spp. isoladas de carcaças frangos que possuem os genes de virulência pesquisados distribuídas conforme o local de origem.

Espécie	Origem de isolamento			Total N=56
	Frangos resfriados N=40	Frangos congelados N=16		
	Minas Gerais N=40 n(%)	Distrito Federal N=12 n(%)	Goiás N=4 n(%)	
<i>C. jejuni</i>	35 (87,5)	9 (75,0)	2 (50,0)	46
<i>C. coli</i>	5 (12,5)	2 (16,7)	1 (25,0)	8
<i>Campylobacter</i> spp.	0	1 (8,3)	1 (25,0)	2

N – número total de cepas com genes de virulência; n – número de cepas por espécie; % - porcentagem encontrada em cada espécie.

De acordo com a Tabela 13, pode-se inferir que a porcentagem de cepas de *C. jejuni* com genes de virulência em amostras de Minas Gerais (87,5%) foi maior do que o observado no Distrito Federal (75,0%) e em Goiás (50,0%). Já em *C. coli* e em *Campylobacter* spp., as porcentagens foram maiores no Distrito Federal (16,7% e

8,3%) e em Goiás (25,0% para ambos) do que o detectado em Minas Gerais (12,5% e 0), respectivamente. A compreensão do maior potencial patogênico a nível molecular em *C. jejuni* e *C. coli* em relação às origens de isolamento, à manifestação de doença e à associação de fatores de virulência ainda não foram bem elucidados (COOTE et al., 2007). Dessa forma, estudos mais amplos são necessários para fornecer maiores informações sobre outros mecanismos patogênicos específicos ainda não bem definidos (RIPABELLI et al., 2010).

4.4. Expressão de genes associados à virulência

Propriedades potenciais de virulência em *Campylobacter* incluem motilidade, quimiotaxia, colonização, capacidade de adesão, invasão e translocação epitelial, termotolerância, sobrevivência intracelular e produção de toxinas (YOUNG et al., 2007). A regulação da expressão gênica dessas propriedades de patogenicidade é dependente de vários fatores intrínsecos ao microrganismo, mas também está relacionada à sensibilidade a pequenas variações do ambiente, tais como a disponibilidade de nutrientes e mudanças de temperatura (GANDRAA et al., 2008).

A avaliação da transcrição de genes associados à virulência é um fator que reforça o poder patogênico das cepas encontradas. Assim, a presença dos transcritos mostra que o microrganismo está se transcrevendo para uma possível expressão desses genes. A avaliação dos transcritos foi realizada nas 56 cepas de *Campylobacter* spp. que apresentaram genes de virulência. As Figuras 8 e 9 ilustram os resultados encontrados para os genes *ciaB* e *dnaJ*, respectivamente.

A análise realizada por RT-PCR constatou a presença de transcritos de virulência em 32/56 (57,1%) das cepas avaliadas. Deste total, 87,5% (28/32) tratavam-se de genes expressos por *C. jejuni* e 12,5% (4/32) por *C. coli*. A Tabela 14 evidencia o número de cepas que expressaram os genes estudados. Em *C. jejuni* foi possível constatar que 8/28 (28,6%) apresentaram apenas transcritos do gene *ciaB*, 2/28 (7,1%) somente expressão para *dnaJ* e 18/28 (64,3%) para ambos os genes. Ao avaliar *C. coli* observa-se que todas (4/4) expressaram transcritos para ambos os *primers* em estudo.

A transcrição do gene *ciaB* está envolvida na invasão de células epiteliais (POLY & GUERRY, 2008). CHANG et al. (2011) relataram que a infecção de *C. jejuni* requer a proteína Ciab para a internalização eficiente da bactéria nas células hospedeiras.

As proteínas oriundas do gene *dnaJ* apresentam uma importante função na superação de variações bruscas de temperatura, de forma que o microrganismo se torne capaz de sobreviver e adaptar-se à nova temperatura (STINTZI, 2003). A resposta ao choque térmico está associada ao desempenho na colonização do trato intestinal e à sobrevivência bacteriana a altas temperaturas (KONKEL et al., 1998).

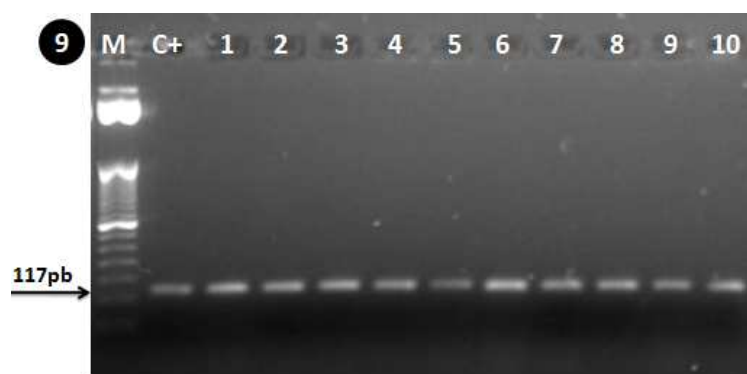
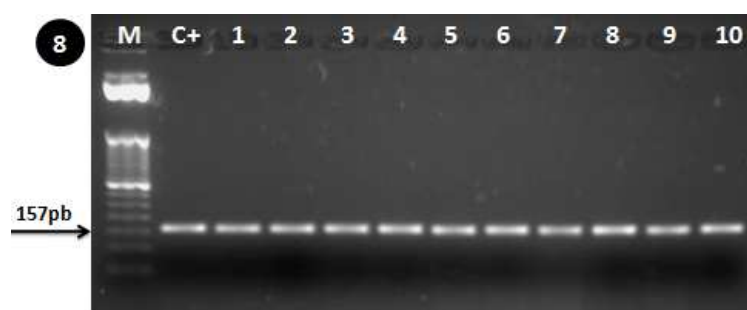


Tabela 14: Presença e porcentagem de transcritos de virulência em *Campylobacter* spp. isolados de amostras de frangos.

Genes de expressão	Espécie			Total – N=32 n (%)
	<i>C. jejuni</i> N=46	<i>C. coli</i> N=8	<i>Campylobacter</i> spp. N=2	
Apenas <i>ciaB</i>	8	-	-	8 (25,0)
Apenas <i>dnaJ</i>	2	-	-	2 (6,25)
<i>ciaB</i> e <i>dnaJ</i>	18	4	-	22 (68,75)
Total – n (%)	28 (60,9)	4 (50,0)	0	32 (100,0)

N – número total de cepas com expressão de transcritos; n – número de cepas que expressam os genes em cada espécie; % - porcentagem encontrada para expressão por espécies.

Vale ressaltar que foram avaliadas 46 cepas de *C. jejuni*, oito cepas de *C. coli* e duas de *Campylobacter* spp. Desse total, 60,9% (28/46) das estirpes de *C. jejuni* foram capazes que expressar transcritos para os genes *ciaB* e/ou *dnaJ* e em *C. coli* a porcentagem foi de 50,0% (4/8).

Recentemente tem havido um interesse crescente na determinação dos efeitos ambientais sobre a virulência e transcrição de genes em patógenos de origem alimentar (BERGHOLZ et al., 2009; OLESEN & JESPERSEN, 2010; OLESEN et al., 2009; 2010; RIEU et al., 2010), porém muito pouco se sabe sobre esses parâmetros em *Campylobacter* (LIGOWSKA et al., 2011; MA et al., 2009; PHONGSISAY et al., 2007; XIE et al., 2011).

Neste estudo, as análises realizadas avaliaram a presença de transcritos sobre condições normais, sem submeter o microrganismo a nenhuma condição de estresse, nem em cultura de células ou inoculando em animais. O fato de algumas cepas não expressarem transcritos para os genes *ciaB* e/ou *dnaJ* pode estar explicado por POLI et al. (2012) que afirmaram que as diferentes estirpes de *C. jejuni* e de *C. coli* podem assumir diversas propriedades para modular sua virulência podendo ser mais patogênica do que outras dependendo da situação que são submetidas, logo, possuem capacidades diversas para causar doença e lidar com o estresse.

A expressão de fatores de virulência é regulada de forma a impedir a sua produção desnecessária e também como forma de escape do sistema imunológico do hospedeiro. A presença de habilidades específicas em *C. jejuni* influencia na

superfície bacteriana, no metabolismo e no comportamento, contribuindo para a virulência, permitindo a rápida alteração de seu fenótipo (MOURIK, 2011). Estudos realizados por STINTZI et al. (2005) e WOODALL et al. (2005) confirmaram grandes diferenças na transcrição de genes *in vitro* e sob condições de crescimento *in vivo*.

O estudo dos sistemas de regulação que explicam o comportamento de *C. jejuni* em diferentes condições ambientais está aumentando devido aos rápidos avanços da genômica e da proteômica (PARKER et al., 2006; HOFREUTER et al., 2006; PARKHILL et al., 2000; PEARSON et al., 2007). Vários perfis de transcrição em *C. jejuni* mantida sob uma variedade de condições de crescimento indicam uma variação considerável na expressão do gene (ANDERSEN et al., 2005; CARRILLO et al., 2004; ELVERS et al., 2005; GAYNOR et al., 2005; HENDRIXSON, 2006; HOLMES et al., 2005; MACKICHAN et al., 2004; MOEN et al., 2005; PALYADA et al., 2004; RAPHAEL et al., 2005; STINTZI et al., 2005; STINTZI, 2003; WOODALL et al., 2005; WÖSTEN et al., 2006; WÖSTEN et al., 2010; MOURIK, 2011), apoiando a idéia de que a regulação dos genes é essencial para a manutenção da sobrevivência de *C. jejuni*. Nos últimos anos, uma série de sistemas de transdução de sinais que podem contribuir para a adaptação bacteriana foram identificados em *C. jejuni* (MACKICHAN et al., 2004). Este microrganismo desenvolveu um repertório de mecanismos específicos que permitem uma rápida adaptação metabólica, além das alterações no crescimento e no comportamento nos diversos ambientes (frango/homem), o que explica as diferenças na patologia quando comparada a outras enterobactérias como *Salmonella* e *Shigella* (MOURIK, 2011).

MA et al. (2009) avaliaram a expressão da virulência associada aos genes *cdtB*, *cadF* e *ciaB* ao submeter *C. jejuni* ao estresse nutricional. A transcrição de *cdtB* foi observada somente nos períodos de 2 a 6 horas, enquanto que a expressão de *cadF* e *ciaB* foi bastante reduzida entre 24 e 48 horas sob estresse nutricional. Distintamente, a exposição ao óxido de zinco (ZnO), um aditivo alimentar não afetou significativamente a transcrição dos genes *cdtB*, *cadF* e *ciaB* (XIE et al., 2011). RIVERA-AMILL et al. (2001) afirmaram que a expressão dos genes que codificam as proteínas Cia está sujeita à regulação ambiental, tal como observado na cultura em células eucarióticas, as quais possuem componentes que induzem essa transcrição.

KONKEL et al. (1998) e REID et al. (2008) ao analisarem proteínas de choque térmico, tais como ClpP e DnaJ, constataram que sua síntese varia com a temperatura de forma que um aumento súbito na temperatura aumenta consideravelmente sua síntese. Já durante o estresse submetido pelo choque frio, os genes de tradução de proteínas de choque térmico reprimem sua expressão (BEALES, 2004).

A distribuição dos transcritos de virulência quanto a origem (Minas Gerais, Distrito Federal e Goiás) e condição da amostra em que *Campylobacter* spp. foi isolada (frango congelado e frango resfriado) pode ser observada na Tabela 15. Pode-se constatar que 55,0% (26/40) estirpes que possuíam genes de virulência isoladas de frangos em Minas Gerais expressaram a característica de invasão (*ciaB*) e/ou termotolerância (*dnaJ*). No Distrito Federal e em Goiás, observou-se que 33,3% (4/12) e 50,0% (2/4) das cepas transcreveram estes genes, respectivamente.

Tabela 15: Distribuição por local de origem da frequência e porcentagem de transcritos de virulência de *C. jejuni* e *C. coli* isolados de carcaças de frangos congeladas e resfriadas.

Genes de expressão	Origem de isolamento						Total n(%)
	Amostras resfriadas		Amostras congeladas				
	Minas Gerais N=26		D. Federal N=4		Goiás N=2		
	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	
	n(%)	n(%)	N(%)	n(%)	n(%)	n(%)	
<i>Apenas ciaB</i>	7	-	1	-	-	-	8 (25,0)
<i>Apenas dnaJ</i>	1	-	-	-	1	-	2 (6,2)
<i>ciaB dnaJ</i>	14	4	3	-	1	-	22 (68,8)
Total	22 (68,8)	4 (12,5)	4 (12,5)	0	2 (6,2)	0	32 (100,0)

N – número total de cepas com expressão de transcritos; n – número de cepas que expressam os genes em cada espécie; % - porcentagem encontrada para expressão por espécie.

Os dados da Tabela 15 indicam uma menor transcrição para o gene *dnaJ* quando se compara ao gene *ciaB*. Provavelmente, esse fato pode estar relacionado à baixa expressão de genes de choque térmico quando as bactérias são submetidas ao estresse a 4°C e -20°C (BEALES, 2004). De acordo com STINTZI & WHITWORTH (2003), em geral, a expressão de cerca de 13% do genoma bacteriano é significativamente alterado no choque frio. Estes mesmos autores

afirmaram que, apesar disso, *Campylobacter* apresenta mecanismos de tolerância e adaptação às baixas temperaturas que incluem a aquisição ou a biossíntese de moléculas crioprotetoras, levando a alterações da composição lipídica da membrana de forma a mantê-la viável nessas condições.

C. jejuni é capaz de se adaptar e sobreviver a uma vasta gama de condições ambientais, de forma ubíqua e persistente, apesar de ter um genoma relativamente pequeno, uma temperatura ótima elevada para seu crescimento, uma sensibilidade para os níveis elevados de oxigênio atmosférico e uma necessidade de meios enriquecidos e seletivos para seu crescimento (PARK, 2000). Portanto, é essencial para *C. jejuni* ter a capacidade para responder rapidamente às mudanças nas condições ambientais através de uma série de sistemas especializados. Estes sistemas funcionam de forma a promover um ajuste de seu transcriptoma de forma a modificar e facilitar uma resposta à condição submetida que se traduz em mudança física (LODGE, 2007).

A resposta de *C. jejuni* às mudanças de temperatura é talvez o tema mais investigado quanto ao seu sistema regulatório. *Campylobacter* pode ser encontrada em uma vasta gama de temperaturas ambientais desde alimentos congelados/refrigerados (-20°C/4°C) até o trato gastrointestinal das aves (42°C). Por conseguinte, é evidente supor que *C. jejuni* possui ambos os mecanismos de defesa ao frio e a altas temperaturas. Várias proteínas de tolerância às variações de temperatura foram identificadas em *C. jejuni*, porém não há homologia com as mesmas encontradas em outras enterobactérias, como *E. coli* (RATH & JAWALI, 2006).

A habilidade de invasão em células por *Campylobacter* é um requisito importante em sua patogenia (SOSULA et al., 1988). A máxima transcrição de genes associados à invasão, como o caso de *ciaB*, ocorre quando as cepas estão em contato com células do epitélio intestinal do hospedeiro de forma que *C. jejuni* se torna mais hábil a sintetizar e secretar um conjunto de proteínas CiaB, designadas como antígenos de invasão de *Campylobacter* (RIVERA-AMILL et al., 2001; KONKEL et al., 2004). A presença de proteínas CiaB aumenta a gravidade da doença com o desenvolvimento de sintomas diarreicos 24 horas após o contato,

diferente de cepas com ausência de tradução dessas proteínas que desenvolvem esse sintoma somente após três dias de incubação (KONKEL et al., 2001).

Os resultados apresentados nesse estudo concretizam a variação observada na transcrição de genes em *Campylobacter*. É importante ressaltar que embora a maioria dos trabalhos atribuam uma maior ênfase para expressão em *C. jejuni*, o presente estudo destaca a importância também relevante à *C. coli* na transcrição de genes associados à virulência que potencializam sua patogenia. A submissão a diferentes condições podem promover variações no transcriptoma desses agentes como forma de superação e adaptação ao ambiente a fim de permitir sua sobrevivência e multiplicação.

4.5. Transcrição de genes de virulência em *C. jejuni* após infecção em células Caco-2

Do total de 46 cepas de *Campylobacter jejuni* que possuíam genes de virulência, 18 (39,1%) não foram capazes de transcrever os genes *ciaB* e *dnaJ* nas condições normais. Dessa forma, 14/18 estirpes foram selecionadas para inoculação em células Caco-2, por apresentarem pelo menos três dos genes de virulência estudados (*flaA*, *pldA*, *ciaB*, *cadF* e complexo *cdt*).

A Tabela 16 caracteriza as 14 cepas submetidas ao cultivo em células que não apresentaram transcritos, mas apresentaram genes de virulência. Destas, 9/14 (64,3%) *C. jejuni* apresentaram todos os genes de virulência estudados.

Após a cultura em células, foi possível constatar que 2/14 (14,3%) cepas passaram a expressar o gene *ciaB*. Trata-se das cepas de número 13 e 46, que apresentaram todos os genes estudados. Quanto ao gene *dnaJ*, sua transcrição foi detectada em todas as cepas testadas. As Figuras 10 e 11 ilustram a expressão dos transcritos dos genes *ciaB* e *dnaJ* nas cepas testadas 24 horas após inoculação em células Caco-2.

Tabela 16: Caracterização, quanto à origem e à presença de genes de virulência, das cepas de *C. jejuni* isoladas de carcaças de frangos, que não apresentaram transcritos de virulência, inoculadas em células Caco-2.

Identificação <i>C. jejuni</i>	Genes					Origem/Condição da amostra
	<i>flaA</i>	<i>pldA</i>	<i>cadF</i>	<i>ciaB</i>	<i>cdtABC</i>	
7	+	-	+	-	+	Minas Gerais/resfriado
9	+	+	+	+	+	Distrito Federal/congelado
11	+	+	+	+	+	Minas Gerais/resfriado
12	+	+	+	+	+	Distrito Federal/congelado
13	+	+	+	+	+	Minas Gerais/resfriado
17	+	+	-	+	+	Minas Gerais/resfriado
29	-	+	+	+	-	Minas Gerais/resfriado
32	+	+	+	+	+	Minas Gerais/resfriado
35	+	+	+	+	+	Minas Gerais/resfriado
37	+	+	+	+	-	Minas Gerais/resfriado
39	+	+	+	+	+	Distrito Federal/congelado
40	+	+	+	+	-	Distrito Federal/congelado
45	+	+	+	+	+	Minas Gerais/resfriado
46	+	+	+	+	+	Minas Gerais/resfriado

+: presença do gene; -: ausência do gene.



Figura 10: Gel de RT-PCR para expressão de *ciaB* das cepas de *C. jejuni* após inoculação em células Caco-2. M (marcador de peso molecular de 50pb, Invitrogen); C+ (controle positivo de *C. jejuni* NCTC 11351); 13 e 46 (estirpes de *C. jejuni* positivas para a transcrição do gene *ciaB*); 7-12 e 17-45 (estirpes de *C. jejuni* negativas para a transcrição do gene *ciaB*).



Figura 11: Gel de RT-PCR para expressão de *dnaJ* das cepas de *C. jejuni* após inoculação em células Caco-2. M (marcador de peso molecular de 50pb, Invitrogen); C+ (controle positivo de *C. jejuni* NCTC 11351); 7-46 (estirpes de *C. jejuni* positivas para a transcrição do gene *dnaJ*).

LI et al. (2008) realizaram um estudo com cepas de *C. jejuni* oriundas de frangos e de humanos e avaliaram a expressão dos genes *ciaB* e *dnaJ* após inoculação em células intestinais de embriões de frangos (CEICs). Os autores observaram um aumento significativo na expressão de todos os genes além de constatarem que alguns componentes secretados durante a cultura são responsáveis pela regulação dessa expressão. Para o gene *dnaJ* houve maior expressão nas bactérias em suspensão no cultivo quando comparada a transcrição de *ciaB*, assim como o presente estudo.

O cultivo das estirpes sob condições de maiores temperaturas, ambiente adequado (5%CO₂), com a presença de nutrientes e células que permitam o desenvolvimento de sua patogenia, podem ter contribuído para a expressão dos genes *ciaB* e *dnaJ*. POLI et al. (2012) afirmaram que quando *C. jejuni* é mantida a baixas temperaturas seu potencial de virulência é reprimido. E, de acordo com STINTZI (2003), a manutenção de *C. jejuni* sob temperaturas elevadas promove uma mudança global em seu transcriptoma, constatando seu perfil transitório. Estes dados, explicam a presença de transcrição dos genes *ciaB* e *dnaJ* nas cepas de *C. jejuni*, isoladas de frangos resfriados e congelados, somente após inoculação nas células Caco-2 mantidas em temperaturas elevadas (37°C).

O gene *dnaJ* desempenha um papel importante na tradução de proteínas ligadas a termotolerância em *C. jejuni*, permitindo que o microrganismo seja capaz de colonizar células em altas temperaturas, equivalentes a 46°C (KONKEL et al., 1998), o que justifica a elevada transcrição deste gene após inoculação em cultura de células Caco-2 há 37°C a 5% de CO₂, observada no presente trabalho, já que

anteriormente as cepas estavam submetidas baixas temperaturas nas carcaças de frangos (4°C e -20°C) e na cultura de células as bactérias encontraram melhores condições para expressarem sua virulência.

A expressão de transcritos do gene *ciaB* pode estar relacionada a presença de componentes específicos das células eucarióticas hospedeiras, que induzem a síntese e secreção da proteína CiaB (RIVERA-AMILL et al., 2001).

A transcrição após a cultura em células Caco-2 para o gene *ciaB* (2/14 – 14,3%) foi consideravelmente baixa em relação ao observado para *dnaJ* (14/14 – 100%). Esse fato concorda com os resultados encontrados por POLI et al. (2012), que ao inocularem em células Caco-2 três cepas distintas de *C. jejuni*, isoladas de frangos e humanos, submetidas a uma variação na temperatura de 4°C para 37°C durante 24 horas, constataram que a capacidade de invasão não foi afetada pela mudança na temperatura pela técnica de RT-PCR para o gene *ciaB*.

Estudo realizado por CHAISOWWONG et al. (2012) comprovou que células viáveis não-cultiváveis (VNC) de *C. jejuni*, que assumiram essa característica após submissão a temperatura de 4°C, adquiriram a capacidade de invadir células humanas do epitélio intestinal (Caco-2) *in vitro*, constatada pela detecção de altos níveis de expressão de genes de virulência, tais como *ciaB*. Dessa forma, os autores concluíram que, apesar do estado de células VNC promovido pelo estresse a baixas temperaturas, *C. jejuni* mantém sua virulência podendo eventualmente levar a doença em humanos, caracterizando uma preocupação potencial à segurança alimentar.

MOEN et al. (2005) investigaram padrões de expressão gênica global de *C. jejuni* que foi cultivada a 5°C por sete dias, e encontrar uma elevada repressão na expressão gênica. Em contraste, um grande número de genes envolvidos no metabolismo energético aumentou sua transcrição quando as cepas foram cultivadas a 25°C, indicando que a *C. jejuni* necessita de maiores temperaturas para efetuar suas funções fisiológicas. Dessa forma, a tensão sob baixas temperaturas poderia ter induzido a redução da expressão de genes de virulência no presente estudo. Portanto, as bactérias podem reduzir sua transcrição em ambientes estressantes e elevar a mesma ao encontrar condições favoráveis.

Além disso, o transcriptoma de *C. jejuni* apresenta um sistema de transdução de sinais que permite sua adaptação às diversas situações sendo mais eficaz *in vivo* do que *in vitro* (MOURIK, 2011). Dessa forma, em condições *in vivo* seria possível obter um maior número de cepas com transcrição para o gene *ciaB*.

Apesar da ausência de fatores de virulência que são típicos à maioria dos outros enteropatógenos, *C. jejuni* apresenta um repertório de mecanismos sofisticados que permitem sua adaptação metabólica e alterações no crescimento de forma rápida nas diferentes condições ambientais em que são submetidos. Essa aptidão permite a detecção dos diferentes comportamentos em análises de transcrição gênica, de forma a determinar e explicar as diferenças observadas na patologia pelas diversas estirpes (MOURIK, 2011).

Os estudos sobre os parâmetros relacionados à transcrição de genes de virulência em *C. jejuni* são escassos. Dados sobre análises de RT-PCR e de cultura em células Caco-2 apresentam-se como ferramentas úteis para diferenciar os potenciais de virulência em cepas de *C. jejuni* (POLI et al., 2012). Dessa forma, o presente estudo destaca a capacidade de *Campylobacter* para modular o seu potencial de virulência, alterando sua expressão gênica conforme a condição que lhe é imposta.

4.6. Alterações morfológicas em células Caco-2

As células Caco-2 têm sido usadas como um modelo do epitélio intestinal para a interação de *C. jejuni* com seu hospedeiro (EVEREST et al., 1992; KONKEL et al., 1992; HARVEY et al., 1999). Essas células têm propriedades semelhantes aos enterócitos do cólon, com formação de bordas em escova com microvilosidades e junções intercelulares, que garantem a resistência transepitelial, exibindo assim as mesmas propriedades do epitélio intestinal do hospedeiro. Além disso, elas são utilizadas como modelos que caracterizam o epitélio de absorção com capacidade de transporte de fluidos (DELIE & RUBAS, 1997).

A seleção das cepas para a inoculação nas células foi baseada nas características de virulência e na similaridade filogenética. Entre as cepas de *C. jejuni* que possuíam mais características de virulência (Tabela 17), e proximidade

genética inferior a 80% (Figura 12), foram selecionadas cinco para inoculação em células do epitélio intestinal humano (Caco-2), que correspondem aos números de identificação 08, 25, 30, 34 e 36. Após incubação por 72 horas observou-se a ocorrência de alterações na morfologia das células quando comparadas ao controle negativo, conforme demonstrado na Figura 13.

Tabela 17: Caracterização, quanto a resistência antimicrobiana e à presença e expressão de genes de virulência, das cinco cepas de *C. jejuni* mais virulentas selecionadas para inoculação em células Caco-2.

Número da cepa	Resistência Antimicrobiana		Presença de genes de virulência					Presença de transcritos	
	ERI	NOR	<i>flaA</i>	<i>pldA</i>	<i>cadF</i>	<i>ciaB</i>	<i>cdtABC</i>	<i>ciaB</i>	<i>dnaJ</i>
08	R	S	+	+	+	+	+	+	+
25	S	S	+	+	+	+	+	+	+
30	S	R	+	+	+	+	+	+	+
34	S	R	+	+	+	+	+	+	+
36	S	R	+	+	+	+	+	+	+

ERI – eritromicina; NOR – norfloxacin; R – resistência; S – sensibilidade; + - presença do gene ou do transcrito.

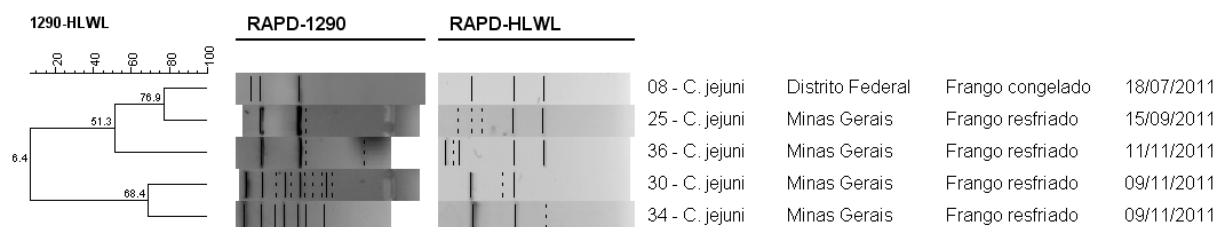


Figura 12: Dendrograma das cepas de *C. jejuni* que mais apresentaram caracteres de virulência, pela técnica de RAPD-PCR com os *primers* 1290 e HLWL, utilizando a média de experimentos (*average from experiments*) com tolerância de 1,5% e método UPGMA com otimização de 80%, pelo programa GelCompar.

Na avaliação morfológica foi verificada diferenças na confluência das células. Antes da infecção, todas as lamínulas foram avaliadas quanto a confluência apresentavam-se diferenciadas e confluentes. Após infecção, tanto controle positivo como todas as cepas tiveram perda de confluência em quase toda sua totalidade (Figura 13).

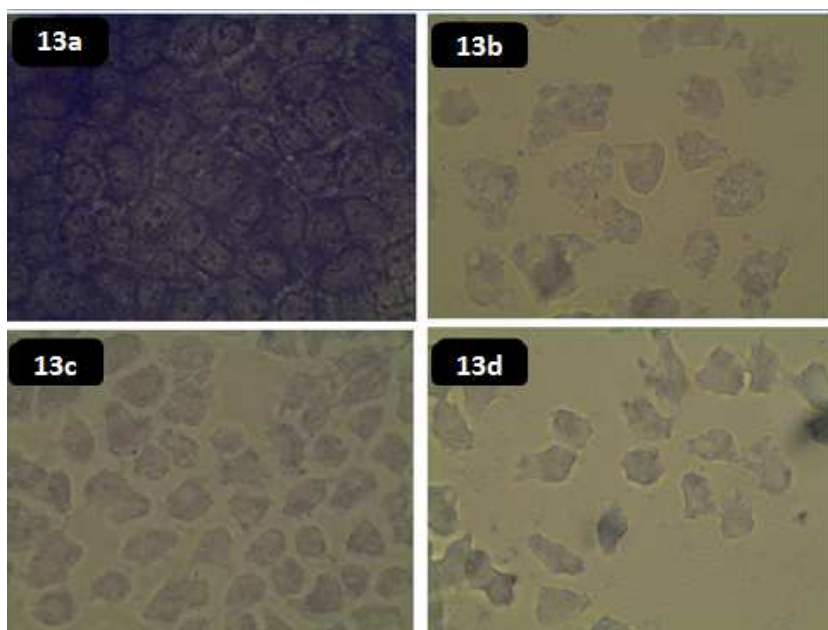


Figura 13: Fotomicrografia em microscopia óptica de luz em objetiva de 100x, ilustrando a atuação de *C. jejuni* nas células Caco-2. 13a – Controle negativo, contendo somente as células do epitélio intestinal humano. 13b – Controle positivo composto pelas células inoculadas com *C. jejuni* NCTC 11351. 13c e 13d – Células inoculadas com as cepas de *C. jejuni*, correspondentes aos números 08 e 36, respectivamente.

A Figura 14 demonstra a presença de *C. jejuni* de forma aglomerada nas células Caco-2, provavelmente atuando no processo de invasão e colonização celular.

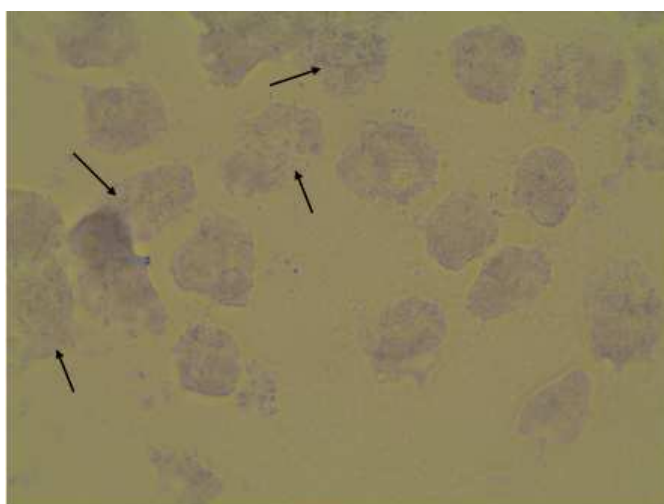


Figura 14: Fotomicrografia em microscopia óptica de luz em objetiva de 100x com aglomerações de *C. jejuni* (cepa de número 25) nas células Caco-2, demonstrando sua propriedade invasiva, conforme evidenciado nas setas.

A perda de confluência ou junção entre as células, observada tanto no controle positivo quanto no grupo teste e ilustrada nas Figuras 13, 14 e 15, também foi relatada por MACCALLUM et al. (2005) que detectaram a perda das junções de oclusão entre as células após contato com *C. jejuni* por 24 horas. Os autores enfatizaram a importância dessas junções na integridade celular, refletindo na perda da capacidade de transporte de fluidos e eletrólitos entre as células, levando a perda da função. Dessa forma, se estas observações são manifestadas *in vivo*, é provável que possam contribuir para a sintomatologia clínica da campilobacteriose.

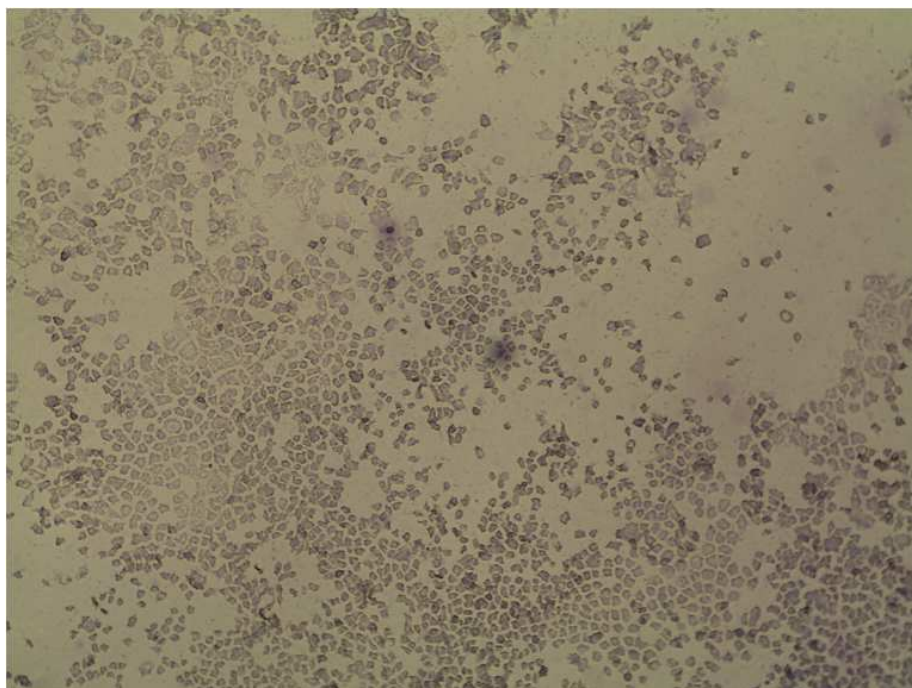


Figura 15: Fotomicrografia em microscopia óptica de luz em objetiva de 40x de *C. jejuni* (cepa de número 25) em células Caco-2 com evidência de total perda da confluência intercelular.

O elevado tempo de contato com as células, equivalente a 72 horas, pode ter favorecido a completa perda de confluência entre elas. O tempo necessário para *C. jejuni* para interromper as junções intercelulares *in vitro* é maior que o observado em *Salmonella* Typhimurium (JEPSON et al., 1995) e *Escherichia coli* enteropatogênicas (BERKES et al., 2003). Porém esse fato não reduz as habilidades de alterações na fisiologia das células por *C. jejuni* além de todas as implicações

resultantes na patogenia causada por estes microrganismos (MACCALLUM et al., 2005).

A integridade juncional das células é pouco mencionada em campilobacteriose. No entanto, a histopatologia de biópsias intestinais de doença aguda mostra intensa infiltração de neutrófilos na mucosa infectada e nas fezes diarréicas (SKIRROW & BLASER, 2000), que presumivelmente tiveram de atravessar o epitélio intestinal, que é facilitada através da atuação bacteriana no alargamento das junções intercelulares (MACCALLUM et al., 2005).

Todos os aspectos levantados quanto às alterações na morfologia celular estão diretamente relacionados à evolução da doença (BACON et al., 2000). Dessa forma, a análise das cepas na cultura de células caracteriza um importante indicador de patogenicidade em *C. jejuni*.

4.7. Similaridade entre os isolados

A tipagem molecular de *Campylobacter* spp. tem sido utilizada para apoiar os estudos sobre a epidemiologia de infecções causadas por esse microrganismo (AQUINO et al., 2010). Apesar da utilização das técnicas como eletroforese em campo pulsado (*pulsed-field gel electrophoresis*) e a tipagem de sequência multilocus (*multilocus sequence typing*) serem altamente padronizados, os métodos baseados na reação em cadeia da polimerase, como RAPD-PCR também apresentam sucesso na discriminação de *C. jejuni* e *C. coli* (ZORMAN et al., 2006; MADDEN et al., 2007).

AQUINO et al. (2010) classificaram o método de RAPD-PCR como o melhor em relação ao seu poder discriminatório, uma vez que a técnica apresentou uma maior diversidade genética quando comparada ao teste do ERIC-PCR.

A análise de similaridade entre as cepas pelos dendrogramas demonstrou a grande diversidade em *C. jejuni* e *C. coli* para ambos os *primers* testados, 1290 e HLWL. Houve divergência quanto ao poder discriminatório dos *primers* em relação às espécies, sendo HLWL mais distinto em *C. jejuni* e *C. coli* e 1290 em *Campylobacter* spp., pela análise utilizando coeficiente de similaridade de Dice.

As Figuras 16, 17 e 18 demonstram a proximidade genética dos isolados de

cada uma das espécies para ambos os *primers*. A análise comparativa foi realizada pelo coeficiente de similaridade de Dice na forma de dendrogramas que discriminaram os grupos semelhantes filogeneticamente para cada um dos *primers*. A avaliação final foi baseada na média de experimentos (*average from experiments*), utilizando os dois *primers* pelo programa GelCompar.

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 80% foram considerados como pertencentes a um mesmo genótipo.

Para cada espécie foi identificado os genótipos e os *clusters*, sendo que estes foram comparados considerando o local de isolamento, a data da coleta, as características fenotípicas, tais como resistência antimicrobiana e expressão de transcritos de virulência, e genotípicas, que incluem a presença dos genes *flaA*, *pldA*, *cadF*, *ciaB* e *cdtABC*.

Foram identificados 15 *clusters* em *C. jejuni* correspondentes aos perfis de A-O com similaridade filogenética superior a 80%, conforme consta na Figura 16. Também foram detectados 18 genótipos distintos, que comprovam a elevada diversidade genética entre os 55 isolados.

Quanto ao local de isolamento, foi possível constatar que os perfis D, E, J, K, L e O apresentaram estirpes oriundas da mesma região, e, coincidentemente, todas de Minas Gerais. Todavia, o mais predominante foi a presença de *clusters* com cepas provenientes de frangos de locais distintos, nos grupos A, B, C, F, G, H, I, M e N. Este fato indica que há transferência dos diferentes genótipos entre três regiões estudadas e provavelmente para os demais estados do país além das diferentes nações que importam os produtos do Brasil.

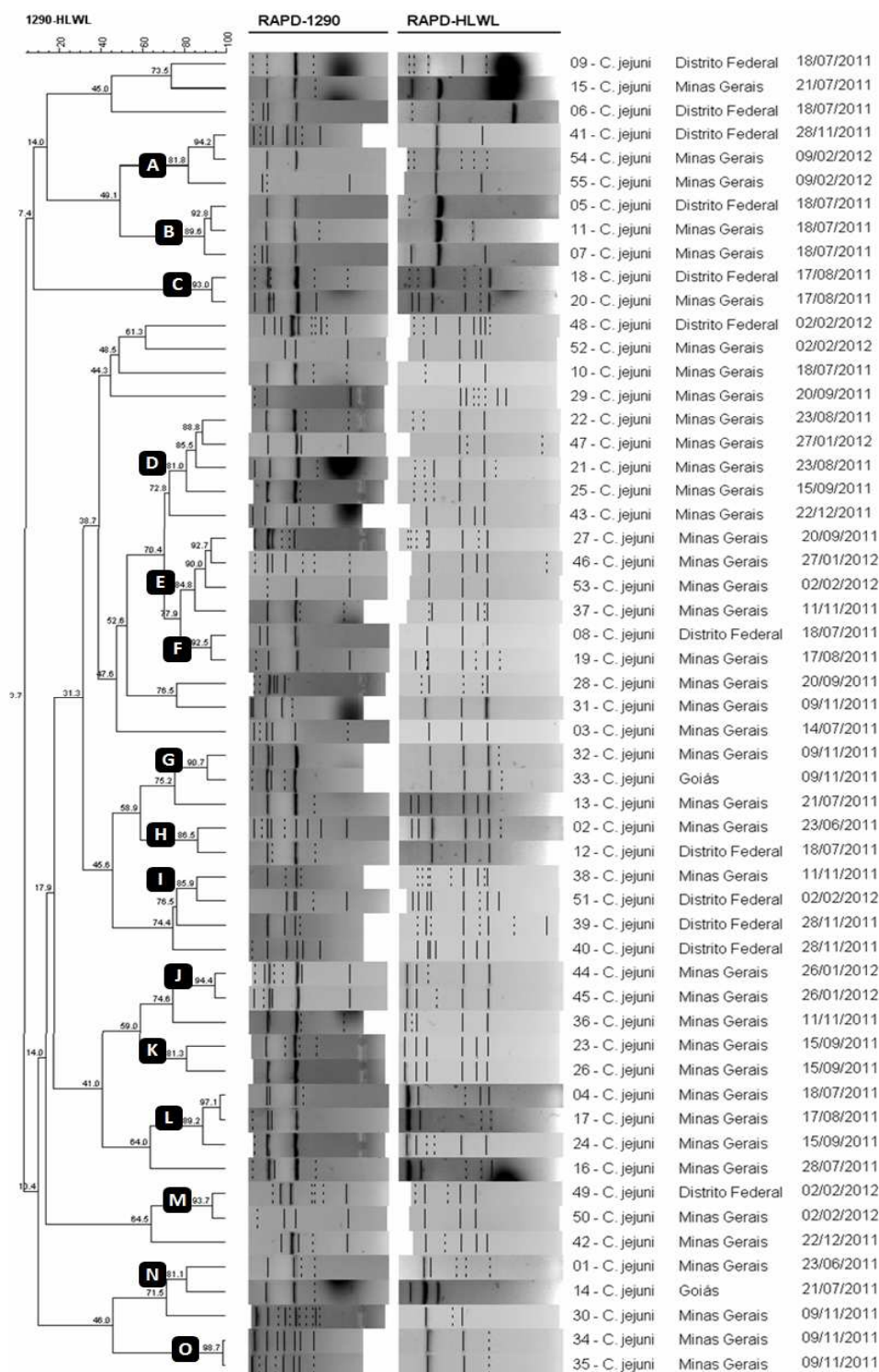


Figura 16: Dendrograma dos 55 isolados de *C. jejuni* oriundos de frangos resfriados e congelados, pela técnica de RAPD-PCR com os *primers* 1290 e HLWL, utilizando a média de experimentos (*average from experiments*) com tolerância de 1,5% e método UPGMA com otimização de 80%, pelo programa GelCompar. Perfil A – *cluster* com 81,8% de homologia, composto por um subgrupo com 94,2% de similaridade. Perfil B – *cluster* com 89,6% de homologia, composto por um subgrupo com 92,8% de similaridade. Perfil C – *cluster* com 93,0% de homologia. Perfil D – *cluster* com 81,0% de

homologia, composto de dois subgrupos com 88,8% e 85,5% de similaridade. Perfil E – *cluster* com 84,8% de homologia, composto de dois subgrupos com 92,7% e 90,0% de similaridade. Perfil F – *cluster* com 92,5% de homologia. Perfil G – *cluster* com 90,7% de homologia. Perfil H – *cluster* com 86,5% de homologia. Perfil I – *cluster* com 85,9% de homologia. Perfil J – *cluster* com 94,4% de homologia. Perfil K – *cluster* com 81,3% de homologia. Perfil L – *cluster* com 89,2% de homologia, composto por um subgrupo com 97,1% de similaridade. Perfil M – *cluster* com 93,7% de homologia. Perfil N – *cluster* com 81,1% de homologia. Perfil O – *cluster* com 98,7% de homologia.

A comparação referente à data da coleta das amostras indica que os perfis B, C, G, J, K, M e O representam *clusters* com cepas isoladas no mesmo dia de coleta, sendo que os grupos J, K e O possuem estirpes de mesmo lote, respectivo para cada perfil. Estes três *clusters* inferem a possibilidade de contaminação cruzada em alguma etapa do processo produtivo, que promoveu a presença de cepas com elevada similaridade nos diferentes frangos do mesmo lote. Os demais grupos, A, D, E, F, H, I, L e N, possuem estirpes de lotes diferentes, que fazem sugerir uma provável negligência a normas de biossegurança, que podem ter contribuído para a persistência do microrganismo ao longo da cadeia produtiva. Esta hipótese pode ser sustentada na observação do *cluster* E, que possui 84,8% de similaridade, composto por quatro estirpes provenientes de frangos de Minas Gerais identificadas nos meses de setembro e novembro de 2011 e janeiro e fevereiro de 2012, comprovando a persistência do genótipo por pelo menos seis meses.

No que se refere às características fenotípicas é importante ressaltar a resistência antimicrobiana às drogas de escolha no tratamento de campilobacteriose (macrolídeo e fluoroquinolona). Apenas o *cluster* G, com homologia de 90,7% entre seus isolados, apresentou resistência ao macrolídeo eritromicina nos seus componentes. A resistência a fluoroquinolona (norfloxacin) foi detectada de forma genérica nos grupos D, E, I, J, K, N e O, sendo que para os perfis D e E esse caráter não foi determinado em todos os membros, mas sim em um subgrupo, com proximidade genética de 88,8% e 92,7%, respectivamente.

A transcrição de genes de virulência, com ou sem inoculação em células Caco-2, foi comum aos *clusters* G, H, J, N e O para o gene *dnaJ* e A, C, E e K para ambos os genes (*ciaB* e *dnaJ*). Para os grupos A e E esse padrão foi encontrado somente nos subgrupos com similaridade filogenética de 94,2% e 92,7%, respectivamente.

A análise das características genotípicas referentes à presença de genes de virulência constatou-se que os perfis B, C, E, H, J, N e O apresentaram todos os genes de virulência em comum (*flaA*, *pldA*, *cadF*, *ciaB* e *cdtABC*). Contudo, para os grupos B e E este fato só foi determinado nos subgrupos com homologia de 92,8% e 92,7%, respectivamente. O subgrupo com proximidade genética de 94,2% do *cluster* A apresentou os genes *pldA*, *cadF* e *ciaB* em comum. Para o *cluster* G a presença dos genes *flaA*, *cadF*, *ciaB* e *cdtABC* foi padrão do grupo. Os genes *cadF* e *ciaB* e os genes *flaA* e *cdtABC* foram detectados nos perfis K e L, respectivamente.

A análise do dendrograma das 19 cepas de *C. coli* permitiu a detecção de três *clusters*, identificados pelos perfis A, B e C e 12 genótipos distintos. Esses resultados comprovam o elevado nível de diversidade genética entre os isolados de *C. coli* (Figura 17).

O perfil A apresentou isolados de locais distintos, sendo um de Minas Gerais e outro do Distrito Federal. Além disso, as amostras de frango foram coletadas em datas diferentes, conforme descrito na Figura 17. Quanto às características fenotípicas, a resistência antimicrobiana às drogas de escolha no tratamento humano (macrolídeo e fluorquinolona) foi comum ao grupo.

A presença de um subgrupo com homologia de 95,4% foi detectada no *cluster* B, sendo este composto por cepas oriundas de um mesmo lote de Goiás, o que faz sugerir que houve transmissão horizontal das estirpes com este genótipo entre os frangos durante o processamento ou produção primária. Já a outra estirpe pertencente ao grupo B diverge das demais, já que é proveniente de Minas Gerais e foi coletada em data distinta.

Um padrão diferente foi encontrado no perfil C, em que ambas as cepas foram isoladas de Minas Gerais, porém de lotes distintos. É possível que a permanência deste genótipo entre lotes consecutivos seja consequência da não adequação das normas de biossegurança de um lote para o outro.

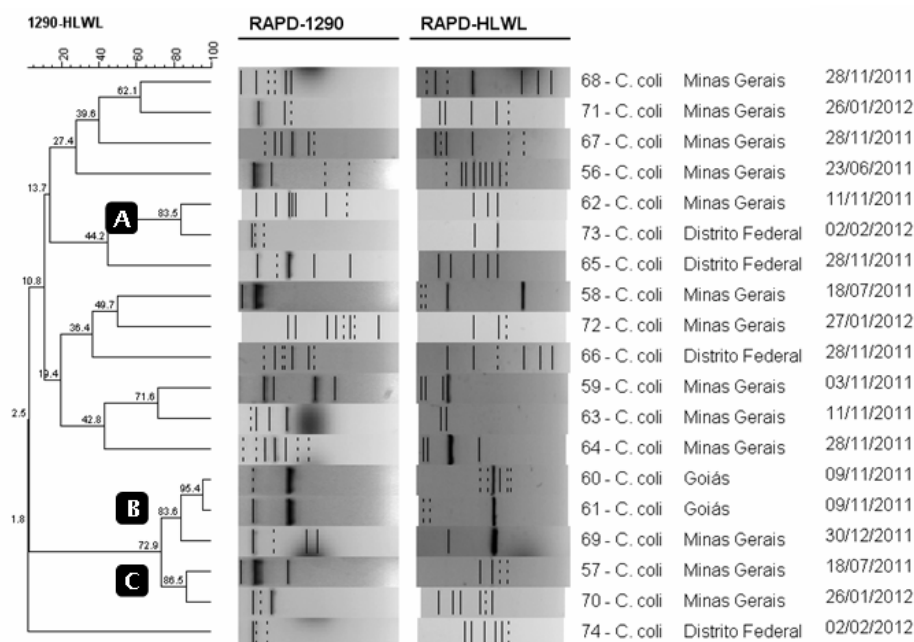


Figura 17: Dendrograma dos 19 isolados de *C. coli* oriundos de frangos resfriados e congelados, pela técnica de RAPD-PCR com os *primers* 1290 e HLWL, utilizando a média de experimentos (*average from experiments*) com tolerância de 1,5% e método UPGMA com otimização de 80%, pelo programa GelCompar. Perfil A – *cluster* com 83,5% de homologia. Perfil B – *cluster* com 83,6% de homologia, composto por um subgrupo com 95,4% de similaridade. Perfil C – *cluster* com 86,5% de homologia.

Em *Campylobacter* spp. observou-se maior homologia entre os 20 isolados. Foram identificados três *clusters* (A, B e C) e três genótipos distintos. Dois perfis são compostos por duas cepas cada e o outro por 13 estirpes com similaridade filogenética de 87,1%. Este dado faz sugerir que provavelmente trata-se de isolados de uma mesma espécie. A baixa proximidade genética encontrada em três genótipos isolados, estirpes de número 83, 88 e 92, pode indicar espécies diferentes das demais (Figura 18).

Os perfis A e C apresentaram padrões semelhantes, com estirpes oriundas de Minas Gerais, de lotes diferentes e encontradas em uma variação de tempo de cinco meses. Provavelmente, não houve uma limpeza adequada do ambiente de processamento dos frangos ou na granja.

Vários subgrupos foram detectados no *cluster* B, sendo todos com similaridade filogenética superior a 92,0%, com cepas oriundas das três regiões e de datas de coleta distintas. O subgrupo com homologia de 98,3% apresentou característica comum de resistência a eritromicina.

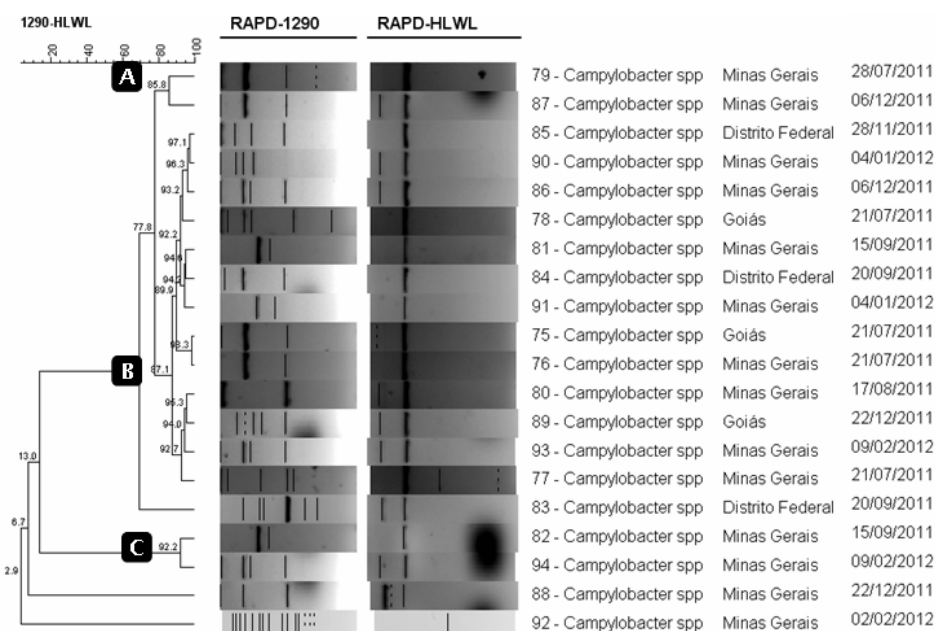


Figura 18: Dendrograma dos 20 isolados de *Campylobacter* spp. oriundos de frangos resfriados e congelados, pela técnica de RAPD-PCR com os primers 1290 e HLWL, utilizando a média de experimentos (*average from experiments*) com tolerância de 1,5% e método UPGMA com otimização de 80%, pelo programa GelCompar. Perfil A – cluster com homologia de 85,8%. Perfil B – cluster com homologia de 87,1%, composto de quatro subgrupos maiores com similaridade de 93,2%, 94,2%, 98,3% e 92,7%. Perfil C – cluster com homologia de 92,2%.

A diversidade genética observada pelo RAPD-PCR em *C. jejuni* e *C. coli* também foi relatada por WORKMAN et al. (2008) em isolados de *Campylobacter* de carne de frangos e de pacientes clínicos em Bridgetown, Barbados. AQUINO et al. (2010) encontraram extrema heterogeneidade nos isolados de *C. jejuni* e *C. coli* de humanos e diferentes animais no Rio de Janeiro, Brasil. Estudos realizados por MADDEN et al. (2007) e RIDLEY et al. (2008) mostraram ampla diversidade genômica em cepas de *Campylobacter*, sendo o primeiro referente a cepas de *C. coli* isoladas do trato gastrointestinal de suínos no momento do abate em Belfast, Reino Unido, e o segundo sobre a instabilidade genética de *C. jejuni* isoladas de intestino de frangos.

Essa variação genotípica pode ser devido à exposição a mais de uma fonte de contaminação durante o processo produtivo de frangos ou a alterações genéticas na população bacteriana após a colonização (WORKMAN et al., 2008). Além disso, *Campylobacter* spp. tem uma capacidade natural de transformação, de sofrer

rearranjos genômicos que também podem explicar este aumento na diversidade genética (RIDLEY et al., 2008). Outras razões incluem a contaminação de amostras com múltiplas cepas e a contaminação cruzada (ZORMAN et al., 2006; WORKMAN et al., 2008).

A persistência de cepas com alta porcentagem de similaridade filogenética em diferentes lotes também foi relatada PETERSEN & WEDDERKOPP (2001) que analisaram 94 cepas de *Campylobacter* de amostras fecais de frangos. Os autores afirmam que as cepas podem estar presentes tanto no ambiente do aviário quanto em locais próximos. Estudos realizados em vários países europeus identificaram fatores de risco como a falta de condições de higiene adequadas e a presença de insetos e roedores como indicativos da permanência do microrganismo na cadeia produtiva de frangos (BERNDTSON et al., 1996; HALD et al., 2000). É também possível que o problema seja relacionado com a manipulação do material da cama utilizada nos lotes, já que *C. jejuni* tem capacidade de sobreviver em resíduos animais (KEARNEY et al., 1993). As condições de abate também podem ser responsáveis pela presença de estirpes com elevado grau de homologia em amostras de mesmo lote, como os equipamentos utilizados no processamento dos animais e a contaminação cruzada (WORKMAN et al., 2008).

Neste estudo, grupos genealógicos semelhantes foram encontrados nas três regiões estudadas, indicando provável associação de genótipos nos diferentes locais do país e possivelmente nas nações importadoras. em diferentes locais do país e provavelmente nas nações importadoras dos produtos, tais como Arábia Saudita, China, Emirados Árabes e Malásia, além da África do Sul e Oriente Médio. A evidência de linhagens altamente similares circulantes no território nacional e possivelmente internacional pode indicar uma capacidade de *Campylobacter* em agir de forma difundida, como uma rede de transmissão global em humanos. SHEPPARD et al. (2010) também analisaram 742 *C. jejuni* e 261 *C. coli* oriundas de carnes de frangos por meio de investigação epidemiológica molecular e observaram elevada semelhança entre os isolados da Holanda, Estados Unidos e Senegal, revelando a difusão internacional de linhagens altamente próximas filogeneticamente.

Estudo realizado na Coreia com 173 isolados de *C. jejuni* determinou clones e

grupos com alta semelhança genética de diferentes países e de tempos distintos, sugerindo uma distribuição global de cepas semelhantes. Os autores ainda revelam a persistência de genótipos comuns por períodos de até quatro anos (KU et al., 2011). Dessa forma, a presença de grupos de *C. jejuni* com homologia, provenientes de carnes de frangos nacionais e importadas, indica provável contaminação cruzada e possibilidade de transmissão aos humanos (NADEAU et al., 2002; ZORMAN et al., 2006).

Contrariamente ao presente trabalho, no qual observamos a presença de cepas de regiões diferentes agrupadas em um mesmo *cluster*, WASSENAAR et al. (2009) avaliaram 293 cepas de *C. jejuni* oriundas de três regiões européias (País Basco, Noruega e Islândia) e observaram extensa diversidade de genótipos ao analisar geograficamente, indicando fortes divergências regionais. Os autores afirmaram que as diferenças regionais, tais como as condições climáticas, são fatores que diferenciam as linhagens de *C. jejuni*.

No presente estudo, a frequência de características fenotípicas e genotípicas que foram associadas em mesmo *cluster* foi mais predominante em *C. jejuni*. A correlação entre o caráter fenotípico e genotípico em *Campylobacter* spp. representa um dado importante na investigação epidemiológica e são poucos os estudos que estabelecem essa relação. MOORE et al. (2003) avaliaram o grau de similaridade fenotípica e genotípica em *Campylobacter* isoladas de frangos (135) e humanos (54) na Irlanda do Norte. Os autores concluíram que determinados fenótipos e genótipos foram vistos apenas em seres humanos e outros foram encontrados somente em frangos.

A correlação entre a diversidade genotípica e a resistência aos antibióticos associados a fenótipos de virulência foi evidenciada nos dados apresentados neste trabalho. SANAD et al. (2011) estabeleceram essa mesma relação ao investigarem 181 cepas de *Campylobacter* spp. isoladas de bovinos nos EUA. Em *C. jejuni*, os autores observaram prevalência de *clusters* com capacidade de invasão e colonização intracelular, já em *C. coli* a resistência antimicrobiana a drogas de escolha no tratamento humano foi mais comum entre os grupos genéticos.

Estudo realizado por ZAUTNER et al. (2011) fundamentou-se na caracterização genotípica com base na presença ou ausência de seis marcadores

genéticos de virulência em combinação com a análise de tipagem molecular pelo MLST em 266 *C. jejuni* provenientes de humanos, frangos, bovinos e perus. Os genótipos formados apresentaram características próprias quanto a sua origem e sua virulência.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A alta incidência de campilobacteriose em países desenvolvidos e sub-desenvolvidos instigou a investigação da patogenia do microrganismo. Além do sistema imune do hospedeiro, a virulência de *Campylobacter* spp. desempenha um papel decisivo na evolução da doença. O presente estudo destacou as propriedades fenotípicas e genotípicas de várias linhagens *Campylobacter* spp. isoladas de amostras de frangos, além da potencial atuação na patogênese da doença em humanos.

As porcentagens de isolamento encontradas nas carcaças de frangos, ou seja, no produto final, indicam os riscos potenciais ao consumidor, já que se tratam de cepas que resistiram ao processamento dos frangos. Isto reforça a necessidade de implementação de programas de controle mais rigorosos que promovam a implantação de normas de biossegurança desde a granja até o produto final de forma a garantir a saúde do consumidor.

Os perfis de multirresistência observados indicam a necessidade de monitoramento sistemático de *Campylobacter* no país. Deve-se priorizar uma análise contínua da prevalência e da resistência antimicrobiana de isolados de frangos.

A avaliação da presença de diversos fatores de virulência, como os associados a adesão, invasão, motilidade e produção de toxina, além da transcrição dessas propriedades permitiu a constatação do alto potencial patogênico das cepas, principalmente em se tratando de *C. jejuni*. Além disso, as variações observadas conforme a condição de cultura do microrganismo demonstraram a capacidade desta espécie em modular seu potencial de virulência, por meio da alteração de seu transcriptoma.

A diversidade genotípica observada nas espécies isoladas revelou que provavelmente existem várias fontes de infecção das aves e contaminação das carcaças durante o processo produtivo.

A perda de confluência celular pelas cepas mais virulentas mostra que não só há genes de virulência. Essas bactérias também levam a alterações fenotípicas importantes o que in vivo provavelmente refletirá em sintomas clínicos.

A variedade de cepas de *Campylobacter* spp. demonstrou elevado grau de

diversidade fenotípica e genotípica. A variação na transcrição de genes evidenciou os diferentes padrões e consequentes riscos aos consumidores. A compreensão da base molecular dos padrões de virulência das cepas isoladas, associada às consequências biológicas da diversidade genética entre as linhagens designou um estudo de suma importância para o entendimento da gravidade da doença. Dessa forma, estes resultados e os dados adicionais futuros obtidos a partir de comparações com isolados de humanos e de outros animais podem formar uma base para o desenvolvimento de estudos baseados nos genótipos e suas fontes de infecção para investigar o perfil das cepas circulantes no país além da origem da campilobacteriose humana e promover intervenções em saúde pública e melhor compreensão da epidemiologia da doença.

REFERÊNCIAS

- ABU-RUWAIDA , A. S. Microbiological quality of broilers during processing in a modern commercial slaughterhouse in Kuwait. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 57, n. 10, p. 887-892, 1994.
- AERESTRUP, F. M.; ENGBERG, J. Antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter*. **Veterinary Research**, Les Ulis, v. 32, n. 3-4, p. 311-321, 2001.
- AHMED, I. H.; MANNING, G.; WASSENAAR, T. M.; CAWTHRAW, S.; NEWELL, D. G. Identification of genetic differences between two *Campylobacter jejuni* strains with different colonization potentials. **Microbiology**, Reading, v. 148, p. 1203-1212, 2002.
- 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.
- ALLOS, B.M. *Campylobacter jejuni* infections: update on emerging issues and trends. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v. 32, n. 8, p. 1201–1206, 2001.
- ALM, R. A.; GUERRY, P.; TRUST, T. J. The *Campylobacter* sigma 54 flaB flagellin promoter is subject to environmental regulation. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 175, n. 14, p. 4448–4455, 1993.
- ALTEKRUSE, S. F.; STERN, N. J.; FIELDS, P. I.; SWERDLOW, D. L. *Campylobacter jejuni*: an emerging foodborne pathogen. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 5, n. 1, p. 28-35, 1999.
- ANDERSEN, M. T.; BRONDSTED, L.; PEARSON, B. M.; MULHOLLAND, F.; PARKER, M.; PIN, C.; WELLS, J. M.; INGMER, H. Diverse roles for *HspR* in *Campylobacter jejuni* revealed by the proteome, transcriptome and phenotypic characterization of an *hspR* mutant. **Microbiology**, Reading, v. 151, n. 3, p. 905-915, 2005.
- ANDERSEN, S.; SAADBYE, P.; SHUKRI, N.; ROSENQUIST, H.; NIELSEN, N.; BOEL, J. Antimicrobial resistance among *Campylobacter jejuni* isolated from raw poultry meat at retail level in Denmark. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 107, n. 3, p. 250-255, 2006.

ANON. Interin report on *Campylobacter*. **Advisory Committee on Microbiological Safety of Food**. London, 1993.

AQUINO, M. H. C.; FILGUEIRAS, A. L. L.; MATOS, R.; SANTOS, K. R. N.; FERREIRA, T.; FERREIRA, M. C. S.; TEIXEIRA, L. M.; TIBANA, A. Diversity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Genotypes from Human and Animal Sources from Rio de Janeiro, Brazil. **Research in Veterinary Science**, London, v. 88, n. 2, p. 214–217, 2010.

AQUINO, M. H. C.; PACHECO, A. P. G.; FERREIRA, M. C. S.; TIBANA, A. Frequency of isolation and Identification of Thermophilic *Campylobacters* from Animals in Brazil. **The Veterinary Journal**, London, v. 164, n. 2, p. 159-161, 2002.

ARTURSSON, P.; BORCHARD, R.T. Intestinal drug absorption and metabolism in cell culture: Caco-2 and beyond. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 14, n. 12, p.1655-1658, 1997.

ASAKURA, M.; SAMOSORNUSUK, W.; TAGUCHI, M.; KOBAYASHI, K.; MISAWA, N.; KUSUMOTO, M; NISHIMURA, K.; MATSUHISA, A.; YAMASAKI, S. Comparative analysis of citolethal distending toxin (*cdt*) genes among *Campylobacter jejuni*, *C. coli* and *C. fetus* strains. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 42, n. 5/6, p. 174-183, 2007.

ATAK, J.; KELLY, D. Oxidative stress in *Campylobacter*: responses, resistance and 109 regulation. **Future Microbiology**, London, v. 4, n. 6, p. 677–90, 2009.

AYRES, M. Bietat 2.0: **Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas**. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, 272 p., 2000.

BABAKHANI, F. K.; JOENS, L. A. Primary swine intestinal cells as a model for studying *Campylobacter jejuni* invasiveness. **Infection and Immunity**, Washington, v. 61, n. 6, p. 2723-2726, 1993.

BACKHED, F.; HORNEF, M. Toll-like receptor 4-mediated signaling by epithelial surfaces: necessity or threat? **Microbes and Infection**, Paris, v. 5, n. 11, p. 951–959, 2003.

BACON, D. J.; ALM, R. A.; BURR, D. H.; HU, L.; KOPECKO, D. J.; EWING, C. P.; TRUST, T. J.; GUERRY, P. Involvement of a plasmid in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. **Infection and Immunity**, Washington, v. 68, n. 8, p. 4384– 4390, 2000.

BAILEY, G. D.; VANSELOW, B. A.; HORNITZK, M. A.; HUM, S. I.; EAMENS, G. J.; GILL, P. A.; KEITH, H.; WALKER, K. H.; CRONIN, J. P. A study of the foodborne pathogens: *Campylobacter*, *Listeria* and *Yersinia*, in faeces from slaughter-age cattle and sheep in Australia. **CDI**, Brasília, v. 27, n. 2, p. 249-256, 2003.

BANG, D. D.; BORCK, B.; NIELSEN, E. M.; SCHEUTZ, F.; PEDERSEN, K.; MADSEN, M. Detection of seven virulence and toxin genes of *Campylobacter jejuni* isolates from Danish turkeys by PCR and cytolethal distending toxin production of the isolates. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.67, n.10, p.2171-2177, 2004.

BANG, D. D.; NIELSEN, E. M.; SCHEUTZ, F.; PEDERSEN, K.; HANDBERG, K.; MADSEN, M. PCR Detection of seven virulence and toxin genes of *Campylobacter jejuni* isolates from Danish pigs and cattle and cytolethal distending toxin production of the isolates. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 94, n. 6, p. 1003–1014, 2003.

BANG, D. D.; SCHEUTZ, F.; AHRENS, P.; PEDERSEN, K.; BLOM, J.; MADSEM, M. Prevalence of cytolethal distending toxin (*cdt*) genes and CDT production in *Campylobacter* spp. isolated from Danish broilers. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 50, n. 12, p. 1087-1094, 2001.

BARDON, J.; KOLA, R. M.; KARPI, S.; KOVA, R.; HRICOVA, K. Prevalence of thermotolerant *Campylobacter* spp. in broilers at retail in the Czech Republic and their antibiotic resistance. **Food Control**, Guildford, v. 22, n. 2, p. 328–332, 2011.

BARTON, M. D.; WILKINS, J. Antibiotic resistance in bacteria isolated from poultry. **Rural Industries Research and Development Corporation Publication**, No 1/105 Report of RIRDC Project No USA-9A, 2001.

BEALES, N. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 3, n. 1, p. 1–20, 2004.

BERGHOLZ, T. M.; VANAJA, S. K.; WHITTAM, T. S. Gene expression induced in *Escherichia coli* O157:H7 upon exposure to model apple juice. **Applied and**

Environmental Microbiology, Washington, v. 75, n. 11, p. 3542–3553, 2009.

BERKES, J.; VISWANATHAN, V. K.; SAVKOVIC, S. D.; HECHT, G. Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. **Gut**, London, v. 52, n. 3, p. 439–451, 2003.

BERNDTSON, E.; EMANUELSON, U.; ENGVALL, A.; DANIELSSON-THAM, M. L. A 1-year epidemiological study of campylobacters in 18 Swedish chicken farms. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 26, n. 3-4, p. 167–186, 1996.

BERRANG, M. E.; BUHR, R. J.; CASON, J. A.; DICKENS, J. A. Broiler carcass contamination with *Campylobacter* from feces during defeathering. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 64, n. 12, p. 2063- 2066, 2001.

BISWAS, D.; HANNON, S. J.; TOWNSEND, H. G. 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. **International Microbiology**, Barcelona, v. 14, n. 1, p. 25-32, 2011.

BLACK, R. E.; LEVINE, M. M.; CLEMENTS, M. L.; HUGHES, T. P.; BLASER, M. J. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 157, n. 3, p. 472– 479, 1988.

BLASER, M. J.; SAZIE, E.; WILLIAMS, P. The influence of immunity on raw milk-associated *Campylobacter* infection. **The Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 257, n. 1, p. 43-46, 1987.

BONITA, R.; Doenças transmissíveis: Epidemiologia, vigilância e resposta. IN: BEAGLEHOLE, R.; KJELLSTRÖM, T. **Epidemiologia básica**, Santos: OMS, 2010. p.117-131.

BORGES, A. C. F. **Antibiorresistência em estirpes de *Campylobacter* spp. isoladas em frangos num matadouro em Portugal**. 2009. Dissertação de Mestrado - Universidade Técnica de Lisboa da Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, 2009.

BOUFLEUR, R. ***Campylobacter jejuni* em frangos de corte, carne e vísceras de frango no rio grande do sul e efeito do congelamento sobre a contaminação nos cortes**. 2009. 47f. Dissertação de mestrado - Programa de Pós-Graduação em

Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

BOZZOLA, J. J.; RUSSEL, L. D. **Electron microscopy: principles and techniques for biologists**. 2 ed. Boston, JONES and BARTLETT Publishers, 1998. 542 p.

BRONZWAER, S.; HUGAS, M.; COLLINS, J.; NEWELL, D.; ROBINSON, T.; MÄKELA, P.; HAVELAAR, A. EFSA's 12th Scientific Colloquium—assessing health benefits of controlling *Campylobacter* in the food chain. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 131, n. 2-3, p. 284-285, 2009.

BUHR, R.J.; COX JR, N.A.; STERN, N.J.; MUSGROVE, M.T.; WILSON, J.L.; HIETT, K.L. Recovery of *Campylobacter* from segments of the reproductive tract of broiler breeder hens. **Avian Diseases**, kennett Square, v. 46, n. 4, p. 919-924, 2002.

BUTZLER, J. P. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 10, n. 10, p. 868–876, 2004.

CARATTOLI, A. Importance of integrons in diffusion of resistance. **Veterinary Research**, Indore, v. 32, n. 3-4, p. 243-259, 2001.

CARRILLO, C. D.; TABOADA, E.; NASH, J. H.; LANTHIER, P.; KELLY, J.; LAU, P. C.; VERHULP, R.; MYKYTCZUK, O.; SY, J.; FINDLAY, W. A.; AMOAKO, K.; GOMIS, S.; WILLSON, P.; AUSTIN, J. W.; POTTER, A.; BABIUK, L.; ALLAN, B.; SZYMANSKI, C. M. Genome-wide expression analyses of *Campylobacter jejuni* NCTC11168 reveals coordinate regulation of motility and virulence by *flhA*. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 279, n. 19, p. 20327-20338, 2004.

CARVALHO, A. F. **Detecção dos genes da Toxina Citoletal Distensiva (CDT) em estirpes de *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* isoladas de frangos de corte e hortaliças**. 2009. 56f. Dissertação de M estrado - Programa de Pós-Graduação do Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo, 2009.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). *Campylobacter* infections. Atlanta. GA: Departmente of Health and Human Services. Centers for Diseases Control, **Division of Bacterial and Mycotic Diseases**, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science>>. Acesso em: 8 abril de 2010.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). *Campylobacter* investigation Guideline. **Kansas Disease Investigation Guidelines**. 2012.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Preliminary food net data on the incidence of food net data on the incidence of foodborne illness-selected sites, United States, 2002. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 52, n. 15, p. 340-343, 2003.

CHAI SOWWONG, W.; KUSUMOTO, A.; HASHIMOTO, M.; HARADA, T.; MAKLON, K.; KAWAMOTO, K. Physiological Characterization of *Campylobacter jejuni* under Cold Stresses Conditions: Its Potential for Public Threat. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 74, n. 1, p. 43–50, 2012.

CHIA-SHUO CHANG , WAN-TING TASI , CHENG-KUO LAI, YU-LUN LU, YUAN-MAN HSU, CHIH-HO LAI. Association of CiaB with membrane raft-microdomains increases *Campylobacter jejuni*-induced pathogenesis of cells. **China Medical University Institutional Repository**, Taiwan, 2011.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved Guideline – Second Edition**. Pennsylvania, 2010. CLSI document M45-A2.

COCKERILL III, F. R. Genetic methods for assessing antimicrobial resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 43, n. 2, p. 199-212, 1999.

COLLES, F. M.; JONES, T. A.; MCCARTHY, N. D.; SHEPPARD, S. K.; CODY, A. J.; DINGLE, K. E.; DAWKINS, M. S.; MAIDEN, M. C. *Campylobacter* infection of broiler chickens in a free-range environment. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 10, n. 8, p. 2042–2050, 2008.

COOTE, J. G.; STEWART-TULL, D. E.; OWEN, R. J.; BOLTON, F. J.; SIEMER, B. L.; CANDLISH, D.; THOMPSON, D. H.; WARDLAW, A. C.; ON, S. L.; CANDLISH, A.; BILLCLIFFE, B.; JORDAN, P. J.; KRISTIANSEN, K.; BORMAN, P. Comparison of virulence-associated in vitro properties of typed strains of *Campylobacter jejuni* from different sources. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 56, n. 6, p. 722–732, 2007.

COX, L. A. Re-examining the causes of campylobacteriosis. **International Journal of Infections Diseases**, Denver, v. 6, n. 3, p. 26-36, 2002.

DATTA, S.; NIWA, H.; ITOH, K. Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler and bovine faeces. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 52, n. 4, p. 345-348, 2003.

DECKERT, A.; VALDIVIESO-GARCIA, A.; REID-SMITH, R.; TAMBLYN, S.; SELISKE, P.; IRWIN, R.; DEWEY, C.; BOERLIN, P.; MCEWEN, S. A. Prevalence and antimicrobial resistance in *Campylobacter* spp. isolated from retail chicken in two health units in Ontario. **Journal of Food Protection**, Des Moines, Iowa, v. 73, n. 7, p. 1317-1324, 2010.

DELIE, F.; RUBAS, W. A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: advantages and limitations of the Caco-2 model. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 14, n. 3, p. 221–286, 1997.

DEUN, K.; HAESEBROUCK, F.; HEYNDRICKX, M.; FAVOREEL, H.; DEWULF, J.; CELEN, L.; DUMEZ, L.; MESSENS, W.; LELEU, S.; VAN IMMERSEEL, F.; DUCATELLE, R.; PASMANS, F. Virulence properties of *Campylobacter jejuni* isolates of poultry and human origin. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 56, n. 10, p. 1284–1289, 2007.

DIMITRAKI, P.; VELONAKIS, E. The survival of pathogens in frozen food as a health risk. **Archives of Hellenic Medicine**, Atenas, v.24, n.5, p. 432-439, 2007.

DINGLE, K. E.; COLLES, F. M.; WAREING, D. R. A.; URE, R.; FOX, A. J.; BOLTON, F. E.; BOOTSMA, H. J.; WILLEMS, R. J. L.; URWIN, R.; MAIDEN, M. C. J. A multi locus sequence typing scheme for *Campylobacter jejuni*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 1, p. 14-23, 2001.

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

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

ELVERS, K. T.; TURNER, S. M.; WAINWRIGHT, L. M.; MARSDEN, G.; HINDS, J.; COLE, J. A.; POOLE, R. K.; PENN, C. W.; PARK, S. F. *NssR*, a member of the *Crp-Fnr* superfamily from *Campylobacter jejuni*, regulates a nitrosative stress-responsive regulon that includes both a single-domain and a truncated haemoglobin. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 57, n. 3, p. 735-750, 2005.

EMBRAPA - *Campylobacter* na segurança dos alimentos e na avicultura. 2008.

ENGBERG, J.; AAERSTRUP, F. M.; TAYLOR, D. E.; GERNER-SMIDT, P.; NACHAMKIN, I. Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 7, n. 1, p. 24-32, 2001.

ENGLER, A. E. H.; DARGATZ, D. A.; LADELY, S. R.; FEDORKA-CRAY, P. J. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* in US dairy cattle. **Journal Applied Microbiology**, Athens, v. 102, n. 6, p. 1570-1577, 2007.

EVEREST, P. H.; GOOSSENS, H.; BUTZLER, J. P.; LLOYD, D.; KNUTTON, S.; KETLEY, J. M.; WILLIAMS, P. H. Differentiated Caco-2 cells as a model for enteric invasion by *Campylobacter jejuni* and *C. Colli*. **Journal Medicine Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 319-325, 1993.

EYIGOR, A.; DAWASON, K. A.; LANGLOIS, B. E.; PICKETT, C. L. Detection of cytolethal distending toxin activity and *cdt* genes in *Campylobacter* spp. isolates from chicken carcasses. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 4, p.1501-1505, 1999.

FALLON, R.; O'SULLIVAN, N.; MAHER, M.; CARROLL, C. Antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from broiler chickens isolated at an Irish poultry processing plant. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 36, n. 5, p. 277-281, 2003.

FAO/WHO. 2009. Risk assessment of *Campylobacter* spp. in broiler chickens: Technical Report. Microbiological Risk Assessment Series No. 12. Geneva. 132pp.

FAUZIAH, O.; PURTON, M. D.; SOLOMON, S. E. Scanning electron microscopy of the respiratory epithelium of chicks fumigated with formaldehyde vapour. **British Poultry Science**. Edinburgh, v. 37, n. 3, p. 563-570, 1995.

FEARNLEY, C.; MANNING, G.; BAGNALL, M.; JAVED, M. A.; WASSENAAR, T. M.; NEWELL, D.G. Identification of hyperinvasive *Campylobacter jejuni* strains isolated from poultry and human clinical sources. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 57, n. 5, p. 570–580, 2008.

FERNANDEZ, H.; GARCÍA, A.; VILLANUEVA, M. P. Serotipos de *Campylobacter jejuni* ssp. *jejuni* aislado de ave para consumo humano y en muestras de heces de niños com diarrea. **Archivos de Medicina Veterinaria**, Valdivia, v. 37, n. 1, p. 79-81, 2005.

FONSECA, B. B. **Transmissão vertical de *Campylobacter* sp em um sistema de produção avícola**. 2006. 65 f. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Center for Food Safety and Applied Nutrition**, 2002. Disponível em: <<http://vm.cfsan.fda.gov/~mow/foodborn.html>> Acesso em: 10 mai. 2010.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - Center for Food Safety and Applied Nutrition, USA. ***Campylobacter jejuni* bad bug book**. 2008. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap4.html>>. Acesso em: 13 mar. 2010.

FRANCHIN, P. R.; P.J. OGLIARI, P. J.; BATISTA, C. R. V. Frequency of thermophilic *Campylobacter* in broiler chickens during industrial processing in a Southern Brazil slaughterhouse. **British Poultry Science**, London, v. 48, n. 2, p. 127 – 132, 2007.

FRAQUEZA, M. Ocorrência de *Campylobacter* em Portugal: contribuição para a caracterização de um perigo emergente em segurança alimentar. In: III CICLO DE CONFERÊNCIAS DE SAÚDE PÚBLICA VETERINÁRIA: SAÚDE ANIMAL E SAÚDE HUMANA UMA ÚNICA SAÚDE, 3 e 4 de Julho de 2009, Porto. **Resumos...** Porto: Conferências de Saúde Pública Veterinária, 2009.

FRIEDMAN, C. R.; HOEKSTRA, R. M.; SAMUEL, M.; MARCUS, R.; BENDER, J. Risk factors for sporadic *Campylobacter* infection in the United States: a case-control study in Foodnet sites. **Clinical Infect Diseases**, Washington, v. 38, n. 3, p. 5285-5296, 2004.

FRIIS, L. M.; PIN, C.; PEARSON, B. M.; WELLS, J. M. In vitro cell culture methods for investigating *Campylobacter* invasion mechanisms. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 61, p. 145–160, 2005.

GANAN, M.; CAMPOS, G.; MUÑOZ, R.; CARRASCOSA, A. V.; DE PASCUAL-TERESA, S.; MARTINEZ-RODRIGUEZ, A. J. Effect of growth phase on the

adherence to and invasion of Caco-2 epithelial cells by *Campylobacter*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 140, n. 1, 2010.

GANDRAA, E. A.; GANDRA, T. K. V.; MELLO, W. S.; GODOI, H. S. Técnicas Moleculares Aplicadas à Microbiologia de Alimentos. **Acta Scientiarum Technology**, Maringá, v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.

GAYNOR, E. C.; WELLS, D. H.; MACKICHAN, J. K.; FALKOW, S. The *Campylobacter jejuni* stringent response controls specific stress survival and virulence-associated phenotypes. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 56, n. 1, p. 8-27, 2005.

GE, B.; WHITE, D. G.; MCDERMOTT, P. F.; GIRARD, W.; ZHAO, S.; HUBERT, S.; MENG, J. Antimicrobial-resistant *Campylobacter* species from retail raw meats. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 5, p. 3005–3007, 2003.

GEORGSSON, F.; THORNORKESSON, A. E.; GEIRSDÓTTIR, M.; REIERSEN, J.; STERN, N. J. The influence of freezing and duration of storage on *Campylobacter* and indicator bacteria in broiler carcasses. **Food Microbiology**, London, v. 23, n. 7, p. 677-683, 2006.

GEWIRTZ, A. T.; NAVAS, T. A.; LYONS, S.; GODOWSKI, P. J.; MADARA, J. L. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 167, n. 4, p. 1882– 1885, 2001.

GILBERT, C. D.; SLAVIK, M. F. Evaluation of attachment and penetration abilities of *Campylobacter jejuni* isolates obtained from humans and chicken carcasses during processing and at retail. **Journal of Food Safety**, Washington, v. 25, n. 3, p. 209–223, 2005.

GILBERT, C.; SLAVIK, M. Determination of toxicity of *Campylobacter jejuni* isolated from humans and from poultry carcasses acquired at various stages of production. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 97, n. 2, p. 347–353, 2004.

GILLESPIE, I. A.; BRIEN, S. J.; FROST, J.A.; ADAK, G. K.; HORBY, P. A case-case comparison of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* infection: a tool for generating hypothesis. **Journal Emerging Infection Diseases**, London, v. 8, n. 9, p. 937-942, 2002.

GUERIN, M. T.; MARTIN, S. W.; REIERSEN, J.; BERKE, O.; MCEWEN, S.A.; FRIDRIKSDÓTTIR, V.; BISAILLON, J. R.; LOWMAN, R. Campy-on-Ice Consortium. Temperature related risk factors associated with the colonization of broiler-chicken flocks with *Campylobacter* spp. in Iceland, 2001-2004. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 86, n. 1-2, p. 14-29, 2008.

GRANT, C. C. R.; KONKEL, M. E.; CIEPLAK JR., W.; TOMPKINS, L. S. Role of flagella in adherence, internalization, and translocation of *Campylobacter jejuni* in nonpolarized and polarized epithelial cell cultures. **Infection and Immunity**, Washington, v. 61, n. 5, p. 1764-1771, 1993.

GRANT, K. A.; BELANDIA, I. U.; DEKKER, N.; RICHARDSON, P. T.; PARK, S. F. Molecular characterization of *pldA*, the structural gene for a phospholipase A from *Campylobacter coli*, and its contribution to cell-associated hemolysis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 65, n. 4, p. 1172-1180, 1997.

GUPTA, A.; NELSON, J. M.; BARRETT, T. J.; TAUXE, R. V.; ROSSITER, S. P.; FRIEDMAN, C. R.; JOYCE, K. W.; SMITH, K. E.; JONES, T. F.; HAWKINS, M. A.; SHIF-ERAW, B.; BEEBE, J. L.; VUGIA, D. J.; RABATSKY-EHR, T.; BENSON, J. A.; ROOT, T. P.; ÂNGULO, F. J. Antimicrobial resistance among *Campylobacter* strains, United States, 1997-2001. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 10, n. 6, p. 1102-1109, 2004.

HABIB, I.; BERKVEN, D.; ZUTTER, L.; DIERICK, K.; HUFFEL, X.; SPEYBROECK, N.; GEERAERD, A. H.; UYTENDAELE, M. *Campylobacter* contamination in broiler carcasses and correlation with slaughterhouses operational hygiene inspection. **Food Microbiology**, London, v. 29, n. 1, p. 105-112, 2012.

HABIB, I.; LOUWEN, R.; UYTENDAELE, M.; HOUF, K.; VANDENBERG, O.; NIEUWENHUIS, E.; MILLER, W.; VAN BELKUM, A.; DE ZUTTER, L. Correlation between genotypic diversity, lipooligosaccharide gene locus class variation, and Caco-2 cell invasion potential of *Campylobacter jejuni* isolates from chicken meat and humans: contribution to virulotyping. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 13, p. 4277-4288, 2009.

HABIB, I.; SAMPERS, I.; UYTENDAELE, M.; BERKVEN, D.; DE ZUTTER, L. Baseline data from a Belgium-wide survey of *Campylobacter* species contamination in chicken meat preparations and considerations for a reliable monitoring program. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 17, p. 5483-5489, 2008.

HALD, B.; WEDDERKOPP, A.; MADSEN, M. Thermophilic *Campylobacter* spp. in Danish broiler production: a cross-sectional survey and a retrospective analysis of risk factors for occurrence in broiler flocks. **Avian Pathology**, Abingdon, v. 29, n. 2, p. 123-131, 2000.

HAN, K.; JANG, S. S.; CHOO, E.; HEU, S.; RYU, S. Prevalence, genetic diversity, and antibiotic resistance patterns of *Campylobacter jejuni* from retail raw chickens in Korea. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 114, n. 1, p. 50-59, 2007.

HANNING, I.; BISWAS, D.; HERRERA, P.; ROESLER, M.; RICKE, S. C. Prevalence and Characterization of *Campylobacter jejuni* Isolated from Pasture Flock Poultry. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 75, n. 7, p. M496–M502, 2010.

HÄNEL, C. M.; ATANASSOVA, V. Impact of different storage factors on the survivability of *Campylobacter jejuni* in turkey meat. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 49, n. 1, p. 146-148, 2007.

HANEL, I.; BORRMANN, E.; MULLER, J.; ATLER, T. Relationships between bacterial genotypes and in vitro virulence properties of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from turkeys. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.102, n. 2, p.433-441, 2007b.

HÄNEL, 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**, Amsterdam, v. 101, n. 2, p. 75–82, 2004.

HÄNNINEN, M.; PERKO-MÄKELÄ, P.; PITKÄLÄ, A.; RAUTELIN, H. A three-year study of *Campylobacter jejuni* genotypes in humans with domestically acquired infections and in chicken samples from the Helsinki area. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 5, p. 1998-2000, 2000.

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.

HAZELEGER, W.; ARKESTEIJN, C.; TOOROPBOUMA, A.; BEUMER, R. Detection of the coccoid form of *Campylobacter jejuni* in chicken products with the use of the

polymerase chain reaction. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 24, n. 1-2, p. 273-281, 1994.

HELMS, M.; SIMONSEN, J.; OLSEN, K. E.; MØLBAK, K. Adverse health effects associated with antimicrobial drug resistance in *Campylobacter* species: a registry-based cohort study. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 191, n. 7, p. 1050–1055, 2005.

HENDRIXSON, D. R. A phase-variable mechanism controlling the *Campylobacter jejuni* *FlgR* response regulator influences commensalism. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 61, n. 6, p. 1646-1659, 2006.

HENDRIXSON, D. R.; AKERLEY, B. J.; DIRITA, V. J. Transposon mutagenesis of *Campylobacter jejuni* identifies a bipartite energy taxis system required for motility. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 40, n. 1, p. 214 -224, 2001.

HIDALGO, I. J.; RAUB, T. J.; BORCHARDT, R. T. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 96, n. 3, p. 736– 749, 1989.

HIRSH, D.C. Organismos espiralados I: *Campylobacter* – *Arcobacter* – *Lawsonia* (Trato Digestivo). In: HIRSH, D. C.; CHUNG ZEE, Y. **Microbiologia Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2003. p. 83-86.

HOFREUTER, D.; TSAI, J.; WATSON, R. O.; NOVIK, V.; ALTMAN, B.; BENITEZ, M.; CLARK, C.; PERBOST, C.; JARVIE, T.; DU, L.; GALAN, J. E. Unique features of a highly pathogenic *Campylobacter jejuni* strain. **Infection and Immunity**, Washington, v. 74, n. 8, p. 4694-707, 2006.

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

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**, Texas, v. 15, n. 1-2, p. 18-25, 2008.

HU, L.; KOPECKO, D. J. Cell biology of human host cell entry by *Campylobacter*

jejuni. 2008. p. 297–313. In: NACHAMKIN, I.; SZYMANSKI, C.M.; BLASER, M. J. (Eds.), **Campylobacter**. ASM Press, Washington D.C.

HU, L.; KOPECKO, D. J. Interactions of *Campylobacter* with eucaryotic cells: Gut luminal colonization and mucosal invasion mechanisms. 2000. p. 191-213. In: NACHAMKIN, I; BLASER, M. J. **Campylobacter**, 2ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

HUMPHREY, T.; O'BRIEN, S.; MADSEN, M. *Campylobacters* as zoonotic pathogens: a food production perspective. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 117, n. 3, p. 237–257, 2007.

HUNT, J. M.; ABEYTA, C.; TRANT, T. *Campylobacter*. In: U S Food and Drug Administration (FDA). **Bacteriological Analytical Manual Online**. Revisado em março de 2001. Disponível em: < <http://vm.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html> >. Acesso em: 04 mar. 2010.

HUNTER, S. M.; BERRANG, M. E.; MEINERSMANN, R. J.; HARRISON, M. A. Genetic diversity of *Campylobacter* on broiler carcasses collected pre-evisceration and post-chill in 17 U.S. poultry processing plants. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 72, n. 1, p. 49–54, 2009.

INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION. ISO 10272-1: Microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. – Part 1: detection method. ISO 10272-1:2006. 2006.

JANG, K. I.; KIM, M. G.; HA, S. D.; LEE, K. A.; CHUNG, D. H.; KIM, C. H.; KIM, K. Y. Morphology and adhesion of *Campylobacter jejuni* to chicken skin under varying conditions. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 17, n. 2, p. 202–206, 2007.

JAWETS, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. *Vibrio*, *Campylobacter*, *Helicobacter* e bactérias associadas. In: **Microbiologia Médica**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1998.

JEON, B.; ITOH, K.; RYU, S. Promoter analysis of Cytotoxic Distending Toxin genes (*cdtA*, *B* and *C*) and effect of a *luxS* mutation on CDT production in *Campylobacter jejuni*. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 49, n. 7, p. 599-603, 2005.

JONES, S. L.; LINDBERG, F. P.; BROWN, E. J. Phagocytosis. In: PAUL, W. E., (ed.). **Fundamental immunology**. 4 th ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa. p. 1011-1015, 1999.

JORE, S.; VILJUGREIN, H.; BRUN, E.; HEIER, B. T.; BORCK, B.; ETHELBERG, S.; HAKKINEN, M.; KUUSI, M.; REIERSEN, J.; HANSSON, I.; ENGVALL, E. O.; LOFDAHL, M.; WAGENAAR, J. A.; VAN, P. W.; HOFSHAGEN, M. Trends in *Campylobacter* incidence in broilers and humans in six European countries, 1997-2007. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 93, n. 1, p. 33-41, 2010.

JORGENSEN, F.; BAILEY, R.; WILLIAMS, S.; HENDERSON, D.R. Prevalence and numbers of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. on raw, whole chickens in relation to sampling methods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 76, n. 1-2, p. 151-164, 2002.

KAPPERUD, G.; ESPELAND, G.; WAHL, E.; HERIKSTAD, H. Factor associated with increased and decreased risk of *Campylobacter* infection: a prospective case-control study in Norway. **American Journal Epidemiology**, Oslo, v. 158, n. 3, p. 234-242, 2003.

KEARNEY, T. E.; LARKIN, M. J.; FROST, J. P.; LEVETT, P. N. Survival of pathogenic bacteria during mesophilic anaerobic digestion of animal waste. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 75, n. 3, p. 215–219, 1993.

KELLER, B. W.; WITTEW, M.; STEPHAN, R.; PERRETEN, V. Distribution and genetic variability among *Campylobacter* spp. isolates from different animal species and humans in Switzerland. **Zoonoses Public Health**, Switzerland, v. 54, n. 1, p. 2-7, 2007.

KETLEY, J. M. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. **Microbiology**, Reading, v. 143, n. 1, p. 5 – 21, 1997.

KINANA, A. D.; CARDINALE, E.; TALL, F.; BAHOUN, I.; SIRE, J. M.; GARIN, B.; BREUREC, S.; BOYE, C. S.; PERRIER-GROS-CLAUDE, J. D. Genetic diversity and quinolone resistance in *Campylobacter jejuni* isolates from poultry in Senegal. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 5, p. 3309–3313. 2006.

KOENRAAD, P. M.; AYLING, R.; HAZELEGER, W. C.; ROMBOUTS, F. M.; NEWELL, D. G. The speciation and subtyping of *Campylobacter* isolates from sewage plants

and waste water from a connected poultry abattoir using molecular techniques. **Epidemiology and Infection**, London, v. 115, n. 3, p. 485-494, 1995.

KONKEL, M. E.; KIM, B. J.; KLENA, J. D.; YOUNG, C. R.; ZIPRIN, R. Characterization of the Thermal Stress Response of *Campylobacter jejuni*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 66, n. 8, p. 3666–3672, 1998.

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**, Salem, v. 32, n. 4, p. 691–701, 1999.

KONKEL, M. E.; KLENA, J. D.; RIVERA-AMILL, V.; MONTEVILLE, M. R.; BISWAS, D.; RAPHAEL, B.; MICKELSON, J. Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is dependent on a functional flagellar export apparatus. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 186, n. 11, p. 3296–3303, 2004.

KONKEL, M. E.; MONTEVILLE, M. R.; RIVERA-AMILL, V.; JOENS, L. A. The pathogenesis of *Campylobacter jejuni*-mediated enteritis. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 55-71. 2001.

KOROLIK, V.; CHANG, J.; COLOE, P. J. Variation in antimicrobial resistance in *Campylobacter* spp isolated in Australia from humans and animals in the last five years. In: NEWELL, D. G.; KETLEY, J. M.; FELDMAN, R. A. (Eds.), "Campylobacters, Helicobacters, and Related Organisms". **Plenum Press**, New York and London, p. 393-398, 1996.

KRAMER, J.M.; FROST, J.A.; BOLTON, F.J.; WAREING, D.R.A. *Campylobacter* contamination on raw meat and poultry at retail sale: identification of multiple types and comparison with isolates from human infection. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 63, n. 12, p. 1654-1659, 2000.

KRUTKIEWICZ, A.; KLIMUSZKO, D. Genotyping and PCR Detection of Potential Virulence Genes in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Isolates from Different Sources in Poland. **Folia Microbiologica**, Praha, v. 55, n. 2, p. 167–175, 2010.

KU, B. K.; KIM, H. J.; LEE, Y. J.; KIM, Y. I.; CHOI, J. S.; PARK, M. Y.; KWON, J. W.; NAM, H. M.; KIM, Y. H.; JUNG, S. C.; LEE, S. J.; KIM, S. H.; KIM, J. H. Genetic Characterization and Antimicrobial Susceptibility of *Campylobacter* Spp. Isolated from Domestic and Imported Chicken Meats and Humans in Korea. **Foodborne**

Pathogens and Disease, Larchmont, v. 8, n. 3, p. 381-386, 2011.

KUANA, S. L.; SANTOS, L. R.; RODRIGUES, L. B.; A. BORSOI, A.; MORAES, H. L. S.; SALLE, C. T. P.; NASCIMENTO, V. P. Occurrence And Characterization Of *Campylobacter* In the Brazilian Production and Processing Of Broilers. **Avian Diseases Digest**, v. 3, n. 4, p. e27-e27, 2008.

KUITWAARD, K.; KONINGSVELD, R.; RUTS, L.; JACOBS, B. C.; DOORN, P. A. Recurrent Guillain–Barré syndrome. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, Rotterdam, v. 80, n. 1, p. 56-59, 2008.

LAMHONWAH, A.; ACKERLEY, C.; ONISUKA, R.; TILUPS, A.; LAMHONWAH, D.; CHUNG, C. Epitop shared by functional variant of organic cation/carnitine transporter, OCTN1, *Campylobacter jejuni* and *Mycobacterium paratuberculosis* may underline susceptibility to Crohns diseases at 5q31. **Journal Biochemical and Biophysical Research Communications**, Toronto, v. 337, n. 4, p. 1165-1175, 2005.

LASTOVICA, A. J. Emerging *Campylobacter* spp.: the tip of the iceberg. **Clinical Microbiology Newsletter**, New York, v. 28, n. 7, p. 44–55, 2006.

LEE, A.; SMITH, S. C.; COLOE, P. J. Survival and growth of *Campylobacter jejuni* after artificial inoculation onto chicken skin as a function of temperature and packaging conditions. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 61, n.12, p. 1609-1614, 1998.

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.

LIGOWSKA, M.; COHN, M. T.; STABLER, R. A.; WREN, B. W.; BRONDSTED, L. Effect of chicken meat environment on gene expression of *Campylobacter jejuni* and its relevance to survival in food. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 145, n. 1, p. S111–S115, 2011.

LITTLE, C. L.; RICHARDSON, J. F.; OWEN, R. J.; DE PINNA, E.; THRELFALL, E. J. *Campylobacter* and *Salmonella* in raw red meats in the United Kingdom: prevalence, characterization and antimicrobial resistance pattern, 2003– 2005. **Food Microbiology**, London, v. 25, n. 3, p. 538–543, 2008.

LODGE, K. B. **A Molecular Investigation of *Campylobacter jejuni* Pathogenesis**. 2007. 345f. Tese de Doutorado - School of Applied Sciences Portfolio of Science, Engineering and Technology RMIT University, 2007.

LUANGTONGKUM, T.; JEON, B.; HAN, J.; PLUMMER, P.; LOGUE, C. M.; ZHANG, Q. Antibiotic resistance in *Campylobacter*: emergence, transmission and persistence. **Future Microbiology**, London, v. 4, n. 2, p. 189-200, 2009.

MA, Y.; HANNING, I.; SLAVIK, M. Stress-induced adaptive tolerance response and virulence gene expression in *Campylobacter jejuni*. **Journal of Food Safety**, Westport, v. 29, n. 1, p. 126–143, 2009.

MACCALLUM, A. J.; HARRIS, D.; HADDOCK, G.; EVEREST, P. H. *Campylobacter jejuni*- infected human epithelial cell lines vary in their ability to secrete interleukin-8 compared to *in vitro*-infected primary human intestinal tissue. **Microbiology**, Reading, v. 152, n. 12, p. 3661–3665, 2005.

MACKICHAN, J. K.; GAYNOR, E. C.; CHANG, C.; CAWTHRAW, S.; NEWELL, D. G.; MILLER, J. F.; FALKOW, S. The *Campylobacter jejuni* *dccRS* two-component system is required for optimal *in vivo* colonization but is dispensable for *in vitro* growth. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 54, n. 5, p. 1269-1286, 2004.

MALAKAUSKAS, M.; JORGENSEN, K.; NIELSEN, E.M., OJENIYI, B., OLSEN, J.E. Isolation of *Campylobacter* spp. from a pig slaughterhouse and analysis of cross-contamination. **International Journal of Food Microbiology**, Copenhagen, v. 108, n. 3, p. 295-300, 2005.

MALBRAN, C. G. **Manual de Procedimientos Campylobacter-Ministerio da Salud**. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Departamento de Bacteriologia-Serviço Bacteriologia Sanitária, Buenos Aires, pp. 29, 2001.

MALIK-KALE, P.; RAPHAEL, B. H.; PARKER, C. T.; JOENS, L. A.; KLENA, J. D.; QUIÑONES, B.; KEECH, A. M.; KONKEL, M. E. Characterization of genetically matched isolates of *Campylobacter jejuni* reveals that mutations in genes involved in flagellar biosynthesis alter the organism's virulence potential. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 10, p. 3123–3136, 2007.

MARIDOR, M. L.; DENIS, M.; LALANDE, F.; BEAUREPAIRE, B.; CARIOLET, R.; FRAVALO, P.; FREDERIGHI, M; SEEGER, H.; BELLOC, C. Experimental infection

of specific pathogen-free pigs with *Campylobacter*: Excretion in faeces and transmission to non-inoculated pigs. **Journal Veterinary Microbiology**, Ploufragan, v. 131, n. 3-4, p. 309-317, 2008.

MARTINEZ, I.; MATEO, E.; CHURRUCA, E.; GIRBAU, C.; ALONSO, R.; FERNANDEZASTORGA, A. Detection of *cdtA*, *cdtB*, and *cdtC* genes in *Campylobacter jejuni* by multiplex PCR. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v. 296, n. 1, p. 45-48, 2006.

MATOBA, Y.; KATSUBE, Y.; SUGIYAMA, M. The crystal structure of prokaryotic phospholipase A2. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 277, n. 22, p. 20059–20069, 2002.

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.

MAZIERO, M. T. **Contaminação de carcaças de frango por *Campylobacter jejuni* antes e após resfriamento e congelamento**. Londrina, 2007. 136 f. Dissertação de mestrado – Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, 2007.

MACCALLUM, A.; HADDOCK, G.; EVEREST, P. H. *Campylobacter jejuni* activates mitogen-activated protein kinases in Caco-2 cell monolayers and *in vitro* infected primary human colonic tissue. **Microbiology**, Reading, v. 151, n. 8, p. 2765–2772, 2005.

MACCALLUM, A.; S. P. HARDY.; P. H. EVEREST. *Campylobacter jejuni* inhibits the absorptive transport functions of Caco-2 cells and disrupts cellular tight junctions. **Microbiology**, Reading, v. 151, n. 7, p. 2451-2458, 2005b.

MADDEN, R. H.; MORAN, L.; SCATES, P. Diversity of *Campylobacter coli* genotypes in the lower porcine gastrointestinal tract at time of slaughter. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 45, n. 6, p. 575–580, 2007.

MCCARTHY, N.; GIESECKE, J. Incidence of Guillain-Barre Syndrome following Infection with *Campylobacter jejuni*. **American Journal Epidemiology**, Solna, v. 153, n. 6, p. 610-614, 2001.

MCCORMICK, B. A. The use of transepithelial models to examine host–pathogen interactions. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 6, n. 1, p. 77– 81, 2003.

MEAD, P. S. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Disease**, Atlanta, v. 5, n. 5, p. 607-625, 1995.

MENA, C.; RODRIGUES, D.; SILVA, J.; GIBBS, P.; TEIXEIRA, P. Occurrence, identification, and characterization of *Campylobacter* species isolated from portuguese poultry samples collected from retail establishments. **Poultry Science**, Champaign, v. 87, n. 1, p. 187–190, 2008.

MICROBIOLOGICAL SAFETY OF FOOD FUNDERS GROUP (MSFFG). **UK publicly funded research relating to *Campylobacter*: update 2007**. Reino Unido, Janeiro 2008. 36 p. Disponível em: <<http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/Campylobacter2.PDF>>. Acesso em: 10 out. 2009

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

MOEN, B.; OUST, A.; LANGSRUD, O.; DORRELL, N.; MARSDEN, G. L.; HINDS, J.; KOHLER, A.; WREN, B. W.; RUDI, K. Explorative multifactor approach for investigating global survival mechanisms of *Campylobacter jejuni* under environmental conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 4, p. 2086-2094, 2005.

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**, Reading, v. 149, n. 1, p. 153–165, 2003.

MOORE, J. E.; BARTON, M. D.; BLAIR, I. S.; CORCORAN, D.; DOOLEY, J. S. G.; FANNING, S.; KEMPF, I.; LASTOVICA, A. J.; LOWERY, C. J.; MATSUDA, M.; MCDOWELL, D. A.; MCMAHON, A.; MILLAR, B. C.; RAO, J. R.; ROONEY, P. J.; SEAL, B. S.; SNELLING, W. J.; TOLBA, O. The epidemiology of antibiotic resistance in *Campylobacter*. **Microbes and Infection**, Paris, v. 8, n. 7, p. 1955-1966, 2006.

MOORE, J. E.; CORCORAN, D.; DOOLEY, J. S. G.; FANNING, S.; LUCEY, B.; MATSUDDA, M.; MCDOWELL, D. A.; MÉGRAUD, F.; MILLAR, B. C.; O'MAHONY,

R.; O'RIORDAN, L.; O'ROURKE, M.; RAO, J. R.; ROONEY, P. J.; SSAIS, A.; WHYTE, P. *Campylobacter*. **Veterinary Researche**, Les Ulis, v. 36, n. 3, p. 351-382, 2005.

MOORE, J. E.; O'RIORDAN, L.; WAREING, D. R. A.; DOYLE, R.; LANSER, J.; STANLEY, T.; MATSUDA, M.; MATSUI, T.; MURPHY, P. G. Phenotypic and genotypic relationship between *Campylobacter* spp isolated from humans and chickens in Northern Ireland: a comparison of three phenotyping and two genotyping schemes. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, Jena, v. 206, n. 3, p. 211-216, 2003.

MOSTOV, K. E.; VERGES, M.; ALTSCHULER, Y. Membrane traffic in polarized epithelial cells. **Current Opinion in Cell Biology**, London, v. 12, n. 4, p. 483– 490, 2000.

MOURIK, A. V. **Host adaptation mechanisms and transcriptional regulation in *Campylobacter jejuni***. 2011. 152f. Tese de Doutorado - Infection and Immunity Center Utrecht, Universiteit Utrecht. 2011.

MULLER, J.; SCHULZE, F.; MULLER, W.; HANEL, I. PCR detection of virulence-associated genes in *Campylobacter jejuni* strains with differential ability to invade Caco-2 cells and to colonize the chick gut. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 113, n. 1–2, p. 123-129, 2006.

NACHAMKIN, I.; ALOOS, B. M.; HO, T. *Campylobacter* species and Guillian-Barre syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 11, n. 3, p. 555-567, 1998.

NACHAMKIN, I.; ENGBERG, J.; AARESTRUP, F. Diagnosis and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* species, *In*: I. Nachamkin, M.J. Blaser (Eds.), **Campylobacter**, ASM, Washington D.C., p. 45-66, 2000.

NADEAU, E.; MESSIER, S.; QUESSY, S. Prevalence and comparison of genetic profiles of *Campylobacter* strains isolated from poultry and sporadic cases of campylobacteriosis in humans. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 65, n. 1, p. 73–78, 2002.

NATIONAL ANTIMICROBIAL RESISTANCE MONITORING SYSTEM (NARMS). **Enteric Bacteria: 2007 Executive Report**. Rockville, 2007. 99 p. Disponível em:

<http://www.fda.gov=AnimalVeterinary=SafetyHealth=AntimicrobialResistance=NationalAntimicrobialResistanceMonitoringSystem=ucm164662.htm>. Acesso em: 20 out. 2011.

NAUTA, M.; HILL, A.; ROSENQUIST, H.; BRYNESTAD, S.; FETSCH, A.; VAN DER LOGT, P.; FAZIL, A.; CHRISTENSEN, B.; KATSMA, E.; BORCK, B.; HAVELAAR, A. A comparison of risk assessments on *Campylobacter* in broiler meat. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 129, n. 2, p. 107-123, 2009.

NELSON, J. M.; SMITH, K. E.; VUGIA, D. J.; RABATSKY-HER, T.; SEGLER, S. D.; KASSENBERG, H. D.; ZANSKY, S. M.; JOYCE, K.; MARANO, N.; HOEKSTRA, R. M.; ANGULO, F. J. Prolonged diarrhea due to ciprofloxacin-resistant *Campylobacter* infection. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 190, n. 6, p. 1150–1157, 2004.

NESBAKKEN, T.; ECKNER, K.; HOIDAL, H. K.; ROTTERUD, O. J. Occurrence of *Yersinia enterocolitica* and *Campylobacter* spp. in slaughter pigs and consequences for meat inspection, slaughtering, and dressing procedures. **International Journal of Food Microbiology**, Oslo, v. 80, n. 3, p. 231-240, 2003.

OLESEN, I.; JESPERSEN, L. Relative gene transcription and pathogenicity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* after long-term adaptation to acid and salt stress. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 141, n. 3, p. 248–253, 2010.

OLESEN, I.; THORSEN, L.; JESPERSEN, L. Relative transcription of *Listeria monocytogenes* virulence genes in liver pates with varying NaCl content. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 141, n. 1, p. S60–S68, 2010.

OLESEN, I.; VOGENSEN, F. K.; JESPERSEN, L. Gene transcription and virulence potential of *Listeria monocytogenes* strains after exposure to acidic and NaCl stresses. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v. 6, n. 6, p. 669–679, 2009.

PALERMO NETO, J. Mecanismos de resistência aos antibióticos em saúde pública. In: CONFERÊNCIA FACTA 2011 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2011, Santos. **Anais...** Santos: FACTA, 2011. p. 39-50.

PALYADA, K.; THREADGILL, D.; STINTZI, A. Iron acquisition and regulation in

Campylobacter jejuni. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 186, n. 14, p. 4714-4729, 2004.

PARK, S. Environmental Regulatory Genes. In: NACHAMKIN, I.; BLASER, M. J. (Ed.). **Campylobacter**. Washington: American Society for Microbiology, 2000. p. 423-440.

PARK, S. F. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 74, n. 3, p. 177-188, 2002.

PARKER, C. T.; QUINONES, B.; MILLER, W. G.; HORN, S. T.; MANDRELL, R. E. Comparative genomic analysis of *Campylobacter jejuni* strains reveals diversity due to genomic elements similar to those present in *C. jejuni* strain RM1221. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 11, p. 4125-4135, 2006.

PARKHILL, J.; WREN, B. W.; 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.; PENN, C. W.; QUAIL, M. A.; RAJANDREAM, M. A.; RUTHERFORD, K. M.; VAN VLIET, A. H.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B. G. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. **Nature**, London, v. 403, n. 6770, p. 665-668, 2000.

PEARSON, A. D.; HEALING, T. D. The surveillance and control of campylobacter infection. **Communicable Disease Review**, London, v. 2, n. 12, p. 133-139, 1992.

PEARSON, B. M.; GASKIN, D. J.; SEGERS, R. P.; WELLS, J. M.; NUIJTEN, P. J.; VAN VLIET, A. H. The complete genome sequence of *Campylobacter jejuni* strain 81116 (NCTC11828). **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 189, n. 22, p. 8402-8403, 2007.

PETERSEN, L.; WEDDERKOPP, A. Evidence that certain clones of *Campylobacter jejuni* persist during successive broiler flock rotations. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 6, p. 2739-2745, 2001.

PEZZOTI, G.; SERAFIN, A.; LUZZI, I.; MIONI, R.; MILAN, M.; PERIN, R. Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in animals and meat in northeastern Italy. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 82, n. 3, p. 281-287, 2003.

PHONGSISAY, V.; PERERA, V. N.; FRY, B. N. Expression of the *htrB* gene is essential for responsiveness of *Salmonella typhimurium* and *Campylobacter jejuni* to harsh environments. **Microbiology-SGM**, Reading, v. 153, n. 1., p. 254–262, 2007.

PICKETT, C. L.; PESCI, E. C.; COTTLE, D. L.; RUSSELL, G.; ERDEM, A. N.; ZEYTIN, H. Prevalence of cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter* sp. *cdtB* gene. **Infection and Immunity**, Washington, v. 64, n. 6, p. 2070–2078, 1996.

PINTO, M. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. **Biology Cellular**, v. 47, p. 323–330, 1983.

POINTON, A.; SEXTON, M.; DOWSETT, P.; SAPUTRA, T.; KIERMEIER, A.; LORIMER, M.; HOLDS, G.; ARNOLD, G.; DAVOS, D.; COMBS, B.; FABIANSSEN, S.; RAVEN, G.; MCKENZIE, H.; CHAPMAN, A.; SUMNER, J. A baseline survey of the microbiological quality of chicken portions and carcasses at retail in two Australian states (2005 to 2006). **Journal of Food Protection**, Des Moines, Iowa, v. 71, n. 6, p. 1123–1134, 2008.

POLI, V. F. S.; THORSEN, L.; OLESEN, I.; WIK, M. T.; JESPERSEN, L. Differentiation of the virulence potential of *Campylobacter jejuni* strains by use of gene transcription analysis and a Caco-2 assay. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 155, n. 1-2, p. 60–68, 2012.

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

POOLE, K. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Wiesbaden, v. 10, n. 1, p. 12–26, 2004.

POPE, J. E.; KRIZOVA, A.; GARG, A. X.; THIESSEN-PHILBROOK, H.; OUIMET, J. A. *Campylobacter* reactive arthritis: a systematic review. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, Orlando, v. 37, n. 1, p. 48–55, 2007.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. **Clinical Veterinary Microbiology**, Spain, Elsevier Limited, section 2, p. 268, 1994.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J. C.; LEONARD, F. C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**, Porto Alegre, editora Artmed, cap.29, p.173, 2005.

RABINSTEIN, A. A. Guillan-Barré syndrome. **The Open General and Internal Medicine Journal**, v. 1, p. 13–22, 2007.

RAHIMI, E.; MOMTAZ, H.; AMERI, M.; GHASEMIAN-SAFAEI, H.; ALI-KASEMI, M. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* species isolated from chicken carcasses during processing in Iran. **Poultry Science**, Champaign, v. 89, n. 5, p. 1015-1020, 2010.

RAPHAEL, B. H.; PEREIRA, S.; FLOM, G. A.; ZHANG, Q.; KETLEY, J. M.; KONKEL, M. E. The *Campylobacter jejuni* response regulator, *CbrR*, modulates sodium deoxycholate resistance and chicken colonization. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 187, p. 3662-3670, 2005.

RATH, D.; JAWALI, N. Loss of expression of *cspC*, a cold shock family gene, confers a gain of fitness in *Escherichia coli* K-12 strains. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 188, n. 19, p. 6780-6785, 2006.

REID, A.N.; PANDEY, R.; PALYADA, K.; NAIKARE, H.; STINTZI, A. Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in the response to acidic pH and stomach transit. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 5, p. 1583–1598, 2008.

REIERSEN, J.; BRIEM, H.; HARDARDOTTIR, H.; GUNNARSSON, E.; GEORGSSON, F.; GUDMUNDSDOTTIR, E.; KRISTINSSON, K. G. Human *Campylobacteriosis* epidemic in Iceland 1998-2000 and effect of interventions aimed at poultry and humans. Marrakech: FAO/WHO **Global Forum of Food Safety Regulators**. 2002.

REINA, J. Analisis de los mecanismos de patogenicidade y virulencia descritos en las campilobacterias. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 11, p. 9, 1993.

RIDLEY, A. M.; TOSZEGERY, M. J.; CAWTHRAW, S. A.; WASSENAAR, T. M.; NEWELL, D. G. Genetic instability is associated with changes in the colonization potential of *Campylobacter jejuni* in the avian intestine. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 105, n. 1, p. 95–104, 2008.

RIEU, A.; GUZZO, J.; PIVETEAU, P. Sensitivity to acetic acid, ability to colonize abiotic surfaces and virulence potential of *Listeria monocytogenes* EGD-e after incubation on parsley leaves. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 108, n. 2, p. 560–570, 2010.

RIPABELLI, G.; TAMBURRO, M.; MINELLI, F.; LEONE, A.; SAMMARCO, M. L. Prevalence of virulence-associated genes and cytolethal distending toxin production in *Campylobacter* spp. isolated in Italy. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, Oxford, v. 33, n. 4, p. 355-364, 2010.

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**, Chicago, v. 183, n. 11, p. 1607–1616, 2001.

RIZAL, A.; KUMAR, A.; VIDYARTHI, A. S. Prevalence of pathogenic genes in *Campylobacter jejuni* isolated from poultry and human. **Internet Journal of Food Safety**, Washington, v. 12, p. 29-34, 2010.

RÖNER, A.; ENGVALL, E.; ANDERSSON, L.; KAIJSER, B. Species identification by genotyping and determination of antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from humans and chickens in Sweden. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 96, n. 2, p. 173-179, 2004.

ROWE, M. T.; DUNSTALL, G.; KIRK, R.; LOUGHNEY, C. F.; COOKE, J. L.; BROWN, S. R. H. Development of an image system for the study of viable but non-culturable forms of *Campylobacter jejuni* and its use to determine their resistance to disinfectants. **Food Microbiology**, London, v. 15, n. 5, p. 491-498, 1998.

ROZYNEK, E.; DZIERZANOWSKA-FANGRAT, K.; KORSACK, D.; KONIECZNY, P.; WARDACK, S.; SZYCH, J.; JAROSZ, M.; DZIERZANOWSKA, D. Comparison of antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from humans and chicken carcasses in Poland. **Journal of Food Protection**, Des Moines, Iowa, v. 71, n. 3, p. 602–607, 2008.

RUSSELL, R. G.; BLASER, M. J.; SARMIENTO, J. I., FOX, J. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in *Macaca nemestrina*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 57, n. 5, p. 1438– 1444, 1989.

RUSSEL, R. G.; O'KONNOGHUE, M.; BLAKE, D.C.; ZULTY, J.; DeTOLLA, L. J. Early colonic damage and invasion of *Campylobacter jejuni* in experimentally challenged infant *Macaca Mulatta*. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 168, n. 1, p. 210-215, 1993.

SAMPERS, I.; HABIB, I.; BERKVEN, D.; DUMOULIN, A.; ZUTTER, L. D.; UYTENDAELE, M. Processing practices contributing to *Campylobacter* contamination in Belgian chicken meat preparations. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 128, n. 2, p. 297-303, 2009.

SANAD, Y. M.; KASSEM, I. I.; ABLEY, M.; GEBREYES, W.; LEJEUNE, J. T.; RAJASHEKARA, G. Genotypic and Phenotypic Properties of Cattle-Associated *Campylobacter* and Their Implications to Public Health in the USA. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. 1-13, 2011.

SÁNCHEZ, R.; FERNANDEZ, B.; DIAZ, M. D.; MUNOZ, P.; RODRIGUEZ, C. Evolution of susceptibilities of *Campylobacter* spp. to quinolones and macrolides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 38, n. 9, p. 1879-1882, 1994.

SANTOS, J. F. A. **Caracterização de isolados de *Campylobacter jejuni* de origem animal e humana quanto aos seus factores genéticos de virulência**. 2011. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa, 2011.

SCIENTIFIC STATUS SUMMARY. Bacteria associated with foodborne diseases. **Institute of Food Technologists**, Chicago, p.1-25, 2004.

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 & Infection**, Cambridge, v. 135, n. 8, p. 1299–1306, 2007.

SHEPPARD, S. K.; COLLES, F.; RICHARDSON, J.; CODY, A. J.; ELSON, R.; LAWSON, A.; BRICK, G.; MELDRUM, R.; LITTLE, C. L.; OWEN, R. J.; MAIDEN, M. C. J.; MCCARTHY, N. D. Host Association of *Campylobacter* Genotypes Transcends Geographic Variation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 15, p. 5269–5277, 2010.

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

SILVA, N.; AMSTALDEN, V. C. **Detecção de *Campylobacter*. Manual de métodos de análise microbiológica**. São Paulo. Livraria Varela, 1997. 326 p. cap. 18, p. 142-148.

SKIRROW, M.; BLASER, M. Clinical aspects of *Campylobacter* infection. In: NACHAMKIN, I.; BLASER, M. J. (Ed.). ***Campylobacter***. Washington: American Society for Microbiology, 2000. p. 68–88.

SMITH, J. L.; BAYLES, D. O. The contribution of cytolethal distending toxin to bacterial pathogenesis. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 32, n. 4, p. 227-248, 2006.

SMITH, K. E.; BESSER, J. M.; HEDBERG, C. W.; LEANO, F. T.; BENDER, J. B.; Wicklund, J. H.; JOHNSON, B. P.; MOORE, K. A.; OSTERHOLM, M. T. Quinolone-resistant *Campylobacter jejuni* infections in Minnesota, 1992e 1998. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 340, n. 20, p. 1525-1532, 1999.

SONGER, J. G. Bacterial phospholipases and their role in virulence. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 5, n. 4, p. 156–161, 1997.

SOSULA, L.; NICHOLLS, E. M.; SKEEN, M. Ultrastructure of *Campylobacter jejuni* in gamma-irradiated mouse jejunum. **American Journal of Pathology**, Bethesda, v. 131, n. 1, p. 125-131, 1988.

STANLEY, K.; JONES, K. Cattle and sheep farms as reservoirs of *Campylobacter*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 94, n. 1, p. 104S–113S, 2003.

STERN, N. J., KOTULA, A. W. Survival of *Campylobacter jejuni* inoculated into ground beef. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 44, n. 5, p.1150, 1982.

STERN, N. J.; FEDORKA-CRAY, P; BAILEY, J. S.; COX, N. A. Distribution of *Campylobacter* spp. in selected U.S poultry production and processing operations. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 64, n. 11, p. 1705-1710, 2001.

STERN, N. J.; RO BACH, M. C. Enumeration of *Campylobacter* spp. in broiler feces and in corresponding carcasses. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 66, n. 9, p. 1557-1563, 2003.

STINTZI, A. Expression Profile of *Campylobacter jejuni* in Response to Growth Temperature Variation. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 185, n. 6, p. 2009–2016, 2003.

STINTZI A.; WHITWORTH L. Investigation of the *Campylobacter jejuni* Cold-Shock Response by Global Transcript. **Genome Letters**, v. 2, n. 1-2, p. 18-27, 2003.

STINTZI, A.; MARLOW, D.; PALYADA, K.; NAIKARE, H.; PANCIERA, R.; WHITWORTH, L.; CLARKE, C. Use of genome-wide expression profiling and mutagenesis to study the intestinal lifestyle of *Campylobacter jejuni*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 73, n. 3, p. 1797-1810, 2005.

TALDUKER, K.; ASLAM, M.; ISLAM, Z. Prevalence of virulence genes and cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* isolates from diarrheal patients in Bangladesh. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 46, n. 4, p. 1485–1488, 2008.

TAREMI, M.; DALLAL, M. M. S.; GACHKAR, L.; ARDALAN, S. M.; ZOLFAGHARIAN, K.; ZALI, M. R. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolated from retail raw chicken and beef meat, Tehran, Iran. **Journal of Food Microbiology**, Des Moines, v. 108, n. 3, p. 401-403, 2006.

THAKUR, S.; GEBREYES, W. A. *Campylobacter coli* in swine production: antimicrobial resistance mechanisms and molecular epidemiology. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 11, p. 5705–5714, 2005.

THAKUR, S.; MORROW, W. E. M.; FUNK, J. A.; BAHNSON, P. B.; GEBREYES, W. A. Molecular epidemiologic investigation of *Campylobacter coli* in swine production systems using multi-locus sequence typing (MLST). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 8, p. 5666–5669, 2006.

THAKUR, S.; ZHAO, S.; MCDERMOTT, P. F.; HARBOTTLE, H.; ABBOTT, J.; ENGLISH, L.; GEBREYES, W. A.; WHITE, D. G. Antimicrobial resistance, virulence, and genotypic profile comparison of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*

isolated from humans and retail meats. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v. 7, n. 7, p. 835-844, 2010.

TOSIN, I.; MACHADO, R. A. Ocorrência de *Campylobacter* spp entre manipuladores de alimentos em cozinhas hospitalares de localidade urbana da região Sul do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 26, n. 6, p. 472-477, 1995.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia - 3º Edição**. Editora Atheneu - São Paulo, cap. 34, p. 255-259, 2002.

VAN DEUN, K.; HAESEBROUCK, F.; HEYNDRICKX, M.; FAVOREEL, H.; DEWULF, J.; CELEN, L.; DUMEZ, L.; MESSENS, W.; LELEU, S.; VAN IMMERSEEL, F.; DUCATELLE, R. PASMANS, F. Virulence properties of *Campylobacter jejuni* isolates of poultry and human origin. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 56, n. 10, p. 1284–1289, 2007.

VAN DEUN, K.; PASMANS, F.; DUCATELLE, R.; FLAHOUE, B.; VISSENBERG, K.; MARTEL, A.; VAN DEN BROECK, W.; VAN IMMERSEEL, F.; HAESEBROUCK, F. Colonization strategy of *Campylobacter jejuni* results in persistent infection of the chicken gut. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 130, n. 3-4, p. 285–297, 2008.

VANDAMME, P.; VANCANNEYT, B.; POT, B.; MELS, L.; HOSTE, B.; DEWETTINCK, D.; VLAES, L.; VAN DEN BORRE, C.; HIGGINS, R.; HOMMEZ, J. Polyphasic taxonomic study of the emended genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* comb. Nov. and *Arcobacter skirrowii* sp. Nov. an aerotolerant bacterium isolated from veterinary specimens. **International Journal of Systematic Bacteriology and Evolution**, v. 42, p. 344-356, 1992.

VANDAMME, P.; DEWHIRST, F. E.; PASTER, B. J.; ON, S. L. W. Genus I. *Campylobacter*. In: BRENNER, D. J. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2º Ed., Vol. 2, Part C. Springer, New York, 2005.

VERHOEFF-BAKKENES, L.; BEUMER, R.; DE JONGE, R.; VAN LEUSDEN, F.; DE JONG, A. Quantification of *Campylobacter jejuni* cross-contamination via hands, cutlery, and cutting board during preparation of a chicken fruit salad. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 71, n. 5, p. 1018-1022, 2008.

WAITE, M. Phospholipases. In: VANCE, D. E.; VANCE, J. E. (Ed.). **Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes**. Amsterdam: Elsevier, 1996. p. 211-236.

WALLIS, M. R. The pathogenesis of *Campylobacter jejuni*. **British Journal Of Biomedical Science**, London, v. 51, n. 1, p. 54-64, 1994.

WASSENAAR, T. M.; BLASER, M. J. Pathophysiology of *Campylobacter jejuni* infections of humans. **Microbes and Infection**, Paris, v. 1, n. 12, p. 1023– 1033, 1999.

WASSENAAR, T. M.; BLEUMINK-PLUYM, N. M.; NEWELL, D. G.; NUIJTEN, P. J. M.; VAN DER ZEIJST, B. A. Differential flagellin expression in a *flaA flaB*⁺ mutant of *Campylobacter jejuni*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 62, n. 9, p. 3901–3906, 1994.

WASSENAAR, T. M.; BLEUMINK-PLUYM, N. M.; VAN DER ZEIJST, B. A. M. Inactivation of *Campylobacter jejuni* flagellin genes by homologous recombination demonstrates that *flaA* but not *flaB* is required for invasion. **EMBO Journal**, Oxford, v. 10, n. 8, p. 2055–206, 1991.

WASSENAAR, T. M.; FERNANDEZ-ASTORGA, A.; ALONSO, R.; MARTEINSSON, V. T.; MAGNUSSON, S. H.; KRISTOFFERSEN, A. B.; HOFSHAGEN, M. Comparison of *Campylobacter fla*-SVR genotypes isolated from humans and poultry in three European regions. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 49, n. 3, p. 388–395, 2009.

WASSENAAR, T. M. Toxin production by *Campylobacter* spp. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 10, n. 3, p. 466–476, 1997.

WEMPE, J. M.; GENIGEORGIS, C. A.; FARVER, T. B.; YUSU FU, H. I. Prevalence of *Campylobacter jejuni* in two California chicken processing plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 45, n. 2, p. 355-359, 1983.

WHITEHOUSE, C. A.; BALBO, P. B.; PESCI, E. C.; COTTLE, D. L.; MIRABITO, P. M.; PICKETT, C. L. *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin causes a G2-phase cell cycle block. **Infection and immunity**, Washington, v. 66, n. 5, p. 1934-1990, 1998.

WHO (WORD HEALT ORGANIZATION), **Campylobacter**, 2000. Fact Sheet nº 255. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/en/>>. Acesso em: 19 jan. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2001). **The increasing incidence of human campylobacteriosis. Report and Proceedings of a WHO Consultation of Experts Copenhagen.** Denmark, 2000. 135 p. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/hq/2001/WHO_CDS_CSRAPH_2001.7.pdf>. Acesso em: 12 fev. 2012.

WHYTE, P.; COLLINS, J. D.; MCGILL, K.; MONAHAN, C. Distribution and prevalence of airborne microorganisms in three commercial poultry processing plants. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 64, n. 3, p. 388-391, 2001.

WIERZBA, T. F.; MESSIH, I. A.; GHARIB, B.; BAQAR, S.; HENDAUI, A.; KHALIL, I.; OMAR, T. A.; KHAYAT, H. E.; PUTNAM, S. D.; SANDERS, J. W.; NG, L. K.; PRICE, L. J.; SCOTT, D. A.; FRENCK, R. R. *Campylobacter* infection as a trigger for Guillain-Barré Syndrome in Egypt. Pub Med. **Central Journals Plos One**, USA, v. 3, n. 11, p. E.3664, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov.picrender.fcgi>>. Acesso em: 08 fev. 2010.

WILSON, D. J.; GABRIEL, E.; LEATHERBARROW, A. J. H.; CHEESBROUGH, J.; GEE, S.; BOLTON, E.; FOX, A.; FEARNHEAD, P.; HART, C. A.; DIGGLE, P. J. Tracing the source of campylobacteriosis. **Plos Genetics**, England, v. 4, n. 9, 2008.

WOODALL, C. A.; JONES, M. A.; BARROW, P. A.; HINDS, J.; MARSDEN, G. L.; KELLY, D. J.; DORRELL, N.; WREN, B. W.; MASKELL, D. J. *Campylobacter jejuni* gene expression in the chick cecum: evidence for adaptation to a low-oxygen environment. **Infection and Immunity**, Washington, v. 73, n. 8, p. 5278-5285, 2005.

WORKMAN, S. N.; MATHISON, G. E.; LAVOIE, M. C. An investigation of sources of *Campylobacter* in a poultry production and packing operation in Barbados. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 121, n. 1, p. 106–111, 2008.

WÖSTEN, M. M.; PARKER, C. T.; VAN MOURIK, A.; GUILHABERT, M. R.; VAN DIJK, L.; VAN PUTTEN, J. P. The *Campylobacter jejuni* PhoS/PhoS operon represents a non-classical phosphatesensitive two-component system. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 62, n. 1, p. 278-291, 2006.

WÖSTEN, M. M.; VAN DIJK, L.; PARKER, C. T.; GUILHABERT, M. R.; VAN DER MEER-JANSSEN, Y. P.; WAGENAAR, J. A.; VAN PUTTEN, J. P. Growth phase-dependent activation of the *DccRS* regulon of *Campylobacter jejuni*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 192, n. 11, p. 2729-2736, 2010.

XIE, Y. P.; HE, Y. P.; IRWIN, P. L.; JIN, T.; SHI, X. M. Antibacterial activity and mechanism of action of zinc oxide nanoparticles against *Campylobacter jejuni*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 7, p. 2325–2331, 2011.

YAN, S.; PENDRAK, M.; FOLEY, S.; POWERS, J. *Campylobacter* infection and Guillain-Barré syndrome: public health concerns from a microbial food safety perspective. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v. 5, n. 5, p. 285-305, 2005.

YANG, H.; LI, Y.; JOHNSON, M. G. Survival and death of *Salmonella* Typhimurium and *Campylobacter jejuni* in processing water and on chicken skin during poultry scalding and chilling. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 64, n. 6, p. 770-776, 2001.

YATES, J. Traveler's diarrhea. **American Family Physician**, Kansas, v. 71, n. 11, p. 2095–2100, 2005.

YOUNG, K. T.; DAVIS, L. M.; DIRITA, V. J. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 5, p. 665-679, 2007.

ZAUTNER, A. E.; HERRMANN, S.; CORSO, J.; TAREEN, A. M.; ALTER, T.; GROB, U. Epidemiological Association of Different *Campylobacter jejuni* Groups with Metabolism-Associated Genetic Markers. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 7, p. 2359–2365, 2011.

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**, Washington, v. 76, n. 24, p. 7949-7956, 2010.

ZHAO, S.; MCDERMOTT, P. F.; FRIEDMAN, S.; ABBOTT, J.; AYERS, S.; GLENN, A.; HALL-ROBINSON, E.; HUBERT, S. K.; HARBOTTLE, H.; WALKER, R. D.; CHILLER, T. M.; WHITE, D. G. Antimicrobial resistance and genetic relatedness among *Salmonella* from retail foods of animal origin: NARMS retail meat surveillance. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v. 3, n. 1, p. 106–117, 2006.

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.

ZILBAUER, M.; DORRELL, N.; WREN, B.W.; BAJAJ-ELLIOTT, M. *Campylobacter jejuni*-mediated disease pathogenesis: an update. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 2, p. 123–129, 2008.

ZIPRIN, R. L.; YOUNG, C. R.; BYRD, J. A.; STANKER, L. H.; HUME, M. E.; GRAY, S. A.; KIM, B. J.; KONKEL, M. E. Role of *Campylobacter jejuni* potential virulence genes in cecal colonization. **Avian Diseases**, kennett Square, v. 45, n. 3, p. 549–557, 2001.

ZIRNSTEIN, G.; LI, Y.; SWAMINATHAN, B.; ANGULO, F. Ciprofloxacin resistance in *Campylobacter jejuni* isolates: detection of *gyrA* resistance mutations by mismatch amplification mutation assay PCR and DNA sequence analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 10, p. 3276–3280, 1999.

ZORMAN, T.; HEYNDRIKX, M.; UZUNOVIC-KAMBEROVIC, S.; SMOLE MOZINA, S. Genotyping of *Campylobacter coli* and *C. Jejuni* from retail chicken meat and human with campylobacteriosis in Slovenia and Bosnia and Herzegovina. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 110, n. 1, p. 24–33, 2006.