DÉBORA DIRANI SENA DE GOBBI

**Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Arcobacter* spp.
provenientes de suínos**

**SÃO PAULO
2013**

DÉBORA DIRANI SENA DE GOBBI

**Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Arcobacter* spp.
provenientes de suínos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Medicina Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Profa. Dra. Andrea Micke Moreno

São Paulo

2013

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2903
FMVZ

Gobbi, Débora Dirani Sena de
Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Arcobacter* spp. provenientes de suínos / Débora Dirani Sena de Gobbi. -- 2013.
73 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Andrea Micke Moreno.

1. Suínos. 2. *Arcobacter*. 3. Genes de virulência. 4. AFLP. 5. PFGE. 6. CIM. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Isolamento e caracterização de *Listeria monocytogenes* e *Yersinia enterocolitica* em abatedouros e cortes de carne suína no Estado de São Paulo e sua comparação genotípica com isolados de casos clínicos em humanos”, protocolado sob o nº1103/2007, utilizando 360 (trezentos e sessenta) suínos (peças de matadouro), sob a responsabilidade da Profa. Dra. Andréa Micke Moreno, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 23/05/07.

(We certify that the Research “Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* from slaughterhouses and pork from São Paulo State and their genotypic comparison with clinical human isolates”, protocol number 1103/2007, utilizing 360 (tree hundred and sixty) swines (parts of slaughterhouses), under the responsibility Profa. Dra. Andréa Micke Moreno, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 05/23/2007).

São Paulo, 24 de maio de 2007

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: GOBBI, Débora Dirani Sena de

Título: Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Arcobacter* spp. provenientes de suínos

Tese apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
em Epidemiologia
Experimental e
Aplicada às Zoonoses da
Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São
Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição:: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição:: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição:: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição:: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição:: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido, Shin Jieh, pelo apoio incondicional, por todos os finais de semana e feriados de companhia no laboratório em nosso primeiro ano de casados, e por todo auxílio tecnológico.

À minha família, pelo apoio e incentivo constantes.

À Prof. Dra. Andrea Moreno, por todos os anos de orientação, trabalho, convívio e todas as oportunidades a mim oferecidas.

À amiga Thaís Ferreira pelos anos de amizade e grande ajuda na parte experimental do doutorado.

À amiga Cristina Amigo pela ajuda na coleta das amostras.

A toda equipe de pós-graduandos, técnicos e amigos do Laboratório de Sanidade Suína e Virologia, pelos anos de convívio e trabalho.

Ao amigo Alexandre, pela disposição e ajuda prestados.

À FAPESP, pela bolsa que possibilitou o desenvolvimento desse trabalho.

Aos funcionários e veterinários responsáveis pelo abatedouro no qual a coleta foi realizada.

A todos os professores, pós-graduandos e funcionários do Departamento de Medicina Preventiva e Saúde Animal, pelos ensinamentos e experiências compartilhadas.

RESUMO

GOBBI, D. D. S. **Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Arcobacter* spp. provenientes de suínos.** [Phenotypic and genotypic characterization of *Arcobacter* spp. strains from swine]. 2013. 73 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Dentre as espécies conhecidas do gênero *Arcobacter*, as espécies *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii* são consideradas potencialmente zoonóticas, podendo ser transmitidas por alimentos de origem animal. O presente estudo teve como objetivos isolar e caracterizar fenotípica e genotipicamente cepas de *Arcobacter* spp. provenientes de carcaças de suínos e amostras de ambiente de abatedouro localizado no Estado de São Paulo. As cepas isoladas foram submetidas a reação em cadeia pela polimerase para a identificação e detecção de um grupo de genes de virulência. A concentração inibitória mínima frente a nove antimicrobianos usados para o controle da infecção pelo agente foi determinada e as cepas foram analisadas através do PFGE e pelo AFLP. Dentre as 30 carcaças avaliadas, 25 foram positivas para o agente e 70 cepas foram selecionadas e identificadas como *Arcobacter* spp. As espécies isoladas foram *A. butzleri* (n=61), *A. cryaerophilus* (n=7) e *A. skirrowii* (n=2). A frequência dos possíveis genes de virulência encontrada variou de 71,4% a 100% para os genes *tlyA*, *pldA*, *cj1349*, *ciaB*, *cadF* e *mviN*. Não foram detectados os genes *hecA*, *hecB* e *irgA*. O perfil de virulência *ciaB/ cj1349/ mviN/ cadF/ pldA/ tlyA* foi o mais frequente e detectado em 66% das cepas. Todas as cepas foram sensíveis à gentamicina e tetraciclina e 77,1% foram multirresistentes, dentre estas o perfil mais frequente foi de resistência a azitromicina/ florfenicol/ ácido nalidíxico/ telitromicina/ clindamicina. Houve grande diversidade genotípica entre as cepas através do PFGE e do AFLP, e ambas as técnicas apresentaram o mesmo poder discriminatório na análise das cepas isoladas.

Palavras-chaves: Suínos. *Arcobacter*. genes de virulência. AFLP. PFGE. CIM.

ABSTRACT

GOBBI, D. D. S. **Phenotypic and Genotypic characterization of *Arcobacter* spp. strains from swine.** [Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Arcobacter* spp. provenientes de suínos]. 2013. 73 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Among the known species of the genus *Arcobacter*, the species *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* and *A. skirrowii* are considered potentially zoonotic and can be transmitted by food of animal origin. This study aimed to isolate and characterize phenotypically and genotypically strains of *Arcobacter* spp from swine carcasses and slaughterhouse environment samples located in the State of São Paulo. The isolated strains were subjected to polymerase chain reaction for identification and detection of a group of putative virulence genes. The minimum inhibitory concentration was determined against nine antimicrobials indicated for the control of infection by the agent and the strains were analyzed by PFGE and by AFLP. Among the 30 carcasses evaluated, 25 were positive for the agent and 70 strains were selected and identified as *Arcobacter* spp. The isolated species were *A. butzleri* (n = 61), *A. cryaerophilus* (n = 7) and *A. skirrowii* (n = 2). The frequency of virulence genes found ranged from 71.4 % to 100 % for genes *tlyA* , *pldA* , *cj1349* , *ciaB* , *cadF* and *mviN* . The genes *hecA*, *hecB* and *irgA* were not detected. The virulence profile *ciaB*/*cj1349*/*mviN*/*cadF*/*pldA*/*tlyA* was the most frequent and detected in 66 % of the strains. All strains were susceptible to gentamicin and tetracycline and 77.1% were multiresistant, among these the most common profile of resistance was azithromycin/ florfenicol/ nalidixic acid/ telithromycin/ clindamycin There were large genotypic diversity among strains by PFGE and AFLP and both techniques showed the same discriminatory power in the analysis of the isolated strains .

Key words: Swine. *Arcobacter*. putative virulence genes. AFLP. PFGE. MIC.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1	ETIOLOGIA	10
2.2	PATOGENICIDADE	12
2.3	EPIDEMIOLOGIA	14
2.4	PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL	15
2.5	ÁGUA COMO VIA DE TRANSMISSÃO	17
2.6	INFECÇÃO EM HUMANOS	18
2.7	DOENÇAS NOS SUÍNOS	20
2.8	MÉTODOS DE ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO	22
2.8.1	Métodos Convencionais	22
2.8.1.1	Resistência aos Antimicrobianos	23
2.8.2	Métodos Moleculares	24
3	OBJETIVOS	26
3.1	OBJETIVO GERAL	26
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4	MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1	AMOSTRAS	27
4.2	COLETA	27
4.3	CULTIVO E ISOLAMENTO BACTERIANO	27
4.4	EXTRAÇÃO DO DNA	28
4.5	IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES	29
4.6	DETECÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA	29
4.7	DETECÇÃO DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO	31
4.8	PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA	31
4.9	ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE)	33
4.10	POLIMORFISMO DO COMPRIMENTO DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS (AFLP)	33
4.11	DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DISCRIMINATÓRIO (ID)	34
4.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS	34
5	RESULTADOS	35
5.1	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO AGENTE	35
5.2	DETECÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA	36
5.3	PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA	37
5.4	ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE)	41
5.5	POLIMORFISMO DO COMPRIMENTO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS (AFLP)	49
6	DISCUSSÃO	52
7	CONCLUSÕES	63
	REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Arcobacter* é composto por dezessete espécies e pertence à família Campylobacteriaceae. As espécies *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii* estão relacionadas com infecções em seres humanos e animais de produção.

Por muitos anos estes agentes foram considerados como pertencentes ao gênero *Campylobacter*. Assim como ocorre com as campilobactérias, o sucesso para o isolamento deste micro-organismo é influenciado pelas exigências diferenciadas de seu crescimento *in vitro*, já que possui crescimento fastidioso e difícil caracterização através de provas bioquímicas.

É considerado um agente potencialmente zoonótico, que pode ser transmitido por alimentos ou pela água contaminados. Os produtos de origem animal, em especial aqueles oriundos de aves e suínos, têm sido associados com a veiculação do agente. A epidemiologia do micro-organismo é pouco elucidada, algumas questões referentes à cadeia de transmissão dos alimentos para o ser humano necessitam ser mais bem compreendidas.

O presente estudo teve por objetivo caracterizar fenotípica e genotipicamente cepas do gênero *Arcobacter* isoladas de carcaças de suínos ao abate. A caracterização fenotípica foi baseada na análise do perfil de sensibilidade a antimicrobianos frequentemente utilizados na terapêutica contra *Campylobacter*. A caracterização genotípica baseou-se na identificação das espécies envolvidas e na detecção de genes de virulência através da PCR, caracterização das cepas através do Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos Amplificados- (AFLP) e da Eletroforese em Gel Pulsado (PFGE).

2 REVISÃO DE LITERATURA

São descritos a seguir os pontos mais relevantes sobre *Arcobacter* spp.

2.1 ETIOLOGIA

Arcobacter spp é uma bactéria pertencente à família *Campylobacteraceae*, que também abrange as bactérias do gênero *Campylobacter* e *Sulfurospirillum* (COLLADO; FIGUERAS, 2011).

O gênero *Arcobacter* foi descrito em 1991 por Vandamme e integra bactérias que no passado eram classificadas como pertencentes ao gênero *Campylobacter*, e por suas características de crescimento *in vitro* eram conhecidas como *Campylobacter* aerotolerantes (PHILLIPS, 2001). Vandamme reclassificou 77 diferentes espécies de *Campylobacter* em cinco grupos distintos de *Arcobacter*. (JOHNSON; MURANO, 1999). O isolamento do agente foi descrito pela primeira vez em 1977 a partir de fetos abortados de bovinos (VILLARRUEL-LOPEZ et al., 2003).

É considerado um gênero atípico dentro da classe Epsilonproteobactérias porque suas espécies são isoladas de diversos habitats e hospedeiros (LEVICAN et al., 2013).

São micro-organismos Gram negativos, com aproximadamente 0.2- 0.9 µm de largura por 0.5-3 µm de comprimento, que crescem tanto em atmosfera microaeróbica como aeróbica, não são esporulados, são curvos e possuem um flagelo polar. Sua temperatura de crescimento varia de 15 a 37°C, sendo que podem crescer a 30°C após isolamento primário em atmosfera microaeróbica (SNELLING et al., 2006). Podem sobreviver à temperatura de 4°C comumente encontrada em abatedouros e estabelecimentos processadores de alimentos, e são inativados em poucos segundos a 55°C (ATANASSOVA et al., 2008).

Por serem extremamente semelhantes às bactérias do gênero *Campylobacter* spp., algumas características são utilizadas para diferenciá-los dos micro-organismos deste gênero: não são capazes de crescer a 42°C, possuem crescimento ótimo a 30°C em aerobiose e apresentam o conteúdo de G+C que varia de 27 a 30 mol % (PHILLIPS, 2001).

Assim como ocorre com as espécies de *Campylobacter*, a rotina de identificação e diferenciação é laboriosa, pois esses micro-organismos possuem crescimento fastidioso (ATABAY et al., 2002; ATABAY; WAINO; MADSEN, 2006).

Atualmente o gênero é composto pelas seguintes espécies: *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. nitrofigilis*, *A. skirrowii*, *A. cibarius*, *A. halophilus* (COLLADO et al., 2008), *A. mytili* (COLLADO et al., 2009), *A. thereius* (HOUF et al., 2009), *A. defluvii* (COLLADO et al., 2011), *A. molluscorum* (FIGUERAS et al., 2011a), *A. marinus*, *A. trophiarum* (DE SMET et al., 2011), *A. ellisii* (FIGUERAS et al., 2011b), *A. bivalviorum* (LEVICAN et al., 2012), *A. venerupis* (LEVICAN et al., 2012) *A. cloacae* e *A. suis* (LEVICAN; COLLADO; FIGUERAS, 2013).

As espécies *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii* estão relacionadas com doenças em seres humanos e em animais de produção, e são as mais estudadas do gênero (KAYMAN et al., 2012; LAPPI et al., 2013).

A. cibarius, *A. thereius*, *A. trophiarum* e *A. suis* foram isoladas de frangos e suínos, mas não foram detectadas em amostras de fezes humanas (HOUF et al., 2005; HO et al., 2007; HOUF et al., 2009; LEVICAN et al., 2013).

A. nitrofigilis é um organismo que fixa nitrogênio encontrado em associação a uma planta pantanosa chamada *Spartina alterniflora* (SNELLING et al., 2006; PEJCHALOVÁ et al., 2008).

As espécies *A. halophilus*, *A. mytili*, *A. molluscorum*, *A. marinus*, *A. ellisii*, *A. bivalviorum* e *A. venerupis* foram encontradas em matrizes ambientais (sedimentos marinhos, lagunas hipersalinas e água do mar) e frutos do mar, como mariscos, mexilhões, amêijoas e estrelas-do-mar (FIGUERAS et al., 2011; LEVICAN et al., 2012).

A. defluvii e *A. cloacae* foram isoladas em tubulações de água de esgoto (COLLADO et al., 2011; LEVICAN; COLLADO; FIGUERAS, 2013).

Graças à grande diversidade de hospedeiros das espécies deste gênero, ele é bastante heterogêneo (HO; LIPMAN; GAASTRA, 2008). A espécie *A. butzleri* é capaz de crescer em meio contendo 1% de glicina e 1,5% de NaCl numa faixa de pH entre 5 e 8,5 e possui fraca reação à catalase e resistência ao cloreto de cádmio. Já *A. cryaerophilus* possui forte atividade da catalase e é sensível ao cloreto de cádmio. Tais características são utilizadas para diferenciar as duas espécies quando em meio de cultivo (HARMON et al., 1997; LEHNER; TASARA; STEPLAN, 2005).

Para *A. butzleri*, 24 horas de incubação podem ser o suficiente para observar colônias visíveis, enquanto 48 a 72 horas podem ser necessárias para o crescimento de *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii*, respectivamente (VAN DRIESSECHE; HOUF, 2007).

Além disso, as colônias de *A. butzleri* podem ser diferenciadas das outras duas espécies por serem maiores e crescerem mais rapidamente (ATABAY; CORRY; ON, 1998). O tamanho da colônia pode variar de 1 a 3 mm, com coloração de amarela a bege (HARRAB; SCHWARTZ; WENZEL, 1998). Algumas colônias podem ou não ser Alfa - hemolíticas.

Alguns autores sugerem a classificação da espécie *A. cryaerophilus* em dois grupos distintos: 1A e 1B através da restrição do DNA com a enzima *Pvu II* (OLIVEIRA; BARCELLOS; BOROWSKI, 1999).

2.1 PATOGENICIDADE

Apenas as espécies *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii* são consideradas patogênicas para o homem e animais (NEWELL, 1997). Até o momento, os mecanismos de patogenicidade e os possíveis fatores de virulência do agente são pouco conhecidos (FERNÁNDEZ et al., 1995).

Sabe-se que algumas cepas podem ou não ser alfa-hemolíticas, porém não se conhece a relação desta característica na virulência do micro-organismo (ATABAY et al., 2002).

Fernandez et al. (1995) determinaram a existência de toxinas ou capacidade de invasão de dois isolados de *A. cryaerophilus* a partir de um feto bovino abortado e fezes de suíno. A presença de toxinas foi avaliada através do teste em alça ligada de rato, que resultou na distensão das alças com acúmulo de fluído e no aumento da concentração de eletrólitos dentro do lúmen intestinal. No mesmo estudo a capacidade de invasão tecidual pelo agente foi avaliada em culturas celulares HEP-2, nas quais foi observada a invasão das células pelos micro-organismos dos dois isolados.

Wesley et al. (1996) infectaram experimentalmente leitões de apenas um dia de vida obtidos por cesariana e privados do recebimento do colostro, com cepas de *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii*. O tempo de eliminação fecal do agente foi avaliado e os leitões que receberam as cepas de *A. butzleri* eliminaram o agente por até 10 dias, o que indica a colonização intestinal e multiplicação do agente no organismo. O tempo de eliminação das outras espécies foi bem reduzido, o que pode sugerir uma menor capacidade de colonização pelas mesmas.

Villarruel-López et al. (2003) testaram cepas de *Arcobacter* spp. isoladas de diversos tipos de carne e as testaram em cultivo de células Vero. Noventa e cinco por cento das cepas produziram efeito citotóxico na linhagem testada, sendo que 38% das cepas induziram um efeito tipo alongamento celular, indicativo de produção de enterotoxina. Outro efeito observado em algumas cepas foi a formação de vacúolos, possivelmente relacionados com a produção de uma toxina de vacuolização.

Ho et al. (2007) pesquisaram a habilidade de adesão, invasão e indução da expressão da interleucina-8 em linhagens de células epiteliais intestinais humanas e suínas. Todas as cepas estudadas aderiram e induziram a produção de IL-8. *A. cibarius* apresentou a maior habilidade de adesão, e apenas *A. cryaerophilus* invadiu as células.

O estudo do genoma de *A. butzleri* ATCC 49616 revelou que essa cepa possui possíveis determinantes de virulência como os genes *cadF* e *cjl1349*, que codificam proteínas que se ligam à fibronectina e auxiliam a célula bacteriana a aderir em células epiteliais; o gene *ciaB* codificador do antígeno invasivo B que contribui para invasão da célula hospedeira; o gene *irgA* que codifica uma proteína de membrana regulada pelo ferro e está associada a aquisição de ferro pela célula bacteriana, o gene *hecA* codificador de hemaglutinina filamentosa associada a adesão, o gene *hecB*, associado a proteína ativadora da hemolisina, o gene *tlyA* que codifica a hemolisina, o gene da fosfolipase *pldA* associada a lise de eritrócitos e o fator de virulência *mvn* que é homólogo a lipase II lipídica de *Escherichia coli*, este fator tem sido associado a capacidade de evasão do sistema imune inato (MILLER et al., 2007).

A detecção dos nove genes associados aos determinantes de virulência descritos acima foi proposta por Doudah et al. (2012) através da reação em cadeia

pela polimerase. Cepas de *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii* foram testadas e nenhuma delas carregou todos os nove genes encontrados na cepa de *A. butzleri* ATCC 49616, o que pode sugerir um potencial de virulência diferente entre estas espécies, justificado ainda pela alta heterogeneidade em seus genomas.

Levican et al. (2013) testaram a capacidade invasiva de cepas de *Arcobacter* spp. em células da linhagem celular Caco-2. Das 17 espécies reconhecidas do gênero, apenas *A. halophilus* e *A. marinus* não integraram o experimento. Neste estudo, apenas cepas de *A. bivalviorum* não invadiram as células; as espécies mais invasivas foram *A. trophiarum*, *A. skirrowii*, *A. cryaerophilus*, *A. butzleri* e *A. defluvii*. As cepas mais invasivas foram isoladas de fezes de animais ou do esgoto. Não foi possível estabelecer uma relação entre a capacidade de invasão dessas cepas com a detecção dos genes de virulência pela M-PCR.

Até o momento, a relação entre a detecção desses genes e sua expressão vinculada a fatores ambientais ainda não foi estabelecida, sendo necessários mais estudos para compreensão do papel desses possíveis fatores de virulência na patogenicidade do *Arcobacter* (DOUIDAH et al., 2012; LEVICAN et al., 2013).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

Arcobacter spp. foi relatado em diversos países: Nova Zelândia (BRIGHTWELL et al., 2007); Dinamarca (ATABAY et al., 2002); Bélgica (HOUF et al., 2003); Turquia (ON; HARRINGTON; ATABAY, 2003); Alemanha (HARRAB; SCHWARTZ; WENZEL, 1998; ATANASSOVA et al., 2008); Brasil (OLIVEIRA et al., 1999b; GOBBI, 2010); Reino Unido (SNELLING et al., 2006); Itália (VANDAMME et al., 1993); África do Sul (DIERGAARDT et al., 2004); Austrália (RIVAS; FEGAN; VANDERLINDE, 2004); Suíça (LEHNER; TASARA; STEPLAN, 2005); Espanha (COLLADO et al., 2008; FIGUERAS et al., 2011a; LEVICAN et al., 2012); República Checa (PEJCHALOVÁ et al., 2008); Irlanda (HAMILL; NEILL; MADDEN, 2008); Estados Unidos (WESLEY, 2007); Índia (PATYAL et al., 2011); Austrália (DUFFY; FEGAN, 2012); Malásia (SHAH et al., 2013).

O agente é associado à doença em seres humanos e em animais, isolado a partir de diversos tipos de tecidos: fetos bovinos e suínos resultantes de abortos

(OLIVEIRA et al., 1997; ON; HARRINGTON; ATABAY, 2003); fezes de animais de diversas espécies (VAN DRIESSCHE et al., 2003; ATABAY; WAINO; MADSEN, 2006); carcaças de aves e suínos (ATABAY; CORRY; ON, 1998; HARRAB; SCHWARTZ; WENZEL, 1998; OLIVEIRA et al., 2003; KABEYA et al., 2004); produtos de origem animal (ZANETTI et al., 1996; OHLENDORF; MURANO, 2002; HOUF et al., 2003; LAPPI et al., 2013) e a partir das fezes e da cultura do sangue de indivíduos que sofreram de gastroenterite e bacteremia (VANDAMME et al., 1992; ENGBERG et al., 2000; LAU et al., 2002; KAYMAN et al., 2012).

Outros integrantes do gênero, ainda não isolados de mamíferos, são encontrados no ambiente aquático, como a água do mar, lagunas hipersalinas e nos encanamentos da rede de esgoto. Algumas espécies foram primeiramente identificadas a partir de mexilhões, mariscos e ostras (DIERGAARDT et al., 2004; FIGUERAS et al., 2011a, b; LEVICAN et al., 2012; LEVICAN; COLLADO; FIGUERAS, 2013).

2.3 PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL

As vias mais importantes de transmissão de *Arcobacter* spp. para seres humanos são os produtos de origem animal e água contaminados (HAMILL; NEILL; MADDEN, 2008).

Em relação aos reservatórios do agente, os animais de produção são importantes carreadores, principalmente aves e suínos. O agente foi isolado do intestino de animais saudáveis de diferentes espécies como bovinos, suínos, ovinos e equinos (LEHNER; TASARA; STEPLAN, 2005).

Lipman et al. (2008) estudaram a presença de *Arcobacter* spp. em galinhas poedeiras e a possível transmissão para os ovos. Os resultados demonstraram a presença do agente no trato intestinal (com uma prevalência variável de 20 a 85%), mas não nos ovos. Assim como ocorre com o *Campylobacter*, não existe consenso sobre a possibilidade de transmissão vertical do agente para o ovo.

Arcobacter spp. é encontrado em carnes de aves e suínos, e em carnes de origem bovina e ovina, em menor frequência (WESLEY, 2007). Além disso, o agente

foi isolado de leite cru de vacas com mastite e de primatas não humanos com diarreia (VAN DRIESSE et al., 2003).

Dentre as espécies conhecidas, *A. butzleri* é a mais comumente isolada de produtos de origem animal, assim como em carcaças de aves e suínos (PHILLIPS, 1999).

Pouco foi esclarecido a respeito da epidemiologia do *Arcobacter* spp. em abatedouros. Kabeya et al. (2004) e Ho et al. (2008) defendem a hipótese de que as carcaças de frangos são contaminadas após o abate, em etapas como a escalda. Houf et al. (2000) acreditam que o procedimento de abate pode não ter papel importante nos níveis de contaminação de carcaças de frango, uma vez que a bactéria não foi isolada do equipamento de abate antes do início das atividades.

Sabe-se que *A. butzleri* é capaz de colonizar as superfícies de equipamentos feitos de aço, cobre e polietileno, o que reforça a questão da formação dos biofilmes em abatedouros, tornando a contaminação do local persistente (KJELDGAARD; JORGENSEN; INGMER, 2009; SHAH et al., 2013).

Em relação à prevalência em carcaças de suínos no Brasil, Oliveira et al. (2003), isolaram *Arcobacter* spp. a partir de 21 carcaças, dentre 74 avaliadas (29,3%) em abatedouro do Sul do país enquanto Gobbi (2010) analisou 120 carcaças suínas provenientes de abatedouros do Estado de São Paulo e obteve 71,6% de carcaças positivas para o gênero.

Collins et al. (1996) analisando amostras de carne de diferentes abatedouros descrevem uma frequência que variou de 5 a 90%, enquanto Boer et al. (1996) isolaram o agente em apenas 0,5% das amostras de carne minimamente processadas. No Japão, Kabeya et al. (2004) analisaram 100 amostras de carne suína e a frequência de isolamento foi de 7%. Ohlendorf e Murano (2002), nos Estados Unidos, encontraram uma frequência que variou de 0 a 64% de acordo com os diferentes abatedouros, observando ainda frequência de contaminação cinco vezes maior em peças de carne com baixos teores de gordura quando comparada a peças de carne com alto teor de gordura. Na Austrália, Rivas et al. (2004) obtiveram uma frequência de 29% de isolados em amostras de carne suína. Na Itália, Zanetti et al. (1996) obtiveram uma prevalência de 3,7% em cortes de lombo suíno, e não isolaram o agente de salsichas suínas. Na Coreia, Lee et al. (2010) não conseguiram isolar o agente em peças de carne suínas comercializadas em estabelecimentos de varejo.

A análise de fezes de suínos obtidas em abatedouros na Bélgica resultou em uma frequência de 44% (36/82) de *Arcobacter* spp., das quais 29 foram *A. butzleri* e sete foram *A. cryaerophilus* (VAN DRIESSCHE et al., 2003). Em 1996, Harmon e Wesley obtiveram uma frequência de 40% de positivos em amostras de fezes de animais saudáveis nos Estados Unidos. Em estudo realizado no Estado de São Paulo, a análise de 120 amostras de fezes de suínos resultou em 4,16% de fezes positivas (GOBBI, 2010).

Tal constatação pode indicar que seja possível que a carne proveniente do abate desses animais possa sofrer contaminação cruzada. Diferentemente das aves, o suíno possui uma temperatura interna (39°C) favorável ao *Arcobacter* spp. enquanto nas aves a temperatura interna (42°C) é muito alta para a multiplicação deste gênero bacteriano (OHLENDORF; MURANO, 2002).

Em outras espécies, a frequência de isolamento a partir das fezes foi de 39% em bovinos, 16% em ovinos e 15% em equinos, segundo estudo conduzido na Bélgica por Van Driessche et al. (2003).

2.4 ÁGUA COMO VIA DE TRANSMISSÃO

Uma via importante de transmissão do agente é a água. Os micro-organismos contaminam o meio aquático, assim como a água utilizada em abatedouros, casas e estações de tratamento a partir das fezes dos animais portadores. A contaminação da água de beber foi identificada como a maior via de transmissão para humanos nos países em desenvolvimento (ASHBOLT, 2004). *A. butzleri* e *A. cryaerophilus* já foram isoladas de estações de tratamento de água na África do Sul por Diergaardt et al. (2004).

Collado et al. (2008) investigaram a presença de *Arcobacter* spp. em 205 amostras de água proveniente de rios, lagos, mar e efluentes de esgoto. Do total, 55,1% foram positivas para o isolamento do agente e houve uma associação significativa com bactérias indicadoras de contaminação fecal (coliformes fecais como *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp.). Tal associação entre a presença de *Arcobacter* spp. e coliformes fecais sugere que a água do mar não seja habitat

natural do agente, e sim, que ele apareça quando há poluição por dejetos, diferentemente do que defendem outros autores .

A veiculação da bactéria pela água do mar também implica em contaminação de crustáceos e mariscos, utilizados na alimentação humana, sendo que segundo Romero et al. (2002), *Arcobacter* spp. é regularmente encontrado em ostras.

Na Índia, Paytal et al. (2010) isolaram *A. butzleri* e *A. skirrowii* de peixes marinhos utilizados na alimentação humana.

2.5 INFECÇÃO EM HUMANOS

Campylobacter spp. e micro-organismos *Campylobacter*-like foram identificados como patógenos de importância veterinária há mais de 80 anos, e devido ao desenvolvimento de técnicas de cultivo seletivo nos anos 70, sua associação com doenças entéricas em seres humanos pode ser estabelecida (NEWELL, 1997).

Graças a sua similaridade filogenética, a patogênese, a distribuição e as vias de transmissão descritas para *C. jejuni* podem ser estendidas para o gênero *Arcobacter*. No entanto, suas semelhanças morfológicas e bioquímicas podem levar a uma detecção incorreta destes agentes (SNELLING et al., 2006; ATABAY; WAINO; MADSEN, 2006; WESLEY, 2007).

Além disso, o isolamento e identificação de *Arcobacter* spp. não são normalmente realizados na rotina de laboratórios de diagnóstico humano, por isso também, pouco se sabe sobre o seu papel em saúde pública. É provável que sua importância como agente zoonótico e sua prevalência em infecções de seres humanos sejam subestimadas graças à utilização de métodos de tipificação inapropriados, já que não há padronização para o seu isolamento e devido à falta de conhecimento dos próprios médicos acerca da epidemiologia deste patógeno (VANDENBERG et al., 2004; ATABAY; WAINO; MADSEN, 2006; SNELLING et al., 2006; FIGUERAS et al., 2008).

A. butzleri e *A. cryaerophilus* são as espécies mais frequentemente relacionadas às gastroenterites em humanos (VANDAMME et al., 1992). Entre essas duas espécies, *A. butzleri* foi a mais freqüente nas fezes de pacientes da Bélgica e

França (HO et al., 2006) e da Índia (PAYTAL et al., 2010) e de pacientes com queixas gastrointestinais na África do Sul (SAMIE et al., 2007).

A primeira evidência da relação epidemiológica entre *Arcobacter* spp. e doença nos seres humanos foi sugerida a partir de um surto de cólica abdominal em crianças na Itália. O surto ocorreu em 1983, em um berçário e escola primária, o qual afetou 10 crianças entre dois a oito anos, três das quais foram hospitalizadas devido aos sintomas muito agudos. As amostras de fezes coletadas foram positivas para *A. butzleri* (ATABAY et al., 2002).

Segundo Mansfield, *A. butzleri* não é habitante normal do intestino de seres humanos, sendo que o autor observou apenas 2% das amostras fecais de indivíduos saudáveis positivas para o agente (MANSFIELD¹, 2000 *apud* OLIVEIRA et al., 2003, p. 889).

Estudos de biotipificação e sorotipagem demonstraram que os mesmos biótipos são simultaneamente distribuídos entre seres humanos e animais (HOUF et al., 2000).

Os sintomas de gastroenterites causada por *Arcobacter* spp. são similares aqueles causados por outros agentes enteropatogênicos: diarreia aquosa, cólica abdominal, náusea, febre, vômitos e calafrios. Pouco se sabe sobre seu período de incubação e duração dos sintomas (VANDAMME et al., 1993). Em alguns casos, a sintomatologia clínica é similar à que ocorre na infecção por *C. jejuni* (VANDENBERG et al., 2004).

Lappi et al. (2013) investigaram um surto alimentar relacionado a *A. butzleri* no qual 47 convidados de um casamento em Wisconsin (EUA) adoeceram após a ingestão de carne de frango que foi servida na festa. A partir dos questionários respondidos pelos convidados, algumas informações sobre o período de incubação do agente foram obtidas: em média, o período de incubação do agente foi de 32 horas após o consumo do alimento, alguns convidados, no entanto, começaram a apresentar os primeiros sintomas após 12 horas. No geral, os sintomas perduraram por três dias, a maioria dos pacientes não apresentou febre e não precisou de hospitalização. A equipe responsável pelo preparo dos alimentos obedeceu aos procedimentos de boas práticas de fabricação e nenhum dos funcionários estava apresentando sintomas gastroentéricos na ocasião.

¹ MANSFIELD, L. P.; FORSITHE, S. J. *Arcobacter butzleri*, *A. skirrowii* and *A. cryaerophilus* – potential emerging human pathogens. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 11, p. 161 – 170, 2000.

Além dos relatos de gastroenterites em crianças e adultos relacionados com *Arcobacter* spp., outras doenças foram associadas à presença do patógeno, cuja infecção pode se tornar fatal em pacientes imunocomprometidos. Lau et al. (2002) relataram bacteremia em uma mulher de 69 anos com quadro agudo de apendicite e Phillips (2001) relata a ocorrência de bacteremia em neonato, um caso de bacteremia em paciente com cirrose hepática, e também um quadro de uremia associada à bacteremia.

A associação entre *Arcobacter* spp. e *Helicobacter pylori* está sendo relacionada à outras doenças em seres humanos como gastrite, úlceras e até câncer gástrico, o que vem despertando o interesse dos pesquisadores pelo agente em termos de saúde pública (SUAREZ et al., 1997).

No entanto, as rotas de infecção ainda não foram esclarecidas, mas podem incluir o contato direto pessoa-pessoa e o consumo de alimentos e água contaminados. A espécie *A. butzleri* possui a maior prevalência e importância dentro do gênero e é considerada um sério risco à saúde humana pela Comissão Internacional Sobre Especificações Microbiológicas para Alimentos (*International Commission on Microbiological Specifications for Foods*) (ICMSF, 2002).

2.6 DOENÇAS NOS SUÍNOS

Há vários relatos do isolamento deste micro-organismo a partir de fezes de animais de produção. No caso de suínos, o agente é relacionado à ocorrência de problemas reprodutivos e isolado de fetos suínos abortados e de marrãs inférteis com descarga vaginal recorrente (NEWELL, 1997; OLIVEIRA et al, 1999).

No entanto, a sua patogenicidade em suínos tem sido discutida já que o agente pode ser isolado do trato gastrointestinal de animais saudáveis (NEWELL, 1997; OLIVEIRA et al, 1999). O agente foi isolado de marrãs e cachacos clinicamente assintomáticos com diferentes taxas de prevalência e colonização, e houve eliminação intermitente de até três espécies simultaneamente (VAN DRIESSE et al., 2003).

A. cryaerophilus é a espécie mais prevalente nos casos de problemas reprodutivos nos animais, ao contrário de *A. butzleri*, que é a mais associada aos

casos de enterite em seres humanos e mais frequentemente encontrada em carcaças de aves e suínos. No Brasil, Oliveira et al. (1997) analisaram seis cepas isoladas de fetos suínos abortados, 10 cepas isoladas do útero e oviduto de marrãs e uma cepa de placenta de uma fêmea que apresentava problema reprodutivo. Do total, 71% das cepas foram classificadas como *A. cryaerophilus* 1B, 24% como *A. cryaerophilus* 1A e 6% como *A. butzleri*.

Oliveira et al. (1999) analisaram, ainda, 74 amostras de fluido prepuccial e nove amostras de sêmen, coletadas em granjas que reportavam problemas reprodutivos. A espécie mais prevalente foi *A. cryaerophilus* (11,1%) seguida por *A. butzleri* (1,48%).

Em 1996, Wesley et al. infectaram experimentalmente leitões de um dia de vida obtidos por cesariana e privados de colostro com as cepas isoladas de casos clínicos de *Arcobacter* spp. Os leitões infectados com *A. butzleri* morreram após 24 horas da inoculação, à necropsia a mucosa do íleo e ceco estava avermelhada, observaram-se pequenas úlceras gástricas na mucosa glandular e o agente foi isolado dos tecidos renal, cerebral, intestinal e pulmonar. *A. cryaerophilus* foi isolado a partir de suabes retais, mas não foi cultivado de tecidos. Os animais infectados por *A. skirrowii* morreram após quatro dias da inoculação, mas não foi possível o cultivo a partir de tecidos. Este estudo indica que leitões neonatos podem ser infectados com *Arcobacter* spp. o que pode explicar o fato de animais saudáveis serem portadores do micro-organismo.

O agente também foi isolado do estômago de suínos que apresentavam úlceras gástricas, uma doença economicamente significativa em todas as linhagens de suínos. Suarez et al. (1997) detectaram bactérias do gênero em 51% dos estômagos analisados, sendo que *A. butzleri* foi a espécie mais prevalente (77%). A partir do exame microscópico dos estômagos, foi possível observar lesões com paraqueratose leve a erosões e ulcerações, e nos casos crônicos, formação de tecido de granulação, hipertrofia da mucosa e presença de tecido necrótico.

2.7 MÉTODOS DE ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO

Os métodos de isolamento e identificação são descritos a seguir:

2.7.1 Métodos Convencionais

A utilização de métodos sensíveis de isolamento permite a detecção de grande número desse micro-organismo. Tais métodos utilizam diferentes meios seletivos associados com baixas concentrações de antibióticos, diferentes atmosferas de incubação (ATABAY; CORRY; ON, 1998) e etapas de enriquecimento. (LEHNER; TASARA; STEPLAN, 2005).

O primeiro protocolo desenvolvido para o isolamento e cultivo de *Arcobacter* spp. utilizava um meio semissólido de isolamento de *Leptospira* spp. denominado Ellinghausen-Mc Cullough - Johnson-Harris Polisorbato- 80 (EMPH-P80) que necessita de suplementação com 100 µL/mL de 5-fluoracil. (OHLENDORF; MURANO, 2002). Este protocolo foi muito utilizado na década de 1990 por diversos autores (HARMON; WESLEY, 1997; OLIVEIRA et al., 1997; SUAREZ et al., 1997).

A partir daí, muitos meios de enriquecimento e de identificação foram elaborados: há no mercado caldos de enriquecimento comerciais que são suplementados com cefoperazone, anfotericina e teicoplanina (CAT) e com cefoperazone modificado, carvão e deoxicolato (mCCD), que permitem o bom crescimento das espécies de *Arcobacter* spp., já que não possuem sistemas de captura de oxigênio, como no caso dos meios que levam sangue e neutralizam o efeito do oxigênio atmosférico (PHILLIPS, 2001).

De Bôer et al. (1996) desenvolveram um meio de enriquecimento para isolamento de *Arcobacter* spp. sob condições aeróbicas, que se baseia em enriquecer a amostra em um caldo seletivo e em seguida, plaqueá-la em ágar seletivo, examinando em seguida as características das zonas de motilidade.

O meio de isolamento mais recente foi desenvolvido por Johnson e Murano, em 1999, sendo realizado totalmente em aerobiose, mais seletivo e rápido e não

requer a identificação de zonas de motilidade como o anteriormente descrito. Este meio contém carvão que é uma agente detoxificante, benéfico para o crescimento de espécies aerotolerantes; cefoperazone, sais biliares, 5-fluoracil que agem como agentes seletivos e a peptona especial que oferece suporte para o crescimento mais efetivo da bactéria.

Como resultado da evolução dos métodos de identificação e isolamento desse agente, a sua frequência de detecção aumentou nos últimos anos (WESLEY, 2007).

Em relação aos métodos de caracterização fenotípica, citam-se: testes bioquímicos, perfis de proteínas de membrana e perfis de ácidos graxos. Quanto aos testes bioquímicos, os resultados são limitados, graças à baixa atividade metabólica geralmente observada dentro desta classe, associada à grande variabilidade de cepas e à reação atípica de algumas delas (HARMON; WESLEY, 1997).

Os testes realizados são a hidrólise de indoxil-acetato e o teste da catalase, que possibilita a diferenciação entre *A. butzleri* e *A. cryaerophilus*, já que a primeira apresenta uma reação mais fraca que a segunda (WESLEY, 2007).

Quanto à sorotipagem, Lior e Wood (1991) desenvolveram um método para sorotipar *A. butzleri*, que utiliza antígenos vivos e antissoros adsorvidos, em teste de aglutinação em lâmina. Até o momento foram discriminados 14 sorogrupos (OLIVEIRA; BARCELLOS; BOROWSKI, 1999).

2.7.2 Resistência aos Antimicrobianos

A determinação do perfil de resistência a antimicrobianos de *Arcobacter* spp. é significativa pois esse agente é associado a doenças em seres humanos.

A diarreia causada pelos membros da família Campylobacteraceae é, no geral, tida como auto limitante. No entanto, alguns casos mais severos ou de duração prolongada podem necessitar de terapia antimicrobiana. Os antibióticos preconizados nesses casos são: eritromicina e as fluorquinolonas como a ciprofloxacina. A tetraciclina, doxiciclina e gentamicina podem ser utilizadas como alternativas (HOUf et al., 2004).

Não há até o presente momento pontos de corte definidos para os valores de sensibilidade ou técnica padrão para testar a suscetibilidade de *Arcobacter* spp. aos agentes antimicrobianos. Diversas metodologias podem ser utilizadas para esse fim como a microdiluição em caldo, a disco difusão e o E-teste (HARRAB; SCHWARTZ; WENZEL, 1998; ATABAY; AYDIN, 2001; FERA et al., 2003; VANDENBERG et al., 2006; SON et al., 2007; KAYMAN et al., 2012; SHAH; SALEHA, 2012; FERREIRA et al., 2013).

2.7.3 Métodos Moleculares

Diversas técnicas moleculares baseadas na Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) foram utilizadas ao longo das duas últimas décadas para a identificação rápida e específica de *Arcobacter* spp. (SUAREZ et al., 1997; OLIVEIRA et al., 2003; KABEYA et al., 2004). Em 1997, Harmon e Welsley desenvolveram a PCR multiplex para diferenciar *A. butzleri* das outras espécies de *Arcobacter* spp. Anos mais tarde, Houf et al. (2000) elaboraram outra reação multiplex para identificação simultânea de *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii*. Em 2007, Brightwell et al. criaram PCR multiplex e PCR em tempo real para identificar cepas de *A. butzleri* e *A. cryaerophilus*.

Em 2009, Pentimalli et al. desenvolveram uma PCR multiplex para a detecção e diferenciação de *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* e *A. cibarius*. Mais recentemente, Doudah et al. (2010) elaboraram uma PCR multiplex com sete primers para a identificação de *A. butzleri*, *A. thereuis*, *A. cibarius*, *A. skirrowii* e *A. cryaerophilus* visando diferenciar as espécies mais frequentemente isoladas de amostras humanas e animais.

Embora a PCR seja altamente discriminatória para identificar as diferentes espécies do gênero, uma limitação encontrada é a inabilidade de diferenciar genotipicamente as cepas dentro da mesma espécie (HUME et al., 2001).

A caracterização genotípica dos isolados pode ser realizada através de técnicas que envolvem a amplificação de DNA ou métodos que envolvam a quebra do DNA bacteriano com enzimas de restrição como a eletroforese em gel de campo

pulsado (PFGE), considerada o método padrão ouro para a maioria dos patógenos bacterianos. Alguns autores já utilizaram a PFGE em isolados provenientes de fezes de suínos para diferenciar cepas de *Arcobacter* spp. (HUME et al., 2001; RIVAS; FEGAN; VANDERLINE, 2004; HO et al., 2006).

Entre as técnicas baseadas na PCR, já foram descritas a amplificação randômica de DNA polimórfico - RAPD (ATABAY et al., 2002; HOUF et al., 2003), polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados- AFLP, (ON; HARRINGTON; ATABAY, 2003; ON et al., 2004; GONZALEZ et al., 2007) e polimorfismo de fragmentos de restrição - RFLP (OLIVEIRA et al., 1999).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar fenotípica e genotipicamente cepas de *Arcobacter* spp. isoladas de suínos em abatedouro do Estado de São Paulo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Isolar bactérias do gênero *Arcobacter* a partir de carcaças de suínos ao abate e do ambiente do abatedouro.
- ✓ Identificar as espécies isoladas.
- ✓ Determinar a presença de genes de virulência nas cepas isoladas através da reação em cadeia pela polimerase.
- ✓ Determinar os padrões de resistência antimicrobiana das cepas.
- ✓ Determinar padrões genotípicos de *Arcobacter* spp. por meio das técnicas de AFLP e PFGE.
- ✓ Comparar o grau de discriminação das técnicas de caracterização genotípicas.
- ✓ Avaliar se existe correlação entre os perfis genotípicos observados, presença dos genes de virulência e os perfis de resistência.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS

Foram avaliadas carcaças de 30 suínos e três amostras de ambiente de abatedouro de suínos com Inspeção Estadual localizado em Hortolândia, Estado de São Paulo. Os animais avaliados eram originários de três sistemas de produção de suínos do Estado de São Paulo.

Para controle de qualidade dos meios e da reação em cadeia pela polimerase foram utilizadas as cepas de referência *A. butzleri* ATCC 49616, *A. cryaerophilus* ATCC 43158 e *A. skirrowii* ATCC 51132.

4.2 COLETA

As amostras foram coletadas durante a linha de abate, com esponjas estéreis acondicionadas em bolsas plásticas (Whirl-Pak® Speci Sponge® bag - NASCO, EUA - 1-1/2" x 3" x 5/8"), mantidas em refrigeração até o momento do processamento. Antes da coleta, as esponjas foram hidratadas com 15 mL de Caldo Lethen (Difco-BBL, Detroit, MI /USA).

Para cada carcaça avaliada foi realizado o esfregaço de uma área de 100 cm² do pernil, pelve e pata traseira e uma área de 300 cm² da região do esterno.

4.3 CULTIVO E ISOLAMENTO BACTERIANO

Para o cultivo e o isolamento bacterianos foram utilizados o Caldo e Ágar seletivo descrito por Johnson e Murano (1999). A cada bolsa plástica contendo as esponjas foi adicionado 225 mL de água peptonada. As bolsas foram fechadas, levadas ao *stomacher* e agitadas a velocidade média por 1 minuto. Em seguida, 1mL

da água peptonada foi adicionada a 9 mL de Caldo Johnson e Murano e os tubos de ensaio foram agitados por 15 segundos. Os tubos foram incubados em aerobiose por 48 horas a 30°C. Após o período de incubação uma alíquota de 10µL do caldo foi depositada sobre uma membrana estéril de celulose (0,45µm) colocada na superfície do ágar seletivo Johnson e Murano. Após uma hora, o filtro foi retirado e a placa de ágar foi estriada. A seguir, as placas foram incubadas em aerobiose por 48 a 72 horas a 30°C. Colônias pequenas, típicas, não hemolíticas foram selecionadas, submetidas a coloração de Gram, inoculadas em caldo *brain heart infusion* (BHI) semissólido (0,15% de ágar) e os tubos foram incubados a 30° C por 48 horas. Os cultivos foram examinados em microscópio de campo escuro, objetiva 40 x para a observação de bactérias curvas e espiraladas, extremamente móveis. Foram então realizados testes de oxidase, catalase e crescimento em ágar MacConkey. As colônias com características de *Arcobacter* spp foram submetidas a identificação através da reação em cadeia pela polimerase e estocadas a -86°C.

4.4 EXTRAÇÃO DO DNA

O DNA bacteriano foi purificado pela extração baseada nas propriedades de lise e inativação de nucleases do Tiocianato de Guanidina junto às propriedades das partículas de terra diatomácea em ligar-se ao DNA ou RNA. Este método para purificação de ácidos nucléicos foi descrito por Boom et al. (1990).

4.5 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES

As cepas selecionadas foram caracterizadas com os primers descritos por Doudah et al. (2010).

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) foi realizada utilizando-se 5 µl do DNA bacteriano, 1.5 mM de MgCl₂, 10 pmoles de cada *primer* (Quadro 1), 1.0 U de *Taq* DNA polimerase, 1 X tampão de PCR e água até o volume final de 50 µl. A reação foi submetida à desnaturação à 94° C por 4 minutos seguido por 35 ciclos de 1 minuto à 94°C, 1 minuto à 55°C e 1 minuto à 72°C.

Quadro 1 - Sequência de primers utilizados para diferenciação das espécies

Região	Primer	Sequência	Espécie
23S rRNA	ButR	TCCTGATACAAGATAATTGTACG	<i>A. butzleri</i>
23S rRNA	TherR	GCAACCTCTTTGGCTTACGAA	<i>A. thereius</i>
23S rRNA	CibR	CGAACAGGATTCTCACCTGT	<i>A. cibarius</i>
23S rRNA	SkiR	TCAGGATACCATTAAAGTTATTGATG	<i>A. skirrowii</i>
23S Rrna	ArcoF	GCYAGAGGAAGAGAAATCAA	Todas anteriores
23S Rrna	CryF	CAGAGGAAGAGAAATCAAAT	<i>A. cryaerophilus</i>
23S Rrna	CryR	CCCACTATTCCATCAGTGAG	

4.6 DETECÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA

Para a detecção dos genes de virulência foram utilizados os primers descritos por Doudah et al. (2012), quadro 2.

A PCR foi realizada utilizando-se 5 µl do DNA bacteriano, 1.5 mM de MgCl₂, 10 pmoles de cada primer, 1.0 U de *Taq* DNA polimerase, 1 X tampão de CR e água até o volume final de 50 µl. A reação foi submetida à desnaturação à 94°C por 4 minutos seguidos por 35 ciclos de 1 minuto à 94°C, 1 minuto à 55°C ou 56 °C e 1 minuto à 72°C.

Quadro 2 - Sequência de *primers* utilizados para detecção dos genes de virulência

Gene	Primer	Sequência	Produto (pb)
<i>CadF</i>	<i>cadF</i> - F <i>cadF</i> -R	TTACTCCTACACCGTAGT AAACTATGCTAACGCTGGTT	283
<i>CiaB</i>	<i>ciaB</i> -F <i>ciaB</i> -R	TGGGCAGATGTGGATAGAGCTTGGA TAGTGCTGGTCGTCCACATAAAG	284
<i>cj1349</i>	<i>cj1349</i> -F <i>cj1349</i> -R	CCAGAAATCACTGGCTTTTGAG GGGCATAAGTTAGATGAGGTTCC	659
<i>IrgA</i>	<i>irgA</i> -F <i>irgA</i> -R	TGCAGAGGATACTTGGAGCGTAACT GTATAACCCCAATTGATGAGGAGCA	437
<i>HecA</i>	<i>hecA</i> -F <i>hecA</i> -R	GTGGAAGTACAACGATAGCAGGCTC GTCTGTTTTAGTTGCTCTGCACTC	537
<i>HecB</i>	<i>hecB</i> -F <i>hecB</i> -R	CTAAACTCTACAAATCGTGC CTTTTGAGTGTTGACCTC	528
<i>MviN</i>	<i>mviN</i> -F <i>mivN</i> -R	TGCACTTGTTGCAAAACGGTG TGCTGATGGAGCTTTTACGCAAGC	294
<i>PldA</i>	<i>pldA</i> -F <i>pldA</i> -R	TTGACGAGACAATAAGTGCAGC CGTCTTTATCTTTGCTTTCAGGGA	293
<i>TlyA</i>	<i>tlyA</i> -F <i>tlyA</i> -R	CAAAGTCGAAACAAAGCGACTG TCCACCAGTGCTACTTCCTATA	230

4.7 DETECÇÃO DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO

A detecção dos produtos de amplificação (10 µl produto e 2µl de tampão de corrida 6X) foi realizada através da eletroforese em gel de agarose 1,5%, utilizando-se tampão TAE (0,04 M tris-acetato [pH 8,5], 0,002 M de EDTA).

Os fragmentos amplificados foram visualizados no sistema de fotodocumentação ImageMaster® (Amershan Biosciences), sendo os mesmos corados com BlueGreen.® (LGC Biotecnologia) e comparados ao marcador 100 pb DNA Ladder (New England BioLabs Inc., Ipswich, MA/USA).

4.8 PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

Os perfis de resistência antimicrobiana dos isolados de *Arcobacter* spp. foram avaliados por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) através do método de microdiluição em placa. O teste foi conduzido conforme padrões definidos no documento M31-A3 do CLSI (2008).

Para determinação da CIM foi utilizada o painel de antimicrobianos Campylobacter MIC Plate - Sensititre® (TREK Diagnostic Systems Inc., Cleveland, OH). Este painel contém os seguintes antimicrobianos: Azitromicina (AZI), Ciprofloxacina (CIP), Eritromicina (ERY), Gentamicina (GEN), Tetraciclina (TET), Florfenicol (FFN), Ac. Nalidixico (NAL), Telitromicina (TEL) e Clindamicina (CLI).

O inóculo bacteriano utilizado no teste de concentração inibitória mínima foi preparado a partir de um cultivo puro de *Arcobacter* spp. em caldo *brain heart infusion* (BHI) suplementado com 5 % de soro fetal bovino, mantidos a 30°C por 48 horas. A turbidez do cultivo em caldo foi ajustada com solução salina estéril a 0,9 %, de modo a obter uma turbidez óptica comparável à da solução padrão 0,5 McFarland. Esta suspensão bacteriana ajustada apresenta uma concentração de aproximadamente 1×10^8 UFC/ml. Uma vez ajustada, a suspensão bacteriana foi diluída na ordem de 1:1000 no caldo Mueller Hinton II com ajuste de cátions (Difco-BBL) suplementado com soro fetal bovino de maneira a obter uma concentração

final de aproximadamente 5×10^5 UFC/mL. Uma alíquota de 50 µL desta cultura foi distribuída em cada um dos 96 poços da microplaca, a mesma foi selada e incubada a 30 °C por 48 horas.

O resultado do teste de microdiluição forneceu a concentração inibitória mínima, que pode ser traduzida como a menor concentração de agente antimicrobiano que inibe completamente o crescimento do micro-organismo nos poços da microplaca. O crescimento foi detectado pela visualização a olho nu de um “botão” no fundo do poço em “u” da placa, denotando o crescimento e a conseqüente precipitação das células bacterianas ao fundo.

No teste de microdiluição foram utilizados como controle as cepas padrão *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, sendo que as mesmas foram semeadas em caldo Mueller Hinton II com ajuste de cátions (Difco-BBL) como preconizado pelo CLSI (CLSI, 2008). A análise dos resultados foi baseada nos pontos de corte descritos no quadro 3, para caracterização das cepas como sensível, resistente e sensibilidade intermediária (CDC, NARMS, 2008).

Quadro 3 - Pontos de corte utilizados para caracterização dos perfis de resistência das cepas de *Arcobacter* spp.

Agentes antimicrobianos	CIM (µg/mL)		
	Sensível	Intermediário	Resistente
Azitromicina	≤2	4	≥8
Ciprofloxacina	≤1	2	≥4
Clindamicina	≤2	4	≥8
Eritromicina	≤8	16	≥32
Gentamicina	≤2	4	≥8
Ácido nalidíxico	≤16	32	≥64
Florfenicol	≤4	-	≥8
Telitromicina	≤1	2	≥4
Tetraciclina	≤4	8	≥16

4.9 ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE)

As cepas foram submetidas ao perfil de macrorestrição através de ensaios de PFGE utilizando o sistema de eletroforese CHEF DR III Chiller System (Bio-Rad). Em resumo, uma alíquota do cultivo bacteriano padronizada na diluição 1×10^9 foi incorporada em agarose de baixo ponto de fusão e, após homogeneização, transferidas para moldes plásticos. Os *plugs* de agarose resultantes contendo o material genético foram então submetidos a um processo de lise *in situ* e, posteriormente, estocados em tampão Tris-EDTA até o momento da eletroforese. Uma fração do *plug* foi submetida à digestão com as enzimas de restrição *SacII*, *EagI* e *SmaI* e posteriormente adicionada ao gel de agarose 1%. A eletroforese foi conduzida num período de 20h a 6V/cm, ângulo fixo de 120° , com pulso inicial de 0,1 s e final de 90s., em tampão TBE 0,5X mantido a 14°C .

4.10 POLIMORFISMO DO COMPRIMENTO DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS (AFLP)

O AFLP foi realizado segundo protocolo descrito por McLauchlin et al. (2000) utilizando a endonuclease de restrição *Hind III*. Para clivagem do DNA bacteriano, 4 μg de DNA foram adicionados a um microtubo contendo 24U de *Hind III*, tampão da enzima (1X) e água até o volume final de 20 μL . O tubo foi incubado a 37°C por 12 a 18 horas.

Uma alíquota de 5 μL do DNA clivado foi adicionada a um microtubo contendo 0,2 μg dos adaptadores ADH1 e ADH2, 1U de T4 DNA ligase, tampão ligase e água até o volume final de 20 μL . Esta reação foi incubada à temperatura ambiente por 3 horas. O DNA ligado foi aquecido a 80°C por 10 minutos.

A PCR foi realizada utilizando-se 2 µl do DNA ligado diluído, 2,5 mM de MgCl₂, 300 ng do primer (HI-X), 1U de *Taq* DNA polimerase, 1 X tampão de PCR e água até o volume final de 50 µL. A reação foi submetida à desnaturação a 94°C por 4 minutos seguido por 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C e 2,5 minutos a 72°C.

A detecção dos produtos de amplificação (20 µl produto e 5µl de tampão de corrida 6X) foi realizada através da eletroforese em gel de agarose 2%, utilizando-se tampão TAE (0,04 M tris-acetato [pH 8,5], 0,002 M de EDTA).

Os fragmentos amplificados foram visualizados no sistema de fotodocumentação ImageMaster (Amershan Biosciences), sendo os mesmos corados com BlueGreen® (LGC Biotecnologia) e comparados ao marcador 100 pb DNA Ladder (LGC Biotecnologia).

4.11 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DISCRIMINATÓRIO (ID)

Os resultados obtidos através da caracterização genotípica foram analisados segundo o método numérico descrito por Hunter e Gaston (1988).

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS

Para análise estatística dos fragmentos gerados foi utilizado o programa Bionumerics (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgica). A similaridade das amostras foi estimada por meio do coeficiente de Dice. Com a matriz de similaridade gerada foi possível determinar os grupos pelo método de "Unweighthed Pair-Group Method Using Arithmetic Average" (UPGMA).

5 RESULTADOS

5.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO AGENTE

A partir da avaliação de 30 suínos e três amostras do ambiente do abatedouro foi possível isolar *Arcobacter* spp. de 25 carcaças e de uma amostra de piso. Para realização das análises propostas foram selecionadas 70 cepas com características sugestivas do gênero *Arcobacter*, sendo que o número de colônias selecionadas por animal positivo variou de 1 a 6, de acordo com o número de colônias isoladas obtidas no plaqueamento.

O objetivo do presente estudo não foi avaliar a frequência do agente e das espécies deste gênero nas carcaças de suínos ou ambientes do abatedouro, portanto, não será dada ênfase a estes dados.

A partir das 70 cepas foi realizada a PCR para determinação das espécies de *Arcobacter* spp. para posterior caracterização fenotípica e genotípica destes isolados. Dentre as cepas selecionadas obteve-se 61 cepas de *A. butzleri*, sete de *A. cryaerophilus* e duas de *A. skirrowii*.

5.2 DETECÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA

A ocorrência dos genes de virulência nas 70 cepas é apresentada na tabela 1. Os perfis genotípicos obtidos pela combinação dos genes de virulência estão descritos na tabela 2.

Tabela 1 - Ocorrência dos genes de virulência dentre as diferentes espécies de *Arcobacter* spp. avaliadas

Espécies		<i>ciaB</i>	<i>cj1349</i>	<i>hecA</i>	<i>irgA</i>	<i>mviN</i>	<i>cadF</i>	<i>HecB</i>	<i>pIdA</i>	<i>tlyA</i>
<i>A. butzleri</i>		61	57	0	0	60	48	0	48	61
<i>A. cryaerophilus</i>		7	6	0	0	7	1	0	1	7
<i>A. skirrowii</i>		1	1	0	0	2	1	0	1	2
Total	N	69	69	0	0	69	50	0	50	70
	(%)	98.5	98.5	0	0	98.5	71.4	0	71.4	100

Tabela 2 - Perfis obtidos de acordo com a presença ou ausência dos genes de virulência pesquisados

Perfil	Genes	<i>Arcobacter butzleri</i>	<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	<i>Arcobacter skirrowii</i>	Total
V1	<i>ciaB/mviN/tlyA</i>	3	1	1	5
V2	<i>ciaB/cj1349/mviN/tlyA</i>	7	5	0	12
V3	<i>ciaB/cj1349/mvinN/cadF/tlyA</i>	3	0	0	3
V4	<i>ciaB/cj1349/mviN/cadF/pIdA/tlyA</i>	45	1	0	46
V5	<i>ciaB/cj1349/mviN/pIdA/tlyA</i>	1	0	0	1
V6	<i>cj1349/mviN/cadF/pIdA/tlyA</i>	0	0	1	1
V7	<i>ciaB/mviN/pIdA/tlyA</i>	1	0	0	1
V8	<i>ciaB/cj1349/pIdA/tlyA</i>	1	0	0	1

5.3 PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA

As 70 cepas foram submetidas à determinação da concentração inibitória mínima (CIM) através da microdiluição em placa. Os resultados obtidos, os valores da CIM50, CIM 90 e as porcentagens de resistência são apresentados na tabela 3. O CIM50 e o CIM 90 representam o CIM que inibe o crescimento visível de 50% e 90% das amostras, respectivamente.

Do total de 70 cepas testadas, 5,7% (4/70) foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados, sendo três cepas de *A. butzleri* e uma *A. cryaerophilus*. As demais cepas num total de 94,3% (66/70) apresentaram resistência a um ou mais antimicrobianos.

A maior taxa de resistência foi observada contra clindamicina 84,3% (59/70), seguido por florfenicol 78,5% (55/70), telitromicina 68,6% (48/70), e em menor porcentagem ao ácido nalidixico 54,2% (38/70), azitromicina 47,1% (33/70); ciprofloxacina 11,4% (8/70) e a eritromicina 6% (4/70). Todas as cepas foram sensíveis à gentamicina e à tetraciclina.

Em relação às 61 cepas de *A. butzleri*, mais de 90% (55/61) foram resistentes à clindamicina e ao ácido nalidixico, 86,7% (55/61) ao florfenicol, 77% (53/61) à telitromicina. Um pouco mais da metade das amostras, 54% (33/61) foi resistente à azitromicina, e menos de 10% foi resistente à ciprofloxacina e eritromicina. (Tabela 3)

Dentre as sete cepas de *A. cryaerophilus*, 85,7% (6/7) foram resistentes ao ácido nalidixico, 71,4% (5/7) foi resistente a ciprofloxacina, e 28,5% (2/7) a clindamicina. Todos foram suscetíveis à azitromicina, eritromicina, florfenicol, gentamicina, telitromicina e tetraciclina. As duas cepas de *A. skirrowii* foram resistentes ao florfenicol, ácido nalidixico e clindamicina. Uma cepa foi a resistente à telitromicina.

Adotando os critérios de resistência múltipla descritos por Magiorakos et al. (2012), são consideradas cepas multirresistentes aquelas resistentes a pelo menos um antimicrobiano pertencentes a três ou mais classes de antimicrobianos.

A partir do exposto, 77,1% (54/70) das cepas apresentaram resistência a três ou mais antimicrobianos de categorias diferentes. Das 54 cepas multirresistentes, 9,2% (5/54) foram resistentes a três, 37% (20/54) a quatro e 53,7% (29/54) a cinco antimicrobianos de classes distintas (Tabela 4).

Os 15 perfis de resistência observados nas cepas avaliadas são descritos na tabela 5. O perfil mais frequente foi o azitromicina/ florfenicol/ ácido nalidíxico/ telitromicina/ clindamicina correspondendo a 26 cepas de *A. butzleri*. O segundo perfil mais frequente foi resistência a florfenicol/ ácido nalidíxico/ telitromicina/ clindamicina, com 16 cepas de *A. butzleri* e uma de *A. skirrowii*.

Tabela 3 - Resultados obtidos a partir da determinação da concentração inibitória mínima de antimicrobianos frente as cepas de *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii* isoladas de carcaças de suínos e de ambiente de abatedouro

Antimicrot. Especies	Número de cepas - CIM (µg/ml)																CIM*50	CIM*90	Res**	
	0.015	0.03	0.06	<0.12	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	>8	16	>16	32	64	>64	(µg/ml)	(µg/ml)	%
Azitromicin: <i>A. butzleri</i>					1	7	1	4	6	9	13		15		4		1	8	16	54.1
<i>A. cryaerophilus</i>					2	3	2											0.25	0.5	0
<i>A. skirrowii</i>										2								4	4	0
Ciprofloxac <i>A. butzleri</i>			26		14	14	4			1			1		1			0.12	0.5	4.9
<i>A. cryaerophilus</i>			1		1					1	3		1					8	16	71.4
<i>A. skirrowii</i>			2															0.06	0.06	0
Clindamicin <i>A. butzleri</i>							1	1	3	1	3		3	49				>16	>16	90.2
<i>A. cryaerophilus</i>								1		4	2							4	4	28.6
<i>A. skirrowii</i>														2				>16	>16	100
Eritromicin: <i>A. butzleri</i>							5	6	7	14	12		13		3		1	4	16	6.6
<i>A. cryaerophilus</i>			1				4	2										0.5	1	0
<i>A. skirrowii</i>										1	1							4	8	0
Florfenicol <i>A. butzleri</i>									7	1	3		14		25	10	1	32	64	86.9
<i>A. cryaerophilus</i>								1	2	4								4	4	0
<i>A. skirrowii</i>															1	1		32	64	100
Gentamicin <i>A. butzleri</i>				5		18	35	3										0.5	0.5	0
<i>A. cryaerophilus</i>				1		4	2											0.25	0.5	0
<i>A. skirrowii</i>						1	1											0.25	0.5	0
Ác. Nalidíxi <i>A. butzleri</i>													1		5	20	35	>64	>64	90.2
<i>A. cryaerophilus</i>											1					5	1	64	>64	85.7
<i>A. skirrowii</i>																	2	>64	>64	100
Telitromicin <i>A. butzleri</i>					2	4	4	4	4	20	9	18						4	>8	77
<i>A. cryaerophilus</i>							2	2	3									1	2	0
<i>A. skirrowii</i>									1	1								2	4	50
Tetraciclina <i>A. butzleri</i>							6	2	14	21	18							4	8	0
<i>A. cryaerophilus</i>							2	5										1	1	0
<i>A. skirrowii</i>									1		1							2	8	0

Tabela 4 - Número de cepas multirresistentes de acordo com a espécie do gênero *Arcobacter*

Nº de antimicrobianos	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. skirrowii</i>	Total
3	4	0	1	5
4	19	0	1	20
5	29	0	0	29
Total	52	0	2	54

Tabela 5 - Perfis de resistência aos antimicrobianos testados dentre as cepas de *Arcobacter* spp. estudadas

Perfil de resistência	Antimicrobianos	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. skirrowii</i>	Total
P1	FFN/NAL/CLI	3	0	1	4
P2	FFN/ CLI	1	0	0	1
P3	AZI/ERY/FFN/NAL/TEL/CLI	2	0	0	2
P4	AZI/FFN/NAL/TEL/CLI	26	0	0	26
P5	AZI/CIP/FFN/NAL/TEL/CLI	1	0	0	1
P6	AZI/FFN/NAL/CLI	2	0	0	2
P7	FFN/NAL/TEL/CLI	16	0	1	17
P8	AZI/ERY/NAL/TEL/CLI	1	0	0	1
P9	AZI/ERY/TEL/CLI	1	0	0	1
P10	FFN/NAL	1	0	0	1
P11	NAL	0	1	0	1
P12	NAL/CLI	1	0	0	1
P13	CIP/NAL/CLI	0	2	0	2
P14	CIP/NAL	2	3	0	5
P15	CLI	1	0	0	1

5.4 ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE)

Três blocos de agarose contendo o DNA das cepas testadas foram submetidos à digestão por três enzimas de restrição (*Sma* I, *Eag* I e *Sac* II) e para cada enzima testada foi realizada uma corrida e com os dados resultantes foram construídos três dendrogramas.

Utilizando-se a enzima da *Sma*I, foram observados 26 perfis distintos a partir das 70 cepas selecionadas, considerando a presença ou ausência de uma ou mais bandas. O índice discriminatório calculado para a PFGE foi de 0,92. A análise dos dados obtidos no PFGE resultou no dendrograma apresentado na figura 1, e nos dados descritos na tabela 6.

No dendrograma (Figura 1) foi possível identificar três grupos principais. O grupo I englobou 18 perfis com 53 cepas, concentrou a maioria das cepas que apresentaram os perfis de resistência AZI/FFN/NAL/TEL/CLI e FFN/ NAL/ TEL/ CLI, que foram os mais frequentes e o perfil de virulência *ciaB*/ *cj1349*/ *mvn*/ *cadF* /*pldA*/ *tlyA* também foi o mais frequente no total das cepas.

O grupo II foi formado por dois perfis e seis cepas, cinco das quais são *A. cryaerophilus*. As cepas desse grupo apresentaram predomínio do perfil de resistência CIP/NAL/CLI e CIP/NAL e do perfil de virulência *ciaB*/ *cj1349*/ *mvn*/ *tlyA*. O grupo III, com seis perfis e 10 cepas, foi o mais heterogêneo em relação aos perfis de resistência (com sete perfis distintos) e aos de virulência (quatro perfis). O perfil 27, cepa 59, foi o único com o padrão de virulência *ciaB*/ *cj1349*/ *pldA*/ *tlyA* e não foi agrupado junto às outras cepas.

Por meio da digestão pela *Eag*I 62 cepas foram tipificáveis e distribuídas em 23 perfis distintos. O índice discriminatório foi de 0,92. A análise dos dados obtidos no PFGE resultou no dendrograma apresentado na figura 2, e nos dados descritos na tabela 7. Os perfis foram distribuídos em dois grandes grupos, o grupo I foi formado por 17 perfis e 55 cepas, com a concentração dos perfis de resistência AZI/FFN/NAL/TEL/CLI e FFN/NAL/TEL/CLI, e o perfil de virulência *ciaB*/ *cj1349*/ *mvn*/ *cadF*/ *pldA*/ *tlyA*.

O grupo II reuniu seis perfis com 23 cepas e foi mais heterogêneo em relação aos perfis de resistência e virulência. Nesse grupo foram inseridas as duas únicas cepas de *A. cryaerophilus* que possuíam sítio de clivagem para a referida enzima. As outras cinco cepas da espécie foram repetidamente testadas, mas não foi possível obter a digestão do material genético.

Com a enzima *SacII* foi possível caracterizar 68 cepas, resultando em 19 perfis, com índice discriminatório igual a 0,91. Duas cepas não apresentaram padrão de restrição com esta enzima após mais de três tentativas. A análise dos dados obtidos no PFGE resultou no dendograma apresentado na figura 3, e nos dados descritos na tabela 8. Os perfis foram distribuídos em dois grandes grupos, o grupo I foi subdividido em três subgrupos. O subgrupo IA englobou um perfil com 10 cepas. Metade das cepas apresentou o perfil de resistência FFN/ NAL/ TEL/ CLI e o perfil de virulência *ciaB/ cj1349/ mviN/ cadF/ pldA/ tlyA*. O subgrupo IB agrupou oito perfis, num total de 40 cepas que, em sua maioria apresentaram o perfil de resistência AZI/ FFN/ NAL/ TEL/ CLI e o de virulência *ciaB/ cj1349/ mviN/ cadF/ pldA/ tlyA*.

No subgrupo IC observa-se três perfis, o primeiro com três cepas que possuem em comum a resistência para FFN/NAL/CLI e os genes de virulência *ciaB/mviN/cj1349/tlyA*; o segundo e o terceiro que reúnem seis cepas, todas da espécie *A. cryaerophilus*.

O grupo II concentrou cinco perfis e oito cepas, todas *A. butzleri*. Metade das cepas foi sensível a todos os antimicrobianos, e a outra metade apresentou uma variedade de padrões de resistência. Os perfis de virulência também foram variados nesse grupo.

Figura 1 - Análise de cepas de *Arcobacter* spp. isoladas de carcaças suínas e de abatedouro através de PFGE com enzima de restrição *Sma*I

Tabela 6 - Características dos perfis obtidos a partir das cepas de *Arcobacter* spp. avaliadas através da PFGE com a enzima *Sma*I

Perfil	Nº de cepas	Nº de perfis resistência	Perfis resistência	Nº de perfis De virulência	Perfis virulência (nº de cepas)
Sm 1	3	3	P8(1), P7(1), P4(1)	1	V2(3)
Sm 2	1	1	P4(1)	1	V4(1)
Sm 3	1	1	P9(1)	1	V4(1)
Sm 4	1	1	P7(1)	1	V2(1)
Sm 5	1	1	P14(1)	1	V2(1)
Sm 6	15	6	P10(1), P6(1), P4(7), P14(1), P1(1), P7(4)	5	V4(10), V8(1), V3(2), V6 (1), V1(1)
Sm 7	1	1	P7(1)	1	V4(1)
Sm 8	2	1	P7(2)	1	V4(2)
Sm 9	1	1	P7(1)	1	V4(1)
Sm 10	11	6	P3(1), P1(1), P6(1), P4(4), P7(3), P5(1)	2(1)	V3 (1), V4(10)
Sm 11	1	1	P4(1)	1	V4
Sm 12	6	3	P4(3), P7(2), P1(1)	1	V4(6)
Sm 13	2	2	P4(1), P7(1)	1	V4(2)
Sm 14	1	1	P7(1)	1	V4(1)
Sm 15	3	2	P4(2), P3(1)	1	V4(3)
Sm 16	1	1	P4(1)	1	V4(1)
Sm 17	1	1	P4(1)	1	V4(1)
Sm 18	1	1	P4(1)	1	V4(1)
Sm 19	5	3	P16(1), P13(2), P14(2)	2	V1(1), V2(4)
Sm 20	1	1	P4(1)	1	V4(1)
Sm 21	1	1	P16(1)	1	V4(1)
Sm 22	1	1	P16(1)	1	V5(1)
Sm 23	4	3	P4(1), P12(1), P14(1), P15(1)	3	V2(1), V4(1), V1(2)
Sm 24	1	1	P16(1)	1	V2(1)
Sm 25	2	2	P1(1), P2(1)	2	V1, V2
Sm 26	1	1	P11(1)	1	V4(1)
Sm 27	1	1	P4(1)	1	V7(1)

Figura 2 - Análise de cepas de *Arcobacter* spp. isoladas de carcaças suínas e de abatedouro através do PFGE com a enzima de restrição *EagI*

Tabela 7 - Características dos perfis obtidos a partir das cepas de *Arcobacter* spp. avaliadas através da PFGE com a enzima *EagI*

Perfil	Nº de cepas	Nº de perfis resistência	Perfis resistência (nº de cepas)	Nº de perfis De virulência	Perfis virulência (nº de cepas)
Ea 1	5	3	P7 (1), P4(3) P1 (1)	2	V4 (4), V6 (1)
Ea 2	1	1	P4	1	V4
Ea 3	4	2	P4 (3) P7 (1)	4	V4, V3, V8, V7
Ea 4	13	6	P10 (1), P6 (1), P7 (6), P4 (3), P5 (1), P14 (1)	3	V4 (11) V3 (1), V1 (1)
Ea 5	1	1	P4	1	V4
Ea 6	5	4	P3 (1), P1 (1), P6 (1), P4 (2)	1	V4
Ea 7	1	1	P7	1	V4
Ea 8	6	2	P4(3) P7 (3)	1	V4
Ea 9	1	1	P16	1	V4
Ea 10	2	1	P4	1	V4
Ea 11	1	1	P4	1	V4
Ea 12	1	1	P9	1	V4
Ea 13	1	1	P4	1	V3
Ea 14	3	3	P1, P4, P7	1	V4
Ea 15	7	3	P8 (1), P4 (2), P7 (4)	2	V2 (4), V4 (3)
Ea 16	2	2	P4, P3	1	V4
Ea 17	1	1	P4	1	V2
Ea 18	1	1	P16	1	V5
Ea 19	2	2	P1, P2	2	V1, V2
Ea 20	1	1	P16	1	V2
Ea 21	1	1	P14	1	V1
Ea 22	1	1	P16	1	V1
Ea 23	1	1	P11	1	V4

Figura 3 - Análise de cepas de *Arcobacter* spp. isoladas de carcaças suínas e de abatedouro através do PFGE com a enzima de restrição *SacI*

Tabela 8 - Características dos perfis obtidos a partir das cepas de *Arcobacter* spp. avaliadas através da PFGE com a enzima *SacI*

Perfil	Nº de cepas	Nº de perfis resistência	Perfis resistência (nº de cepas)	Nº de perfis De virulência	Perfis virulência (nº de cepas)
Sa 1	10	4	P4(3), P7(5), P10(1), P6(1),	2	V4(8), V2(2)
Sa 2	2	2	P4(1), P7(1)	2	V4(1), V8(1)
Sa 3	3	2	P4(1), P7(2)	2	V4(2), V1(1)
Sa 4	3	2	P4(2), P3(1)	1	V4(3)
Sa 5	1	1	P4(1)	1	V4(1)
Sa 6	10	3	P5(1), P4(7), P7(2)	2	V3, V4(9)
Sa 7	15	5	P7(6), P4(6), P1(1), P3(1), P6(1),	3	V2(1), V4(13), V3(1)
Sa 8	5	5	P8(1), P14(1), P4(1), P71(1)	4	V2(1), V4(2), V7(1), V6(1)
Sa 9	1	1	P9(1)	1	V4(1)
Sa 10	1	1	P4(1)	1	V2(1)
Sa 11	1	1	P1(1)	1	V4(1)
Sa 12	1	1	P4(1)	1	V3(1)
Sa 13	6	3	P14(3), P11(1), P13(2)	2	V2(5), V4(1)
Sa 14	1	1	P16(1)	1	V1(1)
Sa 15	3	2	P16(2), P12(1)	3	V5(1), V4(1), V2(1)
Sa 16	1	1	P14(1)	1	V1(1)
Sa 17	1	1	P1(1)	1	V1(1)
Sa 18	2	2	P16(1), P2(1)	2	V4(1), V2(1)
Sa 19	1	1	P15(1)	1	V1(1)

5.5 POLIMORFISMO DO COMPRIMENTO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS (AFLP)

Todas as 70 cepas foram tipáveis, resultando em 29 perfis distintos e com índice discriminatório observado nas cepas foi de 0,92. A análise dos dados obtidos no AFLP resultou no dendograma apresentado na figura 4, e nos dados descritos na tabela 9.

Os perfis foram divididos em três grupos, o grupo I foi subdividido em três subgrupos, a saber: IA, IB e IC. O subgrupo IA agrupou sete perfis com 12 cepas que apresentaram padrões diversos de resistência aos antimicrobianos. O padrão de virulência mais comum entre elas foi o *ciaB/ cj1349/ mviN/ cadF/ pldA/ tlyA*. Houve uma predominância de cepas isoladas a partir das carcaças 6 e 7. O subgrupo IB concentra cinco cepas de *A. cryaerophilus* que compartilharam do mesmo padrão de virulência. O subgrupo IC é o mais heterogêneo dos três em relação aos perfis de resistência e virulência, com quatro perfis e quatro cepas. O grupo II agrupou 13 perfis e 47 cepas, todas pertencentes a espécie *A. butzleri*, com perfil de resistência predominante AZI/ FFN/ NAL/ TEL/ CLI e FFN/ NAL/ TEL/ CLI e o perfil de virulência *ciaB/ cj1349/ mviN/ cadF/ pldA/ tlyA*. O grupo III foi formado por dois perfis, com duas cepas. Uma delas com perfil de resistência para FFN/ CLI, e a outra NAL/ CLI. Em relação ao perfil de virulência, apresentaram em comum os genes *ciaB*, *cj1349*, *mviN* e *tlyA*.

Figura 4 - Análise de cepas de *Arcobacter* spp. isoladas de carcaças suínas e de abatedouro através do AFLP com a enzima de restrição *Hind*III.

Tabela 9 - Características dos perfis obtidos a partir das cepas de *Arcobacter* spp. avaliadas através do AFLP

Perfil	Nº de cepas	Nº de perfis resistência	Perfis resistência (nº de cepas)	Nº de perfis de virulência	Perfis virulência (nº de cepas)
Af1	2	2	P11(1), P16(1)	1	V4(2)
Af 2	1	1	P1(1)	1	V1(1)
Af 3	3	3	P10(1), P6(1), P4(1)	1	V4(3)
Af 4	3	2	P4(1), P7(2)	1	V4(3)
Af 5	1	1	P7(1)	1	V4(1)
Af 6	1	1	P15(1)	1	V1(1)
Af 7	1	1	P16(1)	1	V2(1)
Af 8	2	2	P13, P14	1	V2(2)
Af 9	2	2	P14, P13	1	V2(1)
Af 10	1	1	P14(1)	1	V2(1)
Af 11	1	1	P16(1)	1	V5(1)
Af 12	1	1	P16(1)	1	V1(1)
Af 13	1	1	P4(1)	1	V4(1)
Af 14	1	1	P14(1)	1	V1(1)
Af 15	2	2	P3(1), P7(1)	2	V4(1), V2(1)
Af 16	3	1	P4(3)	3	V2(1), V7(1), V3(1)
Af 17	1	1	P7(1)	1	V4(1)
Af 18	1	1	P9(1)	1	V4(1)
Af 19	1	1	P5(1)	1	V4(1)
Af 20	1	1	P14(1)	1	V4(1)
Af 21	3	1	P4(3)	1	V4(3)
Af 22	4	3	P8(1), P7(1), P4(2)	3	V2(1), V3(1), V4(2)
Af 23	1	1	P4(1)	1	V2(1)
Af 24	2	2	P4(1), P7(1)	2	V4(1), V8(1)
Af 25	15	3	P4(8), P7(6), P1(1)	2	V4(14), V3(1)
Af 26	1	1	P4(1)	1	V4(1)
Af 27	12	5	P7(3), P3(1), P1(2), P6(1), P4(5)	3	V4(10), V6(1), V1(1)
Af 28	1	1	P12(1)	1	V4(1)
Af 29	1	1	P2(1)	1	V2(1)

6 DISCUSSÃO

A cada ano, novos estudos acerca do gênero *Arcobacter* têm sido realizados por grupos de pesquisa em todo mundo. Algumas espécies desse gênero despertam maior interesse por serem consideradas enteropatógenos emergentes e potenciais agentes zoonóticos. Das espécies descritas, *A. cryaerophilus* foi a primeira a ser isolada em fezes humanas e a mais importante em termos de saúde pública é *A. butzleri*.

Os mecanismos de virulência e patogenicidade ainda são pouco conhecidos, apesar dos diversos estudos sobre a capacidade invasiva e a citotoxicidade do agente (COLLADO; FIGUERAS, 2011). O potencial de patogenicidade das cepas de *Arcobacter* foi avaliado no presente estudo através da detecção dos possíveis genes de virulência. Os nove genes avaliados foram descritos após o sequenciamento do genoma completo da cepa de *A. butzleri* RM 4018 por Miller et al. (2007) e os *primers* desenvolvidos por Doudah et al. (2012).

Esses genes são homólogos aos encontrados em *C. jejuni* e codificam diversas proteínas, entre elas proteínas que se ligam a fibronectina (*cadF* e *cj1349*), invasina (*ciaB*), fator de virulência (*mvn*); fosfolipase (*pldA*); hemolisina (*tlyA*); proteína de membrana regulada pelo ferro e associada a captura deste elemento pela célula bacteriana (*irgA*); hemaglutinina filamentosa (*hecA*), e proteína ativadora da hemolisina (*hecB*) (MILLER et al., 2007).

A ocorrência dos genes para as 70 cepas foi: *tlyA* presente em 100% (70/70), seguido pelos genes *ciaB*, *mvn* e *cj1349* em 98,5% (69/70), *cadF* e *pldA* em 71,4% (50/70). Os genes *hecA*, *hecB* e *irgA* não foram encontrados em nenhuma das cepas isoladas. Todas as cepas de *A. butzleri* apresentaram os genes *tlyA* e *ciaB*, e em menor frequência os genes *cj1349*, *cadF*, *pldA* e *mvn*. Estes resultados diferem dos relatados por Doudah et al. (2012) e Karadas et al. (2013) que encontraram esses seis genes em todas as cepas de *A. butzleri* avaliadas e isoladas de diversas origens.

Os genes *hecA*, *hecB* e *irgA* não foram detectados em nenhuma das 70 cepas. Nos estudos conduzidos por Doudah et al. (2012) e Karadas et al. (2013), as frequências de detecção variaram de 12 a 17% para *irgA*, 42% para *hecB* e 0 a 18% para *hecA*.

Doudah et al. (2012) descreveram a presença dos genes de virulência em cepas de *Arcobacter* spp. de diversas origens, e relataram que alguns genes, como o *hecA* foram muito mais frequentes em cepas de bovinos do que em cepas provenientes de humanos e suínos. O gene *hecB* também foi mais frequente em bovinos do que em suínos e aves. O gene *irgA* foi o menos frequente em suínos quando comparados às cepas humanas e bovinas.

Karadas et al. (2013) também não detectaram o gene *hecA* nas 12 cepas de *A. butzleri* provenientes de suínos, enquanto as taxas de detecção para cepas de humanos, aves e água variaram de 9 a 44%. A origem das cepas no presente estudo (carcaças de suínos) pode ser a causa da ausência de detecção dos genes *hecA*, *hecB* e *irgA* na amostragem testada e neste sentido os resultados estão em acordo com a literatura consultada.

O aumento na taxa de isolamento de *Arcobacter* spp. a partir de várias fontes em todo o mundo, assim como a resistência a certos antimicrobianos relatada por diversos grupos de pesquisa, também são aspectos importantes do ponto de vista de saúde pública. Dessa forma, a pesquisa sobre o potencial de resistência a antimicrobianos utilizados na terapêutica humana e veterinária é essencial para a obtenção de melhores resultados quando da utilização de antibióticos para tratamento de doenças causadas por esse micro-organismo. As infecções causadas por esse agente são geralmente auto limitantes, mas em casos de condições severas e crônicas, é necessário o tratamento medicamentoso adequado.

No caso de infecções por *A. butzleri*, as drogas mais comumente prescritas são a eritromicina ou as fluorquinolonas, como a ciprofloxacina. A tetraciclina e a gentamicina são listadas como drogas alternativas para o tratamento. No presente estudo foi utilizada a microdiluição em placas para determinar a concentração inibitória mínima (CIM).

Os critérios do *National Monitoring System for Enteric Bacteria (NARMS)* desenvolvidos para *Campylobacter* foram adotados para categorizar os isolados de *Arcobacter* spp como suscetíveis ou resistentes porque não há dados disponíveis para a interpretação de teste de suscetibilidade em microdiluição em caldo especificamente para esse gênero. Optou-se por utilizar as placas de antimicrobianos para diminuir a probabilidade de erros na diluição dos fármacos, bem como pela sua praticidade e agilidade na leitura dos resultados. Além disso, a escolha por um método quantitativo possibilita estimar, *in vitro*, a concentração da dose efetiva contra o micro-organismo *in vivo*.

Em geral, o espectro de variação das CIMs entre as espécies *A. butzleri* e *A. cryaerophilus* não revelou diferenças significativas, com valores que não foram maiores do que duas diluições. Já as CIMs para *A. skirrowii* foram, em sua maioria, divergentes das obtidas para as outras duas espécies. Tal consideração pode ser passível de erro, devido ao número muito pequeno de cepas de *A. skirrowii* em relação ao total de cepas estudadas.

Na literatura atual não foi possível encontrar sobre o perfil de resistência de *A. skirrowii*. Mesmo considerando apenas as duas cepas de *A. skirrowii*, pode-se observar que, no caso de infecções por essa espécie, os antimicrobianos indicados para o tratamento poderiam ser a eritromicina, gentamicina e tetraciclina.

Embora a comparação de resultados entre as diferentes publicações sobre a suscetibilidade de *Arcobacter* seja difícil pela falta de protocolos padronizados, os valores de CIM obtidos em estudos anteriores utilizando microdiluição em caldo ou em agar são, com algumas exceções, comparáveis ao desse estudo. As variações das CIMs para **ciprofloxacina** nas espécies *A. butzleri* (0,06- 32 µg/ml) e *A. cryaerophilus* (0,06 - 16 µg/ml) diferiram por não mais de duas diluições das obtidas em trabalhos anteriores, como os de Shah et al. (2012) que avaliaram cepas de diversas origens; Vandenberg et al. (2006), cujas cepas foram isoladas de fezes humanas diarreicas e Fera et al. (2003), utilizando cepas de ambiente. Son et al. (2007) obtiveram a variação das CIMs com valores inferiores (0,015-0,25 µg/ml) para *A. butzleri* e para *A. cryaerophilus* (0,12-0,25 µg/ml) trabalhando com cepas provenientes de carcaças de frango.

Ainda em relação à fluorquilonona, Vandenberg et al. (2006) e Son et al. (2007) utilizaram o mesmo ponto de corte que o presente estudo para ciprofloxacina.

O primeiro grupo trabalhou registrou 3,3% de *A. butzleri* e nenhuma cepa de *A. cryaerophilus* resistente ao antimicrobiano. Já no segundo grupo, todas as cepas de *A. butzleri* foram sensíveis à ciprofloxacina, e apenas uma das nove cepas de *A. cryaerophilus* foram resistentes. Os resultados desses autores são similares ao do presente estudo em relação às cepas de *A. butzleri* cuja taxa de resistência foi de 4, 9%.

Um aumento na resistência à ciprofloxacina pode ter importância em saúde pública porque é a droga de escolha no tratamento de infecções por *Campylobacter*. (SHAH et al., 2013). Houf et al. (2004) isolaram cepas *A. butzleri* a partir de carcaças de frangos com taxas de suscetibilidade menor à ciprofloxacina quando comparadas as cepas de origem humana, e relacionou esse fato com o uso de fluorquinolonas na produção aviária na Bélgica. Ferreira et al. (2013) também associaram uma alta taxa de resistência à ciprofloxacina ao uso intensivo desse antibiótico na produção de aves em Portugal. No entanto, os pontos de corte utilizados por esses autores diferem dos utilizados no presente estudo, tornando a comparação entre as taxas de resistência obtidas dificultosa.

A ciprofloxacina é utilizada na suinocultura para tratamentos curativos e preventivos para muitos agentes microbianos que acometem a produção. No entanto, esse é o primeiro trabalho feito no Brasil sobre a resistência a esse antimicrobiano em *Arcobacter*, e pelos resultados, podemos concluir que a ciprofloxacina mostrou boa atividade contra os isolados de *A. butzleri* e pode ser utilizada como antimicrobiano no tratamento das infecções pelo agente.

Considerando a **eritromicina**, os CIMs variaram de 0,5->64 µg/ml para *A. butzleri* e 0,06-1 µg/ml para *A. cryaerophilus*. Os resultados foram similares ao de Shah et al. (2012) que também registraram variações da CIMs para *A. butzleri* de 0,25 – 128 µg/ml. Outros autores, como Kiehjbauch et al. (1992), Houf et al. (2004), Vandenberg et al. (2006) e Kayman et al. (2012) apresentaram CIMs variando de 0,5 - 16 µg/ml.

Todos os estudos citados anteriormente, com exceção de Shah (2012) foram conduzidos em atmosfera microaeróbica. Segundo Houf et al. (2004), o aumento no nível de dióxido de carbono diminui a atividade de antimicrobianos como os macrolídeos. Tal afirmação deve ser levada em conta ao se interpretar os valores menores de CIMs encontrados na literatura em relação ao do presente estudo, conduzido em atmosfera de aerobiose.

A taxa de resistência à eritromicina para *A. butzleri* foi de 6,5%, semelhante ao de Son et al. (2007) que descreveram uma frequência de 4,3% de cepas resistentes. Todas as cepas de *A. cryaerophilus* foram sensíveis em ambos os estudos.

Todas as 70 cepas foram sensíveis a **gentamicina** e a **tetraciclina**. Os CIMs variaram de $<0,12 - 1 \mu\text{g/ml}$ para a gentamicina e $0,5 - 8 \mu\text{g/ml}$ para a tetraciclina. Para a gentamicina, a diferença no espectro de variação das CIMs entre as espécies de *A. cryaerophilus* e *A. butzleri* foi de apenas uma diluição, já para a tetraciclina, as CIMs para *A. butzleri* foram de $0,5-8 \mu\text{g/ml}$ e para *A. cryaerophilus* de $0,5-1 \mu\text{g/ml}$.

Os valores encontrados para esses dois antimicrobianos são similares aos de Kiehjbauch et al. (1992), tanto para a gentamicina nas duas espécies, como para a diferença de espectro entre as duas espécies com a tetraciclina. Quando analisamos os resultados de outros autores, os valores de CIMs são ligeiramente diferentes para a tetraciclina. Vandenberg et al. (2006) registraram variação da CIM de $0,03-4 \mu\text{g/ml}$; Shah e Saleha (2012) observaram variação de $0,12-16 \mu\text{g/ml}$ e Kayman et al. (2012) de $1-8 \mu\text{g/ml}$.

Nos trabalhos de Vandenberg et al. (2006) e Son et al. (2007) todos os isolados das duas espécies também foram suscetíveis a gentamicina e tetraciclina. Dessa forma, gentamicina e tetraciclina podem ser as primeiras alternativas de escolha para o tratamento de doenças causadas por *Arcobacter*.

Os quatro antimicrobianos discutidos até agora são os mais apontados para o tratamento das infecções por *Arcobacter*. Discutiremos a seguir os outros antimicrobianos utilizados na terapêutica contra *Campylobacter*.

A **clindamicina** foi o antimicrobiano menos eficaz contra os isolados de *Arcobacter*, apresentando 84,3% de taxa de resistência total e 90% de resistência para *A. butzleri*, bem como para *A. skirrowii*. *A. cryaerophilus* foi a espécie que mais respondeu a ele, com uma taxa de resistência de 28,5%.

Alguns autores que utilizaram outras metodologias e/ou outros pontos de corte também encontraram altas taxas de resistência para clindamicina em isolados de origem animal e humana. (HARRAB; SCHWARTZ; WENZEL, 1998; FERA et al., 2003; SON et al., 2007).

As variações de CIMs foram de $0,5 - >16 \mu\text{g/ml}$ tanto para o gênero como para *A. butzleri*, e $1-8 \mu\text{g/ml}$ para *A. cryaerophilus*. Fera et al. (2003) registraram variações de CIMs de $1 - >128 \mu\text{g/ml}$ para as duas espécies e Kiehjbauch et al. (1992)

descreve a variação de 2->8 µg/ml para *A. butzleri* e de 0,5-8 µg/ml para *A. cryaerophilus*.

O **florfenicol** e a **telitromicina**, apresentaram taxas de resistência de 78,5% e 68,6% respectivamente. Para *A. butzleri*, as taxas foram de 86,8% para florfenicol e 77% para telitromicina. Todos os isolados de *A. cryaerophilus* foram suscetíveis aos dois antimicrobianos. Entre os dois agentes, a telitromicina foi mais efetiva, com uma CIM50 de 4 µg/ml e CIM90 de >8 µg/ml, enquanto o florfenicol apresentou CIM 50 de 32 µg/ml e CIM90 de 64 µg/ml.

Por último, temos a **azitromicina** e o **ácido nalidíxico** que foram medianamente efetivos, com taxas de resistência totais de 47,1% e 54,2%, respectivamente. As CIM variaram de 0,12->64 µg/ml para *A. butzleri* e 0,12-0,5 µg/ml para *A. cryaerophilus*.

O ácido nalidíxico foi o antimicrobiano que apresentou as maiores taxas de resistência para as três espécies (85% a 100%) e as CIM50 e CIM90 maiores, nos valores de 64 µg/ml a >64 µg/ml, ou seja, a droga com menos eficácia. As variações de CIMs relatadas por outros autores foram próximas as observadas no presente estudo: para *A. butzleri* de 1-64 µg/ml (HOUF et al., 2004); 2-128 µg/ml (VANDENBERG et al., 2006) e 4-64 µg/ml (KAYMAN et al., 2012) e um pouco inferiores para *A. cryaerophilus* de 4-32 µg/ml (HOUF et al., 2004) e 2-32 µg/ml (VANDENBERG et al., 2006).

De uma forma geral, a espécie *A. cryaerophilus* foi mais sensível aos antimicrobianos testados do que *A. butzleri*. No entanto, devido ao baixo número de cepas testadas de *A. cryaerophilus* e também de *A. skirrowii* não se pode afirmar que os resultados aqui determinados se estenderiam para uma amostragem maior. Mais estudos com essas duas espécies devem ser realizados.

A emergência de resistência múltipla aos agentes antimicrobianos em bactérias patogênicas se tornou uma séria ameaça para a saúde pública, principalmente nos casos nos quais não existem outros agentes antimicrobianos disponíveis e limita a escolha dos antibióticos e doses para o tratamento (MAGIORAKOS et al., 2012).

No presente estudo, 77,1% das cepas foram multirresistentes. A resistência a cinco antimicrobianos de diferentes categorias foi a mais comum com mais da metade das cepas multirresistentes apresentando um perfil de resistência a azitromicina/ florfenicol/ ácido nalidíxico/ telitromicina/ clindamicina.

Esta taxa de resistência foi superior aos de Shah et al. (2012) que encontraram 41,3% (19/46) de cepas de *A. butzleri* e de Son et al. (2007) que descrevem 24,1% (28/116) das cepas de *A. butzleri*, com um único perfil de multirresistência a azitromicina/ clindamicina/ ácido nalidíxico.

No presente estudo, assim como o de Son (2007), não houve cepas de *A. cryaerophilus* multirresistentes. Por outro lado, as duas cepas de *A. skirrowii* foram multirresistentes. Apesar da comparação entre os três trabalhos ser parcial, podemos concluir que, de fato, a multirresistência aos antimicrobianos em *A. butzleri* está presente.

Além da caracterização fenotípica das diferentes espécies, várias técnicas moleculares têm sido utilizadas na subtipagem de cepas de *Arcobacter* spp. A escolha do método a ser utilizado na caracterização de agentes bacterianos depende de vários fatores relacionados à espécie estudada e à proximidade genética das amostras utilizadas, assim como fatores relacionados a características intrínsecas ao método, tais como: poder discriminatório e reprodutibilidade. É necessário levar em consideração ainda os custos do teste, a estrutura do laboratório em que a análise será realizada, assim como a capacitação das pessoas que executarão a prova (OLIVE; BEAN, 1999).

Para a diferenciação de cepas, optou-se pela metodologia ainda considerada padrão ouro (*gold standard*) na epidemiologia molecular de agentes bacterianos: o PFGE (GOERING, 1993). O AFLP com uma única enzima também foi avaliado e os resultados das duas técnicas foram comparados.

A PFGE é uma técnica confiável na análise do DNA genômico bacteriano e foi utilizada para cepas de *Arcobacter* spp. por vários autores com resultados satisfatórios (HUME et al., 2001; RIVAS; FEGAN; VANDERLINE, 2004; HO et al., 2006).

Dentre as três enzimas utilizadas, a *SmaI* foi a única a clivar todas as cepas, enquanto com a *SacII* e a *EagI* não foi possível estabelecer padrões genotípicos com algumas cepas. No caso da cepa 48 (*A. butzleri*), por exemplo, as duas enzimas não foram capazes de clivar o DNA genômico, que pode ser avaliado pela enzima *SmaI* sem problemas. Outros estudos de diferenciação genotípica devem ser realizados com essa cepa.

As duas cepas de *A. skirrowii* também são passíveis de futuros estudos genéticos. Diferentemente do que ocorreu com as cepas de *A. cryaerophilus*, que

sempre foram agrupadas entre si, ou em perfis isolados, as cepas de *A. skirrowii* foram agrupadas, com a *EagI* e *SacII* em perfis distintos e sempre em conjunto com cepas de *A. butzleri*. No caso da enzima *SmaI*, elas foram agrupadas dentro do mesmo perfil genotípico, porém consideradas clonais a cepas de *A. butzleri*. Apesar de repetidas reações de Multiplex- PCR para confirmar a identificação positiva dessa espécie, o PFGE não conseguiu diferenciar as espécies *A. butzleri* de *A. skirrowii* nesse estudo.

No caso de cepas da espécie *A. cryaerophilus*, a enzima *EagI* parece não ser indicada para diferenciação, já que das sete cepas, cinco não foram clivadas (6, 7, 8, 9, 10) Com a enzima *SacII*, seis cepas de *A. cryaerophilus* foram agrupadas num mesmo perfil, e a sétima cepa em perfil bastante semelhante. Com a *SmaI*, houve o agrupamento de cinco cepas no mesmo perfil e as cepas 10 e 19 ficaram em perfis diferentes e praticamente opostos no dendograma, o que indica uma maior variabilidade genética entre essas cepas quando submetidas à digestão por essa enzima.

Apesar dos índices discriminatórios praticamente iguais entre as enzimas *SmaI* (0,92), *EagI* (0,92) e *SacII* (0,91), a enzima *SmaI* foi a única capaz de clivar o DNA genômico de todas as cepas. Analisando a PFGE como um todo, os perfis genotípicos apresentaram alta variabilidade genética com as três enzimas utilizadas. De uma forma geral, foi possível diferenciar cepas isoladas de uma mesma carcaça em perfis distintos e houve o agrupamento de cepas provenientes de carcaças distintas e de lotes diferentes em grupos clonais.

Alguns resultados foram iguais com as três enzimas. A cepa 85, a única isolada de amostras do ambiente do abatedouro, não foi agrupada com outras cepas em nenhum dos géis, ou seja, seus perfis genotípicos foram sempre únicos dentro do conjunto de cepas. Da carcaça 16, por exemplo, a cepa 43 foi isolada em um único perfil, já a cepa 46 sempre foi agrupada no mesmo perfil da cepa 49, proveniente da carcaça 19. No caso das cepas 43 e 46, verifica-se que realmente não podem ser consideradas clonais mesmo provenientes de uma mesma carcaça, pois através da clivagem pelas três enzimas, elas foram alocadas em perfis genotípicos distintos.

As cepas 46 e 49 possuem relação clonal e muito provavelmente podem indicar uma possível contaminação de carcaças ao abate, ou ainda, durante o

manejo ou transporte dos animais, já que são provenientes de animais diferentes e oriundos do mesmo lote.

Os resultados do presente estudo em relação a grande heterogeneidade genética desse gênero vão de encontro com os dados relatados por outros autores. Em estudo conduzido nos Estados Unidos utilizando a PFGE, Hume et al. (2001), analisando granjas com movimentação de animais entre si, não foram encontradas cepas de *A. butzleri* provenientes de fezes de marrãs com perfis idênticos, bem como não foram obtidos perfis semelhantes em isolados de *A. cryaerophilus* isolados de fezes de suínos de uma mesma granja. Os autores também observaram perfis diferentes em isolados obtidos de um mesmo animal.

Ho et al. (2006), utilizando a PFGE também citam a heterogeneidade de perfis de *A. cryaerophilus* de isolados de leitões neonatos da mesma ninhada em relação aos isolados da mãe, e entre os isolados de *A. butzleri* obtidos das mães e dos leitões da mesma granja. Esta grande diversidade sugere que existem múltiplos genótipos parentais para isolados de *A. butzleri* e *A. cryaerophilus*.

As bactérias do gênero *Campylobacter* possuem habilidade para transformar DNA genômico endógeno a partir da incorporação de DNA exógeno e rearranjo genômico (ON et al, 2004). Wassenaar et al. (1998) afirmam que bactérias com genomas pequenos como *Campylobacter* e *Helicobacter* utilizam o rearranjo genômico como meio de aumentar a sobrevivência ao ambiente. Dessa forma, é provável que ocorra o mesmo para as bactérias do gênero *Arcobacter*, ou seja, que haja alto nível de recombinação genômica entre a progênie de um número limitado de genótipos parentais.

No presente trabalho, o AFLP foi realizado com uma única enzima de restrição (*HindIII*) e os isolados apresentaram uma grande variabilidade de perfis genotípicos, assim como ocorreu no PFGE, com índice discriminatório idêntico (0,92). Resultados similares foram descritos por Gonzalez et al. (2007) que também utilizaram esse formato de AFLP e por dois outros estudos liderados por On conduzidos com a AFLP utilizando duas enzimas de restrição (ON; HARRINGTON; ATABAY, 2003; ON et al., 2004).

O AFLP também conseguiu discriminar cepas provenientes de uma mesma carcaça em perfis distintos, bem como agrupar cepas de diferentes carcaças e lotes em um mesmo perfil. Tais resultados sugerem evidências epidemiológicas de uma possível contaminação das carcaças durante o momento do abate.

As duas técnicas moleculares apresentaram similaridades de resultados. Retomando o exemplo da cepa 85 (chão do abatedouro), a mesma também foi isolada em um único perfil. As cepas de *A. skirrowii* foram agrupadas dentro de um mesmo perfil compartilhado por outras cepas de *A. butzleri*. No entanto, apesar do maior número de perfis no AFLP, o agrupamento das cepas da espécie *A. cryaerophilus* foi relativamente diferente em relação aos de PFGE. Uma única cepa dessa espécie foi agrupada junto a uma cepa de *A. butzleri*, fato que não ocorreu no PFGE.

Diferentemente do PFGE, as cepas 43 e 46 (carcaça16) antes discriminadas em diferentes perfis, foram reunidas em um só perfil. E a cepa 49 (carcaça 19) que havia sido agrupada com a cepa 46, no AFLP foram alocadas em perfis distintos. Essas diferenças de discriminação entre as duas técnicas moleculares e mesmo dentro da mesma técnica (PFGE) são resultantes da utilização de quatro diferentes enzimas de restrição que agem, necessariamente, em sítios de clivagem distintos.

Diante do exposto, tanto o PFGE como o AFLP são métodos válidos para diferenciar cepas de *Arcobacter* spp, podendo ser utilizados como ferramenta epidemiológica no caso de surtos pelo agente. O AFLP, quando realizado com uma única enzima, é um exame relativamente rápido, barato e fácil de ser executado. Menos laborioso que o PFGE e pode ser realizado com um grande número de amostras. Em casos que haja a necessidade de resultados mais rápidos, ele é uma ferramenta interessante. O PFGE é uma técnica mais trabalhosa, cara e demorada, que exige o parêlho específico para este fim, podendo ser indicada para estudos mais detalhados do agente, quando se dispõem de mais tempo.

Por último, ao relacionar os perfis genotípicos obtidos com as duas técnicas moleculares e os perfis de resistência e de virulência, não foi possível estabelecer uma correlação exata entre eles. De uma forma geral, pode-se afirmar que houve uma maior concentração de determinados perfis de resistência e de virulência com determinados perfis genotípicos. Devemos considerar ainda que o número de perfis de resistência (15) e o número de perfis de virulência (8) foram inferiores que os obtidos no AFLP e PFGE, indicando que os poder discriminatório destas últimas técnicas é superior.

No caso dos perfis de resistência, 26 cepas apresentaram o perfil 4 e 17 cepas apresentaram o perfil 7. Em relação ao perfil de virulência, 46 cepas foram

agrupadas no perfil 4. Assim, é impossível que perfis genotípicos únicos sejam correlacionados a apenas um perfil distinto de resistência e/ou de virulência.

Ao analisar os grupos de perfis genotípicos, podemos perceber que houve uma concentração dos perfis de resistência 4 e 7 e o perfil de virulência 4 em determinados perfis genotípicos agrupados para as cepas de *A. butzleri*. Esse bloco de perfis foi sempre o maior com todas as enzimas de restrição testadas, inclusive no AFLP com a *HindIII*.

Em seguida, outro conjunto formado por cepas de *A. cryaerophilus* que compartilharam dois perfis de resistência 13 e 14 e o perfil 2 de virulência.

É possível observar ainda outro agrupamento formado por cepas com perfis de resistência e virulência mais diversificados, que concentrou os perfis 16, 12, 14, 15, 1, 11 de resistência e os perfis de virulência 1,2,5.

Os resultados encontrados no presente estudo confirmam o alto grau de heterogeneidade genética observada entre cepas do gênero *Arcobacter* juntamente com a detecção de multirresistência a antimicrobianos.

Esse foi o primeiro estudo com cepas de *Arcobacter* spp. associando duas técnicas moleculares de genotipificação, determinação de genes de virulência e descrição de perfil de sensibilidade a antimicrobianos realizados no Brasil. Portanto ainda são necessárias mais pesquisas sobre o potencial de virulência das três espécies aqui estudadas e a correlação entre a presença dos possíveis genes virulência com a capacidade de adesão e invasão em linhagens celulares ou outros modelos experimentais.

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos nesse estudo, podemos concluir que:

- ✓ Os genes de virulência *tlyA*, *mvn*, *ciaB* e *cj1349* são frequentes em cepas de *Arcobacter* spp. isoladas em suínos no Brasil;
- ✓ Os antimicrobianos ciprofloxacina, gentamicina e tetraciclina são os mais indicados para possíveis infecções em humanos ou animais por *Arcobacter* spp. em nosso meio.
- ✓ A multirresistência a antimicrobianos está presente e é frequente nestes isolados de carcaças suínas.
- ✓ As cepas avaliadas apresentaram alta diversidade genética através do PFGE e AFLP.
- ✓ A enzima de restrição *Sma*I é a mais indicada para a utilização no PFGE para análise de cepas de *Arcobacter* spp.
- ✓ O AFLP com uma única enzima pode ser indicado para avaliação das espécies do gênero *Arcobacter* por apresentar o mesmo poder discriminatório que a PFGE.

REFERÊNCIAS

- ASHBOLT, N. J. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. **Toxicology**, v. 198, p. 229-238, 2004.
- ATABAY, H. I.; AYDIN, F. Suscetibility of *Arcobacter butzleri* isolates to 23 antimicrobial agents. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, p. 430-433, 2001.
- ATABAY, H. I.; BANG, D. D.; AYDIN, F.; ERDOGAN, H. M.; MADSEN, M. Discrimination of *Arcobacter butzleri* isolates by polimerase chain reaction-mediated DNA fingerprinting. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, p. 141-145, 2002.
- ATABAY, H. I.; CORRY, J. E. L.; ON, S. L. W. Diversity and prevalence of *Arcobacter* spp. in broiler chickens. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p. 1007-1016, 1998.
- ATABAY, H. I.; WAINO, M.; MADSEN, M. Detection and diversity of various *Arcobacter* species in Danish poultry. **International Journal of Food Microbiology**, v. 109, p. 139-145, 2006.
- ATANASSOVA, V.; KESSEN, V.; REICH, F.; KLEIN, G. Incidence of *Arcobacter* spp. in poultry: quantitative and qualitative analysis and PCR differentiation. **Journal of Food Protection**. v. 71, n. 12, p. 2533- 2536, 2008.
- BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 28, p. 459-453. 1990.
- BRIGHTWELL, G.; MOWAT, E.; CLEMENS, R.; BOEREMA, J.; PULFORD, D. J.; ON, S. L. Development of a multiplex and real time PCR assay for the specific detection of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus*. **Journal of Microbiological Methods**. v. 68, p. 318-325, 2007.
- CENTER OF DISEASE CONTROL, **National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria** (NARMS): human isolates final report, 2007. U.S. Department of Health and Human Services, CDC, 2008 Atlanta, Georgia.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards of antimicrobial susceptibility testing: twentieth informational supplement. Document M100-S20. Wayne, PA: CLSI, 2008.

COLLADO, L.; CLEENWERCK, I.; VAN TRAPPEN, S.; DE VOS, P.; FIGUERAS, M. J. *Arcobacter mytili* sp. nov., an indoxyl acetate-hydrolysis-negative bacterium isolated from mussels. **International Journal Systematical Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 1391-1396, 2009.

COLLADO, L.; FIGUERAS, M. J. Taxonomy, epidemiology and clinical relevance of the genus *Arcobacter*. **Clinical Microbiology**, v. 24, p. 174-192, 2011.

COLLADO, L.; INZA, I.; GUARRO, J.; FIGUERAS, M. J. Presence of *Arcobacter* spp. in environmental waters correlates with high levels of fecal pollution. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 6, p. 1365-1640, 2008.

COLLADO, L.; LEVICAN, A.; PEREZ, J.; FIGUEIRAS, M. J. *Arcobacter defluvii* sp. nov. isolated from sewage samples. **International Journal Systematical Evolutionary Microbiology**, v. 61, p. 2155-2161, 2011.

COLLINS, C. I.; WESLEY, I. V.; MURANO, E. A. Detection of *Arcobacter* spp. in ground pork by modified plating methods. **Journal of Food Protection**, v. 59, p. 448-452, 1996.

DE BOER, E.; TILBURG, J. J.; WOODWAED, D. L.; LIOR, H.; JOHNSON, W. M. A selective medium for the isolation of *Arcobacter* from meats. **Letters in Applied Microbiology**, v. 23, p. 64-66, 1996.

DE SMET, S.; VANDAMME, P.; DE ZUTTER, L.; ON, S. L. W.; DOUIDAH, L.; HOUF, K. *Arcobacter tropharium* sp. nov. isolated from fattening pigs. **International Journal of Systematical Evolutionary Microbiology**, v. 61, p. 356-361, 2011.

DIERGAARDT, S. M.; VENTER, S. N.; SPREETH, J. T.; BROZEL, V. S. The occurrence of campylobacters in water sources in South Africa. **Water Research**, v. 38, p. 2589-2595, 2004.

DOUIDAH, L.; ZUTTER, L. D.; BARÈ, J.; DE VOS, P.; VANDAMME, P.; VANDENBERG, O.; VAN DEN ABEELE, A.; HOUF, K. Occurrence of putative virulence genes in *Arcobacter* species isolated from humans and animals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 735-741, 2012.

DOUIDAH, L.; ZUTTER, L. D.; VANDAMME, P.; HOUF, K. Identification of five human and mammal associated *Arcobacter* species by a novel multiplex-PCR assay. **Journal of Microbiological Methods**, v. 80, p. 281-286, 2010.

DUFFY, L.; FEGAN, N. Prevalence and concentration of *Arcobacter* spp. on Australian beef carcasses. **Journal of Food Protection**, v. 75, n. 8, p. 1479-1482, 2012.

ENGBERG, J.; ON, S.; HARRINGTON, C.; GERNER-SMIDT, P. Prevalence of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter*, and *Sutterella* spp. in Human fecal samples as estimates by a reevaluation of isolation methods for *Campylobacters*. **Journal of Clinical Microbiology**, Jan, p. 286-291, 2000.

FERA, M. T.; MAUGERI, T. L.; GIANNONE, M.; GUGLIANDOLO, C.; LA CAMERA, E.; BLANDINO, G.; CARBONE, M. In vitro susceptibility of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* to different antimicrobial agents. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 21, p. 488-491, 2003.

FERREIRA, S.; FRAQUEZA, M. J.; QUEIROZ, J. A.; DOMINGUES, F. C.; OLEASTRO, M. Genetic diversity, antibiotic resistance and biofilm-forming ability of *Arcobacter butzleri* isolated from poultry and environment from a Portuguese slaughterhouse. **International Journal of Food Microbiology**, v. 162, p. 82-88, 2013.

FERNÁNDEZ, H.; ELLER, G.; PAILLACAR, J.; GAJARDO, T.; RIQUELME. Toxigenic and invasive capacities: possible pathogenic mechanisms in *Arcobacter cryaerophilus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 90, p. 633-634, 1995.

FIGUERAS, M. J., COLLADO, L., LEVICAN, A., PEREZ, J., SOLSONA, M. J., YUSTES, C. *Arcobacter molluscorum* sp. nov. a new species isolated from shellfish. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 34, p. 105-109, 2011a.

FIGUERAS, M. J., LEVICAN, A., COLLADO, L., INZA, M. I., YUSTES, C. *Arcobacter ellisii* sp. nov. isolated from mussels. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 34, p. 414-418, 2011b.

GOBBI, D. D. S. **Isolamento e caracterização de amostras de *Arcobacter* spp. em sistemas intensivos de produção de suínos e abatedouros**. 2010 62 p. Dissertação (Mestrado) -. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

GOERING, R. V. Molecular epidemiology of nosocomial infection: analysis of chromosomal restriction fragment patterns by pulsed-field gel electrophoresis. **Infection Control Hospital Epidemiology**, v. 14, n. 10, p. 595-600, 1993.

GONZALEZ, A.; FERRUS, M. A.; GONZALEZ, R.; HERNANDEZ, J. Molecular fingerprinting of *Campylobacter* and *Arcobacter* isolated from chicken and water. **International Microbiology**, v. 10, p. 85-90, 2007.

HAMILL, S.; NEILL, S. D.; MADDEN, R. H. A comparison of media for the isolation of *Arcobacter* spp. from retail packs of beef. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 4, p. 850-854, 2008.

HARMON, K.; WESLEY, I. Multiplex PCR for the identification of *Arcobacter* and differentiation of *Arcobacter butzleri* from others arcobacters. **Veterinary Microbiology**, v. 58, p. 215-227, 1997.

HARRAB, B.; SCHWARTZ, S.; WENZEL, S. Identification and characterization of *Arcobacter* isolates from broilers by biochemical tests, antimicrobial resistance patterns and plasmid analysis. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 45, p. 87-94, 1998.

HO, T. K. H.; LIPMAN, L. J. A.; HENDRIKS, G. C. J. M. H.; TOOTEN, P. C. J.; ULTEE, T.; GAASTRA, W. Interaction of *Arcobacter* spp. with human and porcine intestinal epithelial cells. **FEMS Immunology Medicine Microbiology**, v. 50, p. 51-58, 2007.

HO, T. K. H.; LIPMAN, L. J. A.; VAN DER GRAAF-VAN BLOOIS, L.; VAN BERGEN, M.; GAASTRA, W. Potential routes of acquisition of *Arcobacter* species by piglets. **Veterinary Microbiology**, v. 114, p. 123-133, 2006.

HO, T. K. H.; LIPMAN, L. J. A.; GAASTRA, W. The introduction of *Arcobacter* spp. in poultry slaughterhouses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, p. 223-229, 2008.

HOUF, K.; DEVRIESE, L. A.; HAESEBROUCK, F.; VANDENBERG, O.; BUTZLER, J.; VAN HOOFF, J.; VANDAMME, P. Antimicrobial susceptibility patterns of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* strains isolated from humans and broilers. **Microbial Drug Resistance**, v. 10, n. 3, p. 243-247, 2004.

HOUF, K.; ON, S. L. W.; COENYE, T.; DEBRUYNE, L.; DE SMET, S.; VANDAMME, P. *Arcobacter thereius* sp. nov., isolated from pigs and ducks. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 2599-2604, 2009.

HOUF, K.; ON, S. L. W.; COENYE, T.; MAST, J.; VAN HOOFF, J.; VANDAMME, P. *Arcobacter cibarius* sp. nov. isolated from broiler carcasses. **International Journal of Systematical Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 713-717, 2005.

HOUF, K.; ZUTTER, L.; VERBEKE, B.; VAN HOOFF, J.; VANDAMME, P. Molecular characterization of *Arcobacter* isolates collected in a poultry slaughterhouse. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 3, p. 364-369, 2003.

HOUF, K.; TUTENEL, A.; DE ZUTTER, L.; VAN HOOFF, J.; VANDAMME, P. Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection and identification of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus* and *Arcobacter skirrowii*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 193, p. 89-94, 2000.

HUME, E. M.; HARVEY, R. B.; STANKER, L. H.; DROLESKEY, R. E.; POOLE, T. L.; ZHANG, H. Genotypic variation among *Arcobacter* isolates from a farrow-to-finish swine facility. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 5, p. 645-651, 2001.

HUNTER, P. R.; GASTON, M. A. Numerical index of discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, p. 2465-2466, 1988.

ICMSF. **Microorganisms in Foods 7, Microbiological Testing in Food Safety Management**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publisher, 2002, p. 171.

JOHNSON, L. G.; MURANO, E. A. Development of a new medium for the isolation of *Arcobacter* spp. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 5, p. 456-462, 1999.

KABEYA, H.; MARUYAMA, S.; MORITA, Y.; OHSUGA, T.; OZAWA, S.; KOBAYASHI, Y.; ABE, MAIKO, A.; KATSUBE, Y.; MIKAMI, T. Prevalence of *Arcobacter* species in retail meats and antimicrobial susceptibility of the isolates in Japan. **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, p. 303-308, 2004.

KARADAS, G.; SHARBATI, S.; HANEL, I.; MESSELHAUBER, U.; CLOCKER, E.; ALTER, T.; GOLZ, G. Presence of virulence genes, adhesion and invasion of *Arcobacter butzleri*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, n. 2, p. 583-590, 2013.

KAYMAN, T.; ABAY, S.; HIZLISOY, H.; ATABAY, H. I.; DIKER, K. S.; AYDIN, F. Emerging pathogen *Arcobacter* spp. in acute gastroenteritis: molecular identification, antibiotic susceptibilities and genotyping of the isolated arcobacters. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, p. 1439-1444, 2012.

KIEHJBAUCH, J. A.; BAKER, C. N.; WACHSMUTH, I. K. In vitro susceptibilities of aerotolerant *Campylobacter* isolates to 22 antimicrobial agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 4, p. 717-722, 1992.

KJELDGAARD, J.; JORGENSEN, K.; INGMER, H.; Growth and survival at chiller temperatures of *Arcobacter butzleri*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 131, p. 256-259, 2009.

LAU, S. K. P.; WOO, P. C. Y.; TENG, J. L. L., LEUNG, K. W., YUEN, K. Y. Identification by 16S ribosomal RNA gene sequencing of *Arcobacter butzleri* bacteremia in a patient with acute gangrenous appendicitis. **Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology**, v. 55, p. 182-185, 2002.

LAPPI, V., ARCHER, J. R., CEBELINSKI, E., LEANO, F., BESSER, J. M., KLOS, R. F., MEDUS, C., SMITH, K. E., FITZGERALD, R. F., DAVIS, J. P. An outbreak of foodborne illness among attendees of a wedding reception in Wisconsin likely caused by *Arcobacter butzleri*. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n. 3, p. 250-255, 2013.

LEE, M. H.; CHEON, D.; CHOI, S.; LEE, B.; JUNG, J.; CHOI, C. Prevalence of *Arcobacter* species isolated from retail meats in Korea. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 7, p. 1313-1316, 2010.

LEHNER, A.; TASARA, T.; STEPLAN, R. Relevant aspects of *Arcobacter* spp. as potential foodborne pathogen. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, p. 127-135, 2005.

LEVICAN, A.; ALKESKAS, A.; GUNTER, C.; FORSYTHE, S. J.; FIGUERAS, M. J. Adherence to and invasion of human intestinal cells by *Arcobacter* species and their virulence genotypes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 16, p. 4951-4957. 2013.

LEVICAN, A.; COLLADO, L.; AGUILAR, C.; YUSTES, C.; DIEGUEZ, A. L.; ROMALDE, J. L.; FIGUERAS, M. J. *Arcobacter bivalviorum* sp. nov. and *Arcobacter venerupis* sp. nov., new species isolated from shellfish. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 35, p. 133-138, 2012.

LEVICAN, A.; COLLADO, L.; FIGUERAS, M. J. *Arcobacter cloacae* sp. nov. and *Arcobacter suis* sp. nov. two new species isolated from food and sewage. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 36, p. 22-27, 2013.

LIPMAN, L.; HO, H.; GAASTRA, W. The presence of *Arcobacter* species in breeding hens and eggs from these hens. **Poultry Science**, v. 87, p. 2404-2407, 2008.

MAGIORAKOS, A.P., SRINIVASAN, A., CAREY, R.B., CARMELI, Y., FALAGAS, M.E., GISKE, C.G., HARBARTH, J.F., HINDLER, J.F., KAHLMETER, G., OLSSON-LILJEQUIST, B., PATERSON, D.L., RICE, L.B., STELLING, J., STRUELENS, M.J., VATOPOULOS, A., WEBER, J.T., MONNET, D.L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, *Clinical Microbiology and Infection*, v. 18, n. 3, p. 268-281, 2012.

MCLAUCHLIN, J.; RIPABELLI, G.; BRETT, M.M.; THRELFALL, E.J. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Clostridium perfringens* for epidemiological typing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, p. 21-28, 2000.

MILLER, W. G.; PARKER, C. T.; RUBENFIELD, M.; MENDZ, G. L.; WOSTEN, M. M.; USSERY, D. W.; STOLZ, J. F.; BINNEWIES, T. T.; HALLIN, P. F.; WANG, G.; MALEK, J. A.; ROGOSIN, A.; STANKER, L. H.; MANDRELL, R. E. The complete genome sequence and analysis of the epsilonproteobacterium *Arcobacter butzleri*. **PLoS One**, v. 2: e1358. doi: 10.1371/journal.pone.0001358, 2007.

NEWELL, D.G. *Campylobacters, Helicobacters* and Related organisms- Disease associations in pigs. **The Pig Journal**, v. 39, p. 102, 1997.

OHLENDORF, D. S.; MURANO, E. A. Prevalence of *Arcobacter* spp. in raw ground pork from several geographical regions according to various isolation methods. **Journal of Food Protection**, v. 65, p. 1700-1705, 2002.

OLIVE, M. D; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6, p.1661-1669, 1999.

OLIVEIRA, S. J.; BAETZ, A. L.; WESLEY, I. V.; HARMON, K. M. Classification of *Arcobacter* species isolated from aborted pig fetuses and sows with reproductive problems in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 57, p. 347-354, 1997.

OLIVEIRA, S. J.; BARCELLOS, D.; BOROWSKI, S. Diversidade antigênica entre amostras de *Arcobacter* spp. isoladas de suínos no Rio Grande do Sul e presença de anticorpos aglutinantes em amostras de soro de porcas com problemas reprodutivos. **Ciência Rural, Sta Maria**, v. 29, n. 4, p.705-710, 1999.

OLIVEIRA, S. J.; IKUTA, N.; LUNGE, V. R.; FONSECA, A.; MORAES, H. L.; KUCHENBECKER, B. S.; PASSOS, D. T. Isolamento de *Arcobacter butzleri* de músculos de suínos de terminação e de matrizes descartadas abatidos em um matadouro no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural, Sta Maria**, v. 33, n.5, p. 889-892, 2003.

OLIVEIRA, S. J.; WESLEY, I. V.; BAETZ, A. L.; HARMON, K. M.; KADER, I. T. A.; UZEDA, M. *Arcobacter cryaerophilus* and *Arcobacter butzleri* isolated from preputial fluid of boars and fattening pigs in Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, p. 462-464, 1999.

ON, S. L. W., ATABAY, H. I., AMISU, K. O., COKER, A. O., HARRINGTON, C. S. Genotyping and genetic diversity of *Arcobacter butzleri* by amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis. **Letters in Applied Microbiology**, v. 39, p. 347-352, 2004.

ON, S. L. W.; HARRINGTON, C. S.; ATABAY, H. I. Differentiation of *Arcobacter* species by numerical analysis of AFLP profiles and description of a novel *Arcobacter* from pig abortions and turkey faeces. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 1096-1105, 2003.

PATYAL, A.; RATHORE, R. S.; MOHAN, H. V.; DHAMA, K.; KUMAR, A., Prevalence of *Arcobacter* spp. in humans, animals, and food of animal origin including sea food from India. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 58, p. 402-410, 2010.

PEJCHALOVÁ, M.; DOSTALÍKOVÁ, E.; SLÁMOVÁ, M.; BROZKOVÁ, I.; VYTRASOVÁ, J. Prevalence and diversity of *Arcobacter* spp. in the Czech Republic. **Journal of Food Protection**, v. 71, n.4, p. 719-727, 2008.

PENTIMALLI, D.; PEGELS, N.; GARCIA, T.; MARTÍN, R.; GONZÁLEZ, I. Specific PCR detection of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, *Arcobacter skirrowii*, and *Arcobacter cibarius* in chicken meat. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 7, p. 1491-1495, 2009.

PHILLIPS, C. A. The effect of citric acid, lactic acid, sodium citrate and sodium lactate, alone and in combination with nisin, on the growth of *Arcobacter butzleri*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, p. 424-428, 1999.

PHILLIPS, C. A. *Arcobacter* spp in food: isolation, identification and control. **Trends in Food Science and Technology**, v. 12, p. 263-275, 2001.

RIVAS, L.; FEGAN, N.; VANDERLINDE, P. Isolation and characterization of *Arcobacter butzleri* from meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, p. 31-41, 2004.

ROMERO, J.; GARCIA-VARELA, M.; LACLETTE, J. P.; ESPEJO, R. T. Bacterial 16S rRNA gene analysis revealed that bacteria related to *Arcobacter* spp. constitute an abundant and common component of the oystermicrobiota (*Tiostrea chilensis*). **Microbial Ecology**, v. 44, p. 365-371, 2002.

SAMIE, A.; OBI, C. L.; BARRET, L. J.; POWELL, S. M; GUERRANT, R. L. Prevalence of *Campylobacter* species; *Helicobacter pylori* and *Arcobacter* species in stool samples from Venda region, Limpopo, South Africa: Studies using molecular diagnostic methods. **Journal of infection**, v. 54, p. 558-566, 2007.

SHAH, A. H., SALEHA, A. A. Antimicrobial susceptibility of an emergent zoonotic pathogen, *Arcobacter butzleri*. **Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, p. 569-570, 2012.

SHAH, A. H., SALEHA, A. A., ZUNITA, Z., MURUGAIYAH, M., ALIYU, A. B., JAFRI, N. Prevalence, distribution and antibiotic resistance of emergent *Arcobacter* spp. from clinically healthy cattle and goats. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 60, p. 9-16, 2013.

SON, I.; ENGLER, M. D.; BERRANG, M. A.; FEDORKA-CREY, P. J.; HARRISON, M. A. Antimicrobial resistance of *Arcobacter* and *Campylobacter* from broiler carcasses. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 29, p. 451-455, 2007.

SNELLING, W. J.; MATSUDA, M.; MOORE, J. E.; DOOLEY, J. S. G. Under the microscope: *Arcobacter* **Letters in Applied Microbiology**, v. 42, p. 7-14, 2006.

SUAREZ, D. I.; WESLEY, I.; LARSON, D. J. Detection of *Arcobacter* species in gastric samples from swine. **Veterinary Microbiology**, v. 57, p. 325-336, 1997.

VANDENBERG, O.; DEDISTE, A.; HOUF, K.; IBEKWEN, S.; SOUAYAH, S.; CADRANEL, S.; DOUAT, N.; ZISSIS, G.; BUTZLER, J. P.; VANDAMME, P. *Arcobacter* species in humans. **Emerging Infectious Disease**, v. 10, p. 1863-1867, 2004.

VANDENBERG, O.; HOUF, K.; DOUAT, N.; VLAES, L.; RETORE, P.; BUTZLER, J.; DEDISTE, A. Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of non-*jejuni/coli* campylobacters and arcobacters from Belgium. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, p. 908-913, 2006.

VAN DRIESSE, E.; HOUF, K. Discrepancy between the occurrence of *Arcobacter* in chickens and broiler carcass contamination. **Poultry Science**, v. 86, p. 744-751, 2007.

VAN DRIESSE, E.; HOUF, K.; HOOF, J.; DE ZUTTER, L.; VANDAMME, P. Isolation of *Arcobacter* species from animal feces. **FEMS Microbiology Letters**, v. 29, p. 243-248, 2003.

VANDAMME, P.; GIESENDORF, B. A. J.; VAN BELKUM, A.; PIERARD, D.; LAUWERS, S.; KERTERS, K.; BUTZLER, J. P.; GOOSENS, H.; QUINT, W. G. V. Discrimination of Epidemic and Sporadic Isolates of *Arcobacter butzleri* by Polymerase Chain Reaction- Mediated DNA Fingerprinting. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 12, p. 3317-3319, 1993.

VANDAMME, P.; PUGINA, P.; BENZI, G.; VAN ETTERIJCK, R.; VLAES, L.; KERTERS, K.; BUTZLER, J.; LIOR, H.; LAUWERS, S. Outbreak of recurrent abdominal cramps associated with *Arcobacter butzleri* in an Italian school. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 9, p. 2335-2337, 1992.

VILLARRUEL-LÓPEZ, A.; MÁRQUEZ-GONZÁLEZ, M.; GARAY-MARTINEZ, E.; ZEPEDA, H.; CASTILLO, A.; MOTA, L.; MURANO, E.; TORRES-VITELA, R. Isolation of *Arcobacter* spp. from retail meats and cytotoxic effects of isolates against Vero Cells. **Journal of Food Protection**, v. 66, p. 1374-1378, 2003.

WESLEY, I. V.; *Arcobacter*. An Overview **Iowa State University** ASL-R1505. Endereço eletrônico Disponível em:

<http://www.extension.iastate.edu/Pages/ansci/swinereports/asl-1505.pdf>. Acessado em 21/03/2007.

WESLEY, I. V.; BAETZ, A. L.; LARSON, D. J. Infection of cesarean – derived colostrum- deprived 1-day-old piglets with *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, and *Arcobacter skirrowii*. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 6, p. 2295-2299, 1996.

ZANETTI, F.; VAROLI, O.; STAMPI, S.; DE LUCA, G. Prevalence of thermophilic *Campylobacter* and *Arcobacter butzleri* in food of animal origin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 35, p. 315-321, 1996.