MARIA GARCIA SPINDOLA

**Isolamento e caracterização de *Campylobacter coli* e *Campylobacter jejuni*
em cortes de carne de frango e suíno comercializados na cidade de São
Paulo**

São Paulo

2017

MARIA GARCIA SPINDOLA

**Isolamento e caracterização de *Campylobacter coli* e *Campylobacter jejuni*
em cortes de carne de frango e suíno comercializados na cidade de
São Paulo**

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 Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Andrea Micke Moreno

São Paulo

2017

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. 3552
FMVZ

Spindola, Maria Garcia

Isolamento e caracterização de *Campylobacter coli* e *Campylobacter jejuni* em cortes de carne de frango e suíno comercializados na cidade de São Paulo. / Maria Garcia Spindola. - 2017.

66 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2017.

Orientador: Profa. Dra. Andrea Micke Moreno.

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Isolamento e caracterização de *Campylobacter* spp. em cortes de carne suína comercializados em mercados na Cidade de São Paulo", protocolado sob o nº 3116/2013, utilizando 400 (quatrocentas) amostras de carne suína, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Andrea Micke Moreno, foi aprovado em reunião de 14/8/2013 e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Isolation and characterization of *Campylobacter* spp. cuts of pork sold in markets in São Paulo", protocol number 3116/2013, utilizing 400 (four hundred) pork meat samples, under the responsibility Profa. Dra. Andrea Micke Moreno, was approved in the meeting of day 8/14/2013 and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo.

São Paulo, 14 de agosto de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SPINDOLA, Maria Garcia

Título: Isolamento e caracterização de *Campylobacter coli* e *Campylobacter jejuni* em cortes de carne de frango e suíno comercializados na cidade de São Paulo.

Tese apresentada a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) para obtenção do título de doutora em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela minha vida, saúde e por ter colocado na minha vida mais esta oportunidade de conquistar um sonho.

A minha mãe Suzana, que desde pequena foi meu exemplo de mulher forte e que sempre me ensinou com o exemplo de suas atitudes.

Agradeço a minha filha Maria Eduarda, pela paciência e compreensão pelas horas em que tive que me ausentar.

A meu namorado Thiago, por todo o carinho e palavras de apoio, sempre nos momentos certos, foram fundamentais durante estes anos.

A minha madrinha, Fátima, que sempre torceu por mim e sempre acreditou em mim.

A meu pai Marcio, por todo o incentivo aos meus estudos que fizeram com que eu chegasse até aqui.

Aos meus avós Maria e Nelson, seja onde estiverem, sei que estão torcendo por mim e tenho certeza que estão orgulhosos.

Agradeço muito a minha orientadora, Prof^a Dr^a. Andrea por todo o aprendizado, paciência, sabedoria e suporte desde o primeiro dia em que estive no laboratório, há sete anos até este momento, sempre de braços abertos para me ajudar.

A toda equipe do Laboratório de Sanidade Suína da FMVZ-USP que participaram de todas as etapas desde o início, em especial à Paula por todo seu conhecimento em anos de experiência e pela amizade mesmo à distância; e à Luiza que sem dúvida foi uma pessoa chave na execução deste projeto, obrigada por toda a sua colaboração e compartilhamento de conhecimento.

À Prof^a.Dr^a. Terezinha por todo apoio e auxílio.

A todos os meus amigos que sempre me apoiaram com palavras e pensamentos positivos, sempre entendendo minha distância, mas que foram muito importantes em todos esses anos. Seria injusto e certamente precisaria de mais páginas nesta seção para colocar o nome de cada um: o meu mais sincero obrigada a cada um.

Aos meus colegas da Adisseo pelo incentivo.

A todas as outras pessoas que ajudaram direta ou indiretamente, que não foram pouco e nem menos importantes e certamente colaboraram na plena realização deste projeto.

RESUMO

SPINDOLA, M.G. **Isolamento e caracterização de *Campylobacter coli* e *Campylobacter jejuni* em cortes de carne de frango e suíno comercializados na cidade de São Paulo.** 2017. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Atualmente, a campilobacteriose representa uma importante zoonose tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento. No Brasil, vários estudos relatam a alta frequência de suínos eliminando o agente nas fezes, porém, a contaminação da carne suína comercializada tem sido pouco avaliada, principalmente no que diz respeito à presença de *Campylobacter* spp. A incidência deste agente em cortes de carne de aves é mais descrita, porém ainda faltam estudos que esclareçam a epidemiologia da doença. Os objetivos principais do presente estudo foram avaliar a presença de *Campylobacter* spp. em cortes de carne de frangos e suínos vendidos em mercados municipais, açougues e mercados de pequeno porte distribuídos nas cinco regiões do município de São Paulo. Das 115 amostras de origem suína avaliadas sete se mostraram positivas ao isolamento de *Campylobacter coli* e, das 105 amostras de carne de frango, 31 estavam contaminadas por *Campylobacter jejuni* ou *Campylobacter coli*. Dentre as 38 amostras de carne de frango e suíno positivas foram selecionadas 60 estirpes, as quais foram caracterizadas quanto à espécie, utilizando a reação em cadeia pela polimerase e a espectrometria de massa MALDI-TOF, foram ainda avaliadas quanto ao perfil de resistência a antimicrobianos e foram submetidas a genotipagem pelo polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP). A partir dos resultados obtidos seis estirpes foram selecionadas para realização do sequenciamento do genoma completo e a partir da análise dos genomas foram identificados os STs, os genes de resistência e genes de virulência.

Palavras-chave: *Campylobacter*. Carne suína, Carne de frango, MIC, AFLP

ABSTRACT

SPINDOLA, M.G. **Isolation and characterization of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* in chicken and pork meat cuts commercialized in the city of São Paulo.** 2017. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Currently, Campylobacteriosis represents an important zoonosis in both developed and developing countries. In Brazil, several studies report a high frequency of pigs excreting the agent in the feces, but the contamination of marketed pork has been insufficiently evaluated, especially with regard to the presence of *Campylobacter spp.* The incidence of this agent in cuts of poultry meat is more detailed; however, there are still studies lacking that clarify the epidemiology of the disease. The main aims of the present study were to evaluate the presence of *Campylobacter spp.* in chicken and pork cuts sold in municipal markets, butchers and small markets distributed in the five regions of the city of São Paulo. Of the 115 pork samples evaluated, seven were *Campylobacter coli* isolation positive and 31 of the 105 chicken samples were contaminated with *Campylobacter jejuni* or *Campylobacter coli*. Of the 38 chicken and pork positive samples, 60 strains were selected, which were characterized by species using polymerase chain reaction and MALDI-TOF mass spectrometry. They were also assessed for antimicrobial resistance profile and were genotyped by amplified fragment length polymorphism (AFLP). From the results obtained six strains were selected to carry out the complete genome sequencing and from the genome analysis the STs, the resistance genes and the virulence genes were identified.

Keywords: *Campylobacter*, Pork, Chicken meat, MIC, AFLP

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Análise de agrupamento dos perfis de resistência pela determinação da concentração inibitória mínima.	38
Figura 2 –	Dendrograma demonstrando a relação entre os genótipos de AFLP das estirpes de <i>Campylobacter jejuni</i> e <i>C. coli</i> estudadas.	40
Figura 3 –	Análise de agrupamento dos perfis alélicos do protocolo de MLST.	43
Figura 4 –	Análise de agrupamento dos perfis alélicos do protocolo de MLST.	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Frequência de resistência aos diferentes antimicrobianos testados por espécie de <i>Campylobacter</i> .	33
Tabela 2 –	Resistência aos diferentes antimicrobianos testados de acordo com a origem do isolamento.	34
Tabela 3 –	Valores de amplitude, CIM ₅₀ , CIM ₉₀ , taxa de resistência e pontos de corte para os antimicrobianos estudados.	35
Tabela 4 –	Distribuição das estirpes estudadas segundo espécie e resistência aos antimicrobianos (número de classes de antimicrobianos resistentes).	36
Tabela 5 –	Distribuição dos perfis resistência identificados segundo espécie.	37
Tabela 6 –	Distribuição dos alelos e sequências tipo (STs) identificados nos genomas estudados, segundo o protocolo de MLST.	42
Tabela 7 –	Genes de resistência adquiridos detectados pela predição <i>in silico</i> .	45
Tabela 8 –	Avaliação da presença do gene <i>cmeB</i> e de mutações pontuais nos genes <i>gyrA</i> e 23S rRNA nos genomas estudados.	46

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Primers utilizados para diferenciação das espécies <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> .	26
Quadro 2 –	Informações das montagens dos genomas dos isolados de <i>Campylobacter</i> spp.	41
Quadro 3 –	Fatores de virulência detectados pela predição <i>in silico</i> .	47

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA	11
1.1 Taxonomia	11
1.2 Características gerais	12
1.3 Histórico	13
1.4 Campilobacteriose em humanos	14
1.5 Fontes de contaminação	16
1.7 Métodos de isolamento e diagnóstico	19
2. OBJETIVOS	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.3 Isolamento	22
3.5 Extração do DNA bacteriano e reação em cadeia pela Polimerase (PCR)	24
3.6 Detecção do produto de amplificação	24
3.7 Perfil de sensibilidade antimicrobiana através da microdiluição em caldo	25
3.8 Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP)	26
3.9 Análise de agrupamento dos perfis de banda	26
3.10 Sequenciamento do genoma	27
3.11 Avaliação de qualidade e “trimagem” das <i>reads</i>	27
3.14 Predição <i>in silico</i> de genes de virulência e resistência	29
4. RESULTADOS	30
5. DISCUSSÃO	46
6. CONCLUSÕES	54
7. BIBLIOGRAFIA	55

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Taxonomia

O gênero *Campylobacter* foi proposto, em 1963, por Sebald e Véron para um grupo de espécies com características diferentes das bactérias conhecidas como do gênero *Vibrio* (GOMES, 2013). Até 1963, a espécie *C. jejuni* era denominada como *Vibrio jejuni*, quando Sebald e Véron (1963) propuseram a criação do gênero *Campylobacter* (do grego campylo= curvo e bacter = bacilo). Com base em estudos filogenéticos, Véron (1966) propôs a inclusão do gênero *Campylobacter* na família *Spirillaceae*. Em 1973, Véron e Chatelain consideraram as bactérias *Vibrio jejuni* e *Vibrio coli* como duas espécies diferentes denominando-as *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*, respectivamente.

Um grupo de pesquisadores é responsável pela “List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature” (LPSN, 2017), a qual foi atualizada em 2017 e cita 36 espécies e 14 subespécies incluídas no gênero *Campylobacter*, são elas:

Campylobacter avium (ROSSI *et al.*, 2009); *Campylobacter butzleri* (KIEHLBAUCH *et al.*, 1991); *Campylobacter canadensis* (INGLIS *et al.*, 2007); *Campylobacter cinaedi* (TOTTEN *et al.*, 1988); *Campylobacter coli* (DOYLE 1948., VÉRON e CHATELAIN, 1973); *Campylobacter concisus* (TANNER *et al.*, 1981); *Campylobacter corcagiensis* (KOZIEL *et al.*, 2014); *Campylobacter cryaerophilus* (corrig. NEILL *et al.*, 1985); *Campylobacter cuniculorum* (ZANONI *et al.*, 2009); *Campylobacter curvus* (TANNER *et al.* 1984., VEAMME *et al.*, 1991); *Campylobacter fennelliae* (TOTTEN *et al.*, 1988); *Campylobacter fetus* (SMITH e TAYLOR 1919., SEBALD e VÉRON, 1963); *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* (SMITH e TAYLOR, 1919; VÉRON e CHATELAIN, 1973); *Campylobacter fetus* subsp. *testudinum* (FITZGERALD *et al.*, 2014, subsp.nov.); *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* (FLORENT, 1959; VÉRON e CHATELAIN., 1973); *Campylobacter geochelonis* (PICCIRILLO *et al.*, 2016, sp. nov.); *Campylobacter gracilis* (TANNER *et al.*, 1981; VANDAMME *et al.*, 1995); *Campylobacter helveticus* (STANLEY *et al.*, 1993, sp. nov); *Campylobacter hepaticus*, VAN *et al.*,

sp. nov.); *Campylobacter hominis* (LAWSON *et al.*, 2001); *Campylobacter hyoilei* (ALDERTON *et al.*, 1995); *Campylobacter hyointestinalis* (GEBHART *et al.*, 1985 *sp. nov.*); *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* (GEBHART *et al.*, 1985; ON *et al.*, 1995); *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *lawsonii* (ON *et al.*, 1995); *Campylobacter iguaniorum* (GILBERT *et al.*, 2015); *Campylobacter insulaenigrae* (FOSTER *et al.*, 2004); *Campylobacter jejuni* (JONES *et al.*, 1931; VÉRON e CHATELAIN, 1973); *Campylobacter jejuni* subsp. *doylei* (STEELE e OWEN, 1988); *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* (JONES *et al.*, 1931; STEELE e OWEN, 1988); *Campylobacter lanienae* (LOGAN *et al.*, 2000); *Campylobacter lari* (corrig. BENJAMIN *et al.*, 1984); *Campylobacter lari* subsp. *concheus* (DEBRUYNE *et al.*, 2009); *Campylobacter mucosalis* (LAWSON *et al.*, 1981; ROOP *et al.*, 1985); *Campylobacter mustelae* (FOX *et al.*, 1988; Fox *et al.*, 1989); *Campylobacter nitrofigilis* (MCCLUNG *et al.*, 1983); *Campylobacter peloridis* (DEBRUYNE *et al.*, 2009); *Campylobacter pylori* (corrig. MARSHALL *et al.*, 1985); *Campylobacter pylori* subsp. *mustelae* (FOX *et al.*, 1988); *Campylobacter pylori* subsp. *pylori* (MARSHALL *et al.*, 1985; FOX *et al.*, 1988); *Campylobacter rectus* (TANNER *et al.*, 1981; VEAMME *et al.*, 1991); *Campylobacter showae* (ETOH *et al.*, 1993); *Campylobacter sputorum* (PRÉVOT, 1940; VÉRON e CHATELAIN, 1973); *Campylobacter sputorum* subsp. *bubulus* (FLORENT, 1953; VÉRON e CHATELAIN, 1973); *Campylobacter sputorum* subsp. *mucosalis* (LAWSON e ROWLE, 1974; LAWSON *et al.*, 1981); *Campylobacter sputorum* subsp. *sputorum* (PRÉVOT, 1940; VÉRON e CHATELAIN, 1973); *Campylobacter subantarcticus* (DEBRUYNE *et al.*, 2010); *Campylobacter upsaliensis* (SESTEDT e URSING, 1991); *Campylobacter ureolyticus* (JACKSON e GOODMAN, 1978; VANDAMME *et al.*, 2010); *Campylobacter volucris* (DEBRUYNE *et al.*, 2010).

1.2 Características gerais

As bactérias do gênero *Campylobacter* podem ter várias formas, dentre elas bastonetes curvos em forma de vírgula, “S”, asa de gaivota ou espiral, cujas dimensões variam entre 0,2 a 0,9 µm de largura por 0,5 a 5 µm de comprimento.

São bactérias Gram-negativas, microaerófilas, não hemolíticas, não esporuladas e as colônias frequentemente não são pigmentadas. Células em culturas com mais de 48 horas tendem a assumir formas esféricas ou cocóides.

São móveis por meio de flagelo único em uma ou ambas as extremidades e possuem movimento característico em serrote ou “sacarolha”, que pode ser observado claramente em microscópio de contraste de fase ou de campo escuro. Apresentam metabolismo do tipo respiratório e não utilizam carboidratos como fonte de carbono (VANDAMME e DE LEY, 1991; HOLT *et al.*, 1994).

1.3 Histórico

O primeiro relato sobre o isolamento de bactérias curvas ou espiraladas de animais foi feito por Mac Fadyen e Stockman (1909 apud PINHEIRO, 2003) Na Inglaterra a partir de fetos bovinos abortados. Anos mais tarde Smith (1918 apud PINHEIRO, 2003), nos Estados Unidos, descreveu a participação de bactérias microaerófilas de morfologia semelhante ao gênero *Vibrio* em abortamentos bovinos e ovinos. Um ano depois, foram denominados “*Vibrius fetus*”, por Smith e Taylor (1919 apud PINHEIRO, 2003), após isolá-las a partir de fetos bovinos abortados (CAMPOS, 2006).

Mais tarde, em 1944, Doyle obteve o isolamento de bactérias curvas microaerófilas a partir de casos de diarreia suína, cujas características fenotípicas não se assemelhavam totalmente ao *Vibrio fetus* nem ao *Vibrio jejuni*, denominando-o *Vibrio coli* e sugerindo como agente etiológico da disenteria suína (PINHEIRO, 2003).

Levy (1946) descreveu um surto de diarreia em humanos, verificando em amostras de fezes e de sangue a presença de formas curvas e espiraladas de vibriões, sugerindo que a ingestão de leite cru teria sido a provável fonte de contaminação estabelecendo assim a primeira infecção humana relacionada a este grupo de bactérias (PINHEIRO, 2003).

1.4 Campilobacteriose em humanos

A importância de doenças transmitidas por alimentos, incluindo a campilobacteriose é substancial e amplamente discutido: A cada ano quase uma em 10 pessoas é acometida por este tipo de doença no mundo. As doenças transmitidas por alimentos podem ser graves, especialmente para crianças pequenas, idosos e indivíduos imunossuprimidos. Sabe-se que a bactéria *Campylobacter* é uma das quatro principais causas globais de doenças transmitidas por alimentos, sendo o agente bacteriano responsável por mais casos, as estimativas globais são em torno de 96 mil casos anuais (WHO, 2017)

Especialmente em países em desenvolvimento, espécies de *Campylobacter* spp. têm sido responsabilizadas como um dos agentes etiológicos que mais tiveram destaque em doenças veiculadas por alimentos (FITZGERALD *et al.*, 2001; ZORMAN e MOZINA, 2002).

Nos Estados Unidos a campilobacteriose é a uma das causas mais comuns de doença diarreica. A vigilância ativa, através do “Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet)” em 2015 identificou mais de 20 mil infecções alimentares confirmadas em laboratório, sendo que destas o *Campylobacter* foi o agente responsável por 6289 (12,8%), sendo que a taxa de incidência por 100 casos foi mais alta entre homens que entre mulheres (14,4% vs 11,25%). Desde 2006 a incidência da infecção por *Campylobacter* não mudou significativamente neste país (CDC, 2015).

Ainda existem muitos casos que não são diagnosticados ou declarados e estima-se que a campilobacteriose afete mais de 1,3 milhões de pessoas a cada ano. Estudos em outros países como Inglaterra e Holanda estimam que a incidência de campilobacteriose seja de 9,3 e 5,8 pessoas por 1000 habitantes/ano, respectivamente (CDC, 2015).

O projeto Global Burden of Disease (GBD) organizado pela World Health Organization (WHO) em países subdesenvolvidos estimou que 8,4% do total de surtos de doenças diarreicas são causados por *Campylobacter*, classificando este

agente como o quarto principal agente causador de diarreia em humanos (WHO, 2013).

Infelizmente no Brasil temos pouca informação e os casos de campilobacteriose são certamente subestimados. Segundo dados da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), no período entre 2007 a 2015, foram notificados no território Nacional 6494 surtos de DTAs (Doenças Transmissíveis por Alimentos), sendo que *Campylobacter* spp. não é um dos 11 agentes pesquisados, podendo englobar-se em 'não identificados' ou 'outros' (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016), dificultando a rastreabilidade dos estudos de epidemiologia.

No Brasil as infecções por *Campylobacter* são usualmente esporádicas, ocorrendo nos meses de verão e no início do outono e a incidência segue uma distribuição bimodal, com elevado índice em bebês e crianças jovens, seguida de um segundo pico de adultos entre 20 e 40 anos. Os surtos normalmente acontecem nos meses de primavera e outono e nos últimos anos estes têm sido associados à ingestão de água e alimentos contaminados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

As espécies mais comumente associadas com infecções em humanos são *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) seguida por *C. coli* e *C. lari*, porém outras espécies de *Campylobacter* já foram relatadas como causadoras de infecção de origem alimentar em humanos (EFSA, 2013). Estudos mostram que *C. jejuni* é responsável por aproximadamente 90% dos casos de infecção alimentar, sendo *C. coli* responsável por 5 a 10% dos casos (GILLESPIE *et al.*, 2002).

O período de incubação em humanos varia de 2 a 5 dias. Pacientes podem ter sintomas leves a graves, sendo os mais comuns os gastrintestinais compreendendo diarreia aquosa/ sanguinolenta, dor abdominal, febre, dor de cabeça e náuseas.

Normalmente as infecções são auto-limitantes durando alguns dias, porém casos extraintestinais ou complicações pós-infecção podem ocorrer, como artrite e distúrbios neurológicos (EFSA, 2013). Nos últimos 20 anos a associação entre a infecção por *C. jejuni* e duas doenças neurológicas emergentes tem sido sugerida: a polineuropatia desmielizante inflamatória aguda, chamada de Síndrome de

Guillain-Barré (GBS), e a Síndrome Paralítica Chinesa, mais recentemente denominada de neuropatia axonal motora (DUIM *et al.*, 2000; PINHEIRO, 2003), além de doenças funcionais do intestino como a síndrome do intestino irritável (SII) (WHO, 2013). Síndromes como síndrome Fisher Miller, síndrome da artrite reativa, síndrome de Reiters e síndrome urêmica hemolítica também são complicações relatadas após infecção (CHAMOVITZ *et al.*, 1983; MEAD, 2014; SCHIELLERUP, 2008).

Devido às complicações que a doença pode causar estima-se que haja aproximadamente 76 casos de morte por campilobacteriose anualmente nos Estados Unidos (CDC, 2015).

1.5 Fontes de contaminação

Campylobacter spp. termotolerantes são amplamente dispersos na natureza, sendo que o principal reservatório é o trato gastrointestinal dos animais, que muitas vezes são assintomáticos. Estas bactérias são frequentes em animais de produção como aves, bovinos, suínos e ovinos, em animais de estimação (incluindo cães e gatos) e aves selvagens, além de poder estar presente na água (EFSA, 2013).

Devido a essa grande dispersão, as rotas de transmissão e fontes específicas de contaminação humana não estão completamente esclarecidas (STEINBRUECKER, *et al.*, 2001).

Durante o abate de aves e suínos este patógeno pode ser transferido do intestino para a superfície da carne, sendo esta uma relevante forma de contaminação destes produtos (BRYAN e DOYLE, 1995; CORTEZ, 2006). Frangos portadores de *Campylobacter* são responsáveis pela contaminação cruzada de outras carcaças durante o processamento, especialmente durante a etapa de evisceração (POWELL *et al.*, 2012).

Em estudo conduzido por Cortez *et al.* (2006), foi pesquisada a contaminação de diferentes pontos de um abatedouro, sendo encontrada uma

taxa de incidência de 5,6% na água de enxague de carcaças evisceradas e 2,8% nas águas de evisceração e escalda, mostrando possíveis e prováveis fontes de contaminação cruzada de produtos que não estejam primariamente contaminados.

Antes do abate, diversos materiais que entram em contato normalmente com as aves se mostraram contaminados, estudos citam 50% de positividade de *Campylobacter* em gaiolas de transporte, 37,5% em cama de aviário e 25% na água de lavagem de gaiola, aumentando assim o risco de contaminação dos animais no pré-abate (FRANCHIN et al., 2005).

Além da carne, as bactérias deste gênero também podem contaminar outros produtos de origem animal como o leite cru e produtos lácteos. Embora sejam menos frequentes há também o risco de contaminação de pescados, mexilhões e legumes frescos. O consumo de água a partir de fontes de água não tratada, o contato com animais de estimação e outros animais também foram identificados como fontes de infecção. Durante a preparação dos alimentos a contaminação cruzada tem sido igualmente descrita como uma importante via de transmissão (EFSA, 2013).

Ou seja, a campilobacteriose é uma zoonose de distribuição mundial, tendo como fonte principal da infecção em humanos o manuseio e o consumo de carne contaminada (CAMPOS, 2006). E também é fator de risco a ingestão de carnes malcozidas e de leite não pasteurizado (ALTERKRUSE, 1998; SKIROW, 1991).

A importância da espécie suína na transmissão de *Campylobacter* spp. assemelha-se aos demais grupos de animais que se destinam à produção de carne, incluindo bovinos e ovinos. Estes agentes podem ser isolados em proporções elevadas de carcaças destas espécies logo após o abate, no qual a evisceração se constitui no ponto crítico de contaminação; embora o resfriamento e a secagem da carcaça por ventilação forçada reduzam significativamente a carga bacteriana (ALTERKRUSE et al., 1999; PINHEIRO, 2003).

1.6 Incidência de *Campylobacter* nos cortes de carne de aves e suínos

Carvalho et al. (2002) coletaram amostras em diferentes fases do abate de frangos e concluíram que as etapas de evisceração e depenação constituem importantes pontos de contaminação no processamento, sendo críticos para o risco de contaminação (CORTEZ, 2006).

Considerando dados de diversos países temos incidências variáveis, na China, Bai et al. (2014) encontraram 26,3% das carcaças de frangos contaminadas com *Campylobacter* e Kim et al. (2010) descreveram 46,1% das amostras contaminadas por *Campylobacter jejuni* e 32,8% por *C. coli*. No México, a presença de *Campylobacter* spp foi descrita em 58,3% das amostras de carne de frango (ZAIDI et al., 2012). Nos Estados Unidos, Zhao et al (2001) descreveram 70,7% da amostragem de carne de frango contaminada por *Campylobacter* spp e na França foi relatada uma incidência de 76% de *Campylobacter* no mesmo tipo de amostras (GUYARD-NICODÉME et al., 2015). Na Itália foi relatada a frequência de 81% dos diferentes cortes de frango avaliados (PEZZOTI et al., 2003) e no Reino Unido foi descrita uma ocorrência de 83% (KRAMER et al., 2000) neste mesmo perfil de amostras.

No Brasil a incidência relatada de contaminação em cortes de carne de aves tem grande variação, sendo observada uma frequência que varia de 14,2% (LOPES, 2009) a 93,7% (FREITAS e NORONHA, 2007).

Cason et al. (1997) observaram a ocorrência de 20% de *Campylobacter* spp. em carcaças de aves (CORTEZ, 2006), assim como Silva et al. (2014), no Rio Grande do Sul, encontraram também 20% nos diferentes cortes de frango pesquisados. Outro estudo, realizado no estado do Paraná, relatou uma frequência de ocorrência de 70,83% de *Campylobacter* termofílico nas amostras estudadas (GONÇALVES et al., 2012) e Costa (2010), na cidade de São Paulo, descreveu 19,6% de amostras positivas para *Campylobacter*.

Um trabalho realizado na China com cortes de frango importados no Brasil descreve que 50% e 8,9% das amostras estavam contaminadas por *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*, respectivamente (KIM et al., 2010).

Em carcaças de suínos foi encontrada a frequência total de isolamento de *Campylobacter* spp de 43,7% (GABRIEL, 2009), sendo que Nebasken et al. (2003) sugeriu que *Campylobacter* spp. pode ser isolado em carcaças suínas com prevalência acima de 10,3% na dependência da técnica utilizada.

Nos Estados Unidos foi relatada por Zhao et al. (2001) a incidência de 1,7% de bactérias do gênero *Campylobacter* spp. em cortes de carne suína compradas em mercados e de 2% por outros dois pesquisadores (NOORMOHAMED e FAKHR, 2013). Estudos conduzidos na Irlanda relataram 10% das carcaças de suínos e 15% dos produtos (embalados e comprados em supermercados) contaminados com bactérias do gênero *Campylobacter* spp (SCANLON et al., 2013). Este último resultado foi semelhante ao encontrado por Zaidi et al. (2012) no México, que relatou uma incidência de 14,6% nas amostras de carne suína.

1.7 Métodos de isolamento e diagnóstico

Até o início da década de 70, os poucos isolados de *Campylobacter jejuni* eram provenientes de materiais clínicos como sangue, líquido sinovial e líquido, em que não havia a interferência de outros microrganismos. Através dos estudos de Dekeyser et al. (1972) estas bactérias puderam ser isoladas a partir de fezes de pacientes com diarreia, através do emprego de filtração da suspensão de fezes em membranas de poro de 0,65µm, e posterior semeadura em meio seletivo. Esta técnica permitiu que o *Campylobacter* spp. pudesse ser isolado sem o desenvolvimento exacerbado dos outros microrganismos fecais (PINHEIRO, 2003).

Desde então diversos autores passaram a modificar os meios de cultura seletivos que viabilizaram o isolamento de *Campylobacter* spp. de indivíduos com diarreia aguda, permitindo a verificação de sua participação tanto nas enfermidades humanas como nas animais (SKIROW, 1977; BUTZLER e SKIROW, 1979; BOLTON e ROBERTSON, 1982, GENOVEZ et al., 1989; SCARCELLI et al., 1998).

O substancial aumento na frequência de isolamento de *Campylobacter* spp. de casos de diarreia humana e as altas taxas de portadores animais destes microrganismos, tornam necessárias a identificação e a caracterização de novos marcadores que deem suporte às investigações epidemiológicas (LIOR, 1994; PINHEIRO, 2003).

O uso de técnicas moleculares ganhou cada vez mais destaque na pesquisa de microrganismos entéricos devido as suas vantagens, como a possibilidade de pesquisar um grande número de amostras em um curto intervalo de tempo e a sensibilidade dos testes (CORTEZ, 2006).

Dentre os métodos empregados na subtipagem de *Campylobacter* spp., destacam-se as técnicas: eletroforese em campo pulsado (“Pulsed Field Gel Electrophoresis” – PFGE) (NIELSEN *et al.*, 2000), polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição do DNA (“Restriction Fragment Length Polymorphism” – RFLP) (Fraser *et al.*, 1992), DNA polimórfico amplificado ao acaso (“Random Amplified Polymorphic DNA” – RAPD) (LAM *et al.*, 1995) e polimorfismo de tamanho de fragmentos amplificados (“Amplified Fragment Length Polymorphism” – AFLP) (DUIM *et al.*, 2000; PINHEIRO, 2003).

Além destas técnicas, a reação em cadeia pela polimerase (PCR) também é muito utilizada para diferenciação entre *C. jejuni* e *C. coli*, por exemplo (ZORMAN *et al.*, 2006; MADDEN *et al.*, 2007).

2. OBJETIVOS

- Isolar estirpes de *Campylobacter spp.* a partir de cortes de carne de frangos e suínos comercializados na cidade de São Paulo;
- Identificar as espécies isoladas por MALDI TOF MS e por PCR;
- Determinar o perfil de resistência dos isolados aos antimicrobianos frequentemente utilizados contra a infecção através da técnica de microdiluição em caldo;
- Caracterizar as estirpes de *Campylobacter coli* e *Campylobacter jejuni* através do polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (AFLP);
- Selecionar de um grupo de seis estirpes para sequenciamento do genoma;
- Caracterizar o genoma de estirpes selecionadas de *Campylobacter coli* e *Campylobacter jejuni*: identificar as sequências tipo (STs - MLST), detectar de genes de virulência e resistência aos antimicrobianos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras

Foram avaliados 105 cortes de carne de frango e 115 cortes de carne suína. Em cada estabelecimento foram coletados quatro cortes diferentes de carne suína (bisteca, pernil, lombo e costela) e quatro cortes de carne de frango (asa, coxa, peito e sobrecoxa), dando preferência sempre à carne resfriada.

3.2 Locais de Coleta

As amostras foram coletadas em 44 locais distribuídos entre mercados municipais, açougues e mercados de pequeno porte do município de São Paulo. Os cortes de frango foram coletados em 27 estabelecimentos e os de carne suína em 32, sendo que os estabelecimentos foram escolhidos de forma em que estivessem distribuídos nas regiões Norte, Sul, Centro e Oeste da cidade.

3.3 Isolamento

Os fragmentos de carne (10g) foram adicionados a bolsas esterilizadas contendo respectivamente 90 ml de Caldo Bolton suplementado com antimicrobianos (Oxoid Ltd, Cambridge/UK). As amostras foram homogeneizadas em *stomacher* por 60 segundos e incubados a 37°C por 24 horas (etapa de pré-enriquecimento). Uma alçada de 10µL foi plaqueada em ágar Campy-Cefex, o qual ficou por 48h em microaerofilia.

O ágar Campy-Cefex consiste em ágar Brucella, 5% de sangue de cavalo hemolisado, 0,05% de sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0,05% de piruvato de sódio, 0,02% de bisulfito de sódio e suplementos antibióticos sendo 33mg/L de cefoperazona de sódio, 50mg/L de nistatina e 50 mg/L de rifampicina) (STERN *et al.*, 1992).

3.4 Identificação do Agente (MALDI-TOF- MS)

As colônias indicativas de *Campylobacter* spp. foram semeadas em ágar Campy-Cefex incubado a 37°C por 48 horas. O crescimento bacteriano foi raspado com o auxílio de um suabe e lavado em solução salina. Uma alíquota de 1 mL desta suspensão foi centrifugada a 5.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado; o pélete recebeu 300 µl de água ultrapura e 900 µl de etanol, foi agitado e em seguida os tubos foram centrifugados a 13.000xg por 2 minutos. Após descarte do sobrenadante, os sedimentos foram secos em temperatura ambiente. Aos sedimentos, foram adicionados 50 µl de ácido fórmico (70%) e 50 µl de acetonitrila (100%). A mistura foi novamente centrifugada a 13.000xg por 2 minutos e o sobrenadante foi transferido a um microtubo novo e armazenado a -20°C.

Para leitura pelo MALDI-TOF MS foi utilizado o espectrofotômetro de massa Microflex™ (Bruker Daltonik) da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB, com o auxílio técnico da Dra. Maria Inês Zanolli Sato e sua equipe. Para leitura, 1 uL de suspensão proteica foi transferido para a placa de aço inox de 96 poços. Após secagem em temperatura ambiente, foi adicionado sobre a amostra 1 uL da matrix (ácido α-ciano-4-hidróxido-cinamico). Cada estirpe foi distribuída em dois poços (duplicata) e para cada placa foram realizadas duas leituras. Para captura dos espectros proteicos foi utilizado o programa FlexControl™ (Bruker Daltonik) pelo método MTB_autoX. O espectrofotômetro foi externamente calibrado com a utilização de proteínas ribossômicas de *Escherichia coli* (BTS - Bruker Daltonik).

Para a identificação bacteriana pelo espectro proteico foi utilizado o programa BioTyper™ (MALDI Biotyper CA Systems) 3.0 (Bruker Daltonik) a partir do qual foi realizada uma comparação dos espectros capturados para cada estirpe com a biblioteca do fabricante. Desta comparação de presença/ausência de picos específicos por gênero e espécie bacteriana, obteve-se um valor de escore (log (score) value). Os critérios para interpretação dos padrões da fabricante Bruker Daltonik foram utilizados neste estudo como segue: escores ≥ 2.0 foram aceitos

para atribuição de espécie, e escores ≥ 1.7 e < 2.0 foram utilizados para identificação de gênero.

3.5 Extração do DNA bacteriano e reação em cadeia pela Polimerase (PCR)

Colônias com morfologia sugestiva de *Campylobacter* spp. foram submetidas a extração do DNA bacteriano para realização da reação em cadeia pela polimerase (PCR) para identificação das espécies *C. coli* e *C. jejuni*. O protocolo para extração de DNA foi realizado segundo descrito por Boom *et al.* (1990). As amostras de DNA foram mantidas a -20°C .

Quadro 1- Primers utilizados para diferenciação das espécies *C. jejuni* e *C. coli*.

<i>Campylobacter jejuni</i>	
HIP 400F	GAA GAG GGT TTG GGT GGT G CTT CTC CCA AAC CCA CCA C
HIP 1134R	AGC TAG CTT CGC ATA ATA ACT TG TCG ATC GAA GCG TAT TAT TGA AC
<i>Campylobacter coli</i>	
CC18F	GGT ATG ATT TCT ACA AAG CGA G CCA TAC TAA AGA TGT TTC GCT
CC519R	ATA AAA GAC TAT CGT CGC GTG TAT TTT CTG ATA GCA GCG CAC

3.6 Detecção do produto de amplificação

A detecção dos produtos de amplificação da PCR 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). O gel foi então fotografado através do Sistema Gel doc XR. Os fragmentos foram identificados utilizando o marcador de pares de base 100bp.

3.7 Perfil de sensibilidade antimicrobiana através da microdiluição em caldo

Os perfis de sensibilidade antimicrobiana dos isolados foram analisados por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo teste de microdiluição em caldo conforme padrões definidos no documento M31-A3 do CLSI (2008).

A determinação da concentração inibitória mínima foi realizada utilizando-se o painel *Sensititre – Campylobacter* MIC Plate (TREK Diagnostic Systems-Thermo Fisher). Os antimicrobianos testados foram: azitromicina, ciprofloxacina, eritromicina, gentamicina, tetraciclina, florfenicol, ácido nalidíxico, telitromicina, clindamicina.

O inóculo bacteriano utilizado no teste de concentração inibitória mínima foi preparado a partir de uma cepa isolada e cultivada em ágar Brucella com 7% de sangue de equino lisado incubado a 42°C por 48 horas. O crescimento bacteriano foi ressuspenso em solução salina e a turbidez do cultivo foi ajustada de modo a obter uma turbidez óptica comparável à da solução padrão 0,5 McFarland e confirmada em espectrofotômetro (0,300 a 600 nm). Esta suspensão bacteriana ajustada conterá aproximadamente $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UFC/mL.

Uma vez ajustada, a suspensão bacteriana foi diluída na ordem de 1: 1000 em caldo Mueller Hinton II (Difco-BBL, Detroit, MI/USA) com 2,5% de sague equino lisado de maneira a obter uma concentração final de aproximadamente 5×10^5 UFC/mL e então, 100 µl desta suspensão foram distribuídos em cada poço da placa.

Após distribuição do inóculo na placa, esta foi selada com adesivo fornecido pelo próprio fabricante e incubada a 42 °C por 48 horas em aerobiose ou microaerofilia. O resultado do teste de microdiluição fornece a concentração inibitória mínima, que pode ser traduzida como a menor concentração de agente antimicrobiano que inibe completamente o crescimento do microrganismo nos poços da microplaca. O crescimento pode ser detectado pela visualização a olho

nu de um “botão” no fundo do poço em “u” da placa, denotando o crescimento e a consequente precipitação das células bacterianas ao fundo.

Para a determinação do perfil de sensibilidade, foram utilizados os pontos de corte descritos nos documentos VET01S (CLSI, 2015) e M100S (CLSI, 2016). A determinação da CIM₅₀, CIM₉₀ e multirresistência foi realizada conforme descrito por Schwarz et al. (2010).

A cada dia de teste foi usada uma placa para validação dos procedimentos contendo a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, conforme preconizado como controle de qualidade pelo CLSI (Documento M31-A3, 2008).

3.8 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 (New England BioLabs Inc). A detecção dos produtos de amplificação foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 2%, utilizando-se tampão TBE 0,5X (Tris-base 45 mM, ácido bórico 45 mM e EDTA 1 mM, pH 8) e voltagem de 90V durante 3 horas. Os fragmentos amplificados foram visualizados no sistema de fotodocumentação *Gel Doc XR* (Bio Rad), sendo os fragmentos corados com *BlueGreen*TM (LGC Biotecnologia) e comparados ao marcador 100 pb DNA *Ladder*TM (New EnglandBioLabs Inc).

3.9 Análise de agrupamento dos perfis de banda

Para a análise de agrupamento dos resultados do perfil de resistência e do AFLP foi utilizado o programa Bionumerics 7.6 (Applied Maths). Os perfis de resistência foram transformados em dados binários e para a análise de agrupamento dos perfis resultantes foi construído um dendrograma utilizando o coeficiente de “*different values*” e o método de Ward.

Para a análise de agrupamento dos perfis de fragmentos amplificados no AFLP, foi construído um dendrograma utilizando o coeficiente de Dice e o método de UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). O ponto de corte de 90% de similaridade genética foi utilizado para determinação e análise dos agrupamentos (genótipos) obtidos (VAN BELKUM et al., 2007).

3.10 Sequenciamento do genoma

Foi selecionado um grupo de seis estirpes a partir dos resultados do AFLP, dos padrões de resistência a antimicrobianos para realização do sequenciamento dos respectivos genomas. O sequenciamento foi realizado em parceria com o professor Roberto Marcello La Ragione (*School of Veterinary Medicine / University of Surrey*). O DNA genômico foi extraído com o kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN), conforme instruções do fabricante, e utilizado para preparo de biblioteca e sequenciamento *paired-end* com fragmentos de 250 pares de bases pela plataforma Illumina™ MiSeq.

3.11 Avaliação de qualidade e “trimagem” das reads

Para análise inicial do sequenciamento foram utilizados os programas FastQC 0.10.0 (Babraham Bioinformatics) e CLC Genomics Workbench 7.5 (CLC Bio / QIAGEN). A partir destes foi realizada a avaliação da confiabilidade da identificação de cada base sequenciada (*base-calling*), pelo valor de qualidade Phred, para determinar a qualidade das *reads* obtidas ao longo de sua extensão. Também foi avaliada a distribuição de frequências por tamanho das *reads*, o conteúdo GC e os níveis de duplicação e de sequências redundantes para determinar a necessidade de “trimar” (cortar) as *reads* conforme seu tamanho e a qualidade das respectivas bases. Foi utilizado o critério de seleção de sequências maiores que 100 pb e qualidade acima de 20 para a continuidade da análise genômica.

3.12 Montagem dos genomas

Para a montagem *ab initio* dos genomas, foi utilizado o programa CLC Genomics Workbench 7.5.1 (CLC Bio) com os seguintes parâmetros: tamanho mínimo de *contig* de 1000 pb, cobertura mínima de cinco sequências para fusão de variantes, detecção automática da distância de pares, além de permitir *gaps* (lacunas).

3.13 Análise *in silico* da Tipagem por Sequenciamento de Multilocus (MLST)

A predição dos alelos e sequências tipo (ST) da Tipagem por Sequenciamento de Multilocus (MLST), para as espécies *C. jejuni* e *C. coli*, foi realizada pela ferramenta *MLST 1.8 server* (LARSEN et al., 2012). Esta possibilitou a busca dos genes *aspA*, *glnA*, *gltA*, *glyA*, *pgm*, *tkl* e *uncA* (DINGLE et al., 2001) cujas sequências foram comparadas às disponíveis no site PubMLST (*Public databases for molecular typing and microbial genome diversity* - <http://pubmlst.org/campylobacter/>) para determinação dos respectivos alelos e STs.

Para a nova combinação de alelos identificada, foi realizada a verificação manual para determinação final do novo perfil alélico que foi submetido ao banco de dados (<http://pubmlst.org/campylobacter/>) para a identificação da nova ST. No caso de *C. jejuni* e *C. coli*, as STs podem ainda ser agrupadas em complexos clonais (CCs); as STs que compartilham no mínimo quatro alelos idênticos compõem um complexo clonal. A partir do banco de perfis alélicos e respectivas STs, foi realizada uma análise de agrupamento (dados categóricos) e construção de *Minimum Spanning trees* (MSTs) com o programa Bionumerics 7.6 (Applied Maths) para observação da diferenciação das STs e CCs e sua relação com a origem das estirpes.

3.14 Predição *in silico* de genes de virulência e resistência

Para a predição *in silico* dos genes de resistência aos antimicrobianos adquiridos foi utilizada a ferramenta *ResFinder* 2.1 (ZANKARI et al., 2012). Também foram analisadas as sequências dos genes *gyrA* e 23S rRNA em busca de mutações pontuais relacionadas a resistência à quinolonas e macrolídeos, respectivamente, além da presença do gene *cmeB* codificador de uma bomba de efluxo relacionada ao fenótipo de multirresistência.

A identificação dos genes de virulência foi realizada pela busca nos genomas dos genes listados no banco *Virulence Factor Database* (VFDB) (CHEN et al., 2016) específicos para o gênero *Campylobacter*. Foram utilizados como critérios de busca identidade de sequência > 90% e cobertura gênica > 80%.

4. RESULTADOS

A partir de 105 cortes de carne de frango coletadas em 27 mercados diferentes 31 amostras (29,5%) foram positivas para o isolamento de estirpes de *Campylobacter spp.* Dentre as 115 amostras de carne suína coletadas em 32 mercados, apenas 7 foram positivas para o isolamento do agente (6%).

Em relação aos diferentes tipos de corte de carne de frango, a menor frequência encontrada foi em coxa e sobrecoxa com 19%, seguidos pelo corte de peito com 26%. Os cortes de asa representaram 36% das amostras de carne de frango contaminadas com *Campylobacter spp.*

Para as carnes de suíno foi observada a mesma frequência de isolamento nos cortes de bisteca, lombo e costela (29%) e uma menor participação no corte de costela com apenas um isolamento (14%).

A partir dos cortes positivos foram selecionadas uma ou duas colônias para caracterização sendo avaliadas 49 estirpes isoladas de carne de frango e 11 de carne suína, perfazendo um total de 60 estirpes. Destas 60 estirpes, 31 foram identificadas como *Campylobacter coli* e 29 como *Campylobacter jejuni*. Todas as colônias suspeitas foram identificadas com total concordância pela PCR e pelo MALDI-TOF MS nas espécies *C. jejuni* e *C. coli*.

De todos os antibióticos testados, foi observada uma maior frequência de resistência à ciprofloxacina (75%), tetraciclina (45%) e à telitromicina (25%). Ao fazer a divisão por espécie de *Campylobacter* foi observada a mesma ordem de resistência aos antibióticos. Em relação ao *C. coli* 73% das estirpes foram resistentes a ciprofloxacina, 63% à tetraciclina e 27% à telitromicina. Para as estirpes de *C. jejuni* encontramos 77% das amostras resistentes à ciprofloxacina, 27% à tetraciclina e 23% à telitromicina (Tabela 1 e gráfico 1).

Tabela 1 – Frequência de resistência aos diferentes antimicrobianos testados por espécie de *Campylobacter* – N (%).

Antibiótico	<i>Campylobacter</i> N (%)	<i>C. coli</i> N (%)	<i>C. jejuni</i> N (%)
Azitromicina	8 (13)	4 (13)	4 (13,7)
Ciprofloxacina	45 (75)	22 (71)	23 (79,3)
Clindamicina	4 (6,6)	2 (6,5)	2 (6,9)
Eritromicina	8 (13)	4 (13)	4 (13,8)
Gentamicina	2 (3)	2 (6,5)	0 (0)
Ácido nalidíxico	6 (10)	3 (9,6)	3 (10,3)
Florfenicol	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Telitromicina	15 (25)	8 (26)	7 (24)
Tetraciclina	27 (45)	19 (61)	8 (27,5)
Total	60 (100)	31 (100)	29 (100)

Gráfico 1 – Frequência de ocorrência entre as *C. coli* e *C. jejuni* em relação a resistência aos antimicrobianos testados.

Pode-se fazer também uma análise de resistência das estirpes encontradas nas diferentes origens de carne, suína ou de frango. Pela tabela 2 abaixo tem-se que apenas a resistência a ciprofloxacina tem um perfil semelhante, alta frequência de resistência independentemente da origem da bactéria encontrada e analisada. A resistência à tetraciclina e a eritromicina se mostra muito mais relevante nas estirpes oriundas de carne suína, embora também tenha aparecido com alta importância nas estirpes isoladas de cortes de frango.

Tabela 2 – Resistência aos diferentes antimicrobianos testados de acordo com a origem do isolamento – N (%)

Classe	Antibiótico	Carne de frango N (%)	Carne suína N (%)
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	37 (76)	8 (73)
	Ácido nalidíxico	5 (10)	1 (9)
Tetraciclinas	Tetraciclina	19 (39)	8 (73)
	Telitromicina	11 (22)	4 (36)
Macrolídeos	Azitromicina	4 (8)	4 (36)
	Eritromicina	4 (8)	4 (36)
Lincosaminas	Clindamicina	2 (4)	2 (18)
Aminoglicosídeos	Gentamicina	0 (0)	2 (18)
Fenicóis	Florfenicol	0 (0)	0 (0)

Nenhuma das estirpes de *Campylobacter* testadas mostrou-se resistente ao florfenicol e o segundo antimicrobiano que teve maior sensibilidade foi a gentamicina com apenas uma estirpe de *C. jejuni* resistente, isolada de um corte de sobrecoxa.

No presente estudo 9 estirpes (15%) foram suscetíveis a todos os antibióticos; e duas estirpes de *C. coli* oriundas de carne de suíno mostraram-se resistentes a 7 antibióticos, sendo sensíveis apenas ao florfenicol e ao ácido nalidíxico. Uma estirpe de *C. jejuni*, isolada de carne de frango, mostrou-se

resistente a 6 antibióticos, sendo sensíveis apenas ao florfenicol, ácido nalidíxico e gentamicina.

Os resultados de CIM₅₀, CIM₉₀ e taxa de resistência aos respectivos antimicrobianos das 60 estirpes selecionadas estão descritos na Tabela 3. Destaca-se que todas as estirpes foram sensíveis ao florfenicol e apenas nove estirpes (15%) foram sensíveis a todos os antimicrobianos estudados. Altas taxas de resistência foram observadas para ciprofloxacina (75%), tetraciclina (45%) e telitromicina (25%).

Tabela 3 - Valores de amplitude, CIM₅₀, CIM₉₀, taxa de resistência e pontos de corte para os antimicrobianos estudados (CIM - µg/mL) – N (%).

Antimicrobiano	Amplitude ¹	CIM ₅₀	CIM ₉₀	Resistência N (%)	Pontos de corte		
					Sensível	Intermediário	Resistente
Ácido nalidíxico	4 - 64	32	32	6 (10,0)	≤ 16	32	≥ 64
Ciprofloxacina	0,015 - 64	8	32	45 (75,0)	≤ 1	2	≥ 4
Azitromicina	0,015 - 64	0,06	> 64	8 (13,3)	≤ 2	4	≥ 8
Eritromicina	0,03 - 6	1	> 64	8 (13,3)	≤ 8	16	≥ 32
Telitromicina	0,015 - 8	1	8	15 (25,0)	≤ 1	2	≥ 4
Gentamicina	0,12 - 32	0,25	0,5	2 (3,3)	≤ 2	4	≥ 8
Clindamicina	0,03 - 16	0,25	2	4 (6,7)	≤ 2	4	≥ 8
Florfenicol	0,03 - 64	1	2	0	≤ 4	-	≥ 8
Tetraciclina	0,06 - 64	2	64	27 (45,0)	≤ 4	8	≥ 16

1 – Amplitude das concentrações de antimicrobianos na microplaca Sensititre™ CAMPY.

Considerando o critério de multirresistência descrito por Schwarz et al. (2010) (resistência a três ou mais classes de antimicrobianos), foram identificadas apenas nove estirpes (15%) multirresistentes (Tabela 4), sendo que cinco destas foram identificadas como *C. jejuni* e as quatro restantes como *C. coli*.

Tabela 4 – Distribuição das estirpes estudadas segundo espécie e resistência aos antimicrobianos (número de classes de antimicrobianos resistentes) – N (%).

Resistência	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	Total
1 classe	14 (63,6)	8 (36,4)	22 (100)
2 classes	3 (15,0)	17 (85,0)	20 (100)
3 classes	4 (66,7)	2 (33,3)	6 (100)
4 classes	1 (100)	-	1 (100)
5 classes	-	2 (100)	2 (100)

Os perfis de resistência foram determinados considerando os resultados de resistência para os antimicrobianos estudados, sendo identificados 16 perfis (R1 – R16) (Tabela 5). Destaca-se maior frequência dos perfis R2 e R7 correspondentes a resistência à ciprofloxacina e tetraciclina. Dentre os 16 perfis, foram identificados seis correspondentes à multirresistência (R9, R12 – R16) distribuídos entre *C. jejuni* e *C. coli*. Destaca-se ainda o perfil R16 de maior resistência (resistência a cinco classes de antimicrobianos) identificado em duas estirpes de *C. coli* isoladas de carne suína.

A análise de agrupamento dos perfis de resistência (Figura 1) possibilitou a distinção das estirpes estudadas em dois grupos: o primeiro composto pela maioria das estirpes (86,7%) sendo estas as de maior susceptibilidade pertencentes aos perfis R1 a R9, enquanto que o segundo grupo contém a maioria dos perfis de multirresistência.

Tabela 5 – Distribuição dos perfis resistência identificados segundo espécie – N (%).

Perfil de resistência		<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	Total
R1	Sensível a todos os antimicrobianos testados	7 (77,8)	2 (22,2)	9 (100)
R2	CIP	8 (61,5)	5 (38,5)	13 (100)
R3	TELI	-	1 (100)	1 (100)
R4	TET	3 (100)	-	3 (100)
R5	NAL / CIP	3 (100)	-	3 (100)
R6	CIP / TELI	-	3 (100)	3 (100)
R7	CIP / TET	2 (14,3)	12 (85,7)	14 (100)
R8	NAL / CIP / TET	1 (50)	1 (50)	2 (100)
R9*	CIP / TELI / TET	2 (66,7)	1 (33,3)	3 (100)
R10	CIP / AZI / ERI	-	1 (100)	1 (100)
R11	AZI / ERI / TELI	-	2 (100)	2 (100)
R12*	NAL / CIP / TELI / TET	1 (100)	-	1 (100)
R13*	CIP / AZI / ERI / TELI / CLIN	-	1 (100)	1 (100)
R14*	CIP / AZI / ERI / TELI / TET	1 (100)	-	1 (100)
R15*	CIP / AZI / ERI / TELI / CLIN / TET	1 (100)	-	1 (100)
R16*	CIP / AZI / ERI / TELI / GEN / CLIN / TET	-	2 (100)	2 (100)

* Perfis de multirresistência. AZI - Azitromicina, CIP - Ciprofloxacina, CLIN - Clindamicina, ERI - Eritromicina, GEN - Gentamicina, FLOR - Florfenicol, NAL - Ácido nalidíxico, TELI - Telitromicina, TET - Tetraciclina.

Figura 1 - Análise de agrupamento dos perfis de resistência pela determinação da concentração inibitória mínima. Escala de cinza corresponde aos resultados de resistência observados (suscetível - em branco, intermediário - cinza, resistente - preto).

As 60 estirpes selecionadas foram caracterizadas pelo AFLP, sendo estas agrupadas em 25 perfis (A1 – A25). Pode-se observar que as estirpes são diferenciadas em dois grupos principais, com mais de 75% de similaridade genética, sendo estes definidos pelas espécies estudadas (*C. jejuni* e *C. coli*).

As estirpes de *C. jejuni* apresentam mais de 80% de similaridade genética entre si e foram diferenciadas em 15 perfis (A1 – A15). Pode-se observar entre os perfis de AFLP de *C. jejuni* uma tendência de agrupamento das estirpes por mercado de origem. No entanto, destaca-se o mercado M27 que apresenta dois genótipos distintos (A1 e A3) correspondentes a estirpes de *C. jejuni* isoladas de cortes diferentes de carne de frango (peito e asa) que também apresentam perfis de resistência diferentes. Já as estirpes de *C. coli* foram diferenciadas em dez perfis (A16 – A25) que também apresentam uma tendência de agrupamento por mercado de origem. No entanto, destacam-se os genótipos A17 e A18 que são compostos por estirpes originárias de mais um mercado (M16 e M8, M29 e M33, respectivamente).

Neste contexto destaca-se ainda um mercado que apresentou mais de um genótipo de *C. jejuni* indicando maior circulação desta espécie no local e possivelmente maior risco de contaminação e para saúde pública.

Figura 2 - Dendrograma demonstrando a relação entre os genótipos de AFLP das estirpes de *Campylobacter jejuni* e *C. coli* estudadas.

Para as seis estirpes selecionadas para sequenciamento e análise genômica, as *reads* obtidas foram filtradas seguindo os padrões mínimos estabelecidos para tamanho e qualidade das sequências. A partir destas, foi realizada montagem *ab initio* dos genomas; as informações de número de *contigs* obtidos, N50, tamanho médio dos *contigs* e tamanho total das respectivas montagens estão apresentadas no Quadro 2. Considerando a variação observada de 2,2 a 2,6 milhão de *reads* por estirpe, a cobertura estimada foi de aproximadamente 250 a 300x, considerando a espécie da estirpe sequenciada.

Quadro 2 - Informações das montagens dos genomas dos isolados de *Campylobacter* spp. (N50 e tamanhos médios e total em pares de bases - pb).

ID	Espécie	Origem	Mercado	Corte	Nº de <i>contigs</i>	N50	Tamanho médio	Tamanho total
A19.1.3	<i>C. coli</i>	Frango	M16	Peito	49	107.803	36.918	1.808.993
A44.1.4	<i>C. jejuni</i>	Frango	M26	Asa	48	122.010	37.248	1.787.900
A73.1.2	<i>C. jejuni</i>	Frango	M40	Coxa	48	93.094	36.785	1.765.695
A89.1.1	<i>C. jejuni</i>	Frango	M36	Peito	49	83.316	36.701	1.798.344
A89.1.3	<i>C. jejuni</i>	Frango	M36	Peito	33	185.830	54.596	1.801.663
S93.1.1	<i>C. coli</i>	Suíno	M37	Costela	32	313,011	56,622	1,811,908

Os perfis alélicos obtidos pela análise *in silico* da MLST são apresentados na Tabela 6. Foram identificadas cinco STs distintas, sendo que a estirpe S93.1.1 apresentou um novo perfil alélico que originou a ST8860, que já foi atualizada no banco. A identificação de espécie das estirpes estudadas apresentou total concordância com as espécies descritas nas respectivas STs. A distinção das espécies *C. coli* e *C. jejuni* também pode ser observada na análise de agrupamento dos perfis alélicos (Figura 4).

Tabela 6 - Distribuição dos alelos e sequências tipo (STs) identificados nos genomas estudados, segundo o protocolo de MLST.

ID	<i>aspA</i>	<i>glnA</i>	<i>gltA</i>	<i>glyA</i>	<i>pgm</i>	<i>tkl</i>	<i>uncA</i>	ST ¹	CC ²	Espécie ³
A19.1.3	33	39	30	79	189	35	17	5187	ST-828	<i>C. coli</i>
A44.1.4	2	1	12	3	2	1	5	50	ST-21	<i>C. jejuni</i>
A73.1.2	7	2	5	10	10	37	1	1035	-	<i>C. jejuni</i>
A89.1.1	7	17	52	10	11	3	6	2036	ST-353	<i>C. jejuni</i>
A89.1.3	7	17	52	10	11	3	6	2036	ST-353	<i>C. jejuni</i>
S93.1.1	53	38	30	79	104	43	17	8860	ST-828	<i>C. coli</i>

¹ ST – sequência tipo. ² CC – complexo clonal. ³ Espécie de *Campylobacter* descrita nas respectivas STs. Em **vermelho** esta destacada a nova ST identificada.

Pode-se observar que *C. jejuni* apresenta maior variação e dispersão das STs do que *C. coli*. Na Figura 3 são apresentadas apenas as STs de *C. coli* e *C. jejuni* que apresentam classificação de complexo clonal, sendo destacadas na coloração laranja as estirpes do presente estudo. Foram identificadas três STs distintas para os genomas de *C. jejuni* estudados, pertencentes a complexos clonais diferentes e que também apresentam origem (mercado) distinta entre si, corroborando a variação descrita para a espécie. Em relação a *C. coli*, apesar de identificadas duas STs, sendo uma destas nova no banco de MLST, ambos os genomas estudados pertencem ao mesmo complexo clonal (ST-828) sendo este o mais descrito para a espécie.

Figura 3 - Análise de agrupamento dos perfis alélicos do protocolo de MLST (A – *C. coli*; B – *C. jejuni*).

Figura 4 - Análise de agrupamento dos perfis alélicos do protocolo de MLST (em laranja as estirpes do presente estudo).

Em relação à predição *in silico* dos genes de resistência aos antimicrobianos, na Tabela 7 são apresentados os genes adquiridos identificados nos genomas estudados e as respectivas classes de antimicrobianos. Pode-se notar que a resistência fenotípica à tetraciclina observada nas estirpes estudadas é decorrente da presença do gene *tet(O)*, enquanto que a resistência à gentamicina pode estar relacionada aos genes *aadE*, *aph(3')-III* e *aph(2'')-Id* na estirpe S93.1.1. Destaca-se que apesar da presença do gene *aph(3')-III* nas estirpes A89.1.1 e A89.1.3, essas não apresentam resistência à gentamicina.

Tabela 7 - Genes de resistência adquiridos detectados pela predição *in silico*.

ID	Espécie	Perfil resistência	Genes adquiridos		
			Aminoglicosídeos	β-lactâmicos	Tetraciclina
A19.1.3	<i>C. coli</i>	CIP / TET	-	<i>blaOXA-61</i>	<i>tet(O)</i>
A44.1.4	<i>C. jejuni</i>	CIP / TET	-	<i>blaOXA-61</i>	<i>tet(O)</i>
A73.1.2	<i>C. jejuni</i>	-	-	-	-
A89.1.1	<i>C. jejuni</i>	NAL / CIP / TET	<i>aph(3')-III</i>	<i>blaOXA-61</i>	<i>tet(O)</i>
A89.1.3	<i>C. jejuni</i>	NAL / CIP / TET	<i>aph(3')-III</i>	<i>blaOXA-61</i>	<i>tet(O)</i>
S93.1.1	<i>C. coli</i>	CIP/AZI/ERI/TELI/GEN/CLIN/TET	<i>aadE</i> , <i>aph(3')-III</i> , <i>aph(2'')-Id</i>	-	<i>tet(O)</i>

Em relação à análise da sequência do gene *gyrA*, em todas as estirpes foi identificada a mutação Thr86Ile que está relacionada a resistência às quinolonas. Na estirpe S93.1.1 também foi detectada a mutação A2075G no gene 23S rRNA. Esta mutação ocasiona alteração do sítio de ligação dos macrolídeos à subunidade 23S rRNA desencadeando a resistência; como o sítio de ligação dos macrolídeos no 23S rRNA se sobrepõe ao sítio de ligação das lincosamidas, essa mutação também está relacionada ao fenótipo de resistência às lincosamidas justificando o fenótipo de resistência à azitromicina, eritromicina, telitromicina e clindamicina observado na estirpe S93.1.1. O gene *cmeB*, que codifica uma bomba de efluxo relacionada ao

fenótipo de multirresistência, só foi detectado nos genomas de *C. coli* estudados (Tabela 8).

Tabela 8 - Avaliação da presença do gene *cmeB* e de mutações pontuais nos genes *gyrA* e 23S rRNA nos genomas estudados.

ID	Espécie	Perfil resistência	Mutações pontuais		<i>cmeB</i> ¹
			<i>gyrA</i> - Thr86Ile	23S rRNA - A2075G	
A19.1.3	<i>C. coli</i>	CIP / TET	+	-	+
A44.1.4	<i>C. jejuni</i>	CIP / TET	+	-	-
A73.1.2	<i>C. jejuni</i>	-	+	-	-
A89.1.1	<i>C. jejuni</i>	NAL / CIP / TET	+	-	-
A89.1.3	<i>C. jejuni</i>	NAL / CIP / TET	+	-	-
S93.1.1	<i>C. coli</i>	CIP/AZI/ERI/TELI/GEN/CLIN/TET	+	+	+

1 - Gene *cmeB* codificador de um bomba de efluxo relacionada ao fenótipo de multirresistência.

Em relação à predição *in silico* dos genes de virulência, no Quadro 3 são apresentados os genes detectados nos genomas estudados segundo função das proteínas codificadas. Pode-se observar que enquanto alguns genes foram detectados em todos os genomas incluindo os genes codificadores da toxina citolética distensiva, alguns foram detectados apenas nas estirpes de *C. jejuni* sendo estes relacionados à adesão, invasão, captação de ferro, biossíntese e transporte de cápsula, flagelo, lipoproteína e proteínas de glicosilação. No entanto, apenas dois genes foram detectados exclusivamente nos genomas de *C. coli* estudados, *pseD* e *pseE*, sendo estes relacionados à glicosilação flagelar.

Quadro 3 - Fatores de virulência detectados pela predição *in silico*.

Função	Genes	<i>Campylobacter jejuni</i>				<i>Campylobacter coli</i>	
		A89.1.3	A73.1.2	A44.1.4	A89.1.1	A19.1.3	S93.1.1
Adesão	<i>cadF</i>	X	X	X	X		
Toxina citoletal distensiva	<i>cdtA, cdtB, cdtC</i>	X	X	X	X	X	X
Quimiotaxia	<i>cheA</i>	X	X	X	X		
	<i>cheV, cheW, cheY</i>	X	X	X	X	X	X
Sistema de captação de haemin	<i>chuA, chuD</i>	X	X	X	X		
	<i>chuB, chuC, chuZ</i>	X	X	X	X	X	
Invasão	<i>ciaB</i>	X	X	X	X		
	<i>ciaC</i>	X	X	X	X	X	X
Captação de ferro	<i>ctuA</i>	X	X	X	X		
Biossíntese e transporte de cápsula	<i>gmhA, hddA, hddC, hldE, kpsM, kpsS, kpsT</i>	X	X	X	X	X	X
	<i>cysC, eptC, kpsC, kpsD, kpsE, kpsF</i>	X	X	X	X		
Flagelo	<i>flaB, flaC, flaD, flaG, flgA, flgB, flgC, flgD, flgE, flgG, flgH, flgI, flgJ, flgK, flgM, flgP, flgQ, flgR, flgS, flhA, flhB, flhG, fliA, fliD, fliE, fliF, fliG, fliH, fliI, fliL, fliM, fliN, flip, fliQ, fliR, fliS, fliW, motA, plfA</i>	X	X	X	X	X	X
	<i>flhF, fliY, motB</i>	X	X	X	X		
Glicosilação flagelar	<i>maf, neuA, neuB, neuC, pseA, pseB, pseC, pseF, pseG, pseH, pseI, ptmA, ptmB</i>	X	X	X	X	X	X
	<i>pseD, pseE</i>					X	X
Lipoproteína	<i>flpA, jlpA</i>	X	X	X	X		
Proteína de ligação periplásmica	<i>pebA</i>	X	X	X	X	X	
Glicosilação	<i>pglA, pglC, pglD, pglE, pglH, pglI, pglJ</i>	X	X	X	X	X	X
	<i>pglB, pglF, pglG</i>	X	X	X	X		
Proteína de membrana externa	<i>porA</i>	X	X	X	X		
Fator RNA polimerase	<i>rpoN</i>	X	X	X	X	X	

5. DISCUSSÃO

Nos últimos anos a campilobacteriose no Brasil não tem tido a mesma importância em termos de aprofundamento de pesquisas quando comparada a outras doenças transmitidas por alimentos. Em registros oficiais, por não ter diagnóstico preciso, a causa certamente está subestimada. Ao comparar com dados mundiais observamos que *Campylobacter* é o agente bacteriano que mais causa doenças transmitidas por alimentos em humanos (WHO, 2017), sendo no presente estudo, encontrada uma frequência de ocorrência bastante relevante em carne de aves e considerável em carnes de suíno, sem diferenças entre os cortes no caso de carne suína, porém no caso de cortes de frango a asa apresentou a maior contaminação (36%) quando comparada aos outros tipos de cortes.

A frequência de isolamento de 29,5% (31/105) de *Campylobacter* spp. em cortes de carne de frango no presente estudo foi semelhante ao descrito em estudo realizado na China por Bai *et al.* (2014) no qual os autores descreveram 26,3% (63/240) de amostras positivas e também ao descrito por Szczepanska *et al.* (2017) na Polônia de 33,3% (144/433) em 2017 e por Narvaez-Bravo *et al.* (2017) com 23,5% (48/204) no Canadá neste mesmo ano. Frequências superiores como 76% (270/355) foram descritas por Guyard-Nicodeme *et al.* (2015) na França e na Argentina por Zbrun *et al.*, (2013) que descreveram 83% (25/30) de positividade em amostras oriundas de carne de frango.

Em estudo realizado na Suíça em 2003 foi observada uma frequência de isolamento de *Campylobacter* em cortes de carne de frango de 22% (91/415) (LEDERGERBER *et al.*, 2013). Este mesmo grupo de pesquisa durante períodos anteriores de estudo encontraram uma frequência de ocorrência de *Campylobacter* em amostras de carne de frango com tendência a diminuir, tendo sido encontrada 60,2% (97/161) de isolamento em 2009 e 32% (18/150) em 2013 (ANDRZEJEWSKA, 2015), os autores sugeriram que esta redução seja decorrente da implementação dos padrões de qualidade e higiene da União Europeia durante o período do estudo.

A grande variação entre os resultados ao redor do mundo mostra que a contaminação ocorre independente do patamar de evolução socioeconômica do país,

sendo que em todos estes estudos as respectivas populações encontram-se em importante risco de contaminação. Diversas pesquisas mostraram a maior susceptibilidade da carne de frangos a contaminação por *Campylobacter* pela colonização já no organismo do animal e pelas diferentes etapas do processo de transporte e do abate onde ocorre a contaminação cruzada. Desta forma, mostra-se imprescindível um programa que vise a diminuição da contaminação dos animais ainda dentro das granjas (BRYAN e DOYLE, 1995; CORTEZ, 2006; POWELL *et al.*, 2012).

A frequência de isolamento de *Campylobacter* spp. em carne suína no presente estudo foi de 7% (7/115). Este achado mostrou-se pouco mais elevado que a frequência descrita nos Estados Unidos por Noormohamed e Fakhr (2013) que descreveram 2% (2/100) de amostras positivas. Em um amplo estudo realizado neste mesmo país de 2002 a 2007 por Zhao *et al.* (2010) foi encontrado 0,3% de bistecas contaminadas (20/6148) assim como o isolamento de apenas 1,6% de *Campylobacter* spp. em amostras de carne suína coletadas entre 2001 e 2006 na Coréia, o qual foi descrito por Hong *et al.* (2007). Apenas um grupo de autores descreveu uma frequência de isolamento ligeiramente maior (9,1%) em carne suína na Nova Zelândia em 2007 (WONG *et al.*, 2007). Existe na literatura uma quantidade muito menor de dados sobre frequência de isolamento de *Campylobacter* em carne suína quando comparamos a carne de frango, muito provavelmente a baixa frequência geralmente reportada não tenha incentivado as pesquisas da mesma forma que para outras origens de contaminação.

Avaliando a resistência a antimicrobianos, foi observado que todas as estirpes foram sensíveis ao florfenicol e apenas nove estirpes (15%) foram sensíveis a todos os antimicrobianos estudados. Considerando o critério de multirresistência descrito por Schwarz *et al.* (2010), foram identificadas nove estirpes (15%) multirresistentes, sendo cinco identificadas como *C. jejuni* e quatro como *C. coli*. Sendo importante mencionar duas estirpes de *C. coli* que se mostraram resistentes a sete dos nove antimicrobianos estudados.

Comparando apenas as amostras isoladas de carne de frango no presente estudo, foi observada uma alta resistência a ciprofloxacina (76%), sendo maior a

resistência nas amostras de *C. coli* 90% (18/20) quando comparada a resistência das amostras de *C. jejuni* 65,5% (19/29). Estes dados estão de acordo com estudo realizado na Polônia com 74,1% (40/54) de resistência em *Campylobacter* spp. a este mesmo antibiótico (SZCZEPANSKA et al., 2017), porém sendo mais alta que achados descritos na Suíça 28,7% (26/91) (LEDERGERBER et al., 2003), Áustria 47% (RESISTENZMONITORING, 2001) e Dinamarca 23% (10/44) (NARVAEZ-BRAVOA et al., 2017). Na China, Ma et al., (2017) descrevem 100% (31/31) das estirpes resistentes a ciprofloxacina em estirpes de *C. jejuni* isoladas de diferentes cortes de frango.

Em relação a tetraciclina o presente estudo identificou 45% (27/60) de resistência dentre as estirpes de *Campylobacter*, o que se mostra de acordo com o encontrado na Áustria (RESISTENZMONITORING, 2001), maior que o encontrado na Suíça 20,6% (LEDERGERBER et al., 2003) e na Dinamarca 7% (DANMAP, 2002). Sendo que todos estes foram menores que a resistência de 66% encontrada nos Estados Unidos para este antibiótico (CODEX, 2003). A resistência a este antibiótico se mostrou a segunda mais frequentes para as estirpes oriundas de carne de frango, 39% (19/49) sendo que destas, as amostras de *C. coli* e *C. jejuni* mostraram frequência de resistência semelhante, 55% (11/20) e 58,6% (17/29) respectivamente.

A resistência a ciprofloxacina e tetraciclina também foi identificada nas estirpes de *Campylobacter* isoladas de carne suína, representando 73% (8/11) das estirpes em ambos antimicrobianos. Os dados encontrados estão de acordo com outros estudos como o de Payot et al. (2004) que encontraram 79% (95/120) de *Campylobacter coli* isolados de suínos em fase de terminação em granjas na França resistentes a tetraciclina.

Cloak e Fratamico (2002) correlacionaram o aumento no número de amostras isoladas de suabes retais de suínos que se mostraram resistentes a ciprofloxacina ao uso veterinário da enrofloxacin, uma vez que boa parte administrada deste antimicrobiano é metabolizado e fica disponível no organismo do animal como ciprofloxacina. Ainda neste estudo foi observado um índice similar de resistência em *C. jejuni* e *C. coli* à eritromicina (63%), sugerindo associação ao amplo uso da tilosina,

pertencente também ao grupo dos macrolídeos. Estes autores observaram ainda uma elevada resistência para gentamicina (50%).

A resistência a tetraciclina também prevaleceu em um estudo realizado nos Estados Unidos em que é descrito 83.7% (113/135) dos isolados de *C. jejuni* oriundos de fezes de bovinos resistentes a este antimicrobiano (CHA *et al.*, 2017). Este mesmo grupo observou 61,7% de isolados de *C. jejuni* oriundos de amostras de humanos sendo também resistentes a tetraciclina (CHA *et al.*, 2016). Em estudo com estirpes de *Campylobacter* isolados de humanos, SZCZEPANSKA *et al.* (2017), descreveram a frequência de resistência a tetraciclina em isolados de *C. coli* e *C. jejuni* oriundos na Polônia, de 42,9% (3/7) e 39,1%(36/92), respectivamente, e de resistência em 71,4% (5/7) e 65,2% (60/92) para ciprofloxacina nas duas espécies. Esta ampla resistência em estirpes de *C. coli* e *C. jejuni* provenientes de diferentes origens mostram que a ampla utilização das quinolonas e tetraciclins levou ao crescimento da resistência generalizada.

A utilização de antibióticos pela indústria de aves e suínos é motivo de grande preocupação. A União Europeia proibiu em 2006 o uso de antimicrobianos como melhoradores de crescimento em animais de produção, sendo assim, todos os países exportadores deveriam seguir as mesmas regras. De acordo com a definição da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2002; apud GOMES, 2004), Antibióticos Promotores de Crescimento são “agentes antibióticos utilizados com o propósito de aumentar o ganho de peso diário ou a eficiência alimentar (taxa de ganho de peso em razão da alimentação) em animais produtores de alimentos”. (GOMES, 2004). O governo dos Estados Unidos proibiu a utilização de antibióticos com este fim em 2006 sendo que grande pressão vem de grandes empresas de alimento por uma demanda da própria população.

Hoje no Brasil ainda existem muitos antibióticos utilizados de maneira ampla, diferente da estratégia pontual da utilização terapêutica. Seja como promotores de crescimento (exemplo: halquinol, tilosina, colistina, tiamulina e salinomina) ou como uso profilático (colistina, clortetraciclina, tiamulina, norfloxacina, leucomicina, amoxicilina e florfenicol). Algumas empresas vêm testando alternativas como

probióticos, óleos essenciais e ácidos orgânicos para reduzir este consumo, porém a realidade do manejo da produção de proteína animal do país ainda mostra uma deficiência para alcançarmos este objetivo.

A técnica de polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) tem sido aplicada em estudos de diversidade genética dos diferentes microorganismos e por isso pode ser muito útil em estudos envolvendo agentes causadores de doenças transmitidas por alimentos, como o *Campylobacter*. Dentre as estirpes de *C. jejuni* avaliadas no presente estudo foi observada uma similaridade genética maior de 80%, sendo o mesmo observado para as estirpes de *C. coli*, dados maiores que a similaridade intra cluster encontrada para *C. jejuni* de 37% e de 70% para *C. coli* em um estudo da Suíça também com técnicas de AFLP (WITTE et al., 2005). On e Harrington (2000) também sugeriram uma similaridade genética menor que o presente estudo entre os clusters por espécie de *Campylobacter*, em uma publicação onde utilizaram a mesma técnica de AFLP e descreveram que a inspeção dos perfis das estirpes de *Campylobacter* estudadas revelou um alto grau de polimorfismo genético.

A análise filogenética de Pergola et al. (2017) através da técnica de polimorfismo do comprimento fragmento amplificado (AFLP) mostrou uma similaridade genética de 70% entre estirpes de *C. coli* e *C. jejuni*, enquanto no presente estudo encontramos uma similaridade de 75% e um agrupamento dos isolados de *C. coli* em 10 perfis e de *C. jejuni* em 15, mostrando uma dispersão genética maior que o observados por Pergola et al. (2017) que agrupou os 140 isolados de *C. coli* e *C. jejuni* em seis e quatro clusters respectivamente. De modo semelhante ao presente estudo, em que se observou uma forte tendência de agrupamento por mercado de origem, estes autores conseguiram correlacionar as estirpes com cada rebanho de origem (PERGOLA et al., 2017).

Cento e trinta isolados de *Campylobacter* foram agrupados em 10 clusters através da análise por polimorfismo de restrição de fragmentos amplificados a partir do gene fla-A (flaA-RFLP) na Tailândia, sugerindo que neste caso a transmissão horizontal seria a principal rota (THOMRONGSUWANNAKIJ et al., 2017).

Em estudo conduzido na China, Ma *et al.* (2017) encontraram uma grande diversidade genética entre os isolados de *C. jejuni* oriundos de diferentes cortes de carne de frango, analisados pela técnica de MLST, o que mostra uma ampla dispersão e reforça a necessidade de intervenções para redução da prevalência de *Campylobacter* no país.

Os complexos clonais encontrados no presente estudo foram ST-21, ST-353 e ST-828 sendo que estes dois últimos apareceram em duas das seis estirpes avaliadas, sendo de *C. jejuni* e *C. coli* respectivamente. Este achado está de acordo ao estudo de Ma *et al.* (2017) que identificaram ST-21, ST-353 e a ST-828, além de ST-354, ST-443 e ST-607 em estirpes de *C. jejuni* isoladas de cortes de carne de frango (MA *et al.*, 2017). Estudo realizado na Tailândia (PRACHANTASENA *et al.*, 2017) também identificou ST-353 em estirpes de *Campylobacter* oriundas de carne de frango, além de ST-45, ST-354 e ST-574. Esta sequência tipo (ST-353) é frequentemente descrita em um dos complexos clonais mais comuns recuperados de casos de humanos e aves (SHEPPARD *et al.*, 2009; RAGIMBEAU *et al.*, 2008). A ST-21 também é extensivamente identificada e associada a infecções em humanos ao redor do mundo. Grandes estudos populacionais, no entanto, indicam que, embora certos complexos clonais possam colonizar múltiplas fontes de infecção, as sequências tipo ST-21 e ST-45 da maioria dos isolados *Campylobacter* são associadas a aves e podem ser diferenciadas de estirpes de ruminantes e ambientais (COLLES e MAIDEN, 2012). Guyard-Nicodeme (2015) descreveu uma alta frequência da ST-21 (43%) em isolados de *C. jejuni* em um estudo realizado na França, enquanto Larena *et al.* (2015) descrevem 9,2% dos isolados identificados como ST-21 na Finlândia.

Noormohamed e Fakhr (2014) descreveram a maioria dos complexos clonais analisados de isolados de *C. jejuni* agrupados em ST-353, ST-607, ST-52, e ST-61, mostrando novamente a importância do ST-353. Estes achados estão de acordo com o encontrado em diversos outros estudos sobre a frequência de ocorrência de ST-353 e ST-21 em isolados de *C. jejuni* (CARRILO *et al.*, 2012; BEHRINGER *et al.*, 2011). A maioria das infecções em humanas são causadas por isolados de *Campylobacter* associados à ST-828 e ST-1150, sendo que a ST-828 é também associada a isolados oriundos de carne de frango (COLLES e MAIDEN, 2012). O que mostra a importância

de técnicas como o MLST na epidemiologia da campilobacteriose da atualidade ao redor do mundo devido a sua capacidade de dispersão. Parece que os genótipos de *Campylobacter* obtidos a partir do MLST estão distribuídos por diferentes continentes colonizando hospedeiros e alimentos (MCCARTHY et al., 2007 apud COLLES e MAIDEN, 2012).

As seis estirpes sequenciadas foram também analisadas quanto a presença de genes de virulência, sendo que todas elas, tanto *C. coli* quanto *C. jejuni* apresentaram genes para produção da toxina citolética distensiva (*cdtA*, *cdtB* e *cdtC*). O presente estudo observou resultados similares ao encontrado por Ripabelli et al. (2010) que descreveu uma alta frequência de ocorrência dos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* nas estirpes de *C.jejuni* e *C.coli* estudadas, sendo 80% e 87,5% respectivamente (WYSOK et al., 2015). Jain et al. (2008) e Gonzalez-Hein et al. (2014) afirmaram que o gene *cdtB* desempenha um papel essencial no efeito citotóxico, pois não encontraram citotoxicidade causada por *C. jejuni* isolada de gado que possuíam apenas os genes *cdtA* e *cdtC*. Estes autores acima mencionados também concluíram que para a atividade máxima de citotoxicidade é necessário que os três genes estejam presentes, verificando uma falha na atividade citotóxica de duas estirpes de *C. coli* oriundas de suínos, que estavam sem ao menos um dos três genes (WYSOK et al., 2015).

Além dos genes *cdt*, as estirpes de *C. jejuni* apresentaram vários genes de virulência relacionados à adesão, invasão, captação de ferro, biossíntese e transporte de cápsula, flagelo, lipoproteína e proteínas de glicosilação. Este achado encontra-se de acordo com o encontrado por Frazão et al. (2017) que descreveram todas as 111 estirpes de *C. jejuni* estudadas contendo os genes *flaA* e *flhA* (flagelo) e *ciaB* (invasão) entre outros. Frazão et al. (2017) e Zeng et al. (2016) que também descreveram genes relacionados a adesão, flagelos, invasão, além de outros ligados a transferência de proteína por exemplo, corroborando com os achados de alta virulência das estirpes de *C. jejuni*. Em bactérias do gênero *Campylobacter* a motilidade é reconhecida como um importante fator de virulência (VAN VLIET e KETLEY, 2001) e isolados oriundos de frango no estudo de Stef et al. (2013) mostraram ser altamente móveis, além de bastante invasivos. No presente estudo as seis estirpes de *C. coli* e *C. jejuni* apresentaram genes relacionados a flagelo e glicosilação flagelar.

Apenas dois genes foram detectados exclusivamente nos genomas de *C. coli* estudados, *pseD* e *pseE*, sendo estes relacionados à glicosilação flagelar. Porém as duas estirpes analisadas apresentaram menos genes ligados a quimiotaxia, invasão (*ciaC*), biossíntese e transporte de cápsula, flagelo e glicosilação. Estes achados podem estar relacionados ao encontrado por Zhang *et al.* (2016) que observaram uma menor virulência das estirpes de *C. coli* quando comparadas às de *C. jejuni*. Sendo que estes autores também descreveram a menor frequência de genes ligados a invasão (*ciaB*, *iamA*) e quimiotaxia (ZHANG *et al.* 2016). Um número menor de estudos reporta a distribuição de fatores de virulência em *C. coli* (ZHANG *et al.*, 2016) quando comparado ao número de estudos em *C. jejuni*, mas foi possível observar que o potencial de virulência das estirpes de *C. coli* analisadas no presente estudo e nos últimos estudos citados é menor que o descrito para estirpes de *C. jejuni*.

6. CONCLUSÕES

- A frequência de isolamento de *Campylobacter spp.* foi maior em cortes de carne de frango que em cortes de carne suína.
- Todas as estirpes isoladas foram identificadas com total concordância pela PCR e pelo MALDI-TOF MS nas espécies *C. jejuni* e *C. coli*.
- Foram observadas altas taxas de resistência a ciprofloxacina e tetraciclina nas duas espécies de *Campylobacter* avaliadas, observando-se apenas 15% de estirpes multirresistentes.
- A caracterização genética pelo AFLP revelou uma tendência de agrupamento das estirpes de *C. jejuni* e *C. coli* de acordo com os mercados de origem.
- Apesar do grande número de STs identificados para o gênero *Campylobacter*, os STs identificados em cinco das seis estirpes do presente estudo pertencem a complexos clonais descritos em aves e em infecções em seres humanos em diferentes países.
- As estirpes avaliadas apresentaram uma ampla gama de genes de virulência, sendo que dez dos genes pesquisados foram identificados apenas nas estirpes de *C. jejuni*.

7. BIBLIOGRAFIA

ALTEKRUSE, S.F; SWERDLOW, D.L; STERN, N.J. Microbial food borne pathogens. *Campylobacter jejuni*. **Veterinary Clinical North American Food Animal Practice**, v.14, p. 31-40, 1998.

ALTEKRUSE, S.F; STERN, N.J; FIELDS, P.I; SWERDLOW, D.L. *Campylobacter jejuni* an emerging foodborne pathogen. **Emerging Infectious Diseases Review**, v. 5, p. 28-35, 1999.

ANDRZEJEWSKA, M. et al. Trends in the occurrence and characteristics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from poultry meat in Northern Poland. **Food Control**, v. 51, p. 90-194, 2015.

BAI, Y; CUI, S; XU, X; LI, F. Enumeration and Characterization of *Campylobacter* species from retail Frango carcasses in Beijing,China. **Foodborne pathogens and disease**, v.11, 2014.

BEHRINGER, M.; MILLER, W.G.; OYARZABAL, O.A. Typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from live broilers and retail broiler meat by flaA-RFLP, MLST, PFGE and REP-PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v. 84, p. 194–201, 2011.

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

BOOM, R. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 28, n.3, p. 495-503, 1990.

BRYAN, F.L; DOYLE, M.P. Health risks and consequences of Salmonella and *Campylobacter jejuni* in raw poultry. **Journal of Food Protection**, v. 58, p. 326–344, 1995.

BUTLER, J.P; SKIROW, M.B. *Campylobacter enteritis*. **Clinical Gastroenterology**, v. 8, p. 737-765, 1979.

CAMPOS, F.R. **Isolamento e caracterização de *Campylobacter* spp. em amostras de fezes e carcaças de suínos provenientes de abatedouros do estado de São Paulo**. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo, São Paulo, 47p, 2006.

CARRILLO, C.D. et al. A framework for assessing the concordance of molecular typing methods and the true strain phylogeny of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* using draft genome sequence data. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.2, n.57, 2012.

CARVALHO, A.C.F.B; LIMA, V.H.C; PEREIRA, G.T. Determinação dos principais pontos de risco de contaminação de frangos por *Campylobacter*, durante o abate industrial. **Revista Higiene Alimentar**, v.16, p. 89-94, 2002.

CASON, J.A; BAYLEY, J.S; STERN, N. J; WHITEMORE, A.D; COX, N.A. Relationship between aerobic bacteria, *Salmonella* and *Campylobacter* on broiler carcasses. **Poultry Science**, v.76, p. 1037-1041, 1997.

CDC – CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Campylobacter*, General Information. Disponível em: <http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/campylobacter/>. Acesso em 20 de agosto de 2015.

CDC – Center for Disease Control and Prevention - Foodborne Disease Active Surveillance Network. Surveillance Report (Final Data), 2015.

CHA, W. et al. Antimicrobial susceptibility profiles of human *Campylobacter jejuni* isolates and association with phylogenetic lineages. **Frontiers in Microbiology**, v.7, 2016.

CHA, W. et al. Comparing the genetic diversity and antimicrobial resistance profiles of *Campylobacter jejuni* recovered from cattle and humans. **Frontiers in microbiology**, v.8, p.818, 2017.

CHAMOVITZ, B.N. et al. *Campylobacter jejuni* associated hemolytic-uremic syndrome in a mother and daughter. *Pediatrics*, v.71, n.2, p. 253-256, 1983.

CHEN L.H; et al. VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis-10 years on. **Nucleic Acids Research**, v.44, 2016.

CLOAK, O. M.; FRATAMICO, P. M. A multiplex polymerase chain reaction for the differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from a swine processing facility and characterization of isolates by pulsed-field gel electrophoresis and antibiotic resistance profiles. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 65, n.2, 2002.

CODEX COMMITTEE ON FOOD HYGIENE. Presence of antimicrobial resistant pathogens in chicken sold at retail: a report on tests by CI members in Australia and the United States. **Information Paper presented by Consumers International to the Codex Committee on Food Hygiene 35th Session**, Orlando. USA, 2003.

COLLES, F.M.; MAIDEN, M.C.J. *Campylobacter* sequence typing databases: Applications and future prospects. **Microbiology**, v.158, p. 2695–2709, 2012.

CORTEZ, A.L.L. et al. Survey of Frango abattoir for the presence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.48, n.6, p.307-310, 2006.

COSTA, C.A.R. **Avaliação da exposição do consumidor à *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. e *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga em produtos cárneos refrigerados comercializados no município de São Paulo**. Tese de doutorado. Faculdade de ciências farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

DANMAP 2002 – Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark. Disponível em: http://www.danmap.org/~media/Projekt%20sites/Danmap/DANMAP%20reports/Danmap_2002.ashx. Acesso em 13 de junho de 2016.

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

DEKEYSER, P. et al. Acute enteritis due to related vibrio: first positive stool cultures. **Journal of Infectious Diseases**, v. 125, p. 390-392, 1972.

DINGLE, K. E. et al. Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p.14–23, 2001.

DUIM, B. et al. Amplified fragment length polymorphism analysis of *Campylobacter jejuni* strains isolated from Frangos and patients with gastroenteritis or Guillain-Barré or Miller Fisher syndrome. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 3917-3923, 2000.

EFSA. *Campylobacter*. Disponível em http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate_publications/files/factsheetcampylobacter.pdf. Acessado em 02 de julho de 2013.

FITZGERALD, C. et al. Evaluation of methods for subtyping *Campylobacter jejuni* during an outbreak involving a food handler. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.7, p. 2386-90, 2001.

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

FRASER, A.D.E; BROOKS, B.W; GARCIA, M.M; LIOR, H. Molecular discrimination of *Campylobacter coli* serogroup 20 biotype I (Lior) strains. **Veterinary Microbiology**, v.30, p.267-280, 1992.

FRAZÃO, M.R. et al. Pathogenic potential and genotypic diversity of *Campylobacter jejuni*: a neglected food-borne pathogen in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v.66, p.350-359, 2017.

FREITAS, J.A; NORONHA, G.N. Ocorrência de *Campylobacter* spp. em carne e miúdos de frango expostos ao consumo em Belém, Pará. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**; v. 59, 2007.

GENOVEZ, M.E; SCARCELLI, E; ROJAS, S. Campilobacteriose genital: proposta de diagnóstico mais sensível em touros. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 56, p.5-7, 1989.

GISLLEPIE, I. et al. A case comparison of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* infection: a tool for generating hypothesis. **Journal Emerging Infection Diseases**, v.8, p. 937-942, 2002.

GOMES, D.M. **Resíduos de antibióticos promotores de crescimento em produtos de origem animal**. Monografia apresentada para a obtenção do certificado de Especialista em Qualidade em Alimentos, 2004.

GOMES, M.J.P. Gênero *Campylobacter* spp. Porto Alegre. Documento impresso, 46p, 2013.

GONÇALVES, K. O. et al. Pesquisa de *Campylobacter* spp. em carnes de frango comercializados na cidade de Campo Mourão-PR. **Alimentos e Nutrição**, v.23, n.2, p. 211-216, 2012.

GONZALEZ-HEIN, G; et al. Prevalence of virulence genes in strains of *Campylobacter jejuni* isolated from human, bovine and broiler. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.44, p. 1223-1229, 2014.

GUYARD-NICODÉME, M. et al. Prevalence and characterization of *Campylobacter jejuni* from Frango meat sold in French retail outlets. **International Journal of Food Microbiology**, v.203, p.8-4, 2015.

HARRINGTON, C. S; THOMSON-CARTER, F. M; CARTER, P.E. Evidence for recombination in the flagellin locus of *Campylobacter jejuni*: implications for the flagellin gene typing scheme. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 2386–2392, 1997.

HOLT, J.G. et al. **Group 2: aerobic/microaerophilic, motile, helical/vibroid Gram negative bacteria**. In Bergey's manual of determinative bacteriology, Baltimore, Md; Willians and Wilkins. 39-63, 1994.

HONG, J.; et al. Prevalence and antibiotic resistance of *Campylobacter* spp. isolated from chicken meat, pork and beef in Korea, from 2001 to 2006. **Journal of Food Protection**, v.70, p. 860–866, 2007

JAIN, D; et al. Differences in virulence attributes between cytolethal distending toxin positive and negative *Campylobacter jejuni* strains. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, p. 267-272, 2008.

KIM, H.J. et al. Prevalence and characterization of *Campylobacter* spp. isolated from domestic and imported poultry meat in Korea, 2004-2008. **Foodborne pathogens and disease**, v. 7, n.10, 2010.

KONELL, K. et al. Detection of thermophilic *Campylobacter* sp. in raw chicken sausages by methods ISO 10272: 2006 in Curitiba – Parana State – Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.45, n.4, 2012.

KONKEL, M.E. et al. The Pathogenesis of *Campylobacter jejuni*-Mediated Enteritis. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v. 2, p.55-71, 2001.

KRAMER, J.M; et al. *Campylobacter* contamination of raw meat and poultry at retail sale: identification of multiple types and comparison with isolates from human infection. **Journal of Food Protection**, v. 63, p.1654-1659, 2000.

LAM, K.M; YAMAMOTO, R; DAMASSA, A.J. DNA diversity among isolates of *Campylobacter jejuni* detected by PCR-based RAPD fingerprint. **Veterinary Microbiology**, v. 45, p. 269-274, 1995.

LLARENA, A. et al. Predominant *Campylobacter jejuni* sequence types persist in Finnish chicken production. **Journal Plos One**, doi:10.1371/journal.pone.0116585, 2015.

LARSEN, M.V. Multilocus sequence typing of total genome sequenced bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v.50, p.1355-1361, 2012.

LEDERGERBER, U. et al. Risk factors for antibiotic resistance in *Campylobacter* spp. Isolated from raw poultry meat in Switzerland. **BMC Public Health**, v.3, n.39, 2003.

LEVY, A.J. A gastro-enteritis outbreak probably due to a bovine strain of vibrio. **Yale Journal Biology and Medicine**, v.18, p. 243-258, 1946.

LIOR, H. *Campylobacters* – epidemiological markers. **Dairy Food Environmental Sanitation**, v. 14, p. 317-324, 1994.

LOPES, N.A. *Campylobacter*. UFPEL, 2009 Disponível em: quimicadealimentos.files.wordpress.com/2009/08/campylobacter.doc. Acesso em 02 de julho de 2013.

LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Disponível em <http://www.bacterio.net/-allnamesac.html>. Acesso em 13 de junho de 2017.

MA, H; et al; Prevalence and characterization of *Campylobacter jejuni* isolated from retail chicken in Tianjin, China. **Journal of Food Protection**, 80, 6, 1032-1040, 2017.

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE. MTDLC - Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial de *Campylobacter*, 2011. Disponível online: <http://u.saude.gov.br/images/pdf/2015/janeiro/09/manual-tecnico-diagnostico-laboratorial-campylobacter.pdf>. Acesso em 20 de agosto de 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. MTDLC - Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, 2016. Disponível online: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/08/Apresenta----o-Surtos-DTA-2016.pdf>. Acesso em 10 de junho de 2017.

MEAD, G. *Campylobacter* update – the challenge. **International Poultry Production**; v.12, n.4, p.26-29, 2004.

NARVAEZ-BRAVOA, C; et al. Epidemiology of antimicrobial resistant *Campylobacter* spp. isolated from retail meats in Canada. **International Journal of Food Microbiology**, v.253, p. 43-47, 2017.

NOORMOHAMED, A; FAKHR, M. K. A higher prevalence rate of *Campylobacter* in retail beef livers compared to other beef and Suíno meat cuts. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.10, p.2058-2068, 2013.

NESBAKKEN, T.et al. Ocurrence of *Yersinia enterocolitica* and *Campylobacter* spp in slaughter pigs and consequences for meat inspection, slaughtering and dressing procedures. **International Journal of Food Microbiology**, v.80, p. 231-240, 2003.

NIELSEN, E.M. et al. Evaluation of phenotypic and genotypic methods for subtyping *Campylobacter jejuni* isolates from humans, poultry and cattle. **Journal Clinical Microbiology**, v.38, n. 10, p. 3800-3810, 2000.

NGUYEN. T.N.M. et al. Genotyping and antibiotic resistance of thermophilic *Campylobacter* isolated from chicken and pig meat in Vietnam. **Gut Pathogens**, v.8, n.19, 2016.

ON, S. L.; HARRINGTON, C.S. Identification of taxonomic and epidemiological relationships among *Campylobacter* species by numerical analysis of AFLP profiles. **FEMS Microbiology Letter**, v.193, p.161–169, 2000.

PARK, S.F; RICHARDSON, P.T. Molecular characterization of a *Campylobacter jejuni* lipoprotein with homology to periplasmic siderophore-binding proteins. **Journal of Bacteriology**, v.177, n.9, p.2259-2264, 1995.

PAYOT, S. et al Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter coli* isolated from fattening pigs in France. **Veterinary Microbiology**, v.101, p.91–99, 2004.

PERGOLA, S. et al. Genetic diversity and antimicrobial resistance profiles of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* isolated from broiler chicken in farms and at time of slaughter in central Italy. **Journal of Applied Microbiology**, doi:10.1111/jam.13419, 2017

PEZZOTI, G.et al. Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in animals and meat in northeastern Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, p. 281-287, 2003.

PINHEIRO, E.S. **Caracterização genética de estirpes de *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* isoladas de diferentes espécies animais**. Tese (doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 69p, 2003.

POWELL, L.F. et al. The prevalence of *Campylobacter* spp in broiler flocks and on broiler carcasses, and the risks associated with highly contaminated carcasses. **Epidemiology & Infection**, v.16, p.1-14, 2012.

PRACHANTASENA, S. et al. Distribution and Genetic Profiles of *Campylobacter* in Commercial Broiler Production from Breeder to Slaughter in Thailand. **Journal Plos One**, doi.org/10.1371/journal.pone.0149585, 2017.

RAGIMBEAU, C. et al. Multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and fla short variable region typing of clonal complexes of *Campylobacter jejuni* strains of human, bovine, and poultry origins in Luxembourg. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n.24, p.7715–7722, 2008

RESISTENZ MONITORING. **A comprehensive survey on the resistance behavior of selected zoonotic agents, indicator bacteria and utero-pathogenic germs in the Styrian farm animal population**. REMOST 2001.

RIPABELLI, G. et al. Prevalence of virulence-associated genes and cytolethal distending toxin production in *Campylobacter* spp. isolated in Italy. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.33, p. 355-364, 2010.

SCANLON K.A. et al. Occurrence and characteristics of fastidious Campylobacteraceae species in porcine samples. **International Journal of Food Microbiology**, v.163, p.6-13, 2013.

SCARCELLI, E. et al. Avaliação do potencial de disseminação de *Campylobacter* spp por diferentes espécies animais. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.65, p.55-61, 1998.

SCARCELLI, E. et al. Molecular subtyping of *Campylobacter jejuni* subsp *jejuni* isolated from different animal species in the state of São Paulo, Brazil, **Brazilian Journal of Microbiology**, 36, 378-382, 2005.

SCHIELLERUP, P; KROGFELT, K.A; LOCHT, H. A comparison of self-reported joint symptoms follows an infection with different enteric pathogens: effects of HLA-B27. **The Journal of Rheumatology**, v.35, p.480-487, 2008.

SEBALD, M; VÉRON, M. Teneur en bases de l'ADN et classification des vibrions. **Annales de l'Institut Pasteur**, v.105, p. 897-910, 1963.

SILVA, D.T. et al. Ocorrência de *Campylobacter* em carne de frango, fezes de frango e humanas e pesquisa dos genes cdt. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.66, p. 297-304, 2014.

SILVA, G.O. et al. Detecção de fatores de virulência em estirpes de *Campylobacter* spp. Isoladas de carcaças de suínos abatidos em frigoríficos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, n.5, p. 1209-1215, 2012.

SKIRROW, M.B. *Campylobacter enteritis*: A “new” disease. **Brazilian Medical Journal**, v. 2, p. 9-11, 1977.

SHEPPARD, S.K. et al. *Campylobacter* genotypes from food animals, environmental sources and clinical disease in Scotland 2005/6. **International Journal of Food Microbiology**, v.134, p. 96–103, 2009.

SKIRROW, M.B. Epidemiology of *Campylobacter enteritis*. **International Journal Food Microbiology**, v.12, p. 9-16, 1991.

STEF, L. et al. Virulence characteristics of five new *Campylobacter jejuni* chicken isolates. **Gut Pathogens**, v.5, 2013.

STEINBRUECKER, B; RUBERG, F; KIRST, M. Bacterial genetic fingerprint: a reliable factor in the study of the epidemiology of human *Campylobacter enteritis*? **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p. 4155-4159, 2001.

STERN, N.J. Reservoirs for *Campylobacter jejuni* and approaches for intervention in poultry, in Nachamkin I; Blaser M.J. and Thompkins L.S; and and L.S.Tompkins (eds). *Campylobacter jejuni*: current status and future trends. **American society for Microbiology**, Washington, D.C, 49-60, 1992.

SZCZEPANSKA, B. et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from children and environmental sources in urban and suburban areas. **BMC Microbiology**, v. 17, n.80, 2017.

TALUKDER, K.A. et al. Prevalence of virulence genes and cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* isolates from diarrheal patients in Bangladesh. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, p.1485-1488, 2008.

THOMRONGSUWANNAKIJ, T; BLACKALL P.J; CHANSIRIPORNCHAI N. A study on *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* through commercial broiler production chains in Thailand: antimicrobial resistance, the characterization of DNA gyrase Subunit A mutation, and genetic diversity by flagellin A gene restriction fragment length polymorphism. **Avian Diseases**, v.61, n.2, p.186-197, 2017

VAN VLIET, A.H; KETLEY, J.M. Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. **Symposium series (Society for Applied Microbiology)**, v.90, p. 45–56, 2001.

- VANDAMME, P; DE LEY, J. Proposal for a new family, Campylobacteraceae. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.41, p.451-455, 1966.
- VÉRON, M. Taxonomie numérique des vibrions et de certaines bactéries comparables. II. Corrélation entre les similitudes phénétiques et la composition en bases de l'ADN. **Ann. Inst. Pasteur**, v.111, p.671-709, 1966.
- VÉRON, M; CHATELAIN, R. Taxonomic study of the genus *Campylobacter* Sabald and Veron and designation of the type species, *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sabald and Véron. **International journal of systematic bacteriology**; v.23, p.122-134, 1973
- WANG, G. et al. Colony Multiplex PCR Assay for Identification and Differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *Fetus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n.12, p. 4744-4747, 2002.
- WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Burden of Disease. Disponível em: http://www.who.int/topics/global_burden_of_disease/en/ Acessado em 07 de julho de 2013.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION f. Antimicrobial resistance. Fact sheet n°194, jan. 2002. Disponível em: <http://www.who.int/>. Acesso em 12 dezembro 2016.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Campylobacter. Fact sheet n°255 updated December 2016. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/en/>. Acesso em 10 de abril de 2017.
- ZAIDI, M.B. et al. Antimicrobial-resistance *Campylobacter* in the Food Chain in Mexico. **Foodborne pathogens and disease**, v. 9, 2012.
- ZBRUN, M. V. et al. Occurrence of thermotolerant *Campylobacter* spp. at different stages of the poultry meat supply chain in Argentina. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 61, n. 6, 2013.
- ZENG, D; et al. Phenotypic characters and molecular epidemiology of *Campylobacter jejuni* in east China. **Journal of Food Science**. v.81, n.1, p. 106-113, 2016

ZHANG, T. et al. Molecular epidemiology, virulence determinants and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spreading in retail chicken meat in Central China. *Gut Pathogens*, v.8, 2016.

ZHAO, C. et al. Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, and *Salmonella* serovars in retail chicken, turkey, swine, and beef from the Greater Washington, D.C., area. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.5431-5436, 2001.

ZHAO, S. et al. Antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolates from retail meat in the United States: 2002–2007. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, p.7949–7956, 2010.

ZORMAN, T; MOZINA, S.S. Classic and molecular identification of thermotolerant *Campylobacters* from poultry meat. **Food Technology and Biotechnology**, v.40, n.3, p.177-184, 2002.

WITTEWER, M. et al. Genetic Diversity and Antibiotic Resistance Patterns in a *Campylobacter* Population Isolated from Poultry Farms in Switzerland. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.6, p.2840-2847, 2005

WONG, T.L. et al. Prevalence, numbers, and subtypes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in uncooked retail meat samples. **Journal of Food Protection**, v.70, p.566–573, 2007.

WYSOK, B; URADZINSKI, J; WOJTACKA J. Determination of the cytotoxic activity of *Campylobacter* strains isolated from bovine and swine carcasses in north-eastern Poland. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v.18, n.3, p. 579–586, 2015.