Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Ocorrência de *Arcobacter* spp. em carne de frango

Nicolle Ferraz de Arruda Padovani

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2019

Nicolle Ferraz de Arruda Padovani
Engenheira de Alimentos

Ocorrência de *Arcobacter* spp. em carne de frango

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:
Profª Drª.**CARMEN JOSEFINA CONTRERAS CASTILLO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Padovani, Nicolle Ferraz de Arruda

Ocorrência de *Arcobacter* spp. em carne de frango / Nicolle Ferraz de Arruda Padovani. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2019.

105 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Microbiologia de alimentos 2. Frango 3. Patógeno alimentar 4. Antimicrobiano 5. *Arcobacter* spp. I. Título

À minha família, em especial à minha querida filha Sofia,
que foi essencial para essa jornada tornando-a mais doce, leve e alegre.

Dedico e ofereço.

AGRADECIMENTOS

A Deus que me guiou em mais uma etapa de minha vida, sem Ele nada seria possível.

À minha orientadora Profa. Dra. Carmen Josefina Contreras Castillo pela orientação, dedicação e confiança.

À Dra. Neusely Silva e à Profa. Dra. Giovana Barancelli pelos ensinamentos, dedicação e confiança sempre que solicitadas.

Ao Prof. Dr. Luis Collado pelos ensinamentos, orientação e oportunidade de estágio no Laboratorio de *Campylobacteraceae* do Instituto de Bioquimica y Microbiogía da Universidad Austral de Chile (UACH) durante o processo de execução das análises moleculares e da árvore filogenética desse trabalho e pela confiança.

À minha tia Neliane Ferraz de Arruda Silveira que é meu exemplo como profissional.

À Denise de A. L. Baptista pela colaboração em toda parte prática, além disso, por me ouvir, me ensinar, me estimular e pela confiança.

Ao Laboratório de Higiene e Laticínios da ESALQ/USP e aos meus colegas e amigos Mayara, Thiago, Amanda, Melina e Vitoria que me ouviram, me animaram, se dedicaram e me ajudaram com as análises de laboratório durante essa etapa.

Ao Laboratorio de *Campylobacteraceae* do Instituto de Bioquimica y Microbiogía da Universidad Austral de Chile (UACH) e aos meus colegas e queridos amigos Sofia, Estefania e Boris que foram fundamentais durante a minha estadia em Valdivia-Chile e no aprendizado das análises molecurales desse trabalho.

Ao Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (LAN) da ESALQ/USP e todos os funcionários que de alguma forma contribuíram para a realização do meu trabalho.

Ao colega Erick Saldaña villa, pelo auxílio na análise estatística.

À Profa. Dra. Andrea Micke Moreno e à Profa. Dra. Terezinha Knöbl do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP) pelos controles positivos de *Arcobacter* spp. concedidos e utilizados nesse trabalho.

À Profa. Dra. Tsai e ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA-ESALQ/USP que permitiram e auxiliaram na realização de parte da análise de sequenciamento 16S.

Ao CNPq pela bolsa de Mestrado concedida.

A todos que, direta ou indiretamente, foram responsáveis pela realização desse projeto.

"Aprender é a única
coisa que a mente não se cansa,
nunca tem medo e nunca se arrepende"

Leonardo da Vinci

SUMÁRIO

RESUMO....9
ABSTRACT....10
LISTA DE FIGURAS....11
LISTA DE TABELAS....12
LISTA DE QUADROS....13
1.INTRODUÇÃO....15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA....17
2.1. *Arcobacter* spp. 17
2.2. Taxonomia....18
2.3. Epidemiologia....20
2.4. *Arcobacter* em humanos 24
2.5. *Arcobacter* spp. em alimentos e água....26
2.6. Resistência a antimicrobianos....32
3. OBJETIVOS.... 35
3.1. Objetivo geral.... 35
3.2. Objetivos específicos.... 35
4. MATERIAL E MÉTODOS 37
4.1. Coleta das amostras.... 37
4.2. Preparo das amostras de frango....39
4.2.1. Carcaças de frango inteiras 39
4.2.2. Cortes de frango....40
4.3 Isolamento de *Arcobacter* spp. adaptado de Houf et al. (2001)....40
4.4 Caracterização das culturas e preservação dos isolados 41
4.5 Identificação genotípica dos isolados....41
4.5.1 Preparo da cultura e extração do DNA 41
4.5.2 Reação de cadeia da polimerase (PCR) para o gênero *Arcobacter*....42
4.5.3 Detecção de espécies de *Arcobacter* spp. por multiplex PCR (mPCR)....43
4.5.4. Amplificação da região rRNA 16S pela reação em cadeia da polimerase (PCR) 44
4.5.5. Detecção de espécies dos gêneros *Arcobacter*, *Campylobacter* e *Helicobacter* pela técnica de PCR dos Polimorfismos na Longitude dos Fragmentos de Restrição (PCR-RFLP)....46
4.5.6. Sequenciamento do gene RNAr 16S 46
4.5.7 Análise Filogenética 47
4.6. Perfil fenotípico de resistência 47
4.6.1. Micro-organismos testados 47

4.6.2. Método de difusão em ágar 50
4.6.3. Análise estatística 52
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 53
5.1. Isolamento de *Arcobacter* 53
5.2 Identificação genotípica 54
5.2.1 PCR Convencional para *Arcobacter* spp. 54
5.2.2. Identificações das espécies dos isolados de *Arcobacter* spp. por m-PCR..... 57
5.2.3. Detecção de espécies dos gêneros *Arcobacter*, *Campylobacter* e *Helicobacter* pela técnica de PCR-RFLP 58
5.2.4. Identificação das espécies de *Arcobacter* por Sequenciamento do gene RNAr 16S 59
5.3. Análise do perfil fenotípico de resistência 67
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS 75
REFÊRENCIAS 77
ANEXOS 101

RESUMO

Ocorrência de *Arcobacter* spp. em carne de frango

Arcobacter spp., anteriormente conhecido como *Campylobacter* aerotolerante, é considerado um gênero bacteriano que inclui espécies consideradas patógenos emergentes que podem ser veiculados por alimentos. O gênero *Arcobacter* tem sido associado a gastroenterites, diarreia persistente e bacteremia em humanos. É uma bactéria Gram negativa, termosensível, embora possa sobreviver à 4ºC. No Brasil, há poucos estudos de ocorrência de *Arcobacter* em alimentos, inclusive os de origem animal, especialmente os mais consumidos, como as carnes de frango e suína. Existem estudos pontuais de sua ocorrência em produtos resfriados, como cortes e em carcaças de frango resfriadas do varejo. O objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de *Arcobacter* spp. em cortes e carcaças de frango refrigeradas e congeladas do varejo e em coxas de frango livres de antibiótico e orgânico refrigeradas provenientes de abatedouro, por técnica de isolamento convencional com posterior confirmação do gênero por reação de polimerase em cadeia (PCR). Foram analisadas 153 amostras de carne de frango, das quais 39,21% (59/153) resultaram positivas para o gênero *Arcobacter*. Foi obtido o total de sessenta e quatro isolados positivos para *Arcobacter* spp., que corresponderam a 89,06% (57/64) de *A. lacus*, 4,7% (3/64) de *A. thereius*, 3,12% (2/64) de *A. butzleri,* e 3,12% (2/64) de *Arcobacter* spp. espécie não identficada até o momento. Foram realizadas análises fenotípicas de resistência a 12 antibióticos com 34 isolados, previamente selecionados, de quatro diferentes fontes de carnes de frango obtidos nesse trabalho, e de três linhagens utilizadas como controle positivo de *Arcobacter.* A resistência fenotípica frente aos antimicrobianos foi de 100% para ácido nalidíxico e clindamicina, 29,73% para eritromicina, 24,32% para canamicina, 21,62% para tetraciclina, 18,42% para cloranfenicol, 13,51% para gentamicina, 8,11% para estreptomicina, 5,41% para azitromicina e ciprofloxacina, 2,10% para vancomicina e 0,00% para ampicilina.

Palavras-chave: Microbiologia de alimentos; Frango; Patógeno alimentar; Antimicrobiano; *Arcobacter* spp.

ABSTRACT

Occurence of *Arcobacter* spp. in poultry meat

Arcobacter spp., previously known as aerotolerant *Campylobacter*, is considered a bacterial genus that includes species considered emerging pathogens that can be transmitted by food. *Arcobacter* has been associated with gastroenteritis, persistent diarrhea and bacteremia in humans. It is a gram negative, thermosensitive bacterium, although it can survive at 4 ^{o} C. In Brazil, there are few studies of the occurrence of *Arcobacter* in animal products including those of animal origin, especially those most consumed, such as poultry and pork. There are occasional studies of their occurrence in cooled products, such as cuts and in refrigerated chicken carcasses. The objective of this study was to evaluate the occurrence of *Arcobacter* spp. in refrigerated chicken cuts and carcasses of the retail and in chicken thighs free of antibiotic and organic refrigerated from slaughterhouse by conventional isolation and genotyping by polymerase chain reaction (PCR). A total of 153 chicken meat samples were analyzed, of which 39.21% (59/153) were positive for the *Arcobacter* genus. A total of sixty-four isolates positive for *Arcobacter* spp., corresponding 89.06% (57/64) of *A. lacus*, 4.7% (3/64) of *A. thereius*, 3.12% (2/64) of *A. butzleri*, and 3.12% (2/64) of *Arcobacter* spp. species not yet identified. Phenotypic resistance analyzes were performed on 12 antibiotics with 34 isolates, previously selected from four different sources of chicken meat obtained in this study, and three strains used as positive control of *Arcobacter* spp. Phenotypic resistance to antimicrobials were 100% for nalidixic acid and clindamycin , 29.73% for erythromycin, 24.32% for kanamycin, 21.62% for tetracycline, 18.42% for chloramphenicol, 13.51% for gentamycin, 8.11% for streptomycin, 5.41% for azithromycin and ciprofloxacin, 2.10% for vancomycin and 0.00% for ampicillin.

Keywords: Food microbiology; Chicken; Foodborne pathogen; Antimicrobial; *Arcobacter* spp.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Crescimento de colônias típicas de *Arcobacter* em Ágar Seletivo.....53
Figura 2 – Coloração de Gram com colônias consideradas presuntivas para *Arcobacter*.....53
Figura 3 – Catalase positiva para as colônias consideradas presuntivas para *Arcobacter*.....53
Figura 4 – Gel de agarose de produtos de amplificação por PCR do gênero de *Arcobacter*.....56
Figura 5 - Gel de agarose representativo de produtos de amplificação por PCR de fragmentos do gene *Arco* I *e Arco* II.....56
Figura 6 - Gel de agarose de produtos de amplificação por m-PCR para espécies de *Arcobacter*.....57
Figura 7 - Gel de agarose de reação de PCR da amplificação de fragmentos de DNA de 1026 pb do gene 16S rRNA.....58
Figura 8 - Gel de agarose de produtos da reação de PCR-RFLP com enzima a *Tru*1I (*Mse*I) para espécies dos gêneros *Arcobacter*, *Campylobacter* e *Helicobacter*.....59
Figura 9 – Árvore filogenética com as sequências obtidas dos isolados de *Arcobacter* de carnes de frango pela técnica de sequenciamento do gene RNAr 16S.....62
Figura 10 – Análises de componentes principais (PCA).....68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Origem e identificação dos micro-organismos testados pela atividade antimicrobiana.....49
Tabela 2 – Padrões utilizados para comparação do nível de resistência ao antimicrobianos de *Arcobacter* spp. e as respectivas referências para a interpretação dos resultados obtidos nesse estudo.....51
Tabela 3 – Resultados positivos para *Arcobacter* spp. nas amostras de carnes de frango.....55
Tabela 4 – Identificação e origem das espécies dos isolados de *Arcobacter* spp. de amostras de carnes de frango.....61
Tabela 5- Perfil de resistência de isolados de diferentes espécies de *Arcobacter* spp. aos antimicrobianos 69

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Lista de espécies de *Arcobacter* spp. e suas origens.....19
Quadro 2 – Estudos de ocorrência e prevalência de *Arcobacter* spp. em frangos.....28
Quadro 3 - Amostragem das carnes de frango coletadas no varejo das cidades de Campinas-SP e Piracicaba-SP.....38
Quadro 4 - Amostragem das coxas de frango provenientes do abatedouro localizado em Ipeúna-SP.....39
Quadro 5 – Sequências de nucleotídeos dos *primers Arco* I e *Arco* II utilizados para identificação do gênero de *Arcobacter* spp. 42
Quadro 6 – Sequência de nucleotídeos utilizados diferenciações das espécies.....44
Quadro 7 – Sequências de nucleotídeos dos *primers* utilizados para amplificação inicial de 1026 pb do gene 16S rRNA.....45
Quadro 8 - Perfil de resistência aos antimicrobianos de *Arcobacter* isolados de carnes de frango dediferentes origens.....71

1.INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por alimentos estão ganhando importância devido ao aumento alarmante do número de surtos nos últimos anos em todo o mundo (Scallan et al., 2016).

O gênero *Arcobacter* spp., anteriormente conhecido como *Campylobacter* aerotolerante, contêm quatro espécies consideradas patogênicas emergentes que podem ser veiculadas por alimentos - *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus, Arcobacter skirrowii* e *Arcobacter thereius* (Jyothsna et al., 2013, McGregor e Wright, 2015).

Arcobacter spp foi identificado como um patógeno zoonótico emergente e o *International Commision Microbiological Specification for Foods* (ICMSF, 2002) classificou espécies de *Arcobacter* como um sério risco à saúde humana. Embora a virulência e a patogénese de certos micro-organismos tenham sido completamente elucidadas, patógenos do gênero *Arcobacter* ainda merecem estudos de específicos necessitando de atenção imediata (Ramees et al., 2017).

Em humanos, essas espécies têm sido associadas a gastroenterites e bacteremia, enquanto em animais têm sido relacionadas a abortamentos, infertilidade, mastites e diarreia (Shah et al., 2013; Vandamme et al., 1991). As mesmas espécies também são frequentemente isoladas de animais assintomáticos, acreditando-se que eles possam ser o reservatório natural desse grupo de micro-organismos (Collado&Figueras, 2011). Alimentos de origem animal provavelmente são a principal via de transmissão de *Arcobacter* para humanos, devido à alta prevalência que tem sido relatada em carnes de frangos, de suínos e de bovinos (Houf et al., 2004; Kabeya et al., 2004; Son et al. 2006; Scanlon et al., 2013; Vicente-Martins et al., 2018) e, ocasionalmente, em alimentos como leite e frutos do mar (Son et al., 2006; Collado et al., 2009; Serraino et al., 2013; Vicente-Martins et al., 2018).

Aves silvestres, como, por exemplo, o peru-selvagem (*Meleagris gallopavo*), atuam como um importante reservatório de *Arcobacte*r e como uma fonte de infecção. Pássaros selvagens, como pombas de colarinho (*Streptopelia decaocto*), também têm sido apontadas como reservatórios (Di Francesco et al., 2014). Intestinos de aves têm sido reportados como lugares para abrigar *Arcobacte*r spp. e contaminar os abatedouros durante o processamento das carcaças, aumentando assim as chances de contaminação adicional (Ho et al., 2008a). Em abatedouros, espécies de *Arcobacte*r têm sido relatadas com frequência a partir de várias fontes e sua persistência foi registrada mesmo após o

acompanhamento dos procedimentos de sanitização, portanto os matadouros atuam como uma fonte potencial de disseminação, mas existem poucos dados epidemiológicos para extrair observações conclusivas (Collado et al., 2010). Portanto, a contaminação de amostras de alimentos e mudanças nas tendências dos hábitos alimentares humanos levam ao aumento das infecções desse patógeno na comunidade humana (Wesley et al., 2000).

Além da escassez de dados de ocorrência de espécies de *Arcobacter* em alimentos, conhece-se muito pouco ainda sobre a diversidade dessa bactéria, inclusive sobre o perfil de resistência a antimicrobianos. De acordo com Rahimi et al., (2014), atualmente, as informações são limitadas sobre a prevalência e os padrões de suscetibilidade aos antimicrobianos. A diversidade e o aumento na resistência a antibióticos têm sido relatados entre isolados de *Arcobacter* de diferentes partes do mundo (Bagalakote et al., 2014). A metodologia de isolamento em laboratório para esse micro-organismo até o presente momento não é padronizada, podendo permitir que muitos dos casos importantes possam passar despercebidos, resultando na subestimação da prevalência e estado epidemiológico de *Arcobacte*r spp. (Harrab et al.,1998). Portanto, os métodos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) são os mais comumente usados para fins específicos de deteção e identificação (Brightwel et al., 2007). Mais estudos são essenciais no campo de diagnóstico de *Arcobacter* spp. para otimizar a sensibilidade e especificidade dos métodos de diagnóstico que estão atualmente em prática (Brightwel et al., 2007).

Todos os aspectos relevantes sobre este importante patógeno de origem alimentar com relação a detalhes etiológicos, evolução, emergência e diversidade genética de diferentes espécies de *Arcobacter* spp., prevalência e epidemiologia em animais necessitam de mais estudos. A patogenia em animais e humanos, a importância na saúde pública e as tendências e avanços no diagnóstico, prevenção e controle são também importantes tópicos a serem estudados para melhor compreensão desse micro-organismo (Ramees et al., 2017). A pesquisa de *Arcobacter* spp. em carnes de frango e a avaliação da resistência aos antibióticos desses isolados, como proposto neste estudo, podem fornecer dados da ocorrência real desse gênero bacteriano e contribui com informações sobre a diversidade do perfil de resistência dessa bactéria ainda tão pouco estudada.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Arcobacter* spp.

O gênero *Arcobacter* foi criado em 1991, a partir da subdivisão das espécies de *Campylobacter* em três grandes grupos de homologia rRNA. Um desses grupos, composto das espécies aerotolerantes de *Campylobacter,* deu origem ao novo gênero, na época contendo apenas duas espécies: *Arcobacter nitrofigilis* e *Arcobacter cryaerophilus* (Vandamme et al., 1991).

Vandamme et al. (1992b), formalmente, transferiram *Campylobacter butzleri* para o gênero *Arcobacter* e à espécie *Arcobacter butzleri*, dessa forma, identificaram cinco grupos principais usando dados de ADN-ADN de hibridação, que incluíram *Arcobacter cryaerophilus*, *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter nitrofigilis* e uma nova espécie *Arcobacter skirrowii*. A espécie *A. butzleri* foi nomeada em honra a Jean-Paul Butzler, um médico belga e microbiologista. O organismo foi identificado a partir de uma grande variedade de *habitats* e hospedeiros, que faz com que o gênero seja reclassificado dentro da subdivisão épsilon do *Proteobacteria* (superfamília VI), juntamente com o gênero *Helicobacter*, que é distinta das outras superfamílias de rRNA dentro do grupo das bactérias Gram negativas (Vandamme et al., 1991; Debruyne et al., 2008).

Arcobacter em latim significa “bactéria em forma de arco” e está incluído na família *Campylobacteraceae* de bactérias Gram-negativas. São helicoidais e não-formadores de esporos. (Vandamme et al.,1991; Lehner et al., 2005; Collado e Figueras, 2011), móveis por meio de um único flagelo polar e demonstram movimento de parafuso, o que lhes permite passar através de filtros que retêm quase todas as outras bactérias, uma característica explorada para o seu isolamento (Mesbah et al., 1989; Vandamme & De Ley, 1991).

Arcobacter spp. difere-se fisiologicamente de *Campylobacter* spp. pela capacidade de tolerar oxigênio, podendo se desenvolver a temperaturas abaixo de 30 °C (Kjeldgaard et al., 2009). As espécies patogênicas, como *A. butzleri*, podem se desenvolver entre a faixa temperatura de 15 °C a 37 °C, sendo ótima de 30 °C (Hilton et al., 2001). Geralmente, nenhum desenvolvimento detectável é observado a 40 °C (Vandamme et al., 1992b). *Arcobacter* spp. podem resistir ao congelamento por até 6 meses a - 20 °C e por até 24 meses a -70 ° C, mas, a partir de 55 °C, é rapidamente inativado (D'Sa & Harrison, 2005).

O desenvolvimento ótimo ocorre sob condições microaerófilas (3-10% O_2) ou em aerobiose, principalmente das espécies patogênicas, mas não exigem a presença de

hidrogênio, enquanto *A. anaerophilus* é anaeróbio. Crescem na presença de 1-2% de Na Cl e 1% (peso/volume). Cepas de *Arcobacter* podem tolerar uma ampla faixa de pH - de 5,5 a 9,5-, mas o desenvolvimento ótimo ocorre entre pH de 6,8-8,0 (Neill et al., 1979). O gênero *Arcobacter* tem o metabolismo aeróbio e utiliza como fontes de carbono aminoácidos e ácidos orgânicos, podendo oxidar compostos sulfurados; carboidratos não são fermentados nem oxidados pela bactéria (Ellis et al., 1977). Estudos relatados até o presente momento demonstraram que *A. butzleri* foi capaz de se desenvolver a 10 °C, temperatura mínima de desenvolvimento por este micro-organismo (D'Sa & Harrison, 2005; Kjeldgaard et al., 2009) e não houve desenvolvimento a 40 °C (Hilton et al., 2001). Confirmações quanto à sua tolerância ao pH, tratamentos de temperatura e concentrações de sal foram documentadas recentemente (Cervenka, 2007; Ferreira et al., 2016; Salas-Massó et al., 2016).

2.2. Taxonomia

A partir dessas espécies, *Arcobacter nitrofigilis* e *Arcobacter cryaerophilus*, várias outras foram descobertas e, até o momento, o gênero é composto por 27 espécies descritas: *A. cryaerophilus*, *A. nitrofigilis*, *A. butzleri*, *A. skirrowii*, *A. cibarius*, *A. halophilus*, *A. mytili*, *A. thereius, A. marinus*, *A. trophiarum*, *A. defluvii*, *A. molluscorum*, *A. ellisii*, *A. bivalviorum*, *A. venerupis*, *A. anaerophilus*, *A. cloacae*, *A. suis*, *A. ebronensis*, *A. aquimarinus*, *A. lanthieri*, *A. pacificus*, *A. faecis*, *A. acticola*, *A. lekithochrous*, *A. haliotis* e *A. canalis* (Collado e Figueras, 2011; Figueras et al., 2012; Levican & Figueras, 2013; Levican et al., 2013a; Sasi Jyothsna et al., 2013; Figueras et al., 2014; Bagalakote et al., 2014; Levican et al., 2015; Whiteduck-Leveillee et al., 2015; Park et al., 2016; Zhang et al., 2016; Figueras et al., 2017; Tanaka et al., 2017; Perez-Cataluña et al., 2018a). As origens das 27 espécies estão dispostas no Quadro 1.

n°	Espécies de *Arcobacter*	Origens	Referências
1	*A. nitrofigilis*	Raízes de Spartina	McClung et al. (1983)
2	*A. cryaerophilus*	Aborto de feto bovino	Neill et al. (1985)
3	*A. butzleri*	Fezes humanas	Kiehlbauch et al. (1991)
4	*A. skirrowii*	Fezes de ovelha	Vandamme et al. (1992b)
5	*A. cibarius*	Carne de frango	Houf et al. (2003)
6	*A. halophilus*	Lagoa hipersalina	Donachie et al. (2005)
7	*A. mytili*	Mexilhões	Collado et al. (2009b)
8	*A. thereius*	Aborto suíno	Houf et al. (2009)
9	*A. marinus*.	Água do mar, algas marinhas e estrela do mar	Kim et al. (2010)
10	*A. trophiarium*	Fezes de porco	De Smet et al. (2011)
11	*A. defluvii*	Amostras de esgoto	Collado et al. (2011)
12	*A. molluscorum*.	Marisco	Figueras et al. (2011a, 2011b)
13	*A. ellisii*.	Marisco	Figueras et al. (2011a, 2011b)
14	*A. venerupis*	Marisco	Levican et al. (2012)
15	*A. bivalviorum*	Marisco	Levican et al. (2012)
16	*A. cloacae*	Marisco	Levican et al. (2013a)
17	*A. suis*	Marisco	Levican et al. (2013a)
18	*A. anaerophilus*	Sedimento estuarino	Sasi Jyothsna et al. (2013)
19	*A. ebronensis*.	Mexilhões	Levican et al. (2015)
20	*A. aquimarinus*	Água do mar	Levican et al. (2015)
21	*A. lanthieri*	Estrume de gado e porco	Whiteduck-Léveillée et al. (2015)
22	*A. pacificus*	Água do mar	Zhang et al. (2015)
23	*A. faecis*	Tanque séptico de resíduos humanos	Whiteduck-Léveillée et al. (2016)
24	*A. acticola*	Água do mar	Park et al. (2016)
25	*A. lekithochrous*	Grandes vieiras (*Pecten maximus*) e tanque de água do mar	Diéguez et al. (2017)
26	*A. haliotis*	Intestino de abalone (molusco)	Tanaka et al. (2017)
27	*A. canalis*	Canal de água contaminado com esgoto urbano	Perez-Cataluña et al. (2018a)

Quadro 1 - Lista de espécies de *Arcobacter* spp. e respectivas origens
Fonte: Adaptado de Pérez-Cataluña et al. (2018)

Entre essas espécies, *A. butzleri, A. cryaerophilus, A. skirrowii* e *A. thereius* são consideradas patógenos emergentes de origem alimentar (Ho et al., 2006a; Prouzet-Mau- leon et al., 2006; Snelling et al., 2006; Houf & Stephan, 2007; Collado et al., 2009a; Amare et al., 2011; McGregor & Wright, 2015). Durante os últimos anos, *Arcobacter* spp. (Ho et al., 2006ª) tem ganhado a atenção de pesquisadores mundiais como um importante enteropatógeno emergente veiculado por alimentos. *A. butzleri* é a espécie mais comum e tem sido associada a doenças humanas, como enterite, diarreia severa e bacteremia (Engberg et al., 2000) e é considerada um sério risco à saúde humana pelo International Commision *Microbiological Specification for Foods*

(ICMSF, 2002). A lacuna de conhecimento no campo do surgimento e evolução de *Arcobacter* é ampla, pois vários temas e questões permanecem sem resposta. Informações sobre taxonomia do gênero *Arcobacter* vem evoluindo rapidamente desde o dia em que foi definido. As características desse patógeno emergente de origem alimentar precisam ser melhor elucidadas, de modo a se melhorar o conhecimento sobre fatores epidemiológicos, de virulência (Ramees et al., 2017) e comportamento da bactéria em alimentos e ambientes relacionados. Plasmídeos, por exemplo, geralmente estão presentes em muitos procariontes e desempenham um papel importante na evolução dessas espécies, como demonstrado no estudo de Ricci & Hernandez (2000), que, ao trabalharem com *Arcobacter*, verificaram que a sequência completa do plasmídeo grande, revelava que as proteínas PEG21 PEG22, PEG23, PEG24, PEG25 PEG26 e PEG 29 mostraram homologia com a secreção do tipo IV, que desempenha um papel na transferência de material de DNA e toxinas. Dessa forma, este grande plasmídeo pode desempenhar uma função na transferência de genes dentro do *Arcobacter* spp. (Ricci & Hernandez, 2000).

2.3. Epidemiologia

Arcobacter é considerado um gênero potencialmente zoonótico e pode contaminar o homem pela ingestão de alimentos e água contaminados e há evidencias de sobrevivência no ar ambiente (Collado e Figueras, 2011; ICMSF, 2002). Aves e suínos são os veículos mais citados na sua transmissão. A epidemiologia tem sido pouco elucidada e requer mais estudos. É considerado um patógeno potencial para o ser humano, especialmente em crianças (Larrauri et al., 2014). Em estudos realizados entre 2008 e 2013, com 6774 pacientes com sintomas de gastroenterite e/ou gastroenterite aguda, o *Arcobacter* foi o quarto patógeno mais isolado (Van de Abbele et al., 2014). Estudos recentes reportam sua sobrevivência no interior das estruturas de amebas (*Acanthamoeba castellani*). As amebas podem assim se tornar um reservatório natural e, dessa forma, veicular a bactéria de fontes aquáticas para diversos lugares (Ferreira et al., 2015).

O gênero *Arcobacter* é associado a seres humanos e animais e já foi relatado na Bélgica, Chile, Espanha, Estados Unidos, França, Itália, Nova Zelândia, Portugal e África do Sul, entre outros, a partir de: fezes e sangue de indivíduos que sofreram de gastroenterite e bacteremia, além dos seguintes tecidos e matrizes: tecidos fetais de

bovinos e suínos resultantes de abortarmentos; fezes de animais de diversas espécies; carcaças de aves e suínos; produtos de origem de animais marinhos e terrestres; água do mar, lagunas hipersalinas e encanamentos da rede de esgoto (Ramees et al., 2017).

Arcobacter foi relatado com origem a partir de animais domésticos (bovinos, suínos, ovinos, equinos , cães), répteis (lagartos, cobras quelônios), carnes (de aves, de suínos, de caprinos, de ovelhas, de bovinos e de coelho), vegetais e humanos em diferentes países como Bélgica, Estados Unidos da América, Dinamarca, Brasil, Austrália, Itália, Holanda, Malásia, Japão, Espanha, República Checa, Coréia, Egito e Índia (Lehner et al.,2005). O gênero *Arcobacter* é uma potencial fonte de contaminação de alimentos e água. Sendo um micro-organismo patogênico, representa um problema sério de saúde pública (Gonzalez et al., 2007b).

Diferentes espécies de *Arcobacter* foram isoladas de uma variedade de animais e seus fluidos corporais, como saliva, secreção vaginal e fezes (Kabeya et al., 2003a; Ho et al., 2006a). Na Índia, Patyal et al. (2011) encontraram taxas de prevalência de 21% em suínos, 15% em fezes de aves e 3% em diarreia humana. Mohan et al. (2014) obtiveramporcentagens de isolamento de 8% em fezes de aves, 10% de fezes de bovinos, 12% de suínos e 2% em amostras de fezes de diarreia humana. Na Bélgica, Van Driessche et al. (2003) obtiveram positividade para *Arcobacter* de 44% (suínos), 16% (ovino) e 15% (equino) em amostras fecais coletadas em abatedouros. Também foi isolado do fígado e rins de suinos abortados espontaneamente, mas sua função na patogenicidade não está ainda elucidada (Houf et al., 2009).

A rota de transmissão fecal-oral desempenha também uma função importante no estabelecimento de infecção em bovinos (Shah et al., 2011). As mesmas espécies de *Arcobacter* foram isoladas num período de dois meses de bebedouros, indicando persistência e capacidade de formar biofilmes ou de agir como um bioformador secundário (Giacometti et al., 2015). *A. cryaerophilus* foi relatado na cavidade oral de gatos, com 79% de casos positivos de *Arcobacter* spp. nesses animais, a partir do uso de PCR como uma ferramenta de diagnóstico (Fera et al., 2009). Em bovinos sadios, tem sido relatadas variações de frequência de ocorrência em diferentes partes do mundo, tendo sua presença já sido sem qualquer manifestação clínica, o que sugere que o gado pode agir como um reservatório (Golla et al., 2002). *A. butzleri* é a espécie mais comumente isolada em fazendas leiteiras comparada a outras espécies de *Arcobacter*, o que pode estar relacionado à capacidade deste organismo de resistir

em diferentes condições ambientais (Golla et al., 2002; Giacometti et al., 2015). Merga et al. (2011, 2013) relataram prevalência de *Arcobacter* em 43% de fezes de bovinos e 40% de fezes de ovelhas no Reino Unido. Um estudo na Bélgica relatou prevalência de 59% a 85% de *Arcobacter* a partir de amostras fecais de suínos (Van Driessche et al., 2004). *Arcobacter* pode colonizar a vesícula biliar, mostrando seu potencial de causar infecções no fígado e no ducto biliar (Aydin et al., 2007). Ambas as transmissões, vertical e horizontal, de *Arcobacter* spp. foram documentadas em animais. Sua transmissão transplacentária também já foi documentada em suínos (Ho et al., 2006b).

Collado et al. (2014) reportaram a prevalência de *Arcobacter* em diferentes espécies marinhas, como moluscos (88%), seguido de mariscos (65%), mexilhões (33%), amêijoas (24%), vieiras (18%) e ostras (15%). Uma taxa menor de prevalência foi relatada a partir de frutos do mar (21%) da Índia (Patyal et al., 2011). As cepas de *A. butzleri* tinham a habilidade de sobreviver dentro das amebas conhecidas como *Acanthamoeba castellanii*, sugerindo que *A. butzleri* era resistente à digestão amebiana, dessa forma *A. castellanii* poderia, assim, atuar como um reservatório ambiental e veículo de transmissão para *Arcobacter* (Villanueva et al., 2016).

As aves domésticas atuam como reservatórios potenciais para *Arcobacter* spp. e a bactéria já foi isolada da pele de aves domésticas, excrementos e carne (Corry e Atabay, 2001; Kabeya et al., 2004; Lehner et al., 2005; Ho et al., 2008b; Collado et al., 2009a)

Muito pouco se conhece sobre a correlação dos genes do *Arcobacter* com os mecanismos de virulência, incluindo as espécies *A. cryaeophilus*, *A. butzleri*, *A. skirrowii* e *A. thereius*. Algumas cepas de *A. cryaeophilus* também produzem toxinas. As quatro espécies são invasivas (Collado e Figueras, 2011; Jyothsna et al., 2013; McGregor e Wright, 2015). A capacidade e velocidade de multiplicação e colonização intestinal de *A. butzleri* é superior à das outras espécies (ICMSF, 2002).

Algumas pesquisas estão sendo desenvolvidas nesse contexto, mas ainda não há uma definição formal ou consenso sobre a virulência funcional, quando comparada com as espécies de *Campylobacter*, as quais já foram amplamente estudadas e têm seu mecanismo de virulência bem elucidado. Ressalta-se que vários estudos têm demonstrado a capacidade de aderência, invasão e citotoxicidade das espécies patogênicas de *Arcobacter* em distintas linhas celulares (Collado e Figueras, 2011). Além disso, recentemente, foram demonstradas que as espécies de *Arcobacter*

apresentam diversos genes putativos de virulência similares aos presentes no *Campylobacter jejuni* (Douidah et al., 2012, Karadas et al., 2013; Collado et al., 2014).

A partir de estudos disponíveis sobre os genes e fatores de virulência em *Arcobacter* spp, entende-se que a adesão, invasão do patógeno, secreção de toxina e citocina pró-inflamatória (IL-8) desempenham papel importante no estabelecimento da infecção no hospedeiro (Collado e Figueras, 2011). *A. cryaerophilus* e *A. butzleri* são as duas principais espécies de *Arcobacter* estudadas até o momento, por suas propriedades de adesão e invasão (Collado e Figueras, 2011). Wesley & Baetz (1999) relataram que o peru (*Beltsville White)* foi o melhor modelo animal para estudar a infecção diarreica causada pelo *Arcobacter*. Também foi relatado que a propriedade de hemaglutinina está associada a *A. butzleri,* que interagiu com eritrócitos, ajudando assim na adesão da bactéria (Tsang et al., 1996).

Como os gêneros *Campylobacter* e *Helicobacter*, a liberação de IL-8 na infecção por *Arcobacter* spp pode desempenhar um papel em causar diarreia (Ho et al., 2007; Ferreira et al., 2014b). A liberação de citocinas pró-inflamatórias é um fator de virulência importante para *H. pylori* e *Campylobacter;* da mesma forma, *Arcobacter* leva à liberação de citocinas pró-inflamatórias (Collado e Figueras, 2011). Zur Bruegge et al. (2014) relataram que o gênero *Arcobacter* tem menos potencial para sobrevivência intracelular e também documentou diferenças específicas de tensão na capacidade de invasão e sobrevivência do organismo dentro do hospedeiro. *Arcobacter* é gênero móvel, como o *Campylobacter*. Seus flagelos também podem ter uma função na invasão de células, como relatado em outras bactérias, na qual o flagelo ajuda na motilidade e também na colonização do patógeno (Ho et al., 2008b). Estudos sobre a função desempenhada pelos mecanismos imunes do hospedeiro precisam ser focalizados para explorar os mecanismos de virulência de *Arcobacter*, já que o hospedeiro também contribui durante a infecção, pois, condições imunes do hospedeiro podem afetar os episódios de diarreia (Collado e Figueras 2011).

Dez genes putativos, nomeadamente, *cadF*, *ciaB*, *cj1349*, *hecA*, *iroE*, *hecB*, *irgA*, *mviN*, *pldA* e *tlyA*, foram reconhecidos no genoma de *A. butzleri* ATCC 49616 (Miller et al., 2007; Douidah et al., 2012; Ferreira et al., 2014b). As funções dos diferentes genes incluem: gene cadF e código do gene cj1349 para as proteínas da membrana externa, facilitando o contato das células epiteliais intestinais com as células, aderindo à fibronectina; o gene ciaB está envolvido na invasão da célula hospedeira, codifica o gene *pldA* para a fosfolipase A da membrana externa que

hidrolisa as ligações do éster acílico, o gene *tlyA* é um gene da hemolisina, o gene *irgA* codifica para um receptor da membrana externa da enterobactina, o gene *hecA* é um membro da família de hemaglutinina filamentosa e códigos de gene hecB para proteína de ativação de hemolisina (Douidah et al. 2012). Um estudo realizado por Tabatabaei et al. (2014), no sul do Irã, revelaram seis genes de virulência (*cadF*, *ciaB*, *cj1349*, *mviN*, *pldA* e *tlyA*) em *Arcobacter* spp. Estes seis genes estavam presentes em todos os isolados de *A. butzleri*. Os genes *cadF*, *ciaB*, *cj1349*, *mviNin*, *pldA* e *tlyA* estavam presentes em 55% e 53%, 98% e 87%, 45% e 60%, 90% e 80%, 33% e 13%, e 38% e 40% de *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii*, respectivamente. A identificação dos genes de virulência revelou o potencial patogênico das espécies testadas de *Arcobacter*.

Vários genes de virulência foram responsáveis pela adesão, nomeadamente *cadF*, *hecA* e *cj1349*, invasão de *ciaB*, lise dos eritrócitos *hecB*, *tlyA* e *pldA*, aquisição de ferro e manutenção da infecção *irgA* e *iroE* e biossíntese de peptidoglicano *mviN*, comprovadamente, em outras bactérias (Ruiz, 2008; Flanagan et al., 2009). No entanto, não se sabe se esses genes de virulência putativos mostram ações semelhantes em *Arcobacter*. Embora *A. butzleri* tenha demonstrado capacidade de se aderir e de invadir várias celulas *in vitro*, nenhuma correlação foi demonstrada entre os genes de virulência de *A. butzleri* e fenótipos de adesão e invasão (Karadas et al., 2013; Levican et al., 2013b). Da mesma forma, cinco genes de virulência (*ciaB*, *cadF*, *cj1349*, *irgA* e *hecA*) foram detectados em *Arcobacter* isolados de diferentes fontes: carne, moluscos, esgoto, fezes de suínos, ovinos e frangos, fontes ambientais, efluentes de suinocultura, água do mar, raízes de *Spartina alterni flora* e feto abortado de suínos de Nottingham no Reino Unido (Levican et al. 2013b). Estudos dos genomas de *Arcobacter* de várias fontes, como suínos, esterco de gado leiteiro, carcaças de frango e fezes humanas foram recentemente publicados, podendo ajudar na exploração dos vários genes e s de suas funções em virulência e patogenicidade (Adam et al., 2014a, 2014b, 2014c; Whiteduck-Léveillée et al., 2016a).

2.4. *Arcobacter* em humanos

Atualmente, o potencial patogênico do gênero *Arcobacter* permanece incerto. Estudos *in vitro* de cultura celular de origem animal e humana revelaram que o *Arcobacter* spp. pode aderir a células eucarióticas, invadir e produzir toxinas,

resultando em danos às células do hospedeiro. A adesão e invasão de bactérias às células hospedeiras são essenciais para o sucesso da colonização e estabelecimento da infecção (Kolling et al., 2012), em que se mostrou relacionado ao comprometimento funcional da barreira epitelial em células de carcinoma do cólon humano (HT-29/B6), aumentando dessa forma a permeabilidade macromolecular através da via paracelular e diminuindo a resistência epitelial, devido à infecção por *A. butzleri* (Tsang et al., 1996). A alteração na composição e distribuição das junções celulares formadas por cadeias de proteína (*tight junction - TJ*) foi relatada durante a infecção por *Arcobacter* spp., com expressão diminuída de proteínas associadas à selagem, claudina-1, claudina-5 e claudina-8, que pode ser responsável pela diarreia induzida por *A.butzleri.*

A. cryaerophilus foi a primeira espécie de *Arcobacter* a ser identificada de humanos no ano de 1988 (Tee et al., 1988; Collado et al., 2011) *Arcobacter* spp. foram isolados de fezes e amostras de sangue de humanos que apresentaram sintomas de diarreia (Fisher et al.,2014). As manifestações gastrointestinais são os sinais comuns em humanos e podem ser exibidas como diarreia aquosa no caso da infecção por *A. butzleri*, enquanto a diarreia sanguinolenta é geralmente notada em *Campylobacter jejuni* (Collado et al., 2011).

Um estudo realizado na África do Sul, relatou *A. butzleri* como a terceira micro-organismo mais predominante nas fezes do homem, enquanto que na Bélgica e na França foi relatada quarto micro-organismo mais prevalente (Van Driessche et al., 2003; Prouzet-Mauleon et al., 2006 Samie et al., 2007; Van den Abeele et al., 2014).

A enterite causada por *Arcobacter* spp é uma diarreia aguda que dura de 3 a 15 dias, às vezes tornando-se persistente ou recorrente por mais de duas semanas ou até dois meses (Vandenberg et al., 2004). A condição é frequentemente acompanhada por dor abdominal e náusea e alguns pacientes também experimentam febre, calafrios, vômitos e fraqueza (Vandamme et al., 1992a). *A. butzleri* foi frequentemente isolado mais de casos diarreicos em comparação com pacientes não diarreicos. A primeira ocorrência do gênero *Arcobacter* em crianças foi relatada na Itália, afetando pacientes com dois a oito anos que apresentavam sintomas agudos de cólicas abdominais (Vandamme et al., 1992a). Com uma prevalência de 8%, o *A. butzleri* foi o agente etiológico da diarreia do viajante adquirida pelos EUA e por

viajantes europeus na Guatemala, México e Índia (Jaing et al. 2010; Shah et al. 2011; McGregor & Wright 2015).

As espécies responsáveis por gastroenterite e queixas gastrointestinais em humanos são *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* e *A. thereius*. Segundo estudos realizados em distintos países entre os anos de 1991 e 2010, essas espécies estão presentes nas fezes dos pacientes e correlacionadas diretamente à diarreia (Collado e Figueras, 2011). Também, estão relacionadas com a diarreia dos viajantes, juntamente com *E. coli*, e espécies de *Shigella*, *Salmonella* e *Campylobacter* (McGrego & Wright 2015). Estudos corroboram a presença de *Arcobacter* spp, associada às outras espécies patogênicas (especialmente *Campylobacter*). A sinergia de infecção de diferentes espécies, entretanto, ainda esta pouco elucidada (Samie et al., 2007).

A identificação de *Arcobacter* spp por diferentes testes bioquímicos é ainda muito complexa, pois esses organismos são metabolicamente inertes (Collado e Figueras 2011), assim, o isolamento desses organismos continua sendo o método padrão-ouro para chegar à conclusão diagnóstica. Os avanços atuais na área de desenvolvimento de diagnósticos rápidos e confirmatórios forneceram vários métodos moleculares para detecção e diferenciação rápida e específica de *Arcobacter* em nível de gênero e espécie, com maior sensibilidade e especificidade (Ramees et al., 2017).

2.5. *Arcobacter* spp. em alimentos e água

Embora as rotas de infecção por *Arcobacter* spp não estejam totalmente elucidadas, infere-se que podem ser através do contato pessoa a pessoa e através do consumo de alimentos e água contaminados (Collado et al., 2009; Collado e Figueras et al., 2011; Ferreira et al., 2018). De fato, vários surtos de gastroenterite relacionados ao consumo de águas (Rice et al., 1999; Fong et al., 2005; Kopilovic et al., 2008) e alimentos (Vandamme et al., 1992; Lappi et al., 2013, Ferreira et al., 2018) têm sido potencialmente atribuídos ao gênero *Arcobacter*, embora ainda não tenha sido comparada essa relação.

Arcobacter spp em humanos causam principalmente distúrbios entéricos e existem vários modos de transmissão pelos quais o patógeno pode colonizar as células hospedeiras (Collado e Figueras 2011; Ramees et al., 2017). Vários relatórios sobre a presença de *Arcobacter* spp na água foram documentados e, portanto, o

consumo de água contaminada atua como uma fonte eficiente de infecção (Jacob et al., 1998). Carne de frango, carne suína e frutos do mar que são consumidos crus ou parcialmente cozidos podem levar à infecção, uma vez que estes são considerados como principais fontes nas quais *Arcobacter* já foram isolados por vários pesquisadores (Collado et al., 2009, Ferreira et al., 2016, Ferreira et al., 2018).

Arcobacter spp. tem sido também relatados como já isolados frequentemente de miúdos e carne de frango ,no geral (Fernandes et al., 2015, Villarrruel-Lopes et al., 2003, Fernandes et al., 2010, Karadas et al., 2013).Também já foram reportados em peito de frango (Fallas-Padilha et al., 2014. Oliveira et al., 2018) e em carcaças de frango (Oliveira et al. ,2001, Eifert et al., 2003, Ávila et al., 2011), conforme pode ser observado no Quadro 2.

Arcobacter spp./Espécie de *Arcobacter* spp.	Fonte	Região	% de *Arcobacter* spp. (n=total de amostras)	Referências
Arcobacter spp.	Carcaça de frango	Reino Unido	0,017 (n = 60)	Atabay and Corry (1997)
A. butzleri	Carcaça de frango	Brasil	46,2 (n = 80)	Oliveira et al. (2001)
A. butzleri	Carne de frango	Austrália	73 (n = 22)	Rivas et al. (2004)
A. butzleri	Carcaça de frango	Espanha	19,8 (n = 32)	González et al. (2007)
A. butzleri, A. cryaerophilus	Carcaça de frango	Estados Unidos	55,1 (n = 325)	Son et al. (2007)
A. butzleri, A. cryaerophilus	Carcaça de frango	República Tcheca	13,6 (n = 420)	Pejchalova et al. (2008)
Arcobacter spp.	Carne de frango	Espanha	64,3 (n = 14)	Collado et al. (2009b)
A. butzleri, A. cryaerophilus, A. skirrowii	Frango	Coréia do Sul	21,1 (n = 360)	Lee et al. (2010)
A. butzleri	Vísceras de frango	Costa Rica	17,3 (n = 150)	Villalobos et al. (2013)
A. butzleri	Linha de processamento de frango	Dinamarca	13,6 (n = 235)	Rasmussen et al. (2013)
A. butzleri, A. cryaerophilus	Carne de frango	Espanha	41.2 (n = 51)	González et al. (2014)
A. butzleri, A. cryaerophilus	Carne de peito de frango	Costa Rica	56 (n = 50)	Fallas-Padilla et al. (2014)
A. butzleri, A. cryaerophilus	Carne de frango	Irã	31 (n = 100)	Rahimi et al. (2014)
A. butzleri, A. thereius, A. skirrowii, A. cibarius	Carne de frango	Índia	32.45 (n=151)	Ramees et al. (2014)
A. skirrowii, A. cloacae, A. cibarius, A. halophilus e A. nitrofigilis	Carne de frango	Polônia	85,7 (n=70)	I. Zacharow et al. (2015)
A. butzleri	Carne de frango	Alemanha	26,8 (n=100)	Lehmann D (2015)
A. butzleri	Carne de frango	Índia	18 (n=300)	Verma M (2015)
A. itius, *A. butzleri* e *A. cryaerophilus*	Carne de frango	Costa Rica	6,5 (n= 352)	Barboza et al. (2017)
A. butzleri, A. cryaerophilus	Esfregaço cloacal do frango	Turquia	78 (n=100)	S. Yesilmen (2017)
A. butzleri, A. cryaerophilus e *A. skirrowii*	Carne de frango	Tunísia	100 (n=26)	Hela Jribi (2017)
A. butzleri, A. cryaerophilus e *A. skirrowii*	Carne de frango	Brasil	18,3 (n=300)	Oliveira et al. (2018)
A. butzleri, A. cryaerophilus e *A. marinus*	Carne de frango	Portugal	92 (n=25)	Vicente-Martins et al. (2018)

Quadro 2 –Estudos de ocorrência e prevalência de *Arcobacter* spp. em frangos

Cabe ainda ressaltar que Oliveira et al. (2001) foram os primeiros pesquisadores a isolar o gênero *Arcobacter* em carcaças de frango para consumo no Brasil, constatando que 42,5% das amostras provenientes de abatedouro estavam contaminadas por *A. butzleri*. No Brasil, há poucos estudos de ocorrência de *Arcobacter* spp. em frangos e suínos em abatedouros e plantas de processamento. Além de Oliveira et al. (2001), outra pesquisa revelou a presença de *Arcobacter* spp. em *18,3%* (55/300) *das* carnes de frangos comercializadas em açougues da cidade de São Paulo, sendo 63,6% de *A. butzleri* 63,6% (35/55) e 36,3% (20/55) de *A. cryaerophilus* (Oliveira et al., 2018).

A incidência em carne suína também é reportada por Collins *et al.,* (1996), Ohlendorf & Murano (2002), Driessche & Houf (2007) e Gobbi (2013). Há alguns relatos de incidência de *Arcobacter* spp. em carne bovina (Golla et al*.,* 2002, Aydin et al*.,* 2007, Balamurugan et al*.,* 2013) e produtos lácteos (Giacometti et al*.,* 2013, Bianchini *et al.,* 2015). Mais recentemente estudos têm relatado a presença de *Arcobacter* em frutos do mar como mexilhões (Levican et al., 2015) e camarões (Larrauri et al*.,* 2014).

De acordo Shah et al. 2011, a carne de frango foi relatada com maior prevalência para *Arcobacter* spp., seguida por carne suína e bovina. Diferentes taxas de prevalência foram registradas em amostras de carne de frango na Índia variando de 12% a 33% (Patyal et al., 2011; Mohan et al., 2014; Ramees et al., 2014b). Recentemente, diferentes espécies de *Arcobacter* foram isoladas (11% das amostras examinadas) de aves de capoeira na Costa Rica (Bogantes et al., 2015). A maior incidência (83%) de *A. butzleri* foi relatada com de carne de frango, seguida por carne bovina (20%) e carne de porco (15%) na Polônia (Zacharow et al., 2015). Villalobos et al. (2013) relataram o isolamento de *Arcobacter* spp. em 17% das amostras de vísceras de aves vendidas na Costa Rica e a maioria desses isolados se mostraram resistentes ao cloranfenicol e à ampicilina. Badilla-Ramirez et al. (2016) demonstraram a capacidade da espécie *A. butzleri* se desenvolver a 4 °C e a 10°C. Esses autores sugeriram que o fato da espécie *A. butzleri*, ser uma bactéria que sobrevive a várias temperaturas de armazenamento, torna-se um risco potencial para a saúde dos consumidores de carne como a de frango (Badilla-Ramirez et al., 2016).

Um estudo realizado na Alemanha por Lehmann et al. (2015) relatou a prevalência de *Arcobacter* spp.: 34% em carne de peixe, 27% em carne de aves e 2% em carne bovina moída. Da mesma forma, De Smet et al. (2010) relataram a presença

de *Arcobacter* spp. em carcaças bovinas pré e pós-resfriadas, indicando a necessidade de práticas higiênicas para quebrar o ciclo de transmissão. A estação de tratamento de água e o ambiente do abatedouros foram implicados na contaminação de carcaças de frango com *Arcobacter* spp no Irã (Khoshbakht et al., 2014). O gênero *Arcobacter* foi isolado da carne de coelho no Egito (Suelam, 2012) e também da Espanha (Collado et al., 2009a). Quatro espécies de *Arcobacter* (*A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* e *A. cibarius*) foram isoladas em grande número de carnes, especialmente de carcaças de frango (Ramees et al., 2017).

Em Portugal, Vicente-Martins et al. (2018), obtiveram a prevalência de *Arcobacter* spp em amostras de varejo, sendo a maior em carne fresca de aves (92,0%), seguida de peixe fresco (68,0%), carne suína fresca (45,8%) e carne bovina fresca (42,1%). Descrições de isolamentos de *Arcobacter* de alimentos do mar, como ostras (Romero et al., 2002), peixes (Patyal et al., 2011), mariscos e moluscos (Collado et al., 2009a) também estão disponíveis. A incidência de *Arcobacter* spp. em frutos do mar é um dos diferenciais em relação às espécies de *Campylobacter*, que geralmente não são encontradas nesses produtos (Collado e Figueras, 2011). Estudos no Brasil ainda são inexistentes até o presente, com mariscos e peixes.

Dados de isolamento de *Arcobacter* spp de amostras de leite também estão disponíveis em diferentes partes do mundo, indicando a possível função o leite como possível veiculo do patógeno. Em um estudo de Selangor, na Malásia, a prevalência de *Arcobacter* spp. foi de 5,8% em amostras de leite de vaca, nas quais *A. butzleri* foi a principal espécie isolada (60%); seguida por *A. cryaerophilus* (40%) (Shah et al., 2012a). Da mesma forma, Ertas et al. (2010) relataram prevalência de 6% (de) em amostras de leite cru na Turquia e Revez et al. (2013) relataram prevalência de 15% na Finlândia. Estudo realizado por Giacometti et al. (2014) mostrou que *A. butzleri* e *A. cryaerophilus* sobreviveram por um período de seis dias em leite armazenado a 4 °C e 10°C. Dessa forma, pode se concluir que o leite bovino pode ser considerado fonte de contaminação por *Arcobacter* spp. para seres humanos (Giacometti et al., 2014). O micro-organismo também sobreviveu durante o processamento e armazenamento de mussarela de búfala, queijo fresco e ricota de ovelha (Serraino et al., 2013a; Yesilmen et al., 2014; Scarano et al., 2014). Estudos também demostraram que *Arcobacter* spp foram isoladas de filtros de leite utilizados em fazendas de criação de gado leiteiro (Serraino et al., 2013b). A eliminação fecal do micro-organismo por bovinos pode levar à contaminação do leite e carcaças de bovinos, levando à infecção

de humanos (Shah et al., 2012b). Em Portugal, Ferreira et al. (2017) examinaram produtos lácteos, para espécies de *Arcobacter*, encontrando a seguintes percentagens de amostras positivas: 47,6% para *A. butzleri,* 5% para *A. marinus* e 5% para *A.cryaerophilus*. Também relataram que todos isolados de *A.butzleri* foram resistentes ao ácido nalidíxico (97%) à cefotaxima e (56%) à ampicilina. No entanto, todas as cepas foram suscetíveis à gentamicina e à eritromicina.

Vários surtos de gastroenterite humana associados a *Arcobacter* spp. tem sido relacionados ao consumo de vegetais frescos contaminados e, portanto, estes podem atuar como uma importante via de transmissão (Gonzalez & Ferrus, 2011; Lee & Choi, 2013). González et al., (2010) relataram a presença de *A. butzleri* em 10 de 50 amostras de alface fresca selecionadas (20%). Recentemente, algumas espécies de *Arcobacter* foram relatadas em alface (Gonzalez & Ferrus, 2011) e em plantas de processamento de cenoura (Hausdorf et al., 2011). Mottola et al. (2016) relataram que a ocorrência de *Arcobacter* spp. em vegetais minimamente processados prontos para consumo, foi de 28% (44/160), dos quais 91% (40/44) isolados foram *A. butzleri* e 9,1% (4/44) isolados foram *A. cryaerophilus*. Esses resultados indicaram que a possibilidade de riscos à saúde está associada ao consumo direto de vegetais crus. Em Portugal, Vicente-Martins et al. (2018), obteve a prevalência de *Arcobacter* spp. em 47,6% das amostras de varejo de vegetais embalados prontos para consumo.

O consumo de alimentos contaminados ou água são matrizes consideradas relevantes na via de transmissão de espécies de *Arcobacter* para humanos e animais, mas isso ainda merece estudos para confirmação (Collado e Figueras, 2011). De acordo com Jacob et al. (1998), a água contaminada é considerada uma importante fonte de infecção por espécies de *Arcobacter* para seres humanos. As infecções por *A. butzleri* são adquiridas em humanos pelo consumo ou mesmo com o contato com água contaminada (De Smet et al., 2011). *Arcobacter* spp. já foram isoladas de rios, lagos, lençóis freáticos e água do mar, bem como de plâncton (Rice et al.,1999). Uma prevalência de 4% de *Arcobacter* spp. foi registrada em 175 amostras de água potável coletadas em Kayseri, Turquia (Ertas et al., 2010). Vários surtos de *Arcobacter* spp. transmitidos pela água, associados à água potável, já foram também documentados, incluindo alguns relatados em Idaho, EUA (Prouet-Mauleon et al., 2006). As mesmas espécies de *Arcobacte*r foram detectadas em plantas de tratamento de água potável e humanos infectados na Alemanha, demostrando que a água atua como uma importante fonte de infecção (Jacob et al.,1993). As variações sazonais na taxa de

prevalência de *Arcobacter* spp em plantas de tratamento de água na Catalunha, Espanha, também foram relatadas com 92% de prevalência na primavera, 83% no verão e 75% no inverno (Collado et al., 2010). Dados sobre isolamentos de *Arcobacte*r spp. da água do mar também foram apresentados (Ansari et al., 2015). *Arcobacte*r *butzleri* não pode crescer experimentalmente na água do mar nem se bioacumular em mexilhões. Levican et al. (2014) demonstraram que a prevalência do organismo nas fontes de água aumentava no período de verão à medida que a temperatura da água aumentava. Chavatte et al. (2016) relataram que 36% (41/115) de amostras de água de várias fontes (66 esgotos, 25 rios, 16 águas de nascente e 8 águas de consumo) foram positivas para *Arcobacter* spp. Para amostras de água do mar onde estavam os peixes, foram positivas para *Arcobacter* 21% (5/24) amostras de água, 19% (8/42) do peixe do local e 15% (5/34) de marisco (Laishram et al., 2016). Estes resultados indicaram que as amostras de água do ambiente são fontes comuns para *Arcobacter* spp.

2.6. Resistência a antimicrobianos

Além da escassez de dados sobre a ocorrência de espécies de *Arcobacter*, conhece-se pouco ainda sobre a diversidade dessa bactéria, inclusive sobre o perfil de resistência a antimicrobianos. As bactérias podem ser classificadas em sensíveis e resistentes aos antimicrobianos. De modo geral, são classificadas como resistentes as bactérias que crescem “in vitro”, nas concentrações médias que os antimicrobianos atingem no sangue, quando administrados por via oral, São consideradas sensíveis as que não crescem nestas concentrações. A resistência bacteriana pode ser natural ou adquirida. A natural corresponde a uma característica da espécie bacteriana e a adquirida, à característica de uma ou mais amostras da espécie (Trabulsi; Toledo, 1989). Os estudos disponíveis sugerem que há um aumento na resistência antimicrobiana contra este patógeno de origem alimentar emergente, o que pode levar a falhas nos tratamentos com antimicrobianos comumente usados. *A. butzleri* é comparativamente mais resistente do que *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii* (Houf et al.,2001; Kabeya et al., 2004; Abay et al.,2012).

Na União Europeia, segundo Bogaard & Stobberingh (2000), cerca de 50% dos antibacterianos são utilizados em animais como forma de tratar e prevenir infecções bacterianas. Sabe-se que o uso indiscriminado de antibióticos é causa de grande

preocupação devido à indução a resistência de bactérias patogênicas (Silbergeld; Graham; Price, 2008). São escassos os registros que relacionam a resistência de *Arcobacter* spp. a antimicrobianos; no entanto, existem muitos estudos que reportam a resistência de *Campylobacter* a antibióticos (Ho et al., 2006).

Infecções causadas por *Arcobacter* spp. geralmente são limitadas, no entanto, o tratamento é necessário em casos de condições crônicas e graves. Fluoroquinolonas e tetraciclina têm sido sugeridas para o tratamento de doenças humanas e infecções causadas por *Arcobacter* spp., De acordo com Vandenberg et al. (2004), estes antibióticos mostraram boa atividade contra estas bactérias. Vários estudos foram realizados para determinar a suscetibilidade antimicrobiana de isolados de espécies de *Arcobacter de* diferentes fontes para vários grupos de antibióticos (b-lactâmicos, aminoglicosídeos, quinolonas, macrolídeos, sulfonamidas e tetraciclinas) (Abay et al.,2012; Son et al., 2007). A resistência das cepas de *A. butzleri* à clindamicina, azitromicina, ciprofloxacina, cefoperazona e outros antimicrobianos tem sido relatada com frequência (Son et al., 2007).

Em relação à susceptibilidade antimicrobiana de *Arcobacter*, *A. butzleri* é a espécie mais discutida (Kiehlbauch et al.,1992; Atabay et al.,2003; Houf et al.,2001; Fera et .2003; Kabeya et al.,2004). Houve um aumento no desenvolvimento de resistência de *Arcobacter* spp. aos antimicrobianos. O aumento do cenário desses micro-organismos resistentes aos medicamentos exige atenção de pesquisadores para encontrar alternativas para essa questão. O controle da bactéria *Arcobacter* spp. e do uso prudente de antimicrobianos são fatores benéficos do ponto de vista de saúde pública e segurança do alimento (Ramees et al., 2017).

Com respeito à susceptibilidade antimicrobiana das espécies de *Arcobacter*, há dados muito limitados e os relatórios disponíveis sugerem que há um aumento na resistência antimicrobiana contra este emergente patógeno de origem alimentar. Vários outros estudos indicaram que espécies de *Arcobacter* são susceptíveis a aminoglicosídeos e à tetraciclina (Fera et al., 2003).A espécie *A butzleri* se mostrou resistente à ampicilina (56%), seguido por cefotaxima (33%) e ciprofloxacina (33%) e suscetível à enrofloxacina e gentamicina, drogas de escolha para o tratamento da infecção por *Arcobacter* spp. Os isolados de *A. cryaerophilus* foram encontrados como sendo suscetíveis à amoxicilina / ácido clavulânico e resistentes à optoquina, vancomicina, ácido fusídico, cloxacilina e cefazolina com suscetibilidade moderada à

amicacina, enrofloxacina, ofloxacina, oxitetraciclina, cloranfenicol, nitrofurantoína, eritromicina, ampicilina sulbactam e amoxicilina. O padrão de resistência contra antibióticos como cefalotina, novobiocina e vancomicina já foi relatado por vários pesquisadores, enquanto que na maioria dos casos a bactéria foi sensível à azitromicina, ao ácido nalidíxico e à gentamicina (Mohan et al., 2014). Susceptibilidade antimicrobiana de 71 isolados de *Arcobacter* spp. foi testada para 14 drogas, usando o método de difusão em disco. Todos os isolados de espécies de *Arcobacter* testados mostraram ser resistentes a um ou mais agentes antimicrobianos. A resistência à cefalotina e à vancomicina (96%) foi o achado mais comum, na maioria dos casos estudados, seguida pela resistência à meticilina, azitromicina e ampicilina. Todos os isolados de *Arcobacter* spp. foram suscetíveis a gentamicina, estreptomicina, tetraciclina e canamicina (Rahimi et al., 2014). No entanto, eritromicina (78%), ciprofloxacina (72%) e doxiciclina (76%) apresentaram atividade moderada contra *Arcobacter* spp. Todos os isolados das espécies de *Arcobacter* eram resistentes à vancomicina, rifampicina, trimetoprim, ceftriaxona e cefalotina, enquanto os isolados eram altamente suscetíveis à oxitetraciclina, tetraciclina, ciprofloxacina, eritromicina, canamicina, amicacina, enrofloxacina e gentamicina. Os mecanismos de resistência das espécies de *Arcobacter* para antibióticos eram principalmente de natureza cromossômica (Abdelbaqi et al.,2007b).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Estudar a ocorrência de *Arcobacter* spp. em carcaças e cortes de frango

3.2. Objetivos específicos

1) Detectar a ocorrência de espécies consideradas patogênicas de *Arcobacter* em carcaças e cortes de frangos congelados e refrigerados comercializados nas cidades de Campinas/SP e Piracicaba/SP.
2) Detectar a ocorrência espécies consideradas patogênicas de *Arcobacter* em coxas de frangos refrigeradas produzidas pelo sistema de criação livre de antibiótico (*Antibiotic Free* – AF) e pelo sistema orgânico em abatedouro localizado em Ipeúna-SP.
3) Selecionar e analisar o perfil fenotípico de resistência de espécies de *Arcobacter* isoladas de carnes de frango do varejo e de coxas de frango refrigeradas de abatedouro com produção orgânica pela técnica de difusão em discos frente a diversos antimicrobianos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada entre os anos de 2016 e 2018 e as coletas de amostras do varejo foram realizadas nas cidades de Campinas-SP e Piracicaba-SP e as de abatedouro localizado na cidade de Ipeúna-SP.

Para controle de qualidade dos meios de cultura, da reação em cadeia pela polimerase (PCR) do gênero *Arcobacter* spp. e como padrão durante a análise de isolamento e identificação desse gênero (*Arcobacter)* foram utilizados três isolados positivos de *Arcobacter* spp. (dois isolados de *Arcobacter butzleri* e um de *Arcobacter cryaerophilus*), os quais foram concedidos pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP) para a execução do presente trabalho (Oliveira et al., 2018).

4.1. Coleta das amostras

Foram coletadas 153 amostras de carnes de frango para esse estudo, sendo 120 de carcaças e cortes de frango congelados e refrigerados obtidos no varejo das cidades de Piracicaba-SP e Campinas-SP entre os meses de Agosto/2016 a Maio/2017, conforme descrito no Quadro 3.

Matrizes	Período de coleta	Número de estabelecimentos	Número de coletas	Total de amostras por matriz
Frango inteiro congelado	Agosto/2016 a Março/2017	5	6	30
Frango inteiro refrigerado				30
Cortes de frango congelados (coxa, sobrecoxa, peito e asa)				30
Cortes de frango refrigerados (coxa, sobrecoxa, peito e asa)				30
Total de amostras do varejo				120

Quadro 3 - Amostragem das carnes de frango coletadas no varejo das cidades de Campinas-SP e Piracicaba-SP

Trinta e três (33) amostras foram oriundas de abatedouro com produção de frangos livres de antibiótico (*Antibiotic Free* – AF) e de sistema orgânico localizado em Ipeúna-SP, interior do estado de São Paulo. Para essas amostras de cortes de frango refrigerados (coxas de frango), as coletas foram realizadas entre os meses de Abril/2017 e Maio/2017, conforme descrito no Quadro 4.

Dias de Coleta	Número de amostras	Tipo de produção
12/04/17	3	Livre de Antibiótico
13/04/17	3	
17/04/17	3	
09/05/17	3	
10/05/17	3	
12/05/17	3	
18/04/17	3	Orgânico
11/05/17	3	
16/05/17	3	
17/05/17	3	
18/05/17	3	
TOTAL	33	

Quadro 4 - Amostragem das coxas de frango provenientes do abatedouro localizado em Ipeúna-SP

O transporte das amostras foi realizado sob refrigeração até o Laboratório de Higiene e Laticínios do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ/USP, onde foi realizado o preparo das amostras, conforme o procedimento do Serviço de Inspeção Federal norte americano (*Food Safety And Inspection Service/United States Department of Agriculture*) (FSIS/USDA, 2014), utilizado para a análise de *Campylobacter*, conforme descrito no item 4.2 do presente trabalho .

4.2. Preparo das amostras de frango

O procedimento do Serviço de Inspeção Federal Norte Americano (*Food Safety and Inspection Service/United States Department of Agriculture*) (FSIS/USDA, 2014), utilizado como referência para a análise de *Campylobacter* spp. As amostras foram preparadas conforme descritas nos itens 4.2.1 e 4.2.2, com adaptação para o caldo de enriquecimento *Arcobacter* Broth suplementado com CAT (8 mg/L de Cefoperazona, 10 mg/L de Anfotericina B e 4 mg/L de Teicoplanina) (Oxoid).

4.2.1. Carcaças de frango inteiras

Foi transferida a carcaça para uma bolsa estéril e a seguir feita a sua pesagem. Adicionaram-se à bolsa e na cavidade da carcaça, 400 mL de Água Peptonada

Tamponada (BPW). A seguir, a bolsa foi fechada e submetida à agitação (rodando o líquido na bolsa), de forma a lavar toda a superfície interna e externa da carcaça. Para a realização dos ensaios, foram adicionados 30mL do líquido de lavagem em 30mL do caldo de enriquecimento *Arcobacter* Broth (Oxoid) suplementado com a mistura de agentes seletivos CAT (8 mg/L de Cefoperazona, 10 mg/L de Anfotericina B e 4 mg/L de Teicoplanina) (Oxoid) em concentração dupla.

4.2.2. Cortes de frango

No experimento, 325 g das amostras de frango foram submetidas à pesagem em condições assépticas, transferidas para bolsas estéreis. A seguir, realizou-se a lavagem da superfície com 1625 mL de Água Peptonada Tamponada (BPW). Sendo que em 30 mL do líquido de lavagem, foram adicionados em 30 mL do caldo de enriquecimento *Arcobacter* Broth (Oxoid), preparado em concentração dupla, suplementado com antimicrobianos CAT (8 mg/L de Cefoperazona, 10 mg/L de Anfotericina B e 4 mg/L de Teicoplanina) (Oxoid).

4.3 Isolamento de *Arcobacter* spp. adaptado de Houf et al. (2001)

Os métodos para isolamento e detecção de *Arcobacter* spp. ainda não são padronizados, similares a outros micro-organismos como de *Campylobacter* (APHA, 2001). Mas, de acordo com Collado e Figueras (2011), os procedimentos descritos por Atabay & Corry (1997) e Houf et al., (2001) têm sido os mais utilizados em pesquisas para esse fim e foram aplicados nesse estudo como testes preliminares para a escolha da metodologia de isolamento. O método adaptado de Houf et al., (2001) foi o escolhido por ser o mais adequado, levando-se em conta o custo e a viabilidade de realização das análises nas condições do Laboratório de Higiene e Laticínios da ESALQ/USP. e, dessa forma, utilizado na presente pesquisa.

a) **Enriquecimento**. A amostra foi preparada e homogeneizada em *Arcobacter* Broth (Oxoid) suplementado com a mistura de agentes seletivos CAT (cefoperazona, anfotericina B e teicoplanina) (Oxoid), conforme descrito no item 4.2. Posteriormente, foi incubado o caldo a 30ºC/48h sob condições aeróbias.

b) **Semeadura**. Após 48h, foi colocado um filtro membrana de poro 0,45µm sobre a superfície de uma placa de Agar Arcobacter (Oxoid). Sobre a membrana, foram inoculados 0,4 mL do caldo enriquecido. As placas foram submetidas à

temperatura ambiente por 60 min, para que o líquido fosse absorvido pelo meio de cultura (filtração passiva). As células de *Arcobacter* spp. são pequenas e móveis, não encontrando dificuldade em passar pela membrana. Após 60min a membrana foi removida e descartada (levando junto a maioria da microbiota acompanhante, enquanto as células de *Arcobacter* spp. ficam retidas no meio de cultura). As placas foram incubadas a 30ºC por até cinco dias, sob condições aeróbias, observando-se o desenvolvimento diariamente.

c) **Isolamento e caracterização das culturas**. Foram selecionadas de uma a quatro colônias de cada placa para a caracterização. Preferivelmente, as colônias típicas com bordas lisas e 2-4mm de diâmetro. As culturas foram repicadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI Broth,) e semeadas em Ágar Sangue suplementado com 5% de sangue de carneiro (estrias de esgotamento) e incubadas a 30°C/24h. Após o crescimento, foram submetidas à coloração de Gram e teste de catalase. As culturas bastonetes Gram negativas e catalase positivas foram consideradas presuntivas.

d)

4.4 Caracterização das culturas e preservação dos isolados

As culturas características foram armazenadas (-20ºC e a -80 ºC) em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI Broth,) contendo 20% de glicerol em tubos criogênicos e em tubos de *Triptone Soy Agar* (TSA) inclinado em B.O.D. a 4ºC para posterior identificação genotípica do gênero *Arcobacter* por PCR convencional, conforme protocolo descrito por Harmon & Wesley (1996) e Houf et al. (2000).

4.5 Identificação genotípica dos isolados

4.5.1 Preparo da cultura e extração do DNA

Os isolados foram reativados em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI Broth,) mantidos em aerobiose a 30 °C por 24 horas. Duas repicagens sucessivas foram realizadas a fim de obter máximo desenvolvimento bacteriano para a extração de ácido desoxirribonucleico (DNA).

A extração do DNA das amostras foi realizada com o InstaGene™ Matrix (Bio-Rad Laboratories Hercules, CA, USA), conforme as recomendações do fabricante. Em microtubos estéreis de 1,5 mL, transferiu-se 1 mL do cultivo em caldo BHI e foram

centrifugados a 12000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e, quando necessário, o procedimento foi repetido. O *pellet* foi lavado com 1 mL de água Milli-Q estéril e centrifugado a 12000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi eliminado e foram adicionados 200 µl de InstaGene™ Matrix ao *pellet*, mantendo a amostra por 30 minutos a 56°C. Em vórtex, o microtubo contendo a amostra foi agitado por 10 segundos em alta velocidade e, em seguida, foi realizado o tratamento térmico a 100° C por 8 minutos e, posteriormente, foi centrifugado a 12.000 rpm por 2 minutos. Para a verificação indireta da quantidade de DNA, foi realizada a medição em espectrofotômetro a 260 nm (Thermo Fisher, Scientific™ NanoDrop™) no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear da Agricultura (CENA). As amostras de DNA foram armazenadas a -20°C.

4.5.2 Reação de cadeia da polimerase (PCR) para o gênero *Arcobacter*

A identificação genotípica das amostras de DNA para o gênero *Arcobacter* foi realizada por PCR convencional, no Laboratório de Higiene e Laticínios da ESALQ/USP, e os *primers* utilizados foram descritos por Harmon &Wesley (1996), conforme dispostos no Quadro 5.

Região	*Primer*	Sequência (5′ → 3′)	Descrição	Pares de bases (Pb)
Gene 16SrRNA gene (Harmon & Wesley, 1996)	*Arco* I	AGAGATTAGC CTGTATTGTA TC	*Arcobacter* spp.	1223
	Arco II	TAGCATCCCC GCGAATGA		

Quadro 5 – Sequências de nucleotídeos dos *primers Arco* I e *Arco* II utilizados para identificação do gênero de *Arcobacter* spp.
Fonte: Adaptado Harmon & Wesley (1996).

Para a reação de PCR foram utilizados 2 µl do DNA bacteriano, 2,0mM de $MgCl_2$, 10 pmol de cada *primer* (*ArcoI* e *ArcoII*), 1.0 U de Taq DNA polimerase, 1 X tampão de PCR e água até o volume final de 25 µl. A reação de PCR realizada iniciou com à desnaturação à 94°C por 4 minutos seguido por 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 58°C e 1 minuto a 72°C. As amplificações foram realizadas em

termociclador Bio-Rad C-1000 (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) (Harmon & Wesley, 1996)

Alíquotas de 5 µL da reação de PCR foram analisadas por eletroforese (80V, 80 mA, 120 minutos) em gel de agarose 1% (m/v) tampão TBE 0,5X (45 mM Tris-Borato; 1 mM EDTA pH 8,0), contendo brometo de etídio (0,3 µg/mL de gel). Foi aplicado um padrão de peso molecular de 100 pares de bases (pb). A imagem do gel foi capturada por um digitalizador sob trans-iluminação ultravioleta usando o Image LabTM Software do Molecular Imager Gel Doc^{TM} XR (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). Para controle da reação em cadeia pela polimerase foi utilizado o DNA extraído de *Arcobacter butzleri* concedido pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP) (Oliveira et al., 2018).

4.5.3 Detecção de espécies de *Arcobacter* spp. por multiplex PCR (mPCR)

A reação por m-PCR para identificação da espécie de *Arcobacter* foi realizada no Instituto de Bioquímica y Microbiología da Facultad de Ciencias da Universidad Austral de Chile (UACH) de acordo com o Convênio com a ESALQ-USP , e os *primers* utilizados foram descritos por Houf et al., (2000); Douidah et al., (2010), conforme mostra o Quadro 6.

Para a reação de PCR foram utilizados 5 µl do DNA bacteriano, 1,5 µl de MgCl2 (50 mM), 1 µl de cada primer (50 µM), 0,3 de Taq DNA polimerase (5U/ µl), 5µl 10X tampão de PCR e água (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) até o volume final de 50 µl. A reação de PCR realizada iniciou com à desnaturação à 94°C por 4 minutos seguido por 30 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 58°C e 2 minutos a 72°C. As amplificações foram realizadas em termociclador Biometra® (Houf et al., 2000; Douidah et al., 2010).

Alíquotas de 10 µl da reação de PCR contendo 1µl Buffer de Carga 10X foram analisados por eletroforese (100V, 500 mA, 120 minutos) em gel de agarose 2% (m/v) com tampão Buffer 1.5X contendo SYBR Safe Invitrogen DNA® (Thermo Fisher Scientific). Foi aplicado o padrão de peso molecular GeneRuler 100 bp plus DNA Ladder. A imagem do gel foi capturada por um digitalizador sob trans-iluminação ultravioleta Fermentas®.

Região	Primer	Sequência	Espécie	Pares de bases (pb)
23SrRNA gene (Houf et al., 2000)	CryF	TGCTGGAGCGGATAGAAGTA	*A. cryaerophilus*	395
	CryR	AACAACCTACGTCCTTCGAC		
23SrRNA gene (Douidah et al., 2010)	ArcoF	GCYAGAGGAAGAGAAATCAA	Região conservada	
	ButR	TCCTGATACAAGATAATTGTACG	*A. butzleri*	2061
	TherR	GCAACCTCTTTGGCTTACGAA	*A. thereius*	1590
	CibR	CGAACAGGATTCTCACCTGT	*A. cibarius*	1125
	SkiR	TCAGGATACCATTAAAGTTATTGAGT	*A. skirrowii*	198

Quadro 6 – Sequência de nucleotídeos utilizados diferenciações das espécies
Fonte: Adaptado de Houf et al. (2000) e Douidah et al. (2010).

Aqueles isolados para os quais não foi possível identificar as espécies por m-PCR foram submetidos e analisados pela técnica de PCR-RFLP (Figueras et al., 2008).

4.5.4. Amplificação da região rRNA 16S pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

A análise de amplificação inicial de 1026 pb do gene 16S rRNA para análise molecular por PCR-RFLP e posterior digestão enzimática utilizando a enzima *Tru*1I (M*se*I) foi realizada no Instituto de Bioquímica y Microbiología da Facultad de Ciencias da Universidad Austral de Chile (UACH).

Para a amplificação por PCR, foram empregados *primers* (CAH 16S 1a-Forward e CAH 16S 1b-Reverse) descritos por Marshall et al. (1999) para amplificar fragmentos de DNA de 1.026 pares de base (pb).

Região	Primer	Sequência (5′ → 3′)	Descrição	Pares de bases (pb)
Gene 16*S* rRNA (Marshall et al.,1999)	CAH 16S 1ª - *Foward*	AAT ACA TGC AAG TCG AAC GA	Fragmentos de DNA do gene 16*S* rRNA	1026
	CAH 16S 1b - *Reverse*	TTA ACC CAA CAT CTC ACG AC		

Quadro 7 – Sequências de nucleotídeos dos *primers* utilizados para amplificação inicial de 1026 pb do gene *16*S rRNA

Fonte: Adaptado Marshall et al. (1999)

Para verificar a amplificação foi utilizado o protocolo descrito por Marshall et al., (1999), com a reação contendo 5 µl do DNA bacteriano, 1 µl de cada primer (50mM), 1 µl de dNTP 10mM, 1,5 µl de MgCl2 , 0,5 µl de Taq DNA polimerase (5 U/ µl), 5 µl de buffer 10X e água ultrapura estéril (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) até o volume final de 50 µl. A reação de PCR realizada iniciou com a desnaturação à 95°C por 2 minutos seguido por 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 52°C, 90 segundos a 72°C e extensão final 72ºC por 10 minutos. As amplificações foram realizadas em termociclador Biometra® (Marshall et al., 1999).

Alíquotas de 10 µL da reação de PCR contendo 1µl Buffer de Carga 10X foram analisados por eletroforese (100V, 500 mA, 40 minutos) em gel de agarose 1% (m/v) com tampão Buffer 1.5X contendo SYBR Safe Invitrogen DNA® (Thermo Fisher Scientific). Foi aplicado o padrão de peso molecular *GeneRuler* 100 bp *plus* DNA *Ladder*. Foram incluídos cinco controles positivos, sendo: *Arcobacter butzleri* (LMG 10828), *Arcobacter cryaerophilus* (LMG 9904), *Arcobacter skirrowii* (LMG 6621), *Arcobacter thereius* (LMG 24486) e *Arcobacter cibarius* (CECT 7203). Também foi utilizado um branco (solução de reação, com adição da enzima e sem adição de DNA) como controle negativo da reação. A imagem do gel foi capturada por um digitalizador sob trans-iluminação ultravioleta Fermentas®.

A amplificação foi realizada como controle para verificar a correta amplificação inicial de 1026 pb do gene 16S rRNA antes de utilizar a enzima *Tru*1I (*Mse*I) na reação de PCR-RFLP, conforme a metodologia de Figueras, et al. (2008).

4.5.5. Detecção de espécies dos gêneros *Arcobacter*, *Campylobacter* e *Helicobacter* pela técnica de PCR dos Polimorfismos na Longitude dos Fragmentos de Restrição (PCR-RFLP)

Assim como a reação por m-PCR, as análises de PCR-RFLP para identificação das espécies dos gêneros *Arcobacter*, *Campylobacter* e *Helicobacter* também foram realizadas no Instituto de Bioquímica y Microbiología da Facultad de Ciencias da Universidad Austral de Chile (UACH) de acordo com o Convênio entre as Universidades.

Após verificação da amplificação, foi feita análise de restrição de endonuclease dos produtos como descrita por Figueras et al. (2008). Alíquota de 10 µl dos produtos de PCR foram acrescidos 2µl de tampão, 5U de enzima de restrição *Tru*1I (*Mse*I), 10 µl de produto da PCR e completando com água ultrapura estéril (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha), perfazendo um total de 20µl. Dessa forma, foram submetidos a 3 horas de digestão a 65ºC em Termoblock, conforme a recomendação do fabricante.

Alíquotas de 10ul da digestão enzimática por *Tru*1I (*Mse*I) contendo 3 µl Buffer de Carga 6X foram submetidos à corrida eletroforética (100 Volts, 500 mA por 2 horas), juntamente com o padrão de peso molecular *GeneRuler* 100 bp plus DNA Ladder em gel de agarose 3% (m/v) com tampão Buffer 1.5X contendo SYBR Safe Invitrogen DNA® (Thermo Fisher Scientific). Foram incluídos um controle positivo para *Arcobacter butzleri* LMG 10828 e um branco (solução de reação, com adição de enzimas e sem adição de DNA. A imagem do gel foi capturada por um digitalizador sob trans-iluminação ultravioleta Fermentas®.

Aqueles isolados para os quais não foi possível identificar a espécie por m-PCR (Houf et al., 2000; Douidah et al., 2010) e foram obtidos como resultados pares de bases semelhantes aos das espécies *Arcobacter* pela técnica de PCR-RFLP (Figueras et al., 2008), foram submetidos a análises adicionais de Sequenciamento do gene RNAr 16S para dar continuidade à identificação dos isolados de *Arcobacter*.

4.5.6. Sequenciamento do gene RNAr 16S

Para os isolados que não foram identificados pelas metodologias descritas anteriormente, foram realizadas análises adicionais de sequenciamento do gene RNAr 16S para dar continuidade à identificação das espécies dos isolados de *Arcobacter.*

Primeiramente, foi realizada a amplificação inicial de 1.026 pb do gene 16S rRNA, conforme Marshall et al. (1999), conforme descrito no item 4.5.4., empregando os *primers* (CAH 16S 1a-Forward e CAH 16S 1b-Reverse) para amplificar fragmentos de DNA de 1.026 pares de base (pb) (Marshall et al.,1999) no Laboratório de Higiene e Laticínios do LAN/ESALQ/USP.

Após a amplificação por PCR, no Laboratório de Biologia Celular e Molecular da Profa. Dra. Tsai do Centro de Energia Nuclear e Agronômico (CENA/USP), foi realizada a purificação dos produtos utilizando-se o kit GE HealthCare marca IllustraTM GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit (made in UK), o DNA quantificado na concentração mínima de 40 ng/µL.

As amostras foram enviadas ao Setor de Sequenciamento de DNA do CEBTEC (Centro de Biotecnologia Agrícola) para finalização com a reação de sequenciamento e para a geração da sequência de cada isolado com a utilização da técnica de Sanger com o Sequenciador 3100.

4.5.7 Análise Filogenética

Em conjunto com o Prof. Dr. Luis Collado do Laboratório de *Campylobacter* do Instituto de Bioquímica y Microbiología da Facultad de Ciencias da Universidad Austral de Chile (UACH), as sequências obtidas foram alinhadas com auxilio do programa MEGA versão 6.0 e comparadas com as depositadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) utilizando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment).

Foram consideradas da mesma espécie, os isolados com resultados que apresentaram acima de 98,6% de similaridade com a sequência do teste.

4.6. Perfil fenotípico de resistência

4.6.1. Micro-organismos testados

A atividade antimicrobiana foi avaliada com 34 isolados do total de 64 isolados de *Arcobacter* das diferentes origens das amostras de carnes de frango coletadas, abrangendo metade do total dos isolados das amostras de Frango em cortes refrigerado do varejo (n=16), Frango inteiro refrigerado do varejo (n=11) e Frango em cortes congelado do varejo (n=6). Para as amostras que obtiveram menor número de isolados, foram testados todos os isolados de *Arcobacter* spp. Essas

amostras foram: Frango inteiro congelado do varejo (n=2) e Frango em cortes refrigerado de abatedouro de produção de orgânica (n=2). Também, foram incluídas três cepas de *Arcobacter* spp. (dois isolados de *Arcobacter butzleri* e um de *Arcobacter cryaerophilus*) fornecidas pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP) para essa pesquisa (Oliveira et al., 2018). A origem e a identificação da espécie de cada isolado ou cepa testados estão dispostas na Tabela 1.

Tabela 1- Origem e identificação dos micro-organismos testados pela atividade antimicrobiana

Identificação para antibiograma	Isolado/Cepa	Origem	Identificação Espécie
1	A00a	Frango inteiro refrigerado do varejo	*A. lacus*
2	A10a	Frango inteiro refrigerado do varejo	*A. lacus*
3	A43	Frango inteiro congelado do varejo	*A. lacus*
4	A44	Frango inteiro congelado do varejo	*A. lacus*
5	A74	Frango em cortes refrigerado do varejo	*Arcobacter* spp. espécie não identficada
6	A66	Frango em cortes refrigerado do varejo	*A. lacus*
7	A66	Frango em cortes refrigerado do varejo	*A. butzleri*
8	A68	Frango em cortes refrigerado do varejo	*A. butzleri*
9	A75	Frango em cortes refrigerado do varejo	*A. lacus*
10	A91	Frango em cortes congelado do varejo	*A. thereius*
11	A95	Frango em cortes congelado do varejo	*A. lacus*
12	A104	Frango em cortes congelado do varejo	*A. thereius*
13	A105	Frango em cortes congelado do varejo	*A. thereius*
14	A146b	Frango em cortes refrigerado de abatedouro de produção orgânica	*A. lacus*
15	A147b	Frango em cortes refrigerado de abatedouro de produção orgânica	*Arcobacter* spp. espécie não identficada
16	A01a	Frango inteiro refrigerado do varejo	*A. lacus*
17	A02a	Frango inteiro refrigerado do varejo	*A. lacus*
18	A05c	Frango inteiro refrigerado do varejo	*A. lacus*
19	A09a	Frango inteiro refrigerado do varejo	*A. lacus*
20	A12b	Frango inteiro refrigerado do varejo	*A. lacus*
21	A14b	Frango inteiro refrigerado do varejo	*A. lacus*
22	A16a	Frango inteiro refrigerado do varejo	*A. lacus*
23	A20a	Frango inteiro refrigerado do varejo	*A. lacus*
24	A21b	Frango inteiro refrigerado do varejo	*A. lacus*
25	A70	Frango em cortes refrigerado	*A. lacus*
26	A72	Frango em cortes refrigerado	*A. lacus*
27	A74	Frango em cortes refrigerado	*A. lacus*
28	A78	Frango em cortes refrigerado	*A. lacus*
29	A84	Frango em cortes refrigerado	*A. lacus*
30	A87	Frango em cortes refrigerado	*A. lacus*
31	A88	Frango em cortes refrigerado	*A. lacus*
32	A90	Frango em cortes refrigerado	*A. lacus*
33	A108	Frango em cortes congelado	*A. lacus*
34	A120	Frango em cortes congelado	*A. lacus*
35	Ab1	Controle Positivo de *Arcobacter* -Frango em cortes refrigerados da cidade de São Paulo (FMVZ/USP; Oliveira, et al., 2018)	*A. butzleri*
36	Ac	Controle Positivo de *Arcobacter* -Frango em cortes refrigerados da cidade de São Paulo (FMVZ/USP; Oliveira, et al., 2018)	*A. cryaerophilus*
37	Ab2	Controle Positivo de *Arcobacter* -Frango em cortes refrigerados da cidade de São Paulo (FMVZ/USP; Oliveira, et al., 2018)	*A. butzleri*

4.6.2. Método de difusão em ágar

A atividade antimicrobiana dos antibióticos frente aos isolados de *Arcobacter* spp. selecionados foi realizada por meio da técnica de difusão em ágar Mueller-Hinton suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado, conhecido como antibiograma com a metodologia recomendada pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2015). O inoculo padrão de cada isolado foi preparado em solução salina de cloreto de sódio 0,85%, a partir de colônias vivas da espécie bacteriana contidas em uma placa de Agar TSA na densidade ótica do padrão 0,5 Mc Farland (0,08 - 0,1 a 625 nm), correspondente a 10^8 UFC/mL. Os antibióticos em discos utilizados foram: ampicilina (10 µg), azitromicina (10 µg), cloranfenicol (30 µg), ciprofloxacina (15 µg), clindomicina (15 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), canamicina (30 µg), ácido nalidíxico (2 µg), estreptomicina (30 µg), tetraciclina (30 µg) e vancomicina (30 µg). As bactérias de cada suspensão foram inoculadas em ágar Muller Hinton com 5% de sangue de carneiro desfibrinado usando um cotonete estéril com ponta de algodão. As placas foram mantidas a 37° C por 1 a 2 minutos, para permitir que aerobiose a 30° C por 48h. O diâmetro das zonas de inibição de desenvolvimento do micro-organismo frente ao antimicrobiano, sendo que quanto maior o diâmetro formado ao redor do disco contendo o antimicrobiano, maior a inibição do micro-organismo testado frente a este antimicrobiano. Os halos foram medidos com paquímetro e comparandos com os padrões estabelecidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* - CLSI (2018) e pelo The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST (2018) para *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*, *Enterobacteriaceae* e organismos não-fastidiosos, conforme apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Padrões utilizados para comparação do nível de resistência ao antimicrobianos de *Arcobacter* spp. e as respectivas referências para a interpretação dos resultados obtidos nesse estudo

Antimicrobianos	Categorias interpretativas e diâmetros, em milímetros, (*breakpoints*), dos antimicrobianos			Faixa do disco de difusão (mm)	Referências	
	Sensível (S) (mm)	Intermediário (I) (mm)	Resistente (R) (mm)			
Ácido nalidíxico 30ug	≥19	14 -18	≤ 13		*Enterobacteriaceae*	CLSI, 2018
Ampicilina 10ug	≥ 14		< 14		*Enterobacteriaceae*	EUCAST, 2018
Azitromicina 15ug	≥ 20		< 20		*Campylobacter jejuni*	EUCAST, 2018
	≥ 24		< 24		*Campylobacter coli*	
Canamicina 30ug	≥ 18	14 – 17	≤ 13		*Enterobacteriaceae*	CLSI, 2018
Ciprofloxacina 5ug	≥ 26		< 26		*Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*	EUCAST, 2018
Clindamicina 2ug				-	Organismos não fastidiosos - *Escherichia coli* ATCC® 25922	CLSI, 2018
				24-30	Organismos não fastidiosos - *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923	
Cloranfenicol 30ug	≥18		< 18		*Enterobacteriaceae*	EUCAST, 2018
Eritromicina 15ug	≥ 20		< 20		*Campylobacter jejuni*	EUCAST, 2018
	≥ 24		< 24		*Campylobacter coli*	
Estreptomicina 10ug	≥15	12 – 14	≤ 11		*Enterobacteriaceae*	CLSI, 2018
Gentamicina 10ug	≥15	13 – 14	≤12		*Enterobacteriaceae*	CLSI, 2018
Tetraciclina 30ug	≥30		<30		*Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*	EUCAST, 2018
Vancomicina 30ug				-	Organismos não fastidiosos - *Escherichia coli* ATCC® 25922	CLSI, 2018
				17-21	Organismos não fastidiosos - *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923	

Legenda: (-) indica que o disco não está disponível ou que os pontos de interrupção não são aplicáveis, no caso dos antimicrobianos Clindamicina e Vancomicina para Organismos não fastidiosos - *Escherichia coli* ATCC® 25922 Gram-negativo (CLSI, 2018), assim como *Arcobacter* spp. Dessa forma, foram necessários utilizar os padrões desses antimicrobianos dos Organismos não fastidiosos para *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 (CLSI, 2018) para que fosse possível as análises dos dados, já

que não há referência padronizada para comparação do nível de resistência a antimicrobianos de *Arcobacter* spp. até o momento.

4.6.3. Análise estatística

A análise estatística dos dados obtidos no teste de antibiograma foi efetuada com auxílio do software FactoMineR, versão 1.39 (2017), pela da Análise exploratória de dados multivariada e mapeamento de dados utilizando o método de componente principais: análise de componentes principais (PCA) para variáveis quantitativas, gerando o mapa de fator individuais e o mapa do fator de variáveis.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Isolamento de *Arcobacter*

A inexistência de uma metodologia padronizada de isolamento de *Arcobacter* tornou necessária a utilização de procedimentos para o preparo da amostra para análise de *Campylobacter*, conforme já descrito e a adaptação da metodologia e isolamento para *Arcobacter* de Houf et al. (2001).

Foram analisadas 153 amostras de carnes de frango. Dessa forma, foram selecionadas de uma a quatro colônias típicas pequenas, lisas e transparentes com bordas lisas e 2-4mm de diâmetro em crescimento a 30°C/72h em Ágar *Arcobacter* (Oxoid), que foram submetidas aos testes bioquímicos de coloração de Gram e catalase. As colônias que apresentaram coloração de Gram negativas, bastonetes de forma helicoidal e catalase positivas foram consideradas presuntivas para *Arcobacter* spp. obtendo um total de 303 isolados, conforme ilustrado nas Figuras 1, 2 e 3. Ressaltando que houveram amostras que apresentaram o desenvolvimento de colônias semelhantes às colônias típicas de *Arcobacter* spp. que não foram confirmadas positividade para *Arcobacter* spp. e, também, possível contaminação nas mesmas placas onde foram isoladas as colônias presutinvas para *Arcobacter* spp.

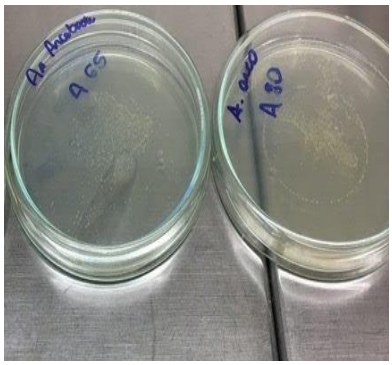

Figura 1 – Crescimento de colônias típicas de *Arcobacter* em Ágar Seletivo. Fonte: Arquivo pessoal (2017)

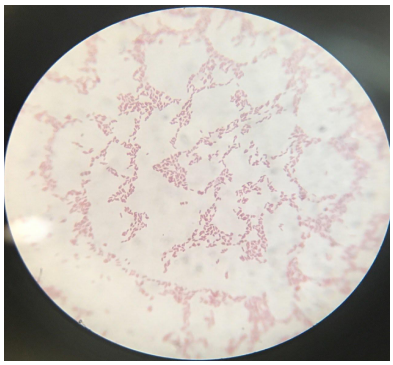

Figura 2 – Coloração de Gram com colônias consideradas presuntivas para *Arcobacter*. Fonte: Arquivo pessoal (2017).

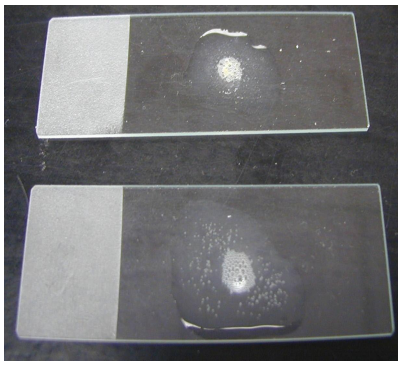

Figura 3 – Catalase positiva para as colônias consideradas presuntivas para *Arcobacter*. Fonte: Arquivo pessoal (20

5.2 Identificação genotípica

5.2.1 PCR Convencional para *Arcobacter* spp.

Das 153 amostras de carnes de frangos analisadas, foram obtidos 64 isolados de *Arcobacter* spp. Pela técnica de PCR convencional, confirmou- se a positividade do agente estudado em 38,56% (59/153) das amostras de carnes de frango e 21,12% (64/303) do isolados presuntivos, conforme exposto na Tabela 3 e ilustrado nas Figuras 4 e 5.

Tabela 3 – Resultados positivos para *Arcobacter* spp. nas amostras de carnes de frango

Origem	Número de amostras	% de amostras positivas *Arcobacter* spp.	% de isolados positivos para *Arcobacter* spp.
Frango inteiro congelado do varejo das cidades de Campinas-SP e Piracicaba-SP	30	6,6% (2/30)	6,6% (2/40)
Frango inteiro refrigerado do varejo Campinas-SP e Piracicaba-SP	30	53,3% (16/30)	36,2% (21/58)
Frangos em cortes congelados do varejo Campinas-SP e Piracicaba-SP	30	40% (12/30)	18,7% (12/64)
Frangos em cortes refrigerado do varejo Campinas-SP e Piracicaba-SP	30	90% (27/30)	38,5% (27/70)
Frango em cortes refrigerado de abatedouro de produção de orgânica localizado na cidade de Ipeúna-SP	15	13,3% (2/15)	8,7% (2/23)
Frangos em cortes refrigerado de abatedouro de produção frango de livre de antibiótico (AF *Antibiotic Free)* localizado na cidade de Ipeúna-SP	18	0,0% (0/18)	0,0% (0/35)
Total	153	38,56% (59/153)	21,12% (64/303)

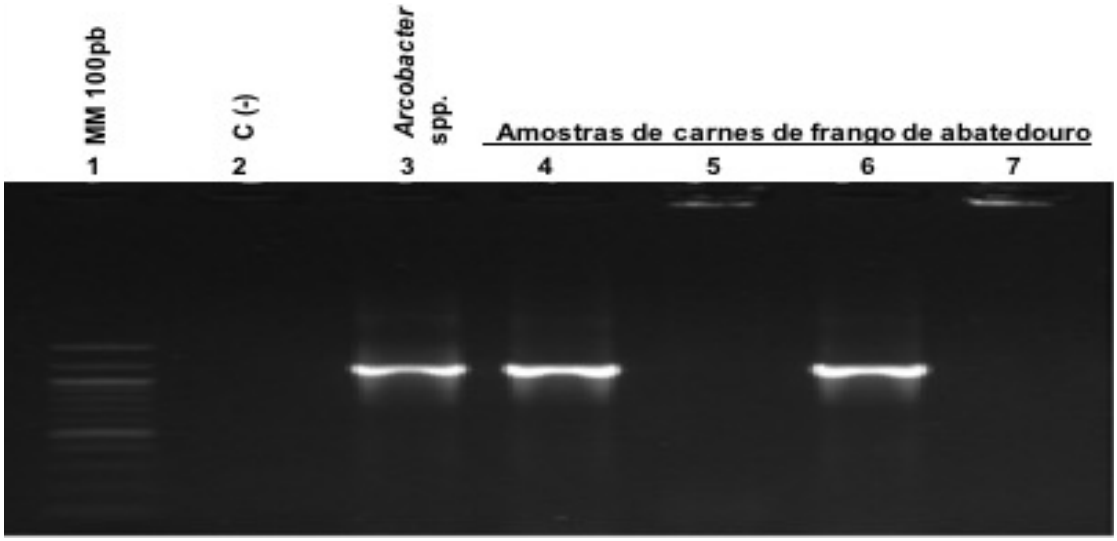

Figura 4 – Gel de agarose de produtos de amplificação por PCR do gênero de *Arcobacter*. 1 – marcador molecular 100 pares de bases (pb); 2 – Controle negativo da reação de PCR; 3 – Controle positivo do gênero de *Arcobacter*; Amostras de isolados de frangos em cortes refrigerados de abatedouro de produção orgânica: 4 – Amostra 146b (positiva); 5 – Amostra 146c (negativa); 6 – Amostra 147b (positiva); 7 – Amostra 147c (negativa)

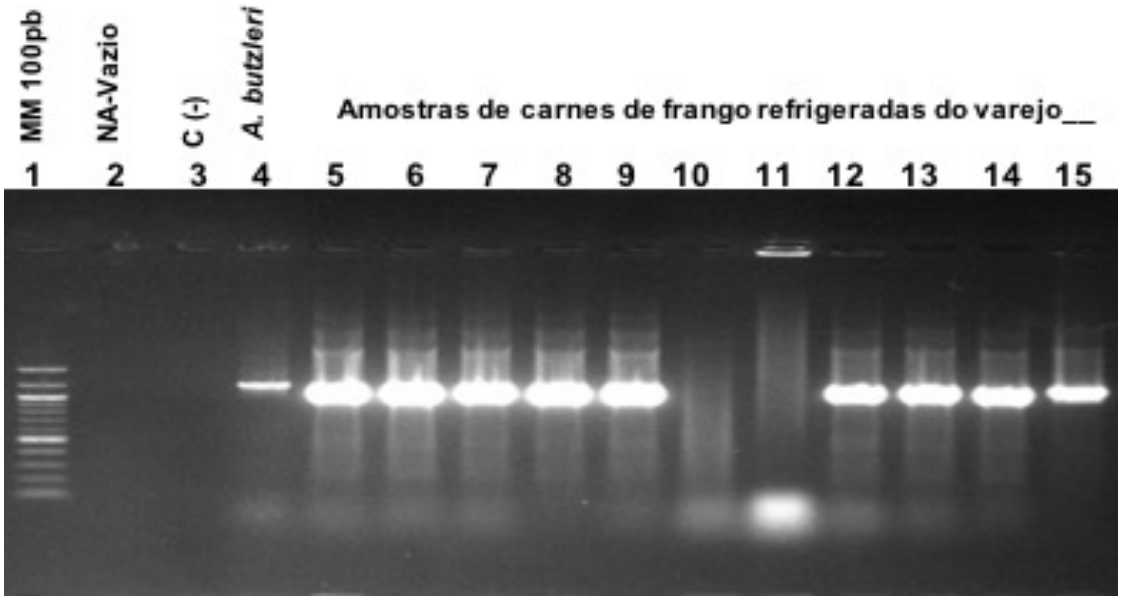

Figura 5 - Gel de agarose representativo de produtos de amplificação por PCR do gênero *Arcobacter* 1- marcador molecular 100 pb; 2 – NA(vazio); 3 – Controle Negativo (reação de PCR sem DNA); 4– Controle positivo *A. butzleri* (controle positivo utilizado pertence à coleção do Departamento de Patologia da FMVZ/USP, Oliveiral et al., 2018); Amostras de frango em cortes refrigerados do varejo: 5- Amostra A70 (positiva); 6- Amostra A71(positiva); 7- Amostra A72 (positiva); 8- Amostra A74 (positiva); 9- Amostra A75 (positiva); 10 – Amostra A76 (negativa); 11 – Amostra A77 (negativa); 12 – Amostra A78 (positiva); 13 –Amostra A79 (positiva); 14 – Amostra A80 (positiva); 15 – Amostra A81(positiva).

5.2.2. Identificações das espécies dos isolados de *Arcobacter* spp. por m-PCR

Os 64 isolados identificados como *Arcobacter* spp. foram submetidos à análise de espécie por m-PCR (Houf et al., 2000; Douidah et al., 2010), podendo os resultados das amplificações ser visualizados na Figura 6.

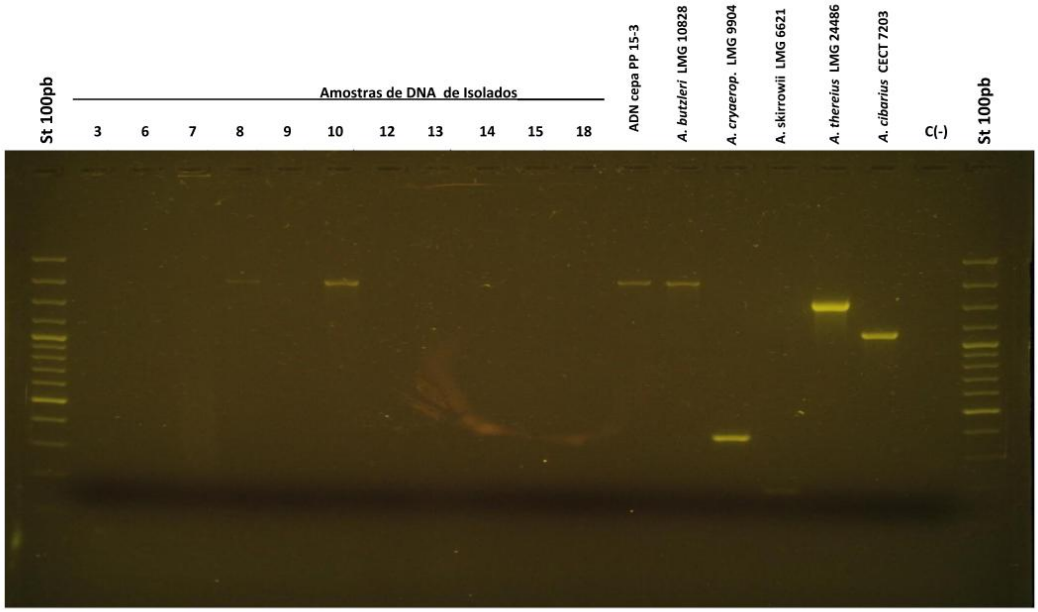

Figura 6 - Gel de agarose de produtos de amplificação por m-PCR para espécies de *Arcobacter*: St 100pb – marcador molecular GeneRuler 100 pb Plus. Amostra 3 (negativo); Amostra 6 (negativo), Amostra (negativo), Amostra 8 (positiva- *A. butzleri)*; Amostra 9 (negativo), Amostra 10 (positiva- *A. butzleri);* Amostra 12 (negativo), Amostra 13 (negativo), Amostra 14 (negativo), Amostra 15 (negativo), Amostra 18 (negativo); DNA cepa PP15-3 – cepa *A. butzleri* pertencente ao Laboratório de *Campylobacteraceae* da UACH; *Arcobacter butzleri* LMG 10828: Controle positivo; *Arcobacter cryaerophilus* LMG 9904: Controle Positivo; *Arcobacter skirrowii* LMG 6621; *Arcobacter thereius* LMG 24486; *Arcobacter cibarius* CECT 7203; St 100pb – marcador molecular GeneRuler 100 pb Plus.

.

Foram identificados 5 isolados pela metodologia de m-PCR para espécies. Das 5 espécies identificadas por m-PCR, 2 foram positivas para *A. butzleri* e 3 para *A. thereius*, obtendo assim o resultado de 3,12% de isolados positivos para *A. butzleri* e 4,68% para *A. thereius*. A origem das amostras de carnes de frango que apresentaram contaminação por *A. butzleri* foi somente a de frango em cortes refrigerado de varejo das cidades de Campinas-SP e Piracicaba-SP, totalizando 1,30% (2/153) do total de amostras de carne de frango. Para *A. thereius*, a origem das amostras contaminadas foi a de frango em cortes congelado do varejo das cidades de Campinas-SP e

Piracicaba-SP, com o total de 1,96% (3/153) das amostras coletadas. Os outros 59 isolados, os quais não foi possível a identificação da espécie por m-PCR, foram analisados por PCR-RFLP (Figueras et al., 2008).

5.2.3. Detecção de espécies dos gêneros *Arcobacter*, *Campylobacter* e *Helicobacter* pela técnica de PCR-RFLP

Os 59 isolados não identificados m-PCR foram submetidos à análise de PCR-RFLP de acordo com Figueras et al. (2008). Para os isolados de todas as amostras de carne de frango (59/59), foram obtidos como resultados pares de bases semelhantes aos da espécie *Arcobacter butzleri*: 548pb, 216pb e 138pb e, como controle positivo, foi utilizada a linhagem *Arcobacter butzleri* (LMG 10828). A Figura 7 apresenta a reação de PCR da amplificação de fragmentos de DNA de 1026 pb do gene RNAr 16S. A Figura 8 apresenta, como resultado, pares de bases semelhantes do gene RNAr 16S da espécie *A. butzleri*.

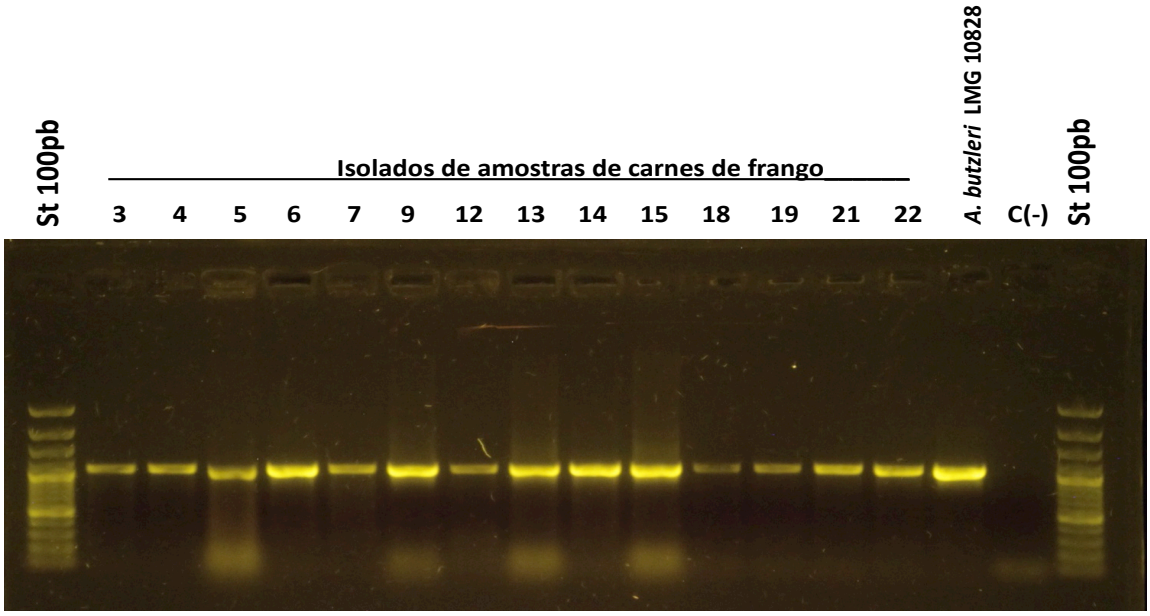

Figura 7 - Gel de agarose de reação de PCR da amplificação de fragmentos de DNA de 1026 pb do gene 16S rRNA: St 100pb – marcador molecular GeneRuler 100 pb Plus; Amostra 3 (positiva – amplificação do gene); Amostra 4 (positiva – amplificação do gene; Amostra 5 (positiva – amplificação do gene); Amostra 6 (positiva – amplificação do gene); Amostra 7 (positiva – amplificação do gene); Amostra 9 (positiva – amplificação do gene); Amostra 9 (positiva – amplificação do gene)); Amostra 12 (positiva – amplificação do gene); Amostra 13 (positiva – amplificação do gene); Amostra 14 (positiva - amplificação do gene); Amostra 15 (positiva - amplificação do gene); Amostra 18 (positiva - amplificação do gene); Amostra 19 (positiva - amplificação do gene); Amostra 21 (positiva - amplificação do gene); Amostra 22 (positiva - amplificação do gene); *Arcobacter butzleri* (LMG 10828): Controle

positivo; C (-): Controle negativo da reação de PCR do gene 16*S r*RNA; St 100pb – marcador molecular GeneRuler 100 pb Plus.

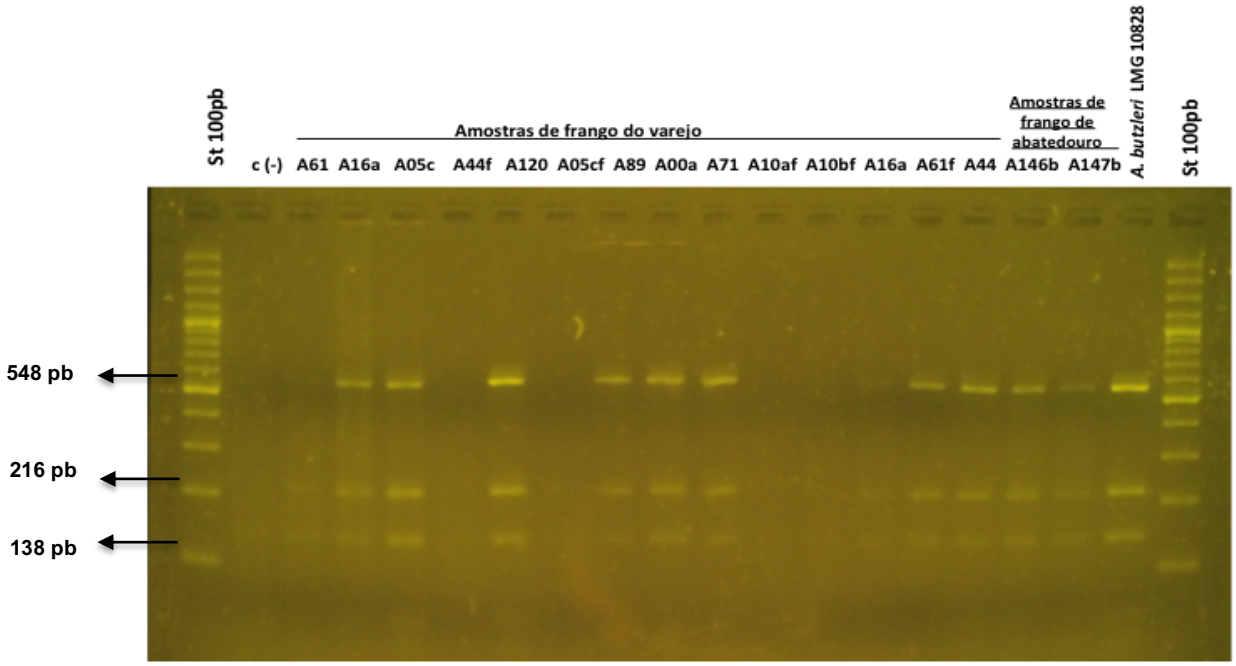

Figura 8 - Gel de agarose de produtos da reação de PCR-RFLP com enzima a *Tru*1I (*Mse*I) para espécies dos gêneros *Arcobacter*, *Campylobacter* e *Helicobacter* : St 100pb – marcador molecular GeneRuler 100 pb Plus; C (-): Controle negativo da reação de PCR-RFLP; A61 (positiva - perfil *A. butzleri*); A16a (positiva - perfil *A. butzleri*); A05c (positiva - perfil *A. butzleri*); A44f (negativa); A120 (positiva - perfil *A. butzleri*); A05cf (negativa); A89 (positiva - perfil *A. butzleri*); A00a (positiva - perfil *A. butzleri*); A71 (positiva - perfil *A. butzleri*); A10af (negativa); A10bf (negativa); A16a (positiva - perfil *A. butzleri*); A61f (negativa); A44 (positiva - perfil *A. butzleri*); A146b (positiva - perfil *A. butzleri*); A147b (positiva - perfil *A. butzleri*); *Arcobacter butzleri* (LMG 10828): Controle positivo; St 100pb – marcador molecular GeneRuler 100 pb Plus

Por PCR – RFLP, todos os isolados apresentaram perfis de bandas visualmente idênticos ou muito semelhantes ao do controle positivo. Entretanto, com os resultados obtidos por essa técnica ainda não é possível confirmar a espécie. Foram, então, necessárias análises de sequenciamento do gene RNAr 16S para identificação das espécies.

5.2.4. Identificação das espécies de *Arcobacter* por Sequenciamento do gene RNAr 16S

Para os 59 isolados que não foram identificados por m-PCR e obtiveram perfil de pares de bases semelhantes aos da espécie *Arcobacter butzleri*, através da PCR-RFLP, conforme descrito anteriormente, foram realizadas análises adicionais de

sequenciamento 16*S* para dar continuidade à identificação das espécies dos isolados de *Arcobacter.*

Do total de amostras de carnes de frango positivas para *Arcobacter* spp. nesse estudo, foram obtidos 64 isolados. As espécies isoladas foram *Arcobacter lacus* com positividade de 89,06% (57/64), seguida por *Arcobacter thereius* com 4,68% (3/64), *Arcobacter butzleri* e *Arcobacter* spp. espécie não identficada ambas com 3,12% (2/64). Pela análise de sequenciamento do gene RNAr 16S, foram identificados os 59 isolados de carnes de frango, sendo que 57 foram positivas para *A. lacus* e 2 para *Arcobacter* spp. espécie não identficada. Assim, do total de isolados analisados (N=64), 89,06% (57/64) de isolados foram positivos para *A. lacus* e 3,12% (2/64) para *Arcobacter* spp., espécie não identficada. As amostras de carnes de frango que apresentaram contaminação e as respectivas espécies de *Arcobacter* estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Identificação e origem das espécies dos isolados de *Arcobacter* spp. de amostras de carnes de frango.

Origem dos isolados	*A. lacus*	*A. butzleri*	*A. thereius*	*Arcobacter* spp. (espécie não identficada)
Frango inteiro congelado do varejo das cidades de Campinas-SP e Piracicaba-SP (n=2)	3,12% (2/64)	-	-	-
Frango inteiro refrigerado do varejo das cidades de Campinas-SP e Piracicaba-SP (n= 21)	32,81% (21/64)	-	-	-
Frango em cortes congelado do varejo das cidades de Campinas-SP e Piracicaba-SP (n=12)	14,06% (9/64)	-	4,68% (3/64)	-
Frango em cortes refrigerado do varejo das cidades de Campinas-SP e Piracicaba-SP (n=27)	37,5% (24/64)	3,12% (2/64)	-	1,56% (1/64)
Frango em cortes refrigerado de abatedouro de produção orgânica localizado em Ipeúna-SP (n=2)	1,56% (1/64)	-	-	1,56% (1/64)
Total de isolados (n=64)	89,06% (57/64)	3,12% (2/64)	4,68% (3/64)	3,12% (2/64)

As sequências obtidas a partir do sequenciamento do gene RNAr 16S foram alinhadas com auxilio do programa MEGA versão 6.0 e comparadas com as depositadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) utilizando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment). Os resultados detalhaos do sequenciamento do gene RNAr 16S para todos os isolados de *Arcobacter* de carnes de frango estão apresentados no ANEXO A desse trabalho.

Foram consideradas como da mesma espécie os isolados com resultados que apresentaram acima de 98,6% de similaridade com a sequência do teste. A Figura 9, apresenta a árvore filogenética das espécies dos isolados. Foi encontrada maior porcentagem de ocorrência de *A. lacus.* No entanto, cabe ressaltar a proximidade entre as espécies *A. lacus* e *A. butzleri* ao observá-las na árvore filogenética. Os resultados mais detalhados da identificação genotípica para todos os isolados de *Arcobacter* de carnes de frango estão apresentados no ANEXO B desse trabalho.

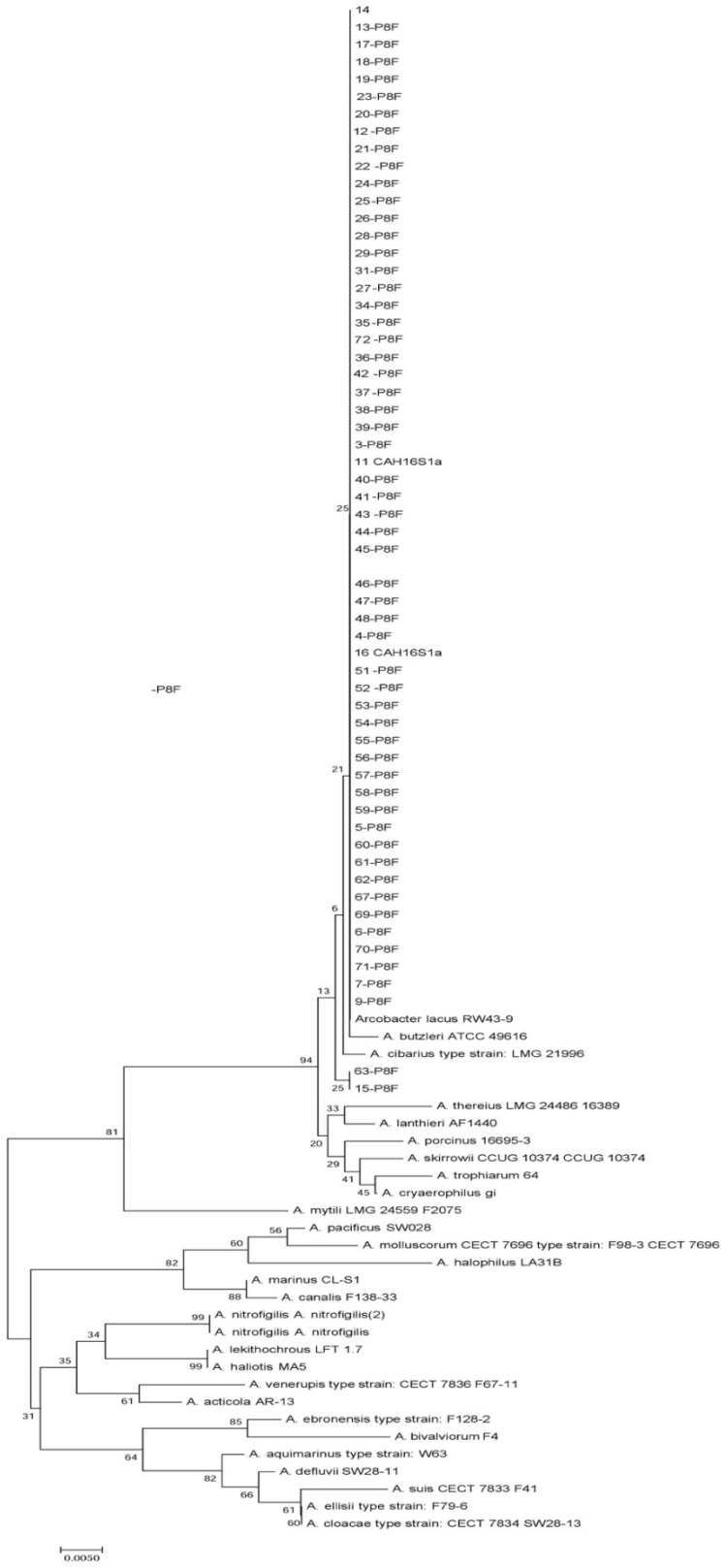

Figura 9 – Árvore filogenética com as sequências obtidas dos isolados de *Arcobacter* de carnes de frango pela técnica de sequenciamento do gene RNAr 16S.

No Brasil existem poucos estudos que relatam a ocorrência de *Arcobacter* em carnes de frango e suína em abatedouros e plantas de processamento. No presente trabalho, do total de 153 amostras de carnes de frango analisadas, a porcentagem de positividade encontrada para *Arcobacter* spp. foi de 38,56% (59/153). Corroborando com a taxa obtida no presente estudo, Fallas et al. (2014) relataram a frequência de ocorrência de *Arcobacter* spp. (56%) em amostras de peito de frango coletadas em amostras comerciais da Costa Rica. Villalobos et al. (2013) verificaram menos amostras positivas (17,3%) quando analisaram vísceras de frango. Oliveira et al. (2018), em pesquisa recente no Brasil, demonstraram 18,3% de carnes de frango contaminadas por *Arcobacter* spp.

A maior taxa de isolamento de *Arcobacter* foi a de amostras de carne de frango provenientes do varejo com 37,25% (57/153). Já para as amostras de carne de frango de origem de abatedouro de produção orgânica e livre de antibiótico (*Antibiotic Free – AF*), a taxa foi bem menor: 1,31% (2/153). Barboza et al. (2017), também encontraram diferenças nas taxas de isolamento de *Arcobacter* spp. entre amostras de varejo e de amostras provenientes de plantas de processamento, obtendo 56,6% para amostras do varejo, 8,7% para amostras de carcaças após tratamento de *chiller*; porém para conteúdo cecal foram positivas 34,8% das amostras.

Em relação à diferença da taxa de isolamento de *Arcobacter* entre a origem das amostras de carnes de frango do varejo (37,25%) e as amostras de carnes de frangos provenientes abatedouro de produção orgânica e livre de antibiótico (*Antibiotic Free – AF*) (1,31%), a taxa de contaminação das provenientes de abatedouro para *Arcobacter* spp., foram de: 1,31% (2/153) para cortes de frango refrigerados de sistema de produção orgânica e 0% (0/153) para cortes de frango refrigerado sistema de produção livre de antibiótico (*AF-Antibiotic Free*). Para as provenientes de varejo, as taxas foram diferentes para cada tipo de temperatura de armazenamento e corte comercializados, sendo encontrada positividade para *Arcobacter* spp. de 17,64% (27/153) para cortes de frangos refrigerados, 10,45% (16/153) para frangos inteiros refrigerados, 7,84% (12/153) para cortes de frangos congelados e 1,31% (2/153) para frangos inteiros congelados, não sendo possível determinar em qual etapa da cadeia produtiva ocorre a contaminação por *Arcobacter* spp., no entanto sugerem que as contaminações desses produtos pode ocorrer nos abatedouros e se estender até os pontos de distribuição. Atabay et al. (2003) também relataram maior incidência de *Arcobacter* spp. em carnes refrigeradas com taxa de 95% e menor em carnes de

frango congeladas com taxa de 23%. Essas menores porcentagens de ocorrência em produtos congelados pode estar relacionada à injúria bacteriana pelo frio.

Pode-se também levantar a hipótese de possível falha do controle da temperatura ao longo da cadeia de processamento de carnes de frango até a gôndola do varejo, permitindo maior incidência de *Arcobacter* spp. em produtos de carnes de frango próximo à temperatura de abuso no armazenamento no varejo, como os cortes refrigerados do varejo e frangos inteiros refrigerados do varejo. Além disso, podem ter ocorrido falhas manipulação de manipulação dos produtos ao longo do processo produtivo de carnes de frango, aumentando a probabilidade de contaminação cruzada por *Arcobacter* spp. através das mãos de manipuladores, objetos, mesa de cortes, utensílios, por exemplo, já que as amostras de cortes de frangos refrigerados e congelados do varejos apresentaram maior contaminação por *Arcobacter* spp., quando comparadas às amostras de frangos inteiros do varejo refrigerados e congelados. Além dessas, podem ter outras fontes de contaminação de *Arcobacter* spp., como o ambiente de processamento, transporte e local de armazenamento inadequados.

Ressalta-se o isolamento da primeira espécie de amostras de carnes de frango provenientes de varejo e de abatedouro de produção orgânica , *A. lacus*, espécie potencialmente nova isolada de água residual reciclada na Espanha (Perez-Cataluña et al., 2018), o que é inédito no Brasil e, além disso, não existem estudos de ocorrência dessa espécie em frangos até o momento. A segunda espécie mais isolada, *A. thereius*, não é frequentemente isolada em carnes de frango, sendo comumente encontrada em amostras de aborto de suínos. A porcentagem de positividade de 3,12% para *A. butzleri* encontrada nesse trabalho em amostras de carne de frango é menor do que as obtidas em outras pesquisas, assim como não foi detectada a espécie *A. cryaerophilus* que, frequentemente, é isolada em carnes de frango.Contrastando com as espécies de *Arcobacter* spp. isoladas em carnes de frango no presente estudo, Oliveira et al. (2018) analisaram em carnes de aves comerciais e encontraram 63,6% de positividade para *A. butzleri* e 36,3% para *A. cryaerophilus*. Outro estudo brasileiro revelou 46,25% das carcaças de frango contaminadas por *A. butzleri* (Oliveira et al., 2001). Fallas-Padilla et al. (2014) avaliaram amostras de peito de frango comercializadas na Costa Rica e obtiveram 59% de *A. butzleri*, 19% de *A. cryaerophilus* e 22% não foram identificados a espécie. Khoshbakht et al. (2014) ao analisarem amostras de carcaças de aves, equipamentos

e instalações de abatedouros iranianos encontraram 73% de *A. butzleri*, 9% de *A. cryaerophilus* e 4,1% de *A. skirrowii*. Lee et al. (2010) analisaram amostras de carne de frango do varejo, na Coréia do Sul e verificaram prevalência de 18,3% para *A. butzleri*, e 2,8% para *A. cryaerophilus.* Esses resultados, assim como os que apresentados na presente pesquisa, apontam mais uma vez para a importante participação da carne de frango como veiculador de *Arcobacter* spp. com potencial patogênico.

As diferenças nas frequências de isolamento podem ser explicadas em termos de diferenças no tamanho da amostragem, de metodologias de isolamento empregadas e das condições higiênicas das lojas de varejo e plantas de processamento. Ressalta-se que a metodologia de isolamento de *Arcobacter* spp. utilizada no presente trabalho foi adaptada de Houf et al. (2001) e foi baseada em cultivo da amostra em caldo *Arcobacter* suplementado por CAT (Oxoid) e, posteriormente, cultivo por filtração passiva (poros de 0,45um) em Ágar *Arcobacter* suplementado com CAT (Oxoid), diferente da utilizada na maioria dos estudos publicados, que empregaram a metodologia de Atabay & Corry (1997), a qual utiliza caldo *Arcobacter* suplementado por CAT (Oxoid) e cultivo posterior em Ágar Sangue (BA – *Blood Agar*). Portanto, a metodologia utilizada na presente pesquisa pode ter possibilitado a obtenção de espécies incomuns de *Arcobacter* spp. em carnes de frangos e a seleção de diferentes espécies e espécie potencialmente nova de *Arcobacter* spp. o que é bastaste interessante. Ao utilizar dois diferentes meios de cultivos para *Arcobacter, Salas*-Massó et al. (2016) obtiveram como resultado de amostras de água e mariscos 51,9% positivas para *Arcobacter* spp. para ambos os meios de cultivos utilizados; 38,5% foram positivas utilizando somente o novo método (caldo *Arcobacter*-CAT com 2,5% de NaCl seguido de desenvolvimento em Ágar Marinho) e 9,6% foram positivas utilizando o método mais comum (caldo *Arcobacter*-CAT seguido de desenvolvimento em Ágar Sangue). Além disso, como etapa essencial de identificação de *Arcobacter* spp. e preliminar para a identificação das espécies de *Arcobacter* spp. por m-PCR, foi realizada a PCR convencional de gênero para todos os isolados presuntivos de *Arcobacter* spp., assegurando que todos os isolados que seriam submetidos às análises moleculares de identificação de espécies eram do gênero *Arcobacter* spp. González et al. (2014) encontraram diferença na metodologia de detecção de *Arcobacter* spp., obtendo maior positividade para *Arcobacter* spp. utilizando a técnica de PCR convencional para *Arcobacter* spp., com

45,1% em amostras de carcaças de frango, do que somente por m-PCR, pela qual obteve 41,2%.

É relevante considerar que 59 isolados, do total de 64 isolados, que não foram identificados por m-PCR e, anteriormente, à identificação dos isolados de *A. lacus* (57/64) e de *Arcobacter* spp. espécie não identficada (2/64) por sequenciamento do gene RNAr 16S, foram submetidos à análise de PCR-RFLP obtiveram perfil de bandas da espécie *A. butzleri* para todos os isolados testados por PCR-RFLP, indicando que essas espécies podem estar relacionadas também com alguma modificação ambiental e/ou da espécie de *A. butzleri*. Dessa forma, existe a possibilidade de *A. lacus* possuir e/ou adquirir características virulentas semelhantes da espécie *A. butzleri*, demonstrando a importância do controle desse micro-organismo como patógeno alimentar em carnes de frangos de varejo e de abatedouro. A relação entre as espécies *A. butzleri* e *A. lacus* foi verificada por uma recente pesquisa realizada por Pérez-Cataluña et al. (2018), na qual reavaliaram a taxonomia das vinte e sete espécies conhecidas de *Arcobacter* spp. e das treze recém-conhecidas, agrupando a espécie *A. butzleri* e a potencial espécie *A. lacus* no mesmo grupo monofilético (cluster 1b), demonstrando que são próximas quanto às características fenotípicas e genotípicas, sendo provenientes de diferentes fontes, como águas residuais, humanos, animais e de pele de frangos.

Dessa forma, considera-se de significante relevância à Saúde Pública a presença de *Arcobacter* nos produtos de origem animal, uma vez que se trata de um patógeno alimentar emergente e com caráter zoonótico (Ho; Lipman; Gaastra, 2006). Além disso, considerando-se que as amostras de carnes de frango do varejo e de abatedouro de produção orgânica são alimentos que deveriam ter a seguridade em relação a patógenos garantida, uma vez que se encontram no último setor antes de chegar ao consumidor, mesmo que esse sofra tratamento térmico anteriormente ao seu consumo. *Arcobacter* spp. é uma bactéria sensível ao calor, já que suas células são inativadas a partir de 55°C (Vandamme et al., 1992, On, 2001, Attanosova et al., 2008) e, portanto, é destruída com cozimento adequado dos alimentos. Entretanto, a presença de patógenos em carnes, mesmo cruas, é sempre uma preocupação, pois existe o risco de ocorrência de contaminações cruzadas nos ambientes de preparo, tanto de serviços de alimentação como de residências, além da possibilidade de falhas de cozimento.

Campylobacter é um microrganismo com algumas características comuns ao *Arcobacter* e tem sido apontado como importante causador de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) nos EUA e Europa. Nos Estados Unidos, recentemente foram estabelecidos padrões para *Campylobacter* em carcaças de frangos e perus (objetivos de desempenho), tendo-se a seguinte tolerância: 10,4% de amostras positivas em um ciclo de 51 carcaças de frango (tolera-se 5 positivas). Para *Salmonella* a tolerância é menor: 7,5% de amostras positivas no ciclo de 51 carcaças de frango. (USDA, 2011). Para *Arcobacter* não há padrões microbiológicos para carnes de frango, porém no futuro esse poderá ser um microrganismo incluído nos padrões microbiológicos de objetivo de desempenho, assim como *Salmonella* e *Campylobacter*.

5.3. Análise do perfil fenotípico de resistência

O perfil de resistência dos isolados de *Arcobacter* spp. aos antibióticos foi avaliado de forma qualitativa através do método de difusão em ágar (NCCLS, 2015) correlacionando a atividade antibacteriana dos doze antibióticos sobre os trinta e quatro isolados de *Arcobacter* spp. de carnes de frango e três controles positivos de *Arcobacter* spp. , dois controles positivos de *A. butzleri* e um de *A. cryaerophilus* concedidos pela FMVZ/USP, a partir da análise de componentes principais (PCA) das médias dos valores do diâmetro da zona de inibição (Figura 10). Observou-se que o eixo horizontal explicou 87,79% da variância total dos resultados obtidos, enquanto que o eixo vertical os outros 4,59% restante (Fig. 10), obtendo, então, a representação dos dados obtidos da atividade antibacteriana dos antibióticos testados sobre isolados de *Arcobacter* spp. nesse trabalho Também, ao demonstrar a medição do diâmetro da zona de inibição por antimicrobiano, foi possível observar que os antimicrobianos que obtiveram maiores valores de medição do diâmetro, ou seja, que houve maior inibição do desenvolvimento bacteriano estão localizados no eixo horizontal positivo, sendo: ciprofloxacina, tetraciclina, cloranfenicol, azitromicina, ampicilina e vancomicina. Já os que obtiveram menor medição do diâmetro, estão no localizados no sentido oposto do eixo horizontal, sendo: ácido nalidíxico, clindamicina e canamicina.

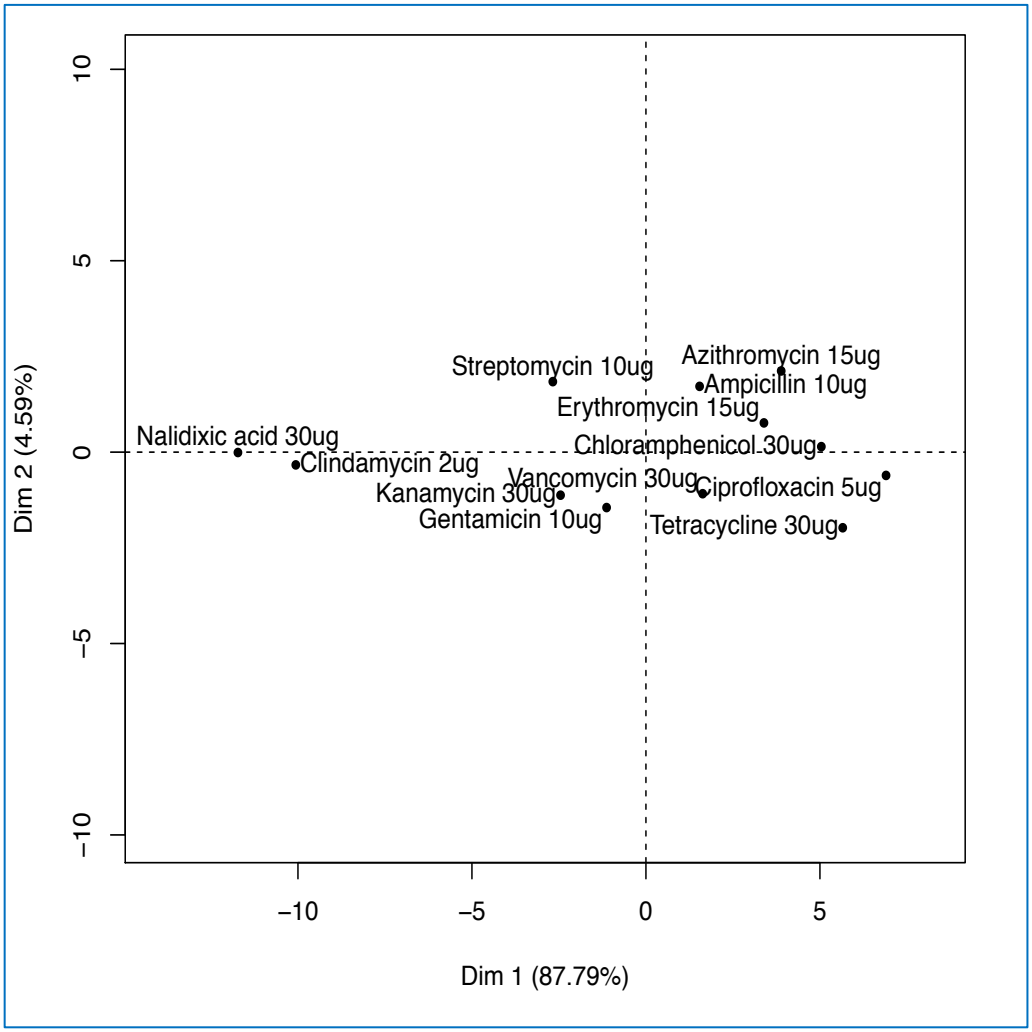

Figura 10 - Análises de componentes principais (PCA)

Dos doze antibióticos testados nos isolados de *Arcobacter* spp. e controles positivos de *Arcobacter* spp. avaliados, onze apresentaram zonas de inibição em pelo menos um dos micro-organismos testados. Para os antibióticos clindamicina e ácido nalidíxico todos os isolados testados (37/37) foram resistentes. Já, para eritromicina (11/37), canamicina (9/37), tetraciclina (8/37), cloranfenicol (7/37), gentamicina (5/37), estreptomicina (3/37), azitromicina (2/37) ciprofloxacina (2/37) e vancomicina (1/37). A quantidade de isolados resistentes foi menor que a metade para cada antibiótico e, para ampicilina, nenhum foi resistente. Foi possível observar que dentre os vinte e sete isolados de *Arcobacter lacus*, no mínimo dois isolados foram resistentes aos doze antibióticos testados. Para as quatro espécies testadas de *Arcobacter butzleri* (incluindo os dois controles positivos concedido pela FMVZ/USP), as três espécies de *Arcobacter thereius*, uma espécie de *Arcobacter cryaerophilus* (controle positivo

concedido pela FMVZ/USP) e para as duas espécies de *Arcobacter* spp. espécie não identficada, no mínimo um isolado obteve perfil resistência para quatro antibióticos diferentes. Esses resultados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5- Perfil de resistência de isolados de diferentes espécies de *Arcobacter* spp. aos antimicrobianos

Antimicrobiano	Espécies testadas de *Arcobacter* spp. de isolados de carnes de frango							
	Arcobacter spp. (n = 37)[1]	*Arcobacter* spp. (n = 34)[2]	*A. lacus* (n = 27)	*A. thereius* (n= 3)	*A. butzleri* (n = 2)	*Arcobacter* spp. espécie não identficada (n = 2)	*A. butzleri* CP[3] (n=2)	*A. cryaerophilu* CP[4] (n=1)
Ácido nalidíxico	37 (100%)	34 (100%)	27 (100%)	3 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	1 (100%)
Ampicilina	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Azitromicina	2 (5,41%)	2 (5,41%)	2 (7,41%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Canamicina	9 (24,32%)	9 (24,32%)	9 (33,33%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Ciprofloxacina	2 (5,41%)	2 (5,41%)	2 (7,41%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Clindamicina	37 (100%)	34 (100%)	27 (100%)	3 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	1 (100%)
Cloranfenicol	7 (18,42%)	6 (18,42%)	5 (18,52%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (50%)	1 (50%)[5]	0 (0%)
Eritromicina	11 (29,73%)	10 (29,73%)	10 (37,04%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)
Estreptomicina	3 (8,11%)	3 (8,11%)	3 (11,11%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Gentamicina	5 (13,51%)	5 (13,51%)	5 (18,52%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Tetraciclina	8 (21,62%)	8 (21,62%)	7 (25,62%)	1 (33,33%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Vancomicina	1 (2,70%)	1 (2,94%)	1 (3,70%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Legenda:[1]Considerando os trinta e quatro isolados de *Arcobacter* spp. testados e os três controles positivos de *Arcobacter* spp. utilizados *A. butzleri* CP1 e CP3 e *A. cryaerophilus* CP2 ; 2 Considerando somente os trinta e quatro isolados de *Arcobacter* de carnes de frango testados [3]Dois controles positivos de *A. butzleri (*CP1 e CP3); [4] Controle positivo de *A. cryaerophilus* (CP2); [5]Somente o controle positivo *A. butzleri* CP3 apresentou resistência ao Cloranfenicol.

Os resultados do perfil fenotípico de resistência aos antibióticos referentes à origem dos isolados de *Arcobacter* spp. demonstrou que os isolados de frango em cortes e frango inteiro refrigerados do varejo apresentaram maior resistência do que os provenientes de outros tipos de amostras, sendo resistentes a nove do total de doze antibióticos testados. Entretanto, esses isolados estavam em maior número

dentro os testados. Já as amostras de frango inteiro e frango em cortes congelados do varejo e de cortes de frango de produção orgânica obtiveram perfil de resistência em quantidade menor de antibióticos, com menor número de isolados de *Arcobacter* spp. testados, sendo a primeira a seis antibióticos, a segunda e a terceira a cinco antibióticos, conforme o Quadro 8.

Quadro 8 - Perfil de resistência aos antimicrobianos de *Arcobacter* spp. isolados de carnes de frango de diferentes origens

Origem / Antimicrobiano	Frango em cortes refrigerado do varejo* (n = 13)	Frango inteiro refrigerado do varejo* (n = 11)	Frango em cortes congelado do varejo* (n = 6)	Frango inteiro congelado do varejo* (n =2)	Frango em cortes refrigerado de abatedouro ** de produção orgânica (n = 2)	Total (n = 34)[1]	Controles positivos de *Arcobacter* - Frango em cortes refrigerados do varejo*** (n = 3)	Total (n = 37)[2]
Ácido nalidíxico	13 (100%)	11 (100%)	6 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	34 (100%)	3 (100%)	37 (100%)
Ampicilina	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Azitromicina	1 (7,69%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (50%)	2 (5,41%)	0 (0%)	2 (5,41%)
Canamicina	0 (0%)	6 (54,45%)	1 (16,76%)	2 (100%)	0 (0%)	9 (24,32%)	0 (0%)	9 (24,32%)
Ciprofloxacina	0 (0%)	2 (18,18%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (5,41%)	0 (0%)	2 (5,41%)
Clindamicina	13 (100%)	11 (100%)	6 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	34 (100%)	3 (100%)	37 (100%)
Cloranfenicol	1 (7,69%)	5 (45,45%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	6 (17,64%)	1 (33,33%)	7 (18,42%)
Eritromicina	1 (7,69%)	6 (54,45%)	0 (0%)	2 (100%)	1 (50%)	10 (29,41%)	1 (33,33%)	11 (29,73%)
Estreptomicina	2 (15,38%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (50%)	3 (8,82%)	0 (0%)	3 (8,11%)
Gentamicina	0 (0%)	4 (36,36%)	0 (0%)	1 (50%)	0 (0%)	5 (14,70%)	0 (0%)	5 (13,51%)
Tetraciclina	1 (7,69%)	4 (36,36%)	1 (16,76%)	2 (100%)	0 (0%)	8 (23,52%)	0 (0%)	8 (21,62%)
Vancomicina	0 (0%)	1 (9,09%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (2,94%)	0 (0%)	1 (2,10%)

Legenda:[1]Considerando os trinta e quatro isolados de *Arcobacter* spp. testados e os três controles positivos de *Arcobacter* spp. utilizados *A. butzleri* CP1 e CP3 e *A. cryaerophilus* CP2; [2]Considerando somente os trinta e quatro isolados de *Arcobacter* spp. de carnes de frango testados; *= Varejo das cidades de Campinas-SP e Piracicaba-SP; **= Abatedouro de produção orgânica localizado na cidade de Ipeúna-SP; ***= Varejo do munícipio de São Paulo-SP (Oliveira et al., 2018).

Do total de trinta e quatro isolados e três controles positivos de *Arcobacter* spp. testados, a resistência fenotípica frente aos antimicrobianos foi de 100% para ácido nalidíxico e clindamicina, 29,73% para eritromicina, 24,32% para canamicina, 21,62% para tetraciclina, 18,42% para cloranfenicol, 13,51% para gentamicina, 8,11% para estreptomicina, 5,41% para azitromicina e ciprofloxacina, 2,10% para vancomicina e 0,0% para ampicilina.

Na presente pesquisa, do total de trinta e quatro isolados de *Arcobacter* spp. de carnes de frango e três controles de positivos de *Arcobacter* spp., nenhum foi resistente à ampicilina. Kabeya et al., (2004) também relataram que todas as estirpes testadas de *Arcobacter* spp. foram susceptíveis à ampicilina.

Em concordância com o presente trabalho, que obteve 13,51% e 21,62% dos isolados de *Arcobacter* spp. testados resistentes à gentamicina e à tetraciclina, respectivamente, vários outros estudos indicam que *Arcobacter* é sensível aos aminoglicosídeos e à tetraciclina (Fera et al., 2003; Son et al., 2007; Collado e Figueras, 2011; Abay et al., 2012; Ferreira et al., 2016; Ferreira et al., 2018) . Já a pesquisa de Ferreira et al. (2016) contrasta, demonstrando que 56% de *A. butzleri* foram resistentes à ampicilina, seguido de cefotaxima (33%) e ciprofloxacina (33%) e susceptíveis à enrofloxacina e gentamicina, drogas de escolha para o tratamento de infecção por *Arcobacter* spp.

Na presente pesquisa, os isolados testados apresentaram sensibilidade à azitromicinia, à gentaminicina e à vancomicina, no entanto, mostraram resistência frente ao ácido nalidíxico. Os dados obtidos no presente estudo divergem de outros, já que os padrões de resistência a antibióticos, como a cefalotina, a novobiocina e vancomicina tem sido relatada por vários trabalhos. Rahimi et al. (2014) encontraram 96% de cepas de *Arcobacter* spp. resistentes à vancomicina. Também verifica-se, na maioria dos casos, a sensibilidade frente à azitromicina, ao ácido nalidíxico e à gentamicina (Mohan et al., 2014).

Os trinta e quatro isolados de *Arcobacter* spp. de carnes de frango e os três controle positivos de *Arcobacter* spp. utilizados apresentaram suscetibilidade de 78,38% para tetraciclina, 94,59% para ciprofloxacina e para azitromicina, 70,27% para eritromicina, 75,68% para canamicina e 86,49% para gentamicina. Com resultados semelhantes ao presente trabalho, Shirzad Aski et al. (2016) demonstraram que isolados de *Arcobacter* spp. de animais foram altamente susceptíveis à oxitetraciclina,

tetraciclina, ciprofloxacina, eritromicina, canamicina, amicacina e gentamicina. Rahimi et al. (2014) também demonstraram que isolados de *Arcobacter* spp. foram susceptíveis à gentamicina, à estreptomicina, à tetraciclina e à canamicina. Van den Abeele et al. (2016) também relataram a susceptibilidade de cepas de *A. butzleri* e *A. cryaerophilus:* 78% para eritromicina, 72% para ciprofloxacina, 76% para doxiciclina e 9 % para ampicilina, reafirmando a susceptibilidade obtida na presente pesquisa e em outras citadas anteriormente.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

✓ Não existem metodologias oficiais para amostragem, isolamento, identificação fenotípica e genotípica de *Arcobacter* no Brasil e em outros países, o que tornou o trabalho desafiador e uma oportunidade de aprendizado.

✓ Existem poucos estudos de ocorrência de *Arcobacter* em alimentos no Brasil, onde há somente dois estudos em carnes de frango, um em produtos lácteos e pesquisas em andamento no Laboratório de Higiene e Laticínios do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ/USP em alimentos.

✓ Os resultados de ocorrência *Arcobacter* spp. encontrados nesse estudo em amostras cortes de carne de frango provenientes do varejo e de abatedouro no estado de São Paulo são relevantes. No entanto, estudos são necessários para um melhor conhecimento da epidemiologia do micro-organismo, especialmente em quais etapas da produção e manipulação de carnes de frango podem ocorrer contaminações por essa bactéria.

✓ Foram realizadas análises moleculares com técnicas avançadas, porém, ainda assim, recomenda-se análises adicionais de sequenciamento dos genes *rpo*B, *gyr*B e *hsp*20 para a potencial espécie '*A. lacus*' e para a espécie de *Arcobacter* spp. ainda não descrita.

✓ São necessários estudos adicionais para o melhor entendimento da distribuição e controle de *Arcobacter* ao longo da cadeia produtiva de cortes de carnes de frango refrigerados e congelados oriundos do varejo e de abatedouro e outros ambientes relacionados à sua produção.

✓ A presença de espécies diferentes de *Arcobacter* em carnes de frango no Brasil reforça a necessidade de cuidados em relação à contaminação cruzada e ao cozimento adequado do produto.

✓ A variação, em relação à ocorrência desse microrganismo, quando comparada a outros estudos,, pode ser atribuída à diferença de distribuição da bactéria no ambiente de produção dos animais, de processamento das carcaças e de manipulação de carnes, uma vez que são estudos epidemiologicamente não relacionados.

✓ Pouco se conhece ainda sobre o comportamento da bactéria em ambientes de abate e em produtos alimentícios. Assim, estudos relacionados ao

comportamento de espécies de *Arcobacter* em diversas matrizes alimentícias, em diferentes temperaturas de refrigeração, e frente a sanitizantes utilizados na indústria de alimentos são necessários. Estudos relacionados à identificação de espécies também são importantes para melhor conhecimento desse gênero bacteriano.

✓ Arcobacteres isolados de amostras refrigeradas de cortes de frango e de frango inteiro do varejo foram mais resistentes a antimicrobianos que aqueles isolados de cortes de frango congelados do varejo, frango inteiro congelado do varejo e cortes de frango refrigerado de abatedouro de sistema de produção orgânica.

✓ *Arcobacter lacus* apresentou maior resistência à maioria dos antimicrobianos testados do que as espécies *Arcobacter thereius*, *Arcobacter butzleri* e *Arcobacter* spp. espécie não identficada.

REFÊRENCIAS

ASHBOLT N J. 2004. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions**. Toxicology**.198; 1-3 p.229–238.

ASSANTA, M.A., ROY D., LEMAY, M.J., MONT PETIT D., 2002. Attachment of *Arcobacter butzleri*, a new water borne pathogen, to water distribution pipe surfaces .**Journal Food Protection.** 65(8), p. 1240 e 1247.

ATANASSOVA V, KESSEN V, REICH F, KLEIN G. 2008, Incidence of *Arcobacter* spp. in poultry: quantitative and qualitative analysis and PCR differentiation. **Journal of Food Protection**. 71, n.12. p. 2533-2536.

ATABAY HI, AYDIN F, HOUF K, SAHIN M, VANDAMME P. 2002. The prevalence of *Arcobacter* spp. on chicken carcasses sold in retail markets in Turkey, and identification of the isolates using SDS-PAGE. **Int J Food Microbiol**. 81:21–28.

ATABAY HI, AYDIN F, HOUF K, SAHIN M, VANDAMME P. 2003. The prevalence of *Arcobacter* spp. on chicken carcass sold in retail markets in Turkey and identification of the isolates using SDS-PAGE. Int **J Food Microbiol**. 25:21–28.

ATABAY HI, AYDIN F. 2001. Susceptibility of *Arcobacter butzleri* isolates to 23 antimicrobial agents**. Lett Appl Microbiol**. 33:430–433.

ATABAY HI, CORRY JEL, ON SLW. 1998. Diversity and prevalence of *Arcobacter* spp. in broiler chickens. **J Appl Microbiol**. 84:1007–101.

CORRY JEL. 1996. Comparison of the productivity of a variety of selective media for *Campylobacter* and *Arcobacter* species In: Newell DJ, Ketley JM, Felman RA, editors. *Campylobacter*, *Helicobacter* and related organisms. New York (NY): **Plenum Press**; p. 19–23.

CORRY JEL. 1997. The prevalence of *Campylobacter* and *Arcobacter* in broiler chickens. **J Appl Microbiol**. 83:619–626. ATABAY HI, CORRY JEL. 1998. Evaluation of a new *Arcobacter* enrichment medium and comparison with new media developed for enrichment for *Campylobacter* spp. **Int J Food Microbiol.** 41:53–58.

ATABAY HI, UNVER A, SAHIN M, OTLU S, ELMALI M, YAMAN H. 2008. Isolation of various *Arcobacter* species from domestic geese.**Vet Microbiol**. 128:400–405.

ATABAY HI, WAIN M, MADSEN M. 2006. Detection and diversity of various *Arcobacter* species in Danish poultry. **Int J Food Microbiol**. 9:139–145.

AYDIN F., GUMUSSOY K.S. ATABAY H.I., IÇA T. , ABAY S. Prevalence and distribution of *Arcobacter* species in various sources in Turkeyand molecular analysis of isolated strains by ERIC-PCR. 2007. **Journal of Applied Microbiology**. 103, p.27–35.

ÁVILA, J. V. O.; CAMILOTTI, E, OCHA, S. L. S. **Pesquisa de *Arcobacter butzleri* e *Arcobacter cryaerophilus* em carcaças de frangos resfriadas**. XXIII Salão de Iniciação Cientifica, Salão de Iniciação Científica 23: out 2011. 3-7: UFRGS, Porto Alegre, RS. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10183/46946>. Acesso em: 04 jul 2016.

BADILLA-RAMIREZ Y, FALLAS-PADILLA KL, FERNANDEZ-JARAMILLO H, ARIAS-ECHANDI ML. 2016. Survival capacity of *Arcobacter butzleri* inoculated in poultry meat at two different refrigeration temperatures. **Rev Inst Med Trop**. São Paulo. 58:22.

BAGALAKOTE PS, RATHORE RS, RAMEES TP, MOHAN HV, SUMANKUMAR M, AGARWAL RK, KUMAR A, DHAMA K. 2014. Molecular characterization of *Arcobacter* isolates using randomly amplified polymorphic DNA- polymerase chain reaction (RAPD-PCR). **Asian J Anim Vet Adv**. 9:543–555.

BALAMURUGAN S, AHMED R, CHAMBERS JR. Survival of *Arcobacter butzleri* on vacuum packaged chill stored beef.2013. **Food Research International**, 52:503–7.

BIANCHINI, V., RECORDATI, C., BORELLA, L. *Helicobacteraceae* in Bulk Tank Milk of Dairy Herds from Northern Italy. **BioMed Research International**. Volume 2015, Article ID 639521, 4 p.

BRODIE EOIN L., TODD Z. DESANTIS, JORDAN P. MOBERG PARKER, INGRID X. ZUBIETTA, YVETTE M. PICENO, AND GARY L. ANDERSEN. Urban aerosol sharbor diverse and dynamic bacterial populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 1, p. 299-304, 2007

BRIGHTWELL G, MOWAT E, CLEMENS R, BOEREMA J, PULFORD DJ, ON SL. 2007. Development of a multiplex and real time PCR assay for the specific detection of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus*. **J Microbiol Methods**. 68:318–325.

BUCKER R, TROEGER H, KLEER J, FROMM M, SCHULZKE JD. 2009. *Arcobacter butzleri* induces barrier dysfunction in intestinal HT-29/B6 cells. **J Infect Dis**. 200:756–764. CALVO G, ARIAS ML, FERNANDEZ H. 2013. *Arcobacter:* a foodborne emerging pathogen. **Arch Latinoam Nutr.** 63:164–172. CERVENKA L. 2007. Survival and inactivation of *Arcobacter* spp., a current status and future prospect. **Crit Rev Microbiol**. 33:101–108.

CHAVATTE N, BARE J, LAMBRECHT E, VAN DAMME I, VAEREWIJCK M, SABBE K, HOUF K. 2014. Co-occurrence of free-living protozoa and foodborne pathogens on dishcloths: implications for food safety. **Int J Food Microbiol**. 191:89–96.

CHINIVASAGAM HN, CORNEY BG, WRIGHT LL, DIALLO IS, BLACKALL PJ. 2007. Detection of *Arcobacter* spp. in piggery effluent and effluent-irrigated soils in southeast Queensland. **J Appl Microbiol**. 103:418–426.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-eighth informational supplement**. M100 S28. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018. Disponível em: https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/. Acesso em: 29 mar. 2018.

COLLADO L, FIGUERAS MJ. 2011. Taxonomy, epidemiology and clinical relevance of the genus *Arcobacter*. **Clin Microbiol Rev**. 24:174–192.

COLLADO L, LEVICAN A, PEREZ J, FIGUERAS MJ. 2011. *Arcobacter defluvii* sp. nov., isolated from sewage samples. **Int J Syst Evol Microbiol**. 61:2155–2161.

COLLADO L, CLEENWERCK I, VAN TRAPPEN S, DE VOS P, FIGUERAS MJ. 2009b. *Arcobacter mytili* sp. nov., an indoxyl acetate- hydrolysis-negative bacterium isolated from mussels. **Int J Syst Evol Microbiol**. 59:1391–1396.

COLLADO L, GUARRO J, FIGUERAS M. 2009a. Prevalence of *Arcobacter* in meat and shellfish. **J Food Protect**. 72:1102–1110.

COLLADO L, INZA I, GUARRO J, FIGUERAS M J. 2008. Presence of A*rcobacter* spp. in environmental waters correlates with high levels of fecal pollution. **Environ Microbiol**. 10:1635– 1640.

COLLADO L, JARA R, VASQUEZ N, TELSAINT C. 2014. Antimicrobial resistance and virulence genes of *Arcobacter* isolates recovered from edible bivalve mollusks. **Food Control**. 46:508–512.

COLLADO L, KASIMIR G, PEREZ U, BOSCH A, PINTO R, SAUCEDO G, HUGUET JM, FIGUERAS MJ. 2010. Occurrence and diversity of *Arcobacter* spp. along the Llobregat river catchment, at sewage effluents and in a drinking water treatment plant. **Water Res**. 44:3696–3702.

COLLINS, C.I., WESLEY, I.V., Murano, E.A. Detection of *Arcobacter* spp. In ground pork by modified plating methods. 1996. **Journal of Food Protection**. 59, 448–452.

CONTRERAS-MOREIRA, B.; VINUESA, P. Get Homologues. A versatile software package for scalable and robust microbial pangenome analysis. **Applied and Environmental Microbiology.** Baltimore, v. 79, p. 7696-7701, 2013.

CORRY JE, ATABAY HI. 2001. Poultry as a source of *Campylobacter* and related organisms. **J. Appl. Microbiol**. 90:96S–114S. DEBRUYNE L, GEVERS D, VANDAMME P. 2008. Taxonomy of the family *Campylobacteraceae.* In: Nachamkin I, Szymanski C, Blaser M, editors. Campylobacter. Vol. 3. Washington (DC): **ASM press**; p. 3–25.

DHAMA K, CHAKRABORTY S, MAHIMA, WANI MY, VERMA AK, DEB R, TIWARI R, KAPOOR S. 2013b. Novel and emerging therapies safeguarding health of humans and their companion animals: a review. **Pak J Biol Sci.** 16:101–111.

DHAMA K, RAJAGUNALAN S, CHAKRABORTY S, VERMA AK, KUMAR A, TIWARI R, KAPOOR S. 2013a. Food-borne pathogens of animal origin-diagnosis, prevention, control and their zoonotic significance: a review. **Pak J Biol Sci**. 16:1076–1085.

DI FRANCESCO A, DELOGU M, GIACOMETTI F, STANCAMPIANO L, GRILLI E, GUARNIERO I, SERRAINO A. 2014. First detection of *Arcobacter* spp. in Eurasian collared doves (*Streptopelia decaocto*). Vet Ital. 50:313–315.

DIÉGUEZ AL, BALBOA S, MAGNESEN T, ROMALDE JL. 2017. *Arcobacter lekithochrous* sp. nov., a new species isolated from a molluscan hatchery in Norway. **Int J Syst Evol Microbiol.** Doi:10.1099/ijsem.0.001809.

DIÉGUEZ, A. L., PÉREZ-CATALUÑA, A., FIGUERAS, M. J., AND ROMALDE, J. L. 2018. *Arcobacter haliotis* Tanaka et al., 2017 is a later heterotypic synonym of *Arcobacter lekithochrous* Diéguez et al., 2017. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**. doi: 10.1099/ijsem.0.002909.

DONACHIE SP, BOWMAN JP, ON SLW, Alam M. 2005. *Arcobacter halophilus* sp. nov., the first obligate halophile in the genus *Arcobacter.* **Int J Syst Evol Microbiol**. 55:1271–1277.

DOUIDAH L, DE ZUTTER L, BARE J, HOUF K. 2014B. Towards a typing strategy for *Arcobacter* species isolated from humans and animals and assessment of the in vitro genomic stability. **Foodborne Pathog Dis**. 11:272–280.

DOUIDAH L, DE ZUTTER L, VAN NIEUWERBURGH F, DEFORCE D, INGMER H, VANDENBERG O, VAN DEN ABEELE AM, HOUF K. 2014a. Presence and analysis of plasmids in human and animal associated *Arcobacter* species. **PloS One**. 9:e85487.

DOUIDAH L, ZUTTER LD, VANDAMME P, HOUF K. 2010. Identification of five human and mammal associated *Arcobacter* species by a novel multiplex-PCR assay. J**. Microbiol.Methods.** 80:281–286.

DOUIDAH L, DE ZUTTER L, BARE J, DE VOS P, VANDAMME P, VANDENBERG O, VAN DEN ABEELE AM, HOUF K. 2012. Occurrence of putative virulence genes in *Arcobacter* species isolated from humans and animals. **J. Clin. Microbiol**. 50:735–741.

EIFERT J. D., R. M. CASTLE, F. W. PIERSON, C. T. LARSEN, AND C. R. HACKNEY. Comparison of Sampling Techniques for Detection of *Arcobacter butzleri* from Chickens. 2003. **Poultry Science**. 82:1898–1902.

ENGBERG J, ON SLW, HARRINGTON CS, GERNER-SMIDT P. 2000. Prevalence of *Campylobacter, Arcobacter, Helicobacter and Sutterella* spp. in human fecal samples as estimated by a reevaluation of isolation methods for *Campylobacter*. **J.Clin.Microbiol**.38:286–291.

EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING (EUCAST).**Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters**. v. 8.0. 20148. Disponível em: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/. Acesso em: 29 mar. 2018.

FALLAS-PADILLA KL, RODRIGUEZ-RODRIGUEZ CE, FERNANDEZ JARAMILLO H, ARIAS ECHANDI ML. 2014. *Arcobacter*: comparison of isolation methods, diversity, and potential pathogenic factors in commercially retailed chicken breast meat from Costa Rica. **J Food Prot.** 77:880–884.

FERA MT, GUGLIANDOLO C, LENTINI V, FAVALORO A, BONANNO D, LA CAMERA E, MAUGERI TL. 2010. Specific detection of *Arcobacter* spp. in estuarine waters of Southern Italy by PCR and fluorescent in situ hybridization. **Lett Appl Microbiol**. 50:65–70.

FERA MT, LA CAMERA E, CARBONE H, MALARA D, PENNISI MG. 2009. Pet cats as carriers of *Arcobacter* spp. in Southern Italy. **J Appl Microbiol**. 106:1661–1666.

FERA MT, MAUGERI TL, GIANNONE M, GUGLIANDOLO C, LA CAMERA E, BLANDINO G, CARBONE M. 2003. In vitro susceptibility of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* to different anti- microbial agents. **Int J Antimicrob Agents**. 21:488–491.

FERNANDÉZ H, ELLER G, PAILLACAR J, GAJARDO T, RIQUELME A.1995. Toxigenic and invasive capacities: possible pathogenic mechanisms in *Arcobacter cryaerophilus*. **Mem Inst Oswaldo.** 90:633–634.

FERNANDÉZ H., VILLANUEVA M. P., MANSILLA I., GONZALEZ M., LATIF F. *Arcobacter butzleri* and *A. cryaerophilus* in human, animals and food sources, in southern Chile**. Brazilian Journal of Microbiology.** 2015. n 46, v.1, p. 145-147.

FERNÁNDEZ, H.; FLORES, S.; INZUNZA, F. 2010. *Arcobacter butzleri* strains isolated from different sources display adhesive capacity to epithelial cells in vitro. **Acta Science Vet**. 38, 287-291.

FERREIRA S, QUEIROZ JA, OLEASTRO M, DOMINGUES FC. 2014b. Genotypic and phenotypic features of *Arcobacter butzleri* pathogenicity. **Microb Pathog**. 76:19–25.

FERREIRA S, QUEIROZ JA, OLEASTRO M, DOMINGUES FC. 2016. Insights in the pathogenesis and resistance of *Arcobacter*: a review. **Crit Rev Microbiol**. Early Online: 1–20.

FERREIRA S, SILVA F, QUEIROZ JA, OLEASTRO, M, DOMINGUES FC. 2014a. Resveratrol against *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus*: activity and effect on cellular functions. **Int J Food Microbiol**. 180:62–68.

FIGUERAS MJ, COLLADO L, GUARRO J. 2008. A new 16S rDNA-RFLP method for the discrimination of the accepted species of *Arcobacter*. **Diag Microbiol Infect Dis**. 62:11–15.

FIGUERAS MJ, COLLADO L, LEVICAN A, PEREZ J, SOLSONA MJ, YUSTES C. 2011a. *Arcobacter molluscorum* sp. nov., a new species isolated from shellfish. **Syst Appl Microbiol**. 34:105–109.

FIGUERAS MJ, LEVICAN A, COLLADO L. 2012. Updated 16S rRNA- RFLP method for the identification of all currently characterised *Arcobacter* spp. **BMC Microbiol.** 12:292.

FIGUERAS MJ, LEVICAN A, PUJOL I, BALLESTER F, RABADA, QUILEZ MJ, GOMEZ-BERTOMEU F. 2014. A severe case of persistent diarrhea associated with *Arcobacter cryaerophilus* but attributed to *Campylobacter* spp. and a review of the clinical incidence of *Arcobacter* spp. **New Microbes New Infect**. 2:31–37.

FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE/UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (FSIS/USDA). Chapter new, revised, or archived: MLG 41 Appendix 1.01. Laboratory Flow Chart for Isolation and Identification of *Campylobacter jejuni/coli/lari* from Poultry Rinse, Sponge and Raw Product Samples: **Direct Plating Analysis**. 2014. 1p.

FISHER JC, LEVICAN A, FIGUERAS MJ, MCLELLAN SL. 2014. Population dynamics and ecology of *Arcobacter* in sewage. **Front Microbiol**. 5:1–9.

FONG T. T., GRIFFIN, D. W., LIPP, E. K. 2005. Molecular assays for targeting human and bovine enteric viruses in coastal waters and their application for library-independent source tracking. **Applied and Environmental Microbiology**. P. 2070-2078.

FONG, T.T., MANSFIELF, L.S., WILSON, D.L., SCHWAB, D.J., MOLLOY, S.L., ROSE, J.B., 2007. Massive microbiological groundwater contamination associated with a waterborne outbreak in Lake Erie, South Bass Island, Ohio. **Environmental Health Perspectives**. 115 (6), 856e864.GIACOMETTI F, LUCCHI A, DI FRANCESCO A,

DELOGU M, GRILLI E, GUARNIERO I, STANCAMPIANO L, MANFREDA G, MERIALDI G, SERRAINO A. 2015. *Arcobacter butzleri, Arcobacter cryaerophilus* and *Arcobacter skirrowii* circulation in a dairy farm and sources of milk contamination. **Appl Environ Microbiol.** 81:5055–5063.

GIACOMETTI F, LUCCHI A, MANFREDA G, FLORIO D, ZANONI RG, SERRAINO A. 2013. Occurrence and genetic diversity of *Arcobacter butzleri* in an artisanal dairy plant in Italy. **Appl Environ Microbiol.** 79:6665–6669.

GIACOMETTI F, SERRAINO A, PASQUALI F, DE CESARE A, BONERBA E, ROSMINI R. 2014. Behavior of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* in ultrahigh-temperature, pasteurized, and raw cow's milk under different temperature conditions. **Foodborne Pathog Dis**. 11:15–20.

GOBBI, D, D.S. **Caracterização Fenotípica e genotípica de isolados de *Arcobacter* spp. provenientes de suínos.** Phenotypic and genotypic characterization of *Arcobacter* spp. Strains from wine. 2013. 73 f. Tese de Doutorado em Ciências-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

GOLLA S C, MURANO E A, JOHNSON L G, TIPTON N C, CUREINGTON E A, SAVELL J W. 2002. Determination of the occurrence of *Arcobacter butzleri* in beef and dairy cattle from Texas by various isolation methods. **J Food Prot**. 65:1849–1853.

GONZÁLEZ A, SUSKI J, FERRUS MA. 2010. Rapid and accurate detection of Arcobacter contamination in commercial chicken products and waste water samples by real-time polymerase chain reaction. **Foodborne Pathog Dis**. 7:327– 338.

GONZÁLEZ AM, FERRUS MA. 2011. Study of *Arcobacter* spp. contamination in fresh lettuces detected by different cultural and molecular methods. **Int J Food Microbiol**. 145:311– 314.

GONZÁLEZ I, GARCIA T, ANTONLIN A, HERNANDEZ PE, MARTIN R. 2000. Development of a combined PCR-culture technique for the rapid detection of *Arcobacter* spp. in chicken meat. **Lett Appl Microbiol**. 30:207–212.

GONZÁLEZ A, BOTELLA S, MONTES RM, MORENO Y, FERRUS MA. 2007a. Direct detection and identification of *Arcobacter* species by multiplex PCR in chicken and waste water samples from Spain. **J Food Prot**. 70:341–347.

GONZÁLEZ A, MORENO Y, GONZALEZ R, HERNANDEZ J, FERRUS MA. 2006. Development of a simple and rapid method based on polymerase chain reaction-based restriction fragment length polymorphism analysis to differentiate *Helicobacter, Campylobacter* and *Arcobacter* species. **Curr Microbiol**. 53:416–421.

GONZÁLEZ A, FERRUS MA,GONZALEZ R,HERNANDEZ J.2007b. Molecular fingerprinting of *Campylobacter* and *Arcobacter* isolated from chicken and water. **Int Microbiol**. 10:85–90.

GONZÁLEZ I, FERNANDEZ-TOME S, GARCÍA T, MARTÍN R. 2014. Genus-specific PCR assay for screening *Arcobacter* spp. in chicken meat. **J Sci Food Agric**. 94:1218–1224.

GUREVICH, A.; SAVELIEV, V.; VYAHHI, N.; TESLER, G. Quast: quality assessment tool for genome assemblies. **Bioinformatics**, v. 29, n. 8, p. 1072-1075, 2013.

HAMILL, S., NEILL, S.D. AND MADDEN, R.H. 2008 A comparison of media for the isolation of *Arcobacter* spp. from retail packs of beef. **Journal Food Protection** 71, 850–854.

HARMON, K. M., & WESLEY, I. V. 1996. **Identification of *Arcobacter* isolates by PCR. Letters in Applied Microbiology,** *23*(4), 241–244. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1996.tb00074.x

HARMON KM, WESLEY IV. 1997. Multiplex PCR for the identification of *Arcobacter* and differentiation of *Arcobacter butzleri* from other *Arcobacters*. **Vet Microbiol**. 58:215–227.

HAUSDORF, L., NEUMANN, M., BERGMANN, I., SOBIELLA, K., MUNDT, K., FRÖHLING, A., KLOCKE, M. 2013. Occurrence and genetic diversity of *Arcobacter* spp. in a spinach-processing plant and evaluation of two *Arcobacter*-specific quantitative PCR assays. **Systematic and applied microbiology**. 36(4), 235-243.

HO HT, LIPMAN LJ, GAASTRA W. 2008a. The introduction of *Arcobacter* spp. in poultry slaughterhouses. **Int J Food Microbiol**. 125:223–229.

HOUF, K., DEVRIESE, L. A., HAESEBROUCK, F., VANDENBERG, O., BUTZLER, J. P., VAN HOOF, J., Antimicrobial susceptibility patterns of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacte*r *cryaerophilus* strains isolated from humans and broilers. **Microbial Drug Resistance**. 2004. 10, 243e247.

HOUF, K., DEVRIESE, L.A., DE ZUTTER, L. Development of a new protocol for the isolation and quantification of *Arcobacter* species from poultry products. **International Journal Food Microbiology.** 71:189-196.

HOUF, K., TUTENEL, A., ZUTTER, L., HOOF, J., & VANDAMME, P. 2000. Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection and identification of *Arcobacter butzleri* , *Arcobacter cryaerophilus* and *Arcobacter skirrowii.* **FEMS Microbiology Letters**, 193(1), 89–94. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09407.x

HSU, T-T D.; LEE, J. 2015. Global Distribution and Prevalence of *Arcobacter* in Food and Water. **Zoonoses and Public Health**. doi: 10.1111/zph.12215

HUNT , Bacteriological Analytical Manual Online da Food and Drug Administration (BAM/FDA), 2001. **Bacteriological Analytical Manual**. Chapter 7 Campylobacter.

ITEMAN, I., R. RIPPKA, N. TANDEAU DE MARSAC, M. HERDMAN. Comparison of conserved structural and regulatory domains within divergent 16S rRNA–23S rRNA spacer sequences of cyanobacteria. 2000. **Microbiology**. 146: 1275–1286.

INTERNATIONAL COMMISSIONN MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS (ICMSF). **Microorganisms in Foods 7, Microbiological Testing in Food Safety Management**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publisher 2002. p. 171.

JALAVA K, RINTALA H, OLLGREN J, MAUNULA L, GOMEZ-ALVAREZ V, REVEZ J. 2014 Novel Microbiological and Spatial Statistical Methods to Improve Strength of Epidemiological Evidence in a Community-Wide Waterborne Outbreak. **PLoS ONE** 9(8): e104713. doi:10.1371/journal,pone.0104713

JYOTHSNA, T. S., RAHUL, K., RAMAPRASAD, E. V., SASIKALA, CH., & RAMANA, C. V. *Arcobacter anaerophilus* sp. nov., isolated from an estuarine sediment and emended description of the genus *Arcobacter*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.** 2013 63, 4619-4625.

JRIBI, H.; SELLAMO, H.; HASSENA, A. B.; GDOURA, R. Prevalence of Putative Virulence Genes in *Campylobacter* and *Arcobacter* Species Isolated from Poultry and Poultry By-Products in Tunisia. **J. Food Prot.** 2017 Oct;80(10):1705-1710. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-16-509.

KABEYA, H., MARUYAMA, S., MORITA, Y., OHSUGA, T., OZAWA, S., KOBAYASHI, Y. Prevalence of *Arcobacter* species in retail meats and antimicrobial susceptibility of the isolates in Japan. **International Journal of Food Microbiology**. 2004. 90, 303e308.

KARADAS G, SHARBATI S, HANEL I. Presence of virulence genes, adhesion and invasion of *Arcobacter butzleri*. **Journal of Applied Microbiology**. 2013.115:583–90.

KOPILOVIĆ, B., UCAKAR, V., KOREN, N., KREK, M., KRAIGHER, A. 2008. Waterborne outbreak of acute gastroenteritis in a coastal area in Slovenia in June and July 2008. **Euro Surveill**. *13*(34), 561-570.

KIEHLBAUCH J. A.; BRENNER D. J.; NICHOLSON M. A.; BAKER C. N.; PATTON C. M.; STEIGERWALT A. G.; WACHSMUTH I. K. 1991. Campylobacter butzleri sp. nov. isolated from humans and animals with diarrheal illness. **J. Clin. Microbiol**.29:376–385.

LAPPI V, ARCHER JR, CEBELINSKI E. An outbreak of foodborne illness among attendees of a wedding reception in Wiscenonsin likely caused by *Arcobacter butzleri*. **Foodborne Pathogens and Disease.** 2013.10,p.250–255.

LEE C., AGIDI S., MARION J. W., LEE J. 2012. *Arcobacter* in Lake Erie beach waters: an emerging gastrointestinal pathogen linked with human-associated fecal contamination. **Applied and Environmental Microbiology**. 78, 5511–5519.

LEHMANN D, ALTER T, LEHMANN L, UHERKOVA S, SEIDLER T, GOLZ G. 2015. Prevalence, virulence gene distribution and genetic diversity of *Arcobacter* in food samples in Germany**. Berl Munch Tierarztl Wochenschr**. 128:163–168.

LEVICAN A, COLLADO L, YUSTES C, AGUILAR C, FIGUERAS MJ. Higher water temperature and incubation under aerobic and microaerobic conditions increase there covary and diversity of *Arcobacter* spp. from shellfish. **Applied and Environmental Microbiology**. 2014. 80:385-91.

LEVICAN, A., RUBIO-ARCOS, S, MARTINEZ-MURCIA, A, COLLADO, L, FIGUERAS, M.J. *Arcobacter ebronensi* ssp. nov.and *Arcobacter aquimarinus* ssp. nov., two new species isolated from marine environment. **Systematic and Applied Microbiology**. 2015. 38, 385–391.

MILESSI S. **Emerging pathogen *Arcobacter* spp. in food of animal origin.** Doctoral Program in Animal Nutrition and Food Safety, Università degli Studi di Milano 2009. 100p.

MORENO, Y., BOTELLA, S., ALONSO, J.L., FERRÚS, M.A., HERNÁNDEZ, M. AND HERNÁNDEZ, J. 2003. Specific detection of *Arcobacter* and *Campylobacter* strains in water and sewage by PCR and fluorescent in situ hybridization. **Applied and Environmental Microbiology**. 69, 1181–1186.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). 2015. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing.** CLSI document M100-S25. Villanova, PA.

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

OLIVEIRA S. J., MORAES H. L. S., KUCHENBECKER B. S., IKUTA N., LUNGE V., FONSECA A., COIRO J. R. Isolation of *Arcobacter* spp. from poultry carcasses, in Brazil. **Ciência Rural, Santa Maria.** 2001. v. 31, n.4, p.639-643.

OLIVEIRA, M. G. X. D., GOMES, V. T. D. M., CUNHA, M. P. V., MORENO, L. Z., MORENO, A. M., & KNÖBL, T. 2018. Genotypic Characterization of Arcobacter spp. Isolated from Chicken Meat in Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**, *15*(5), 293–299. https://doi.org/10.1089/fpd.2017.2368

OLIVEIRA, M.G.X. **Caracterização genotípica de *Arcobacter* spp. isolados de carnes de aves comercializadas no Município de São Paulo – SP. Dissertação de Mestrado em Patologia Experimental e Comparada.** Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016, 63f.

ON, S.L.W. .Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter and* lated bacteria: current status, future prospects and immediate concerns**. J. Appl. Microbiol**. 90, IS. 2001.

OVERBEEK, R.; OLSON, R.; PUSCH, G.D.; OLSEN, G.J.; DAVIS, J.J.; DISZ, T., VONSTEIN, V. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). **Nucleic acids research**, p. 42, n. D1, p. D206-D214, 2014.

PÉREZ-CATALUÑA, A.; SALAS-MASSÓ, N.; DIÉGUEZ, A.L.; BALBOA, S.; LEMA, A., ROMALDE, J.L.; FIGUERAS, M.J. .2018. Revisiting the Taxonomy of the Genus Arcobacter: Getting Order from the Chaos. **Front. Microbiol.** 9:2077. doi: 10.3389/fmicb.2018.02077

RICE, W. C.; CROUGHAN, T. P.; RING, D. R.; MUEGGE, M. A.; STOUT, M. J. Delayed flood for management of rice water weevil (Coleoptera: Curculionidae). **Environmental Entomology**, College Park, v. 28, n. 6, p.1130- 1135, 1999.

SAMIE, A.; OBI, C. L.; BARRETT, L. J.; POWELL, S. M.; GUERRANT, R. L. Prevalence of *Campylobacte*r species, *Helicobacter pylori* and *Arcobacter* species in stool samples from the venda region, Limpopo, South Africa: studies using molecular diagnostic methods. **The Journal of Infection**, v. 54, n. 6, p. 558–66, 2007.

SANTARPIA J. L. , RATNESAR-SHUMATE S. , GILBERRY J. U, JASON J. Q. Relationship Between Biologically Fluorescent Aerosol and Local Meteorological Conditions. **Aerosol Science and Technology**. 2013. 47:6, 655-661.

SERRAINO, A., FLORIO, D., GIACOMETTI, F., PIVA, S., MION, D., & ZANONI, G. Presence of *Campylobacter* and *Arcobacter* species in in-line milk filters of farms authorized to produce and sell raw milk and of water buffalo dairy farm in Italy. **Journal of Dairy Science**. 2013. 96, 2801e2807.

SON I, ENGLEN MD, BERRANG ME, FEDORKA-CRAY PJ, HARRISON MA. Antimicrobial resistance of *Arcobacter* and *Campylobacter* from broiler carcasses. **Int J Antimicrob Agents** 2007;29:451–5.

SCANLON, K. A., CAGNEY, C., WALSH, D., MCNULTY, D., CARROLL, A., MCNAMARA, E. B. Ocurrence and characteristics of fastidious *Campylobacteraceae* species in porcine samples**. International Journal of Food Microbiology**. 2013. 163, 6e13.

SCHMIEDER, R.; EDWARDS, R. Fast identification and removal of sequence contamination from genomic and metagenomic datasets**. PloS one**. v. 6, no 3, p. e17288, 2011.

SHAH, A. H., SALEHA, A. A., ZUNITA, Z., MURUGAIYAH, M., ALIYU, A. B., & JAFRI, N. Prevalence, distribution and antibiotic resistance of emergent *Arcobacter* spp. from clinically healthy cattle and goats. **Transboundary Emerging Diseases**. 2013. 60, 9 e16.

ŠILHOVÁ,L. Fish detection of Campylobacter and *Arcobacter* adhered to stainless steel coupons. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**. 2015. v. 4,n.4,p.347-351.

RAMEES T P., RATHORE R S, BAGALKOT P S, MOHAN H V, KUMAR A , DHAMA K. 2014. Detection of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* in clinical samples of humans and foods of animal origin by cultural and multiplex PCR Based Methods. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances***,* 9: 243-252

RAMEES, T. P.; DHAMA, K.; KARTHIK, K. ; RATHORE, S.; KUMAR, A. SAMINATHAN, M.; TIWARI, R.; YASHPAL SINGH MALIK, Y. S.; SINGH, R. K. . 2017. *Arcobacter*: an emerging food-borne zoonotic pathogen, its public health concerns and advances in diagnosis and control – a comprehensive review. **Veterinary Quarterly**. 37:1. 136-161. DOI: 10.1080/01652176.2017.1323355.

TANAKA, R., CLEENWERCK, I., MIZUTANI, Y., IEHATA, S., BOSSIER, P.; VANDAMME, P. 2017. *Arcobacter haliotis* sp. nov., isolated from abalone species *Haliotis gigantea*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol** 67, 3050–3056. doi: 10.1099/ijsem.0.00 2080.

VAN DEN ABEELE, A.M.; VOGELAERS, D.; VAN HENDE, J.; HOUF, K. Prevalence of *Arcobacter* Species among Humans, Belgium, 2008–2013. **Emerging Infectious Diseases,** v. 20, n. 10, p. 1746–1749, 2014.

VAN DRIESSCHE E., HOUF K. Characterization of the *Arcobacter* contamination on Belgianpork carcasses and raw retail pork. **International Journal of Food Microbiology.** 2007. 118, p.20–26.

VANDAMME, P., DEWHIRST, F.E., PASTER, B.J., ON, S.L.W. Genus *Arcobacter*. In: DeVos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A. Schleifer, K. & Whitman, W.B. (eds.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2009. 2nd edition.** v. 3. New York, Springer. pp. 1161-1165.

VANDAMME P, DE LEY J. 1991. Proposal for a new family *Campylobacteraceae*. **Int J Syst Bacteriol**. 41:451–455.

VANDAMME, P., FALSEN, E., ROSSAU, R., HOSTE, B., SEGERS, P, TYTGAT, R, DE LEY, J. Revision of Campylobacter, Helicobacter, and Wolinella taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* genera. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 1991. 41, 88-103.

VANDAMME, P., VANCANNEYT, M., POT, B., MELS, L., HOSTE, B., DEWETTINCK, D. Polyphasic taxonomic study of the emended genus Arcobacter with *Arcobacter* but Šilhová,L.leri comb.Nov. and *Arcobacter skirrowii* sp.nov., an aerotolerant bacterium isolated from veterinary specimens. **International Journal of Systematic Bacteriology.** 1992. 42, 344e356.

VANDENBERG O, DEDISTE A, HOUF K, IBEKWEM S, SOUAYAH H, CADRANEL S.1993 *Arcobacter*species in humans. **Emerg Infect Dis** 2004;10:1863–7.

.VILLARRUEL-LOPEZ A, MARQUEZ-GONZALEZ M, GARAY-MARTINEZ LE. Isolation of *Arcobacter* spp. from retail meats and cytotoxic effects of isolates against Vero cells. **Journal of Food Protection.** 2003. 66:1374–8.

VILLALOBOS, E. G., H. F. JARAMILLO, C. C. ULATE, AND M. L. ECHANDI. 2013. Isolation and identification of zoonotic species of genus *Arcobacter* from chicken viscera obtained from retail distributors of the metropolitan area of San Jose, Costa Rica. **J. Food Prot**. 76:879– 882.

WHITEDUCK-LÉVEILLÉE, K., WHITEDUCK-LÉVEILLÉE, J., CLOUTIER, M. *Arcobacter lanthieri* sp. nov., isolated from pig and dairy cattle manure. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.** 2015. V. 65 p. 2709–2716. DOI 10.1099/ijs.0.000318.

WHO. **Food safety and foodborne illness. World Health Organi**zation. 2018. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/fergreport/en/>. Acesso em: 20 fev. 2017.

WILLIAMS, N. & HALL, N. **Application of whole genome sequencing to fully characterize *Campylobacter* isolates from the UK Infectious Intestinal Disease 1 and 2 Studies**. Study of University of Liverpool. 2015. Disponível em: < https://www.food.gov.uk/sites/default/files/FS101072 FINAL technical report - 12 Aug 2015.pdf>. Acesso em: 21 dez. 2016.

WUTS, K. P. J ,, DE WACHTER, R. RNAVIZ An improved representation of RNA secondary structure. **Bioinformatics**, 2003 *19*(2), 299-300.

ZACHAROW, I.; BYSTRON, J.; WALECKA-ZACHARSKA, E.; PODKOWIK, M.; BANIA, J. Genetic diversity and incidence of virulence-associated genes of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* isolates from pork , beef , and chicken Meat in Poland. **BioMed Research International,** v. 2015, p. 1–6, 2015.

ZERPA LARRAURI, R., ALARCÓN VILLAVERDE, J. O., VIGO, L., PERCY, E., PATIÑO GABRIEL, L., REYES DIOSES, A., ALARCÓN LEÓN, M. J. (2014). Identificação de *Arcobacter* em fezes de crianças e adultos com/sem diarria e em reservatórios animais. Em *Anais da Facultad de Medicina* (Vol. 75, No. 2, pp. 185-187). UNMSM. **Facultad de Medicina**.

VAN DRIESSCHE E, HOUF K. 2007b. Discrepancy between the occurrence of *Arcobacter* in chickens and broiler carcass contamination. **Poult Sci**. 86:744–751.

VANDAMME P, DE LEY J. 1991. Proposal for a new family *Campylobacteraceae*. **Int J Syst Bacteriol**. 41:451–455.

VANDAMME P, FALSEN E, ROSSAU R, HOSTE B, SEGERS P, TYTGAT R, DE LEY J. 1991. Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter* and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* genera. **Int J Syst Bacteriol**. 41:88–103.

VANDAMME P, GIESENDORF AJ, VAN BELKUM P, LAUWERS S, KERSTERS K, BUTZLER P, GOOSSENS H, QUINT WG. 1993. Discrimination of epidemic and sporadic isolates of *Arcobacter butzleri* by polymerase chain reaction-mediated DNA fin- gerprinting. **J Clin Microbiol**. 31:3317–3319.

VANDAMME P, PUGINA P, BENZI G, VAN ETTERIJCK R, VLAES L, KER- STERS K, BUTZLER JP, LIOR H, LAUWERS S. 1992a. Outbreak of recurrent abdominal cramps associated with *Arcobacter butzleri* in an Italian school. **J Clin Microbiol**. 30:2335–2337.

VANDAMME P, VANVANNEYT M, POT B, MELS L, HOSTE B, DEWETTINCK D, VLAES L, VAN DEN BORRE C, HIGGINS R, HOMMEZ J. 1992b. Polyphasic taxonomic study of the emended genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* comb. nov. and *Arcobacter skirrowii* sp. nov., and aerotolerant bacterium isolated from veterinary specimens. **Int J Syst Bacteriol**. 42:344–356.

VAN DEN ABEELE AM, VOGELAERS D, VAN HENDE J, HOUF K. 2014. Prevalence of *Arcobacter* species among humans, Belgium, 2008–2013**. Emerg Infect Dis**. 20:1731–1734.

VAN DEN ABEELE A M, VOGELAERS D, VANLAERE E, HOUF K. 2016. Antimicrobial susceptibility testing of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* strains isolated from Belgian patients. **J Antimicrob Chemother**. 71:1241–1244.

VANDENBERG O, DEDISTE A, HOUF K, IBEKWEM S, SOUAYAH H, CADRANEL S, DOUAT N, ZISSIS G, Butzler JP, Vandamme P. 2004. *Arcobacter* species in humans. **Emerg Infect Dis.** 10:1863–1867.

VERGIS J, NEGI M, POHARKAR K, DAS D P, MALIK SV, KUMAR A, DOIJAD S P, BARBUDDHE SB, Rawool DB. 2013. 16S rRNA PCR followed by restriction endonuclease digestion: a rapid approach for genus level identification of important enteric bacterial pathogens. **J Microbiol Methods**. 95:353– 356.

VILAR M J, PENA F J, PÉREZ I, DIÉGUEZ F J, SANJUAN M L, RODRIGUEZ-OTERO J L, YUS E. 2010. Presence of *Listeria*, *Arcobacter*, and *Campylobacter* spp. in dairy farms in Spain. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr**. 23:58–62.

VILLALOBOS E G, JARAMILLO H F, ULATE C C, ECHANDI M L. 2013. Isolation and identification of zoonotic species of genus *Arcobacter* from chicken viscera obtained from retail distributors of the metropolitan area of San José, Costa Rica. **J Food Prot.** 76:879–882.

VILLANUEVA M P, MEDINA G, FERNÁNDEZ H. 2016. *Arcobacter butzleri* survives within trophozoite of *Acanthamoeba castellanii*. **Rev Argent Microbiol**. 48:105–109.

VILLARRUEL-LÓPEZ A, MÁRQUEZ-GONZÁLEZ M, GARAY-MARTÍNEZ LE, ZEPEDA H, CASTILLO A, MOTA DE LA GARZA L, MURANO EA, TORRES-VITELA R. 2003. Isolation of *Arcobacter* spp. from retail meats and cytotoxic effects of isolates against vero cells. **J Food Prot**. 66:1374–1378.

VYTRASOVÁ J, PEJCHALOVÁ M, HARSOVÁ K, BÍNOVÁ S. 2003. Isolation of *Arcobacter butzleri* and *A. cryaerophilus* in samples of meats and from meat-processing plants by a culture tech- nique and detection by PCR. **Folia Microbiol**. 48:227–232.

WANG X, SEO DJ, LEE MH, CHOI C. 2014. Comparison of n- ventional PCR, multiplex PCR and loop-mediated isothermal amplification assays for rapid detection of *Arcobacter* species. **J Clin Microbiol**. 52:557–563.

WEBB A L, BORAS V F, KRUCZKIEWICZ P, SELINGER L B, TABOADA E N, INGLIS G D. 2016. Comparative detection and quantification of *Arcobacter butzleri* in stools from diarrheic and non-diarrheic people in Southwestern Alberta, Canada. **J Clin Microbiol**. 54:1082–1088.

WEBB AL, KRUCZKIEWICZ P, SELINGER LB, INGLIS GD, TABOADA EN. 2015. Development of a comparative genomic fingerprinting assay for rapid and high-resolution genotyping of *Arcobacter butzleri*. **BMC Microbiol**. 15:94.

WESLEY IV, BAETZ AL. 1999. Natural and experimental infections of *Arcobacter* in poultry. **Poult Sci**. 78:536–545.

WESLEY IV, SCHRODER-TUCKER L, BAETZ AL, DEWHURST FE, PASTER BJ. 1995. *Arcobacter butzleri*-specific 16S rRNA based probes. **J Clin Microbiol**. 33:1691–1698.

WESLEY IV, SCHROEDER-TUCKER L, FRANKLIN SL. 2003. Recovery of *Arcobacter* species from exotic animal species. **Int J Med Microbiol.** 293:57.

WESLEY IV, WELLS SJ, HARMON KM, GREEN A, SCHROEDER-TUCKER L, GLOVER M, SIDDIQUE I. 2000. Fecal shedding of *Campylobacter* and *Arcobacter* spp. in dairy cattle. **Appl Environ Microbiol**. 66:1994–2000.

WESLEY IV. 1994. *Arcobacter* infections. In: Beran GW, Steele JH, editors. In handbook of zoonoses. **CRC Press**; p. 181– 190.

WESLEY IV. 1997. *Helicobacter* and *Arcobacter*: potential human foodborne pathogens? **Trends Food Sci Technol**. 8:293– 299.

WHITEDUCK-LÉVEILLÉE J, CLOUTIER M, TOPP E, LAPEN DR, TALBOT G, VILLEMUR R, KHAN IU. 2016a. Development and evaluation of multiplex PCR assays for rapid detection of virulence- associated genes in *Arcobacter* species. **J Microbiol Methods**. 121:59–65.

WHITEDUCK-LÉVEILLÉE K, WHITEDUCK-LÉVEILLÉE J, CLOUTIER M, TAMBONG JT, XU R, TOPP E, ARTS MT, CHAO J, ADAM Z, LÉVESQUE CA. 2015. *Arcobacter lanthieri* sp. nov., isolated from pig and dairy cattle manure. **Int J Syst Evol Microbiol**. 65:2709–2716.

WHITEDUCK-LÉVEILLÉE K, WHITEDUCK-LÉVEILLÉE J, CLOUTIER M, TAMBONG JT, XU R, TOPP E, ARTS MT, CHAO J, ADAM Z, LÉVESQUE CA, et al. 2016b. Identification, characterization and description of *Arcobacter faecis* sp. nov., isolated from a human waste septic tank. **Syst Appl Microbiol**. 39:93–99.

WINTERS DK, SLAVIK MF. 2000. Multiplex PCR detection of *Campylobacter jejuni* and Arcobacter butzleri in food products**. Mol Cell Probes**. 14:95–99.

WIRSEN CO, SIEVERT SM, CAVANAUGH CM, MOLYNEAUX SJ, AHMAD A, TAYLOR LT, DELONG EF, TAYLOR CD. 2002. Characterization of an autotrophic sulfide-oxidizing marine *Arcobacter* sp. that produces filamentous sulfur. **Appl Environ Microbiol.** 68:316–325.

WOO PCY, CHONG KTK, LEUNG KW, QUE TL, YUEN KY. 2001. Identification of *Arcobacter cryaerophilus* isolated from a traffic accident victim with bacteremia by 16S ribosomal RNA gene sequencing. **Diagn Microbiol Infect Dis**. 40:125– 127.

WYBO I, BREYNAERT J, LAUWERS S, LINDENBURG F, HOUF K. 2004. Isolation of *Arcobacter skirrowii* from a patient with chronic diarrhea. **J Clin Microbiol**. 42:1851–1852.

YADAV AS, KOLLURI G, GOPI M, KARTHIK K, MALIK YS, DHAMA K. 2016. Exploring alternatives to antibiotics as health promoting agents in poultry- a review. **J Exp Biol Agri Sci**. 4:368–383.

YAN JJ, KO WC, HUANG AH, CHEN HM, JIN YT, WU JJ. 2000. *Arcobacter butzleri* bacteremia in a patient with liver cirrhosis. **J Formos Med Assoc**. 99:166–169.

YESILMEN S, VURAL A, ERKAN ME, YILDIRIM IH. 2014. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Arcobacter* species in cow milk, water buffalo milk and fresh village cheese. **Int J Food Microbiol**. 188:11–14.

YILDIZ H, AYDIN S. 2006. Pathological effects of *Arcobacter cryaerophilus* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*). **Acta Vet Hung**. 54:191–199.

ZACHAROW I, BYSTRON J, WAECKA-ZACHARSKA E, PODKOWIK M, BANIA J. 2015. Prevalence and antimicrobial resistance of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* isolates from retail meat in Lower Silesia region, Poland. **Pol J Vet Sci**. 18:63–69.

ZHANG Z, YU C, WANG X, YU S, ZHANG XH. 2016. *Arcobacter pacificus* sp. nov., isolated from seawater of the South Pacific Gyre. **Int J Syst Evol Microbiol**. 66:542–547.

ZURBRUEGGE J,BACKES C,GOLZ G,HEMMRICH-STANISAK G, SCHAREK-TEDIN L, FRANKE A, Alter T, Einspanier R, Keller A, Sharbati S. 2016. MicroRNA response of primary human macrophages to *Arcobacter butzleri* infection. **Eur J Microbiol Immunol**. 6:99–108.

ZUR BRUEGGE J, HANISCH C, EINSPANIER R, ALTER T, GOLZ G, SHAR- BATI S. 2014. *Arcobacter butzleri* induces a pro-inflammatory response in THP-1 derived macrophages and has limited ability for intracellular survival. **Int J Med Microbiol.** 304:1209–1217.

ANEXOS

ANEXO A

Tabela 6 - Identificação das espécies dos isolados de *Arcobacter* de carnes de frangos pela técnica de sequenciamento do gene RNAr 16S

Amostra	Identificação por Sequenciamento do gene RNAr 16S
3	*A. lacus*
4	*A. lacus*
5	*A. lacus*
6	*A. lacus*
7	*A. lacus*
9	*A. lacus*
12	*A. lacus*
13	*A. lacus*
14	*A. lacus*
15	*Arcobacter* spp. espécie não identficada
17	*A. lacus*
18	*A. lacus*
19	*A. lacus*
20	*A. lacus*
21	*A. lacus*
22	*A. lacus*
23	*A. lacus*
24	*A. lacus*
25	*A. lacus*
26	*A. lacus*
27	*A. lacus*
28	*A. lacus*
30	*A. lacus*
31	*A. lacus*
34	*A. lacus*

35	*A. lacus*
36	*A. lacus*
37	*A. lacus*
38	*A. lacus*
39	*A. lacus*
40	*A. lacus*
41	*A. lacus*
42	*A. lacus*
43	*A. lacus*
44	*A. lacus*
45	*A. lacus*
46	*A. lacus*
47	*A. lacus*
48	*A. lacus*
51	*A. lacus*
52	*A. lacus*
53	*A. lacus*
54	*A. lacus*
55	*A. lacus*
56	*A. lacus*
57	*A. lacus*
58	*A. lacus*
59	*A. lacus*
60	*A. lacus*
61	*A. lacus*
62	*A. lacus*
63	*Arcobacter* spp. espécie não identficada
67	*A. lacus*
69	*A. lacus*
70	*A. lacus*
71	*A. lacus*
72	*A. lacus*

ANEXO B

Tabela 7 - Identificação, origem e metodologia utilizada para identificação genotípica dos isolados de *Arcobacter* de carnes de frangos

Identificação dos isolados (Amostras)	Origem do isolado	Metodologia utilizada para a possível Identificação genotípica da espécie	Isolados identificados
3	A	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
4	A	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
5	A	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
6	A	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
7	A	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
8	A	m-PCR (**)	*A. butzleri*
9	A	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
10	A	m-PCR (**)	*A. butzleri*
11	A	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
12	A	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
13	A	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
14	A	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
15	A	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*Arcobacter* spp. espécie não identficada
16	A	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
17	A	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
18	A	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
19	A	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
20	A	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
21	A	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
22	A	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
23	A	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
24	A	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*

25	A	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
26	A	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
27	A	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
28	A	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
71	A	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
29	B	m-PCR (**)	*A. thereius*
30	B	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
31	B	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
32	B	m-PCR (**)	*A. thereius*
33	B	m-PCR (**)	*A. thereius*
34	B	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
35	B	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
36	B	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
37	B	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
38	B	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
39	B	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
40	B	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
41	C	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
42	C	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
43	C	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
44	C	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
45	C	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
46	C	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
47	C	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
48	C	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
51	C	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
52	C	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
53	C	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
54	C	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*

55	C	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
56	C	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
57	C	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
58	C	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
59	C	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
60	C	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
61	C	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
67	C	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
72	C	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
69	D	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
70	D	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
62	E	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*A. lacus*
63	E	Amplificação PCR 16S rRNA, PCR-RFLP e Sequenciamento do gene RNAr 16S (*)	*Arcobacter* spp. espécie não identficada

Legenda:
(*) = Protocolos de Marshall et al (1999) e Figueras et al (2008)
(**) = Protocolos de Houf et al (2000) e Douidah et al (2010)
A = Frango em cortes refrigerado do varejo das cidades de Campinas-SP e Piracicaba-SP
B = Frango em cortes congelado do varejo das cidades de Campinas-SP e Piracicaba-SP
C = Frango inteiro refrigerado do varejo das cidades de Campinas-SP e Piracicaba-SP
D = Frango inteiro congelado do varejo das cidades de Campinas-SP e Piracicaba-SP
E = Frango em cortes refrigerado de abatedouro de produção orgânica localizado em Ipeúna-SP