UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Caracterização molecular de linhagens de *Campylobacter coli* isoladas de
origens diversas

Carolina Nogueira Gomes

Ribeirão Preto

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Caracterização molecular de linhagens de *Campylobacter coli* isoladas de
origens diversas

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para
obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientada: Carolina Nogueira Gomes

Orientadora: Prof^a Dr^a Juliana Pfrimer Falcão

Ribeirão Preto

2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Gomes, Carolina Nogueira

Caracterização molecular de linhagens de *Campylobacter coli* de origens diversas. Ribeirão Preto, 2015.

107p. :il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Falcão, Juliana Pfrimer.

1. *Campylobacter coli* 2. Tipagem Molecular. 3. Genes relacionados à virulência. 4. Susceptibilidade a antimicrobianos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Carolina Nogueira Gomes

Caracterização molecular de linhagens de *Campylobacter coli* de origens diversas

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Prof^a Dr^a Juliana Pfrimer Falcão

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Este trabalho foi realizado nos seguintes laboratórios de pesquisa:

Laboratório de Bacteriologia, Epidemiologia Molecular, Virulência Bacteriana e Estudos da Genômica de Microrganismos do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP), sob a orientação da *Profª. Dra. Juliana Pfrimer Falcão*.

Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), nas dependências da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, onde foram realizados os experimentos de sequenciamento sob a coordenação do *Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas*.

Dedico este trabalho

À minha mãe Neusa e ao meu pai Antonio pelo amor e apoio incondicionais. Aos meus irmãos Gabriela, Marcos, Carina e ao meu sobrinho João Vitor pela presença amorosa apesar da distância física. Ao meu namorado Alessandro pelo carinho e momentos de alegria. Amo vocês....

AGRADECIMENTOS

Este espaço é dedicado àqueles que, de alguma forma, contribuíram para que esta dissertação fosse realizada. Não sendo viável nomeá-los a todos, há no entanto alguns a quem não posso deixar de manifestar o meu apreço e agradecimento sincero.

Á Deus pela benção da vida, proteção e força para superar os obstáculos ao longo da minha jornada.

À *Prof^a Dr^a Juliana Pfrimer Falcão*, pela orientação, pelo carinhoso apoio, partilha do saber e as valiosas contribuições para a realização desse trabalho. Acima de tudo, obrigada por continuar a acompanhar-me nesta jornada e por estimular o meu interesse pelo conhecimento. Agradeço pela confiança em mim depositada, pelo empenho, paciência e o exemplo profissional e moral durante todo esse período. Minha profunda admiração. Muito Obrigada por tudo!

Á minha querida e amada Mãe pelo amor sem reservas, pelos momentos de carinho e por tornar a minha vida mais colorida. Ao meu Pai pela figura firme e segura que me empurra nos momentos mais difíceis, por tornar possível os meus sonhos e conquistas. Não tenho palavras para descrever esse Amor!

Aos meus queridos irmãos Gabriela, Marcos, Carina e ao meu sobrinho João Vitor pelo incentivo, apoio e carinho. Vocês são parte de mim!

Á aquele que não leva jeito com as palavras, mas tem um abraço que me acalma, um olhar que me alegra, um sorriso que conforta e um amor que me transforma. Alessandro, “Não me lembro mais qual foi nosso começo. Sei que não começamos pelo começo. Já era amor antes de ser”!

Aos amigos de pós-graduação do Laboratório de Epidemiologia Molecular, Virulência e Genômica de Bactérias de Importância Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP *Amanda, Fábio, Fernanda, Miliane, Priscilla e Roberto*, muito obrigada pelas

discussões científicas, apoio nos experimentos, críticas, amizade, bom humor, momentos de alegria contagiante. É muito bom poder contar com vocês!

Um agradecimento especial à *Jaqueline Passaglia* pela valiosa amizade, compreensão e carinho nos momentos mais difíceis. Agradeço também pelo auxílio técnico-laboratorial sem o qual o término desse trabalho, dentro do prazo, não seria possível.

À *Vania Cláudia de Albuquerque* pela tão preciosa amizade carinho e colo no decorrer desse trabalho e pelo auxílio administrativo.

À Pesquisadora Fundadora da Coleção de *Campylobacter* do Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, Ana Luiza Lauria Filgueiras, à Curadora Sheila da Silva Duque e à Pesquisadora do Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto, Marta Inês Cazentini Medeiros, pela preciosa colaboração sem a qual a realização desse trabalho não seria possível. Meus mais sinceros Agradecimentos!

Ao Prof. Dr. *Dimas Tadeu* pelo uso do sequenciador no Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática- Sala de Sequenciamento do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) nas dependências da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto.

À *Adriana Aparecida Marques*, funcionária da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, pela gentileza com esse trabalho e pelos sequenciamentos realizados.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia da FCFRP-USP, pelos esforços para oferecer sempre as melhores oportunidades científicas e acadêmicas.

À *Rosana Florêncio* e *Henrique Teodoro*, funcionários da Seção de Pós-Graduação, pela atenção dispensada com toda competência durante a pós-graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de Mestrado.

À *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo* (FAPESP) pelo suporte financeiro à esse projeto de pesquisa (Proc 2014/13029-0) bem como por todo o suporte financeiro ao laboratório.

A todos os meus *familiares* pelo carinho, apoio, orações, ensinamentos e alegrias de uma vida.
Muito Obrigada!!!

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

O SENTIDO DA VIDA

“Não sei...

se a vida é curta ou longa demais pra nós,
mas sei que nada do que vivemos tem sentido,
se não tocamos o coração das pessoas.

Muitas vezes basta ser:

colo que acolhe,

braço que envolve,

palavra que conforta,

silêncio que respeita,

alegria que contagia,

lágrima que corre,

olhar que acarícia,

desejo que sacia,

amor que promove.

E isso não é coisa de outro mundo,

é o que dá sentido à vida.

É o que faz com que ela não

seja nem curta, nem longa demais,

mas que seja intensa,

verdadeira,

pura...enquanto durar...”

Cora Coralina

RESUMO

Gomes, C. N. **Caracterização molecular de linhagens de *Campylobacter coli* isoladas de origens diversas**. 2015. 107f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Campylobacter spp., principalmente as espécies *C. coli* e *C. jejuni*, são a causa mais comum de doença bacteriana veiculada por alimentos na Europa, Estados Unidos e alguns outros locais do mundo. No Brasil, há uma escassez de estudos de *C. coli*, o que dificulta avaliar a dimensão do envolvimento dessa bactéria como causadora de doença nos seres humanos e em animais, bem como, determinar o impacto de sua presença em alimentos e no meio ambiente. O objetivo desse trabalho foi caracterizar molecularmente linhagens de *C. coli* isoladas de origens diversas no Brasil pela pesquisa da presença de genes relacionados à virulência por PCR, perfil de sensibilidade a antimicrobianos e pela análise da similaridade genotípica por métodos de tipagem molecular. Adicionalmente, o Índice de Discriminação (*D*) de tais metodologias foi verificado. Foram estudadas 63 linhagens de *C. coli*, isoladas de humanos (12), animais (21), alimentos (10) e ambiente (20), entre os anos de 1995 e 2011, nos Estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais. Todas as linhagens apresentaram os genes *flaA*, *cadF* e *sodB*. O gene *cdtB* foi detectado em 20 (31,7%) linhagens, o gene *flhA* foi detectado em 11 (17,5%) linhagens, o gene *dnaJ* foi encontrado em 10 (15,9%) linhagens, o gene *pldA* foi detectado em sete (11,1%) linhagens, o gene *iamA* foi detectado em três (4,8%) linhagens, os genes *cdtC* e *docA* foram encontrados em duas (3,2%) linhagens, os genes *cdtA* e *crsA* foram encontrados em uma (1,6%) linhagem e os genes *ciaB*, *wlaN*, *virB11* e *racR* não foram detectados. Dentre as 63 linhagens estudadas, 42 foram susceptíveis a todos os antimicrobianos testados. Das 21 linhagens resistentes, 10 (15,9%) foram resistentes a tetraciclina e doxaciclina, seis (9,5%) foram resistentes a ciprofloxacina e uma (1,6 %) foi resistente a eritromicina. Somente quatro (6,3%) linhagens foram resistentes a pelo menos duas diferentes classes de antibióticos testados simultaneamente. O dendrograma de similaridade genética de *Pulsed field gel electrophoresis* (PFGE) agrupou as 63 linhagens estudadas em dois grupos principais denominados PFGE-A e PFGE-B com similaridade genômica de 44,9% entre eles. Entretanto, algumas linhagens isoladas de humanos, animais, ambiente e alimentos apresentaram uma alta similaridade genotípica acima de 80% entre elas e, foram agrupadas em sete subgrupos denominados PFGE-A1 a PFGE-A7. O dendrograma de similaridade genômica das sequências da SVR do gene *flaA* agrupou as linhagens

estudadas em dois grupos principais designados SVR-A e SVR-B, com similaridade acima de 83,1 % entre eles. Ademais, o depósito das sequências da SVR do gene *flaA* no banco de dados *online* demonstrou que os alelos 30 e o 1647 foram os mais frequentemente encontrados e permitiu a comparação das linhagens estudadas com os alelos descritos no banco de dados. Sete alelos, dentre os 22 encontrados, não haviam sido previamente descritos. A análise do *locus* CRISPR por HRMA dividiu as linhagens de *C. coli* em quatro diferentes perfis de *melting*. O *Multilocus sequence typing* (MLST) foi utilizado para tipar 20 linhagens de *C. coli* e foram obtidos 18 STs diferentes dos quais apenas dois já haviam sido previamente descritos. O *D* das metodologias de PFGE, sequenciamento da SVR do gene *flaA*, análise do *locus* CRISPR por HRMA e MLST foi de 0,986, 0,916, 0,550 e 0,989, respectivamente. Pode-se concluir que o potencial patogênico das linhagens de *C. coli* não foi evidenciado o que pode estar relacionado ao fato da maioria dos estudos envolvendo patogênese terem sido realizados para a espécie *C. jejuni*. Algumas linhagens apresentaram-se resistentes aos antimicrobianos testados, o que é preocupante uma vez que tais linhagens podem disseminar genes de resistência a outras isoladas de diversas fontes. Os resultados gerados pelos métodos de tipagem molecular por PFGE e sequenciamento da pequena região variável (SVR) do gene *flaA* demonstraram uma alta similaridade genotípica entre algumas linhagens de *C. coli*, sugerindo que uma possível contaminação tenha ocorrido entre linhagens isoladas de fontes clínicas e não clínicas ao longo de 16 anos no Brasil. Ademais, a análise dos alelos da SVR do gene *flaA* nos permitiu concluir que os alelos prevalentes nas linhagens estudadas diferem daqueles encontrados nos países Europeus. Os dados obtidos por MLST sugerem que as linhagens estudadas possuem uma grande diversidade genética entre si e em comparação com as linhagens isoladas em diferentes locais do mundo. Finalmente, as técnicas de MLST e PFGE foram as mais eficientes e adequadas na genotipagem das linhagens de *C. coli* estudadas.

Palavras-chave: *Campylobacter coli*, genes relacionados à virulência, perfil de sensibilidade a antimicrobianos, PFGE, SVR-*flaA*, Análise do *locus* CRISPR por HRMA e MLST.

ABSTRACT

Gomes, C. N. **Molecular characterization of *Campylobacter coli* strains isolated from different sources**. 2015. 107f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Campylobacter spp., mainly the *C. coli* and *C. jejuni* species, are the most common cause of bacterial disease conveyed by food in Europe, United States, and other places worldwide. In Brazil, there is a paucity of studies on *C. coli*, which makes it difficult to evaluate the involvement of this bacterium as a cause of diseases in humans and animals, as well as to determine the impact of its presence in food and the environment. The aim of this study was to molecularly characterize *C. coli* strains isolated from diverse origins in Brazil by searching for the presence of virulence-related genes by PCR, antimicrobial sensitivity profile, and analysis of the genotypic similarity by molecular typing methods. Additionally, the Discriminatory Index (*D*) of those methodologies was accessed. Sixty-three *C. coli* strains isolated from humans (12), animals (21), food (10), and the environment (20) between 1995 and 2011, in the States of Rio de Janeiro, São Paulo, and Minas Gerais were studied. All strains presented the *flaA*, *cadF* and *sodB* genes. The *cdtB* gene was detected in 20 (31.7%) strains; the *flhA* gene was detected in 11 (17.5%) strains; the *dnaJ* gene was detected in 10 (15.9%) strains; the *pldA* gene was detected in 7 (11.1%) strains; the *iamA* gene was detected in three (4.8%) strains; the *cdtC* and *docA* genes were found in two (3.2%) strains; the *cdtA* and *crsA* were found in one (1.6%) strain and the *ciaB*, *wlaN*, *virB11* and *racR* genes were not detected. Among the 63 strains studied, 42 were susceptible to all antimicrobials tested. Of the 21 resistant strains, 10 (15.9%) were resistant to tetracycline and doxacycline, six (9.5%) showed resistance to ciprofloxacin, and one (1.6%) was resistant to erythromycin. Only four (6.3%) strains were simultaneously resistant to at least two different classes of the antibiotics tested. The dendrogram of genetic similarity of *Pulsed field gel electrophoresis* (PFGE) grouped the 63 strains studied into two groups namely PFGE-A and PFGE-B with a genomic similarity of 44.9% among them. However, some strains isolated from humans, animals, the environment and food presented a high genotypic similarity above 80% and were subdivided into seven groups designated as PFGE-A1 to PFGE-A7. The dendrogram of genetic similarity of the *SRV-flaA* gene sequences grouped the strains studied into two groups namely SVR-A and SVR-B, with similarity above 83.1% among them. Besides, the deposit of the SVR sequences of the *flaA* gene in the online database showed that the alleles 30 and 1647 were the

most frequently found and allowed the comparison between the strains studied with the alleles described in the database. Seven alleles, among the 22 found have never been described before. The CRISPR locus analysis divided the *C. coli* strains into four different melting profiles. The Multilocus sequence typing (MLST) was used to type 20 *C. coli* strains and revealed 18 different STs among which just two had been previously described. The *D* of PFGE, SVR-*flaA* sequence, HRMA of CRISPR locus analysis and MLST was 0.986, 0.916, 0.550 and 0.989, respectively. In conclusion, the pathogenic potential of the *C. coli* strains was not highlighted, which could be related to the fact that the majority of the pathogenicity studies were performed with *C. jejuni* species. Some strains showed resistance to the antibiotics tested what is a concern once those strains may spread the resistance genes to other strains isolated from different sources. The results obtained by PFGE and SVR-*flaA* sequence showed a high genomic similarity among some *C. coli* strains which may suggest that a possible contamination may have occurred among clinical and non-clinical sources during 16 years in Brazil. Furthermore, the analysis of SVR-*flaA* alleles allowed the conclusion that the prevalent alleles in the strains studied were different from those found in European countries. The data obtained by MLST suggests that the strains studied had a high genomic diversity among them and in comparison with strains isolated from different places worldwide. Finally, the MLST and PFGE techniques were the most efficient and adequate in genotyping the *C. coli* strains studied.

Keywords: *Campylobacter coli*, virulence-related genes, antimicrobial sensitivity profile, PFGE, SVR-*flaA*, HRMA of CRISPR locus analysis and MLST.

RESUMEM

Gomes, C. N. **Caracterización molecular de cepas de *Campylobacter coli* aisladas de diversos orígenes**. 2015. 107f. Disertación (Maestría). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

El *Campylobacter*, principalmente las especies *C. coli* y *C. jejuni*, es la causa más común de enfermedad bacteriana vehiculada por alimento en Europa, Estados Unidos y otros sitios del mundo. En Brasil hay escasez de estudios de *C. coli*, lo que dificulta la evaluación de la dimensión del involucramiento de esa bacteria como causadora de enfermedad en los seres humanos y en los animales, así como, determinar el impacto de su presencia en alimentos y en el medio ambiente. El objetivo de ese trabajo fue caracterizar molecularmente las cepas de *C. coli* aisladas de diversos orígenes en Brasil por medio de investigación de genes relacionados a la virulencia por PCR, perfil de sensibilidad genotípico por métodos de tipificación molecular, además de verificar el Índice de Discriminación (*D*) de tales metodologías. Fueron estudiadas 63 cepas de *C. coli*, aisladas de humanos (12), animales (21), alimentos (10) y ambiente (20), entre los años de 1995 y 2011, en los Estados de Rio de Janeiro, São Paulo y Minas Gerais. Todas las cepas presentaron los genes *flaA*, *cadF* y *sodB*. El gene *cdtB* fue detectado en 20 (31,7%) cepas; el gene *flhA* fue detectado en 11 (17,5%) cepas; el gene *dnaJ* fue detectado en 10 (15,9%) cepas; el gene *pldA* fue detectado en 7 (11,1%) cepas; el gene *iamA* fue detectado en 3 (4,8%) cepas; los genes *cdtC* y *docA* fueron encontrados en 2 (3,2%) cepas; los genes *cdtA* y *crsA* fueron encontrados en solamente una (1,6%) cepa. Los genes *ciaB*, *wlaN*, *virB11* y *racR* no fueron encontrados en ninguna cepa. De las 63 cepas estudiadas, 42 fueron susceptibles a todos los antimicrobianos testados. De las 21 cepas resistentes, 10 (15,9%) fueron resistentes a los antimicrobianos de la clase de las tetraciclinas, seis (9,5%) fueron resistentes al ciprofloxacino y una (1,6 %) fue resistente a la eritromicina. Apenas cuatro cepas fueron resistentes al menos a dos distintas clases de antibióticos testados simultáneamente. El dendrograma de similitud genético de *Pulsed field gel electrophoresis* (PFGE) agrupó las 63 cepas estudiadas en dos grupos principales denominados PFGE-A y PFGE-B con similitud genómica de 44,9% entre ellos. Algunas cepas aisladas de humanos, animales, ambiente y alimentos presentaron una alta similitud genotípica arriba de 80% entre ellas y fueron agrupadas en siete subgrupos denominados PFGE-A1, PFGE-A2, PFGE-A3, PFGE-A4, PFGE-A5, PFGE-A6 y PFGE-A7. El dendrograma de similitud genômica de las secuencias de la SVR del gene *flaA* agrupó las cepas estudiadas en dos grupos principales designados SVR-A e SVR-B, con similitud arriba de 83,1 % entre ellos. Además, el depósito

de las secuencias de la SVR del gene *flaA* en el banco de datos *online* demostró que los alelos 30 y 1647 fueron los más frecuentemente encontrados y posibilitó la comparación de las cepas estudiadas con los alelos descritos en el banco de datos. Siete alelos de los 22 encontrados no habían sido previamente descritos. El análisis del *locus* CRISPR por HRMA dividió las cepas de *C. coli* en cuatro distintos perfiles de *melting*. El *Multilocus sequence typing* (MLST) fue utilizado para tipificar 20 cepas de *C. coli* y fueron obtenidos 18 STs distintos de los cuales solamente dos ya habían sido previamente descritos. El *D* de las metodologías de PFGE, secuencia de la SVR del gene *flaA*, análisis del *locus* CRISPR por HRMA y MLST fue de 0,986, 0,916, 0,550 y 0,989, respectivamente. Se puede concluir que el potencial patogénico de las cepas de *C. coli* no fue evidenciado lo que puede estar relacionado al hecho de que la mayoría de los estudios envolviendo patogénesis son realizados para la especie *C. jejuni*. Algunas cepas se presentaron resistentes a los antimicrobianos testados, lo que es bastante preocupante, una vez que esas cepas pueden diseminar genes de resistencia a otras aisladas de distintas fuentes. Los resultados generados por los métodos de tipificación molecular por PFGE y secuenciación de la pequeña región variable (SVR) del gene *flaA* demostraron una alta similitud genotípica entre algunas cepas de *C. coli*, sugiriendo que una posible contaminación haya ocurrido entre cepas aisladas de fuentes clínicas y no clínicas a lo largo de 16 años en Brasil. Además, el análisis de los alelos de la SVR del gene *flaA* permitió concluir que la prevalencia de los mismos entre las cepas estudiadas se distingue de aquellos encontrados en los países Europeos. Los datos obtenidos por MLST sugieren que las cepas estudiadas poseen una grande diversidad genética entre ellas y en comparación con las cepas aisladas en diferentes sitios del mundo. Finalmente, las técnicas de MLST y PFGE fueron las más eficientes y adecuadas en la tipificación de las cepas de *C. coli* estudiadas.

Palabras-clave: *Campylobacter coli*, perfil de sensibilidad a antimicrobianos, genes relacionados a virulencia, PFGE, SVR-*flaA*, Análisis del *locus* CRISPR por HRMA y MLST.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Gel representativo dos produtos da extração do DNA genômico seguido de eletroforese horizontal em gel de agarose 0,8%.....	44
Figura 2.	Gel representativo da reação de reconfirmação da espécie seguido de eletroforese em gel de agarose 1,5%	45
Figura 3.	Placas representativas do ensaio com o Etest® para os antibióticos eritromicina, ciprofloxacina, tetraciclina e doxaciclina.....	47
Figura 4.	Gel de agarose 1% representativo do ensaio de PFGE de algumas linhagens de <i>Campylobacter coli</i> estudadas digeridas com a enzima <i>SmaI</i>	48
Figura 5.	Dendrograma de similaridade genotípica gerado pelo método UPGMA e coeficiente de similaridade DICE a partir do padrão de bandas obtido pelo PFGE com a enzima <i>SmaI</i> para as 63 linhagens de <i>Campylobacter coli</i> estudadas.....	51
Figura 6.	Dendrograma gerado a partir dos dados do sequenciamento da SVR do gene <i>flaA</i> utilizando o modelo de correção de distância de dois parâmetros de Jukes & Cantor e o algoritmo UPGMA.....	54
Figura 7.	Gráfico representativo da curva de <i>melting</i> das 63 linhagens de <i>Campylobacter coli</i> estudadas.....	55
Figura 8.	Gel de agarose 1,5% representativo da amplificação do gene <i>glnA</i> em algumas linhagens de <i>Campylobacter coli</i> estudadas.....	56
Figura 9.	Alinhamento e análise de sequências do gene <i>glnA</i> de uma das linhagens de <i>Campylobacter coli</i> estudada (CCAMP 494), pelo programa ChromasPro.....	57
Figura 10.	Diagrama de similaridade genética gerado pelo programa <i>eBURSTv3</i> com os dados de todas as 7753 linhagens de <i>Campylobacter</i> spp. disponíveis no banco de dados.....	59
Figura 11.	Diagrama de similaridade genética gerado pelo programa <i>eBURSTv3</i> com os STs das 20 linhagens de <i>Campylobacter coli</i> tipadas no presente estudo em conjunto com linhagens do banco de dados relacionados aos STs encontrados.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Propriedades fenotípicas de algumas espécies de <i>Campylobacter</i>	6
Tabela 2.	Características das 63 linhagens de <i>C. coli</i> estudadas.....	23
Tabela 3.	<i>Primers</i> utilizados na PCR para amplificação dos genes 16S rRNA, <i>mapA</i> e <i>ceuE</i> e tamanho dos produtos de amplificação gerados.....	27
Tabela 4.	Descrição dos reagentes utilizados na reconfirmação da espécie por PCR.....	28
Tabela 5.	Descrição dos reagentes utilizados na pesquisa dos genes relacionados à virulência por PCR.....	29
Tabela 6.	<i>Primers</i> utilizados na PCR para a amplificação dos genes relacionados à virulência estudados, tamanho dos produtos de amplificação gerados e temperatura de hibridação.....	30
Tabela 7.	Mistura utilizada para a digestão dos <i>plugs</i>	33
Tabela 8.	Descrição dos reagentes utilizados para a amplificação do gene <i>flaA</i>	35
Tabela 9.	Descrição dos reagentes utilizados para as reações de PCR em tempo real.....	37
Tabela 10.	Dados gerais sobre os <i>primers</i> utilizados na amplificação dos genes <i>housekeeping</i> utilizados na técnica de MLST.....	39
Tabela 11.	Descrição dos reagentes utilizados para a amplificação dos sete genes <i>housekeeping</i> utilizados na técnica do MLST.....	40
Tabela 12.	Frequência dos genes relacionados à virulência pesquisados nas 63 linhagens de <i>Campylobacter coli</i> estudadas.....	46
Tabela 13.	Perfil de resistência aos antimicrobianos eritromicina, ciprofloxacina, tetraciclina e doxaciiclina das 63 linhagens de <i>Campylobacter coli</i> isoladas de humanos, animais, alimentos e ambiente.....	47
Tabela 14.	Combinação dos alelos obtidos pelo sequenciamento dos genes <i>asp</i> , <i>gln</i> , <i>glt</i> , <i>gly</i> , <i>pmg</i> , <i>tkt</i> e <i>unc</i> e STs gerados pela combinação desses alelos.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
C.	<i>Campylobacter</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
D	Índice de discriminação
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfatados
D.O.	Densidade óptica
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
F	<i>Forward</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
ND	Não Detectado
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed field gel electrophoresis</i>
q.s.p.	Quantidade suficiente para
R	<i>Reverse</i>
rpm	Rotações por minuto
rRNA	RNA ribossômico
SI	Sem informação
spp.	Espécies
TAE	Tris Acetato EDTA
TBE	Tris Borato EDTA
TE	Tris EDTA
Tris	Hidroximetilaminometano
U	Unidade (s)
UFC	Unidade formadora de colônia
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
Σ	Somatório
≥	Maior ou igual a
-	Negativo
+	Positivo
μg	Micrograma (s)
μL	Microlitro (s)
A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
HCl	Ácido clorídrico
H₂S	Sulfeto de hidrogênio
KH₂PO₄	Fosfato de potássio monobásico
Kb	Quilobase (s)
KDa	Quilodalton (s)
mg	Miligramma (s)
MgCl₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro (s)
mM	Milimolar
NaOH	Hidróxido de sódio
ng	Nanograma (s)
nm	Nanômetro (s)
pmol	Picomol
T	Timina
V	Volt (s)
X	Vez (es)

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
RESUMEN	v
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
LISTA DE SÍMBOLOS	x
1. INTRODUÇÃO	2
1.1. História e taxonomia.....	2
1.2. Características do microrganismo.....	4
1.3. Manifestações clínicas e patogênese.....	6
1.4. Genes relacionados à virulência.....	8
1.5. Tratamento e susceptibilidade a antimicrobianos.....	10
1.6. Métodos de tipagem de <i>Campylobacter</i>	11
1.6.1. <i>Pulsed field gel electrophoresis</i> (PFGE).....	12
1.6.2. Sequenciamento da pequena região variável (<i>short variable region</i> , SVR) do gene <i>flaA</i>	13
1.6.3. Análise do <i>locus</i> CRISPR por HRMA.....	14
1.6.4. <i>Multilocus sequence typing</i> (MLST).....	15
1.7. Epidemiologia	15
2. RELEVÂNCIA DO ESTUDO	19
3. OBJETIVOS	21
3.1. Objetivo geral	21
3.2. Objetivos específicos	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1. Linhagens bacterianas.....	23
4.2. Verificação da pureza.....	25
4.3. Extração e verificação da pureza do DNA genômico.....	25
4.4. Reconfirmação da espécie por PCR.....	27

4.5. Armazenamento das linhagens bacterianas.....	29
4.6. Pesquisa dos genes relacionados à virulência por PCR.....	29
4.7. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	31
4.8. <i>Pulsed field gel electrophoresis</i> (PFGE).....	32
4.8.1. Preparo das amostras.....	32
4.8.2. Digestão dos <i>plugs</i>	33
4.8.3. Corrida eletroforética.....	34
4.8.4. Análise do padrão de bandas gerados com os dados de PFGE	34
4.8.5. Construção do dendrograma de similaridade genômica gerado com os dados de PFGE	34
4.9. Sequenciamento da pequena região variável (SVR) do gene <i>flaA</i>	35
4.9.1. Análise do sequenciamento da SVR do gene <i>flaA</i>	36
4.9.2. Construção do dendrograma de similaridade genômica gerado com os dados do sequenciamento da SVR do gene <i>flaA</i>	36
4.10. Análise do <i>locus</i> CRISPR por HRMA.....	37
4.11. <i>Multilocus sequence typing</i> (MLST).....	38
4.11.1. Escolha das linhagens.....	38
4.11.2. Amplificação dos genes <i>housekeeping</i>	38
4.11.3. Sequenciamento	40
4.11.4. Análise das sequências obtidas.....	40
4.11.5. Construção do diagrama de similaridade genética com os dados do MLST.....	40
4.12. Cálculo do índice de discriminação.....	41
5. RESULTADOS	43
5.1. Verificação da pureza das linhagens.....	43
5.2. Extração e verificação da pureza do DNA genômico.....	43
5.3. Reconfirmação da espécie por PCR.....	44
5.4. Pesquisa dos genes relacionados à virulência por PCR.....	45
5.5. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	46
5.6. <i>Pulsed field gel electrophoresis</i> (PFGE).....	47
5.6.1. Construção do dendrograma de similaridade genômica gerado com os dados de PFGE	48
5.7. Sequenciamento da SVR do gene <i>flaA</i>	52

5.7.1. Construção do dendrograma de similaridade gerado com os dados do sequenciamento da SVR do gene <i>flaA</i>	52
5.8. Análise do <i>locus</i> CRISPR por HRMA.....	55
5.9. <i>Multilocus sequence typing</i> (MLST).....	56
5.9.1. Amplificação dos genes <i>housekeeping</i>	56
5.9.2. Sequenciamento	56
5.9.3. Diagramas de similaridade genética gerado com os dados de MLST.....	57
5.10. Índice de Discriminação.....	61
6. DISCUSSÃO	63
7. CONCLUSÕES	77
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
APÊNDICES	101
ANEXOS	104

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. História e taxonomia

As bactérias que atualmente pertencem ao gênero *Campylobacter* foram possivelmente descritas pela primeira vez em 1886 por Theodor Escherich, que publicou uma variedade de artigos descrevendo a presença de uma bactéria espiralada na biópsia do cólon de crianças que haviam morrido de uma doença denominada por ele de “cólera diarreica”. Tempos depois, Escherich observou a presença de organismos espiralados nas fezes de crianças que apresentavam doença entérica (Butzler, 2004).

O reconhecimento desse patógeno como uma importante causa de doenças ocorreu primeiramente no ramo veterinário. Em 1909, dois cirurgiões veterinários, McFadyean e Stockman, reportaram a presença de microrganismos vibróides em fetos abortados de ovelhas. No ano de 1919, Smith e Taylor, propuseram o nome *Vibrio fetus* para os microrganismos isolados de casos de aborto em bovinos nos Estados Unidos (Smith, 1919; Butzler, 2004). Em 1931, Jones e colaboradores atribuíram a diarreia de bezerros à infecção por uma bactéria com características morfológicas similares às descritas acima e a denominaram *Vibrio jejuni*. Da mesma maneira, treze anos mais tarde Doyle denominou de *Vibrio coli* microrganismos vibróides associados a diarreia em suínos (Butzler, 2004).

O primeiro relato de infecções em humanos causada por bactérias do gênero, atualmente conhecido como *Campylobacter*, foi feito em Illinois em 1938. As infecções foram associadas ao consumo de leite cru por 355 pacientes e o microrganismo isolado da hemocultura desses pacientes foi denominado *Vibrio jejuni*. No ano de 1947, na França, Vicent e colaboradores isolaram *Vibrio fetus* da hemocultura de três mulheres grávidas que haviam sido internadas com sepse, duas delas abortaram e o exame da placenta revelou a presença de áreas de necrose e inflamação (Butzler, 2004).

O gênero *Campylobacter*, cuja palavra de origem grega significa bacilo curvo, foi inicialmente proposto por Sebald e Véron em 1963. Baseados na relação Citosina/Guanina do DNA o gênero *Vibrio* foi separado do gênero *Campylobacter* após verificarem que o teor de Guanina/Citosina das bactérias do gênero *Vibrio* oscilava em torno de 47% enquanto que no gênero *Campylobacter* essa variação era de 30 a 40% (Ketley, 1997). Em 1973, Véron e Chatelain publicaram um estudo mais detalhado envolvendo a taxonomia desses microrganismos e consideraram quatro espécies como pertencentes ao gênero *Campylobacter*: *Campylobacter fetus*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter sputorum* (Engberg, 2006).

O isolamento de *Campylobacter* a partir de fezes de pacientes com diarreia se tornou eficaz após 1973, quando Butzler e colaboradores propuseram um novo método de cultivo para essa bactéria. Quatro anos depois, Skirrow desenvolveu um suplemento seletivo contendo vancomicina, polimixina B e trimetropima, o que possibilitou o diagnóstico e isolamento de *Campylobacter* com a inibição da microbiota acompanhante. Objetivando facilitar o processo de isolamento, Blaser e colaboradores propuseram uma nova mistura de drogas contendo vancomicina, trimetropima, polimixina B, anfotericina B e cefalotina. Segundo os autores o número de isolamentos de *Campylobacter* utilizando esse suplemento foi semelhante ao isolamento de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. (Blaser *et al.*, 1980).

Assim, a partir da década de 80, microrganismos similares a *Campylobacter* foram isolados de fontes ambientais, alimentos, animais e humanos. Estudos envolvendo os “*Campylobacter-like organisms* (CLO)” foram, gradativamente, identificando novas espécies de *Campylobacter* ou variantes bioquímicas das espécies pré-estabelecidas. Comparações utilizando uma porção do 16S rRNA identificaram clades distintas dentro do gênero e novos gêneros. Dessa maneira, várias espécies do grupo CLO foram transferidas, como por exemplo o *C. pylori* que passou a pertencer ao gênero *Helicobacter*, e ocorreu a criação do gênero *Arcobacter* (Goodwin *et al.*, 1989; On, 2001; Engberg, 2006). Em 1991, Vandamme e colaboradores propuseram uma revisão completa da taxonomia e nomenclatura do gênero *Campylobacter* a partir da análise dos dados de hibridização DNA-rRNA e análise de dados fenotípicos e genéticos (Vandamme *et al.*, 1991). Estes microrganismos ficaram agrupados na superfamília rRNA VI que compreende os grupos homólogos I, II e III representados pelos gêneros *Campylobacter*, *Arcobacter* e *Helicobacter*, respectivamente. Devido à estreita relação filogenética e similares características fenotípicas e genotípicas entre os grupos I e II foi proposto a criação e inclusão de ambos na família *Campylobacteraceae* (Engberg, 2006).

Atualmente o gênero *Campylobacter* é composto por 26 espécies denominadas: *Campylobacter avium*; *Campylobacter canadensis*; *Campylobacter coli*; *Campylobacter concisus*; *Campylobacter cuniculorum*; *Campylobacter curvus*; *Campylobacter fetus* (*Campylobacter fetus* subsp *fetus*, *Campylobacter fetus* subsp *venerealis*, *Campylobacter fetus* subsp *testudium*); *Campylobacter gracilis*; *Campylobacter helveticus*; *Campylobacter hominis*; *Campylobacter hyointestinalis* (*Campylobacter hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *lawsonii*); *Campylobacter insulaenigrae*; *Campylobacter jejuni* (*Campylobacter jejuni* subsp. *doylei*, *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni*); *Campylobacter lanienae*; *Campylobacter lari* (*Campylobacter lari* subsp *concheus*); *Campylobacter mucosalis*; *Campylobacter peloridis*; *Campylobacter rectus*;

Campylobacter showae; *Campylobacter sputorum* (*Campylobacter sputorum* bv *sporutum*, *Campylobacter sputorum* bv *faecalis*, *Campylobacter sputorum* bv *paraureolyticus*); *Campylobacter subantarcticus*; *Campylobacter upsaliensis*; *Campylobacter ureolyticus*; *Campylobacter corcagiensis*; *Campylobacter volucris* e *Campylobacter iguaniorum* (Fitzgerald, 2015).

Vale ressaltar, que as espécies *C. coli* e *C. jejuni* são os patógenos mais frequentemente relatados em casos de gastroenterite bacteriana aguda em humanos (Merchant-Patel *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2011; EFSA, 2015; CDC, 2015).

1.2. Características do microrganismo

O gênero *Campylobacter* compreende microrganismos gram-negativos de morfologia diversificada, apresentando-se, usualmente, na forma espiral ou curva, possuem de 0,2 a 5,0 μm de diâmetro por 0,5 a 5,0 μm de comprimento, não produzem esporos e são móveis devido à presença de um único flagelo polar em uma ou em ambas as extremidades, com exceção da espécie *C. gracilis* que não possui flagelo e da espécie *C. showae* que possui múltiplos flagelos (Silva *et al.*, 2011).

São microrganismos fastidiosos, e requerem condições específicas para o seu crescimento sendo nutricionalmente exigentes e incapazes de se proliferar na presença de ar atmosférico. A maioria das espécies crescem sob condições de microaerofilia com metabolismo respiratório complexo, necessitando de uma atmosfera que contenha baixas concentrações de oxigênio e maiores concentrações de hidrogênio e de dióxido de carbono (Gunther; Chen, 2009; John *et al.*, 2011).

A concentração de oxigênio ideal para a multiplicação de *Campylobacter* spp. é de 5%, sendo que em concentrações inferiores a 3% ou superiores a 15% sua multiplicação é inibida. Ademais, as espécies desse gênero são capnofílicas, ou seja, requerem cerca de 10% de CO_2 para a sua multiplicação (Garenaux *et al.*, 2008; John *et al.*, 2011).

As espécies de *Campylobacter* se desenvolvem em temperaturas que variam de 25°C a 42°C, entretanto, as espécies *C. coli*, *C. jejuni*, *C. lari* e *C. upsaliensis* são classificadas como termotolerantes por apresentarem temperatura ótima de multiplicação em torno de 42°C, sendo incapazes de se multiplicar em temperaturas inferiores a 37°C (Fitzgerald, 2015).

O crescimento de *Campylobacter* spp. não ocorre em ambientes com atividade de água (a_w) menor do que 0,987, são microrganismos sensíveis a concentrações de NaCl maiores do que 2%, não são termo resistentes, sendo facilmente destruídos pelo processo de

pasteurização e o pH ótimo para a multiplicação das bactérias desse gênero varia entre 6,5 e 7,5. Em culturas antigas, ou sob condições adversas de cultivo, as células de *Campylobacter* spp. podem adquirir formas esféricas ou cocóides que são denominadas formas viáveis, porém não cultiváveis (VNC) e representam um estágio degenerativo do seu ciclo de vida, no entanto, não ocorre a perda da capacidade infectante (Nachamkin, 2007). A transição da morfologia celular vibróide para a forma cocóide ocorre na fase estacionária do crescimento e, durante esse processo, não são detectáveis por metodologias convencionais de diagnóstico (Butzler, 2004; Garenaux *et al.*, 2008).

Campylobacter spp. apresenta metabolismo oxidativo e não utiliza carboidratos como fonte de energia. A obtenção de energia ocorre através da oxidação de aminoácidos ou ácidos intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico. São produtores de oxidase, catalase, reduzem nitrato a nitrito, mas não hidrolisam ureia, gelatina, caseína, amido ou tirosina (Holt *et al.*, 2000). São sensíveis ao oxigênio e a espécies reativas de oxigênio, dessa maneira a utilização de meios seletivos para os processos de isolamento e cultivo, contendo um ou mais redutores de oxigênio, tais como sangue, sulfato ferroso, piruvato de sódio, FBP [(0.05% de sulfato ferroso, 0.05% de piruvato de sódio, 0.05% de metabissulfito de sódio) diluído em água estéril], se faz necessário (Corry *et al.*, 1995; John *et al.*, 2011). Algumas das características citadas acima são utilizadas para a confirmação do gênero *Campylobacter* spp. e diferenciação das espécies (Tabela 1).

No entanto, devido ao fato desses microrganismos serem fastidiosos, complexos e bioquimicamente inertes, uma variedade de métodos fenotípicos e genotípicos tem sido utilizados no processo de identificação de membros desse grupo (Fitzgerald; Nachamkin, 2007).

Os membros desse gênero estão amplamente distribuídos na natureza e têm sido isolados de humanos, mamíferos, aves, répteis, moluscos e protozoários (Fitzgerald; Nachamkin, 2007). Estima-se que o manuseio, preparação e consumo de carne de frango seja responsável por 20-30% dos casos de infecção por *Campylobacter* em humanos, enquanto que 50-80% dos reservatórios desse patógeno são atribuídos as aves de maneira geral (EFSA, 2010).

Tabela 1. Propriedades fenotípicas de algumas espécies de *Campylobacter*.

Testes	Espécies					
	<i>C.coli</i>	<i>C.jejuni</i>	<i>C.fetus</i>	<i>C.lari</i>	<i>C.upsaliensis</i>	<i>C.hyointestinalis</i>
Oxidase	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	-	+
H ₂ S (TSI)	V	-	-	-	-	+
Redução de NO ₃	+	+	+	+	+	+
Hidrolise do Hipurato	-	+	-	-	-	-
Hidrolise do Acetato de Hidroxila	+	+	-	-	+	-
<u>Crescimento a:</u>						
25°C	-	-	+	-	-	V
37°C	+	+	+	+	+	+
42°C	+	+	-	+	+	V
1% de Glicina	+	+	+	V	+	V
<u>Sensibilidade a:</u>						
Ácido Nalidixico	S	S	V	R	S	R
Cefalotina	R	R	S	R	S	S

Modificado de Murray *et al.*, editores: *Manual of Clinical Microbiology*, 2007, American Society for Microbiology. +, reação positiva; -, reação negativa; V, reação variável; S, sensível; R, resistente

1.3. Manifestações clínicas e patogênese

A doença causada por *Campylobacter coli* é denominada campilobacteriose e a contaminação por este agente enteropatogênico está associada à ingestão de alimentos, tais como carne de aves, suínos e bovinos, leite não pasteurizado, água e através do contato com animais portadores, incluindo animais de estimação (Moore *et al.*, 2005; Gras *et al.*, 2013).

A campilobacteriose varia tanto em gravidade quanto em duração, apresentando diferentes manifestações clínicas e sendo clinicamente indistinguível das infecções causadas por outros enteropatógenos, como *Salmonella*, *Shigella* e algumas espécies de *Yersinia*, porém a baixa dose infectante de *Campylobacter*, cerca de 500 UFC/mL, pode ser considerada um agravante (Allos, 2001).

Os surtos relacionados à infecção por *Campylobacter* são raros, porém bem documentados, a maioria dos casos são esporádicos para os quais o percurso da infecção é raramente estabelecido (Magnusson *et al.*, 2011). A infecção é caracterizada por uma diarreia autolimitada, que pode apresentar-se sanguinolenta ou não, acompanhada de febre, dores abdominais e raramente de vômitos, dor de cabeça e dor muscular. O período de incubação é normalmente de 2 a 5 dias, podendo se estender por até 2 semanas (Butzler, 2004; Young *et*

al., 2007). Em casos mais graves, onde a reposição hidroeletrólítica não se faz suficiente, o uso de antimicrobianos é recomendado (Snelling *et al.*, 2005; Pollett *et al.*, 2012).

Embora a campilobacteriose seja geralmente considerada benigna (Crushell *et al.*, 2004), complicações pós infecção e manifestações extra intestinais podem ser graves e as vezes fatal. Existem relatos de bacteremia, sepse, meningite, artrite reativa, endocardite, aborto, periodontite, celulite e abscessos em locais variados associados a infecção por espécies de *Campylobacter* posteriormente a infecção intestinal (Blaser *et al.*, 1986; Selander, 1993; Butzler, 2004; Man, 2011). As sequelas mais relevantes incluem a síndrome de Guillan-Barré, síndrome de Miller-Fisher, síndrome de Reiter's e a síndrome Hemolítico-urêmica (Gillespie *et al.*, 2002).

A síndrome de Guillan-Barré é a manifestação mais grave da doença e caracteriza-se por uma reação inflamatória autoimune com perda da bainha de mielina dos nervos periféricos e das raízes nervosas resultando em paralisia neuromuscular aguda (Nachamkin, 2002; Shane; Stern, 2003). O desenvolvimento desta síndrome se dá através de um mecanismo de mimetismo antigênico entre os lipopolissacarídeos da parede celular bacteriana e os gangliosídeos da membrana dos nervos periféricos. Uma vez que a estrutura do gangliosídeo GM1 presente na membrana das células nervosas é semelhante aos glicolipídios do polissacarídeo de parede celular do *Campylobacter*, os anticorpos produzidos devido à infecção pela bactéria podem produzir uma reação cruzada e atacar os nervos, interferindo na condução dos estímulos nervosos, causando fraqueza muscular que pode evoluir para paralisia muscular aguda (Takahashi *et al.*, 2005).

Em alguns casos, a infecção por *Campylobacter* pode desencadear a síndrome de Miller-Fisher, que se caracteriza por perda dos reflexos oculomotores e relativa perda da força nas extremidades e tronco. O processo é mediado por anticorpos autoimune contra a bainha de mielina do sistema nervoso periférico (Overell; Willison, 2005).

Embora saibamos que os mecanismos que envolvem a patogênese de *Campylobacter* spp. estão relacionados aos processos de adesão e invasão ao epitélio intestinal, a elucidação desse processo como um todo não está completa e muito do que se sabe está relacionado, especificamente à espécie *C. jejuni*. Entretanto, foram propostos alguns possíveis mecanismos de patogênese para as espécies consideradas emergentes como é o caso de *Campylobacter coli*.

Após a ingestão, *C. coli* migra através do estômago e atinge o lúmen intestinal. As bactérias desse gênero possuem flagelo que confere a elas a capacidade de mover-se através

da camada de muco que reveste o epitélio intestinal aderindo-se a essas células e posteriormente invadindo-as. Existem evidências que sugerem que estas bactérias podem translocar-se através do epitélio intestinal tanto por via transcelular como por via paracelular (Man, 2011).

Ao atingirem a camada submucosa essas bactérias resistem a fagocitose devido à presença de uma camada protetora envolvendo a bactéria e de um *serum-killing* que, possivelmente, atua inibindo a deposição do sistema complemento sobre a membrana bacteriana durante a fase sistêmica da infecção (Blaser *et al.*, 1987; Pei *et al.*, 1988; Blaser, 1993). Além disso, proteínas efetoras podem ser entregues às células epiteliais do hospedeiro através de um sistema de secreção do tipo IV (T4SS) (Batchelor *et al.*, 2004; Moolhuijzen *et al.*, 2009).

O processo de patogênese também envolve a produção de toxinas, incluindo a toxina distensora citoletal (CDT). A ligação desta toxina à superfície da célula hospedeira é mediada pelas proteínas CdtA e CdtC seguida da entrega de CdtB ao núcleo celular do hospedeiro (Pickett *et al.*, 1996; Fouts *et al.*, 2005; Asakura *et al.*, 2008). Dessa maneira, a bactéria causa danos ao DNA da célula hospedeira e promove a interrupção do ciclo celular. Outras toxinas, como por exemplo a hemolisina, também podem ser produzidas durante o processo de bacteremia promovendo a lise dos eritrócitos (Man, 2011).

1.4. Genes relacionados à virulência

O mecanismo pelo qual o *Campylobacter* spp. causa doença em humanos ainda não está totalmente esclarecido. No entanto, alguns fatores são reconhecidos como importantes no que se refere à virulência desse gênero e estão associados tanto a genes plasmidiais, contidos no plasmídeo pVir, quanto a genes cromossômicos. Esses fatores incluem: motilidade, quimiotaxia, capacidade de colonização, adesão as células intestinais, invasão e translocação epitelial, sobrevivência intracelular e produção de toxinas (Ketley, 1997; Muller *et al.*, 2006; Wiczorek; Osek, 2008; Fernandes *et al.*, 2010).

O flagelo confere ao microrganismo a mobilidade que o torna capaz de se mover contra o peristaltismo e através da camada viscosa de muco do trato gastrointestinal (Park, 2002; Zilbauer *et al.*, 2005). Diversos experimentos envolvendo mutações flagelares demonstraram sua importância nos processos de aderência e invasão (Young *et al.*, 2007). O flagelo de *Campylobacter* spp. sofre modificação pós-traducional por glicosilação, o que é importante para a montagem da maquinaria flagelar, motilidade e virulência (Logan *et al.*,

1989; Guerry *et al.*, 2006). Ademais, o flagelo pode exportar tanto proteínas flagelares como não flagelares desempenhando um importante papel no processo de secreção (Song *et al.*, 2004; Konkel *et al.*, 2004). Assim, genes que codificam proteínas flagelares, como por exemplo os genes *flaA* e *flhA*, dentre outros, são frequentemente utilizados como alvo para a caracterização de isolados de *Campylobacter* spp. e investigação da virulência (Ketley, 1997; Meinersmann *et al.*, 1997).

A identificação de adesinas em *Campylobacter* spp. tem sido um grande desafio. Embora as estruturas que estão normalmente envolvidas com o processo de adesão não tenham sido identificadas, muitas outras moléculas são capazes de desempenhar o papel de uma adesina, como por exemplo, as proteínas codificadas pelos genes *cadF*, *docA*, *racR* e *dnaJ* (Muller *et al.*, 2006; Biswas *et al.*, 2011). Estudos utilizando mutantes demonstraram que a ausência das proteínas codificadas por esses genes reduziu a capacidade de colonização dessas bactérias (Konkel *et al.*, 1999; Ziprin *et al.*, 1999; Muller *et al.*, 2006).

De acordo com Linton *et al.* (2000a) o gene *wlaN* codifica a produção da β -1,3 galactosyltransferase que é responsável por estruturas específicas do Lipooligosacarídeo (LOS) consideradas críticas para o desenvolvimento de neuropatias após a infecção por *Campylobacter* (Linton *et al.*, 2000) e, assim como os genes *pldA*, *ciaB* e *iam*, está relacionado ao processo de invasão e sobrevivência na célula hospedeira (Bang *et al.*, 2003; Datta *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2010; Wieczorek *et al.*, 2013).

O gene *virB11* codifica proteínas do sistema de secreção do tipo IV (T4SS), que é uma maquinaria pela qual a bactéria introduz proteínas efetoras ou DNA em células de hospedeiros eucarióticos ou em outra bactéria, e a sua presença também está relacionada ao processo de invasão. Vale ressaltar que esse gene é o único, dentre os citados, localizado no plasmídeo pVir (Bacon *et al.*, 2000; Wieczorek; Osek, 2008).

As toxinas produzidas por *Campylobacter* também são importantes fatores de patogenicidade. Entretanto, há relativamente pouco conhecimento a respeito dessas estruturas. Sabe-se que a toxina distensora citoletal (CDT) é formada por três subunidades codificadas pelos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*, mas sua função específica não está totalmente elucidada. Acredita-se que haja o envolvimento de CDT no processo de diarreia causando alterações na cripta epitelial, o que leva à uma erosão temporária e subsequente perda na função de absorção (Ziprin *et al.*, 1999; van Vliet; Ketley, 2001; Wieczorek; Osek, 2008). Outra toxina descrita para algumas espécies de *Campylobacter* é a hemolisina, que possui a capacidade de promover a lise dos eritrócitos (Man, 2011).

As razões pelas quais as espécies de *Campylobacter* necessitam de uma atmosfera gasosa específica não está completamente elucidada. No entanto, é sabido que essa espécie é particularmente sensível a espécies reativas de oxigênio. Dessa maneira, a presença do gene *sodB*, que codifica a enzima superóxido desmutase, é importante no que se refere a proteção quanto a situações adversas, bem como a presença da proteína regulatória CsrA codificada pelo gene *crsA* (Purdy *et al.*, 1999; Biswas *et al.*, 2011; John *et al.*, 2011).

1.5. Tratamento e susceptibilidade a antimicrobianos

A resistência a antibióticos em bactérias do gênero *Campylobacter* é reconhecida pelo Organização Mundial de Saúde (OMS) como um importante problema em saúde pública (Greig, 2003; McDermott *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2011).

O uso de antibióticos não é usualmente indicado para o tratamento de casos de gastroenterite causados por *Campylobacter coli*. Entretanto, existe uma variedade de infecções sistêmicas e crônicas que estão associadas a infecção por *C. coli* para as quais existe a necessidade do uso de antimicrobianos e nesses casos, os antibióticos de escolha para o tratamento da campilobacteriose são macrolídeos, tetraciclina e fluoroquinolonas (Silva *et al.*, 2011; Duarte *et al.*, 2014). No entanto, o aumento da resistência a esses antibióticos tem comprometido a eficácia dos tratamentos (Aarestrup; Engberg, 2001; Engberg *et al.*, 2001; Gibreel; Taylor, 2006; Alfredson; Korolik, 2007). Alternativamente, o uso da gentamicina vem sendo feito em casos de infecções sistêmicas por linhagens de *Campylobacter coli* multirresistentes (Aarestrup; Engberg, 2001; Silva *et al.*, 2011).

Estudos comparando a evolução dos padrões de resistência a antibióticos das espécies de *Campylobacter* demonstraram um rápido desenvolvimento de resistência tanto em linhagens de origem clínica como em isolados de alimentos (Lucey *et al.*, 2002; Gallay *et al.*, 2007; Mazi *et al.*, 2008; Duarte *et al.*, 2014; Khalid *et al.*, 2015). Existem evidências de que o uso indiscriminado de antibióticos na produção animal ao longo de décadas, a fim de controlar, prevenir e tratar infecções, além de estimular o crescimento dos animais tenha contribuído para o surgimento e propagação da resistência a antibióticos entre as espécies de *Campylobacter* (Rozynek *et al.*, 2007; Igimi *et al.*, 2008).

A aprovação e utilização de fluoroquinolonas em frangos de corte na Europa e nos Estados Unidos foi acompanhada de um aumento significativo da resistência de *Campylobacter* spp. a essa classe de antibióticos tanto em linhagens isoladas de animais como em isoladas de humanos (Smith; Fratamico, 2010). Segundo Luangtongkum *et al.* (2006),

linhagens de *Campylobacter* isoladas a partir de frangos orgânicos, onde o uso de antibióticos não é permitido, são significativamente mais sensíveis aos antibióticos do que linhagens isoladas de frangos de corte criados em granjas convencionais.

Estudos realizados por Gallay *et al.* (2007) e de Han *et al.* (2009) demonstraram que a utilização de uma política de regulação limitando o uso de antibióticos em animais para consumo resultou em uma redução da resistência a fluoroquinolonas. No entanto, outros estudos sugerem que a resistência pode persistir por longos períodos de tempo (Nelson *et al.*, 2007; Price *et al.*, 2007).

Vale ressaltar que, por razões ainda não esclarecidas, a espécie *C. coli* é comumente mais resistente a múltiplos antibióticos do que os isolados de *C. jejuni* (D'Lima *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2011).

1.6. Métodos de tipagem de *Campylobacter*

A caracterização de isolados patogênicos desempenha um papel fundamental na epidemiologia de doenças infecciosas, gerando as informações necessárias para a identificação, rastreamento e intervenção em surtos de doenças (Urwin; Maiden, 2003). A habilidade de metodologias em discriminar linhagens de uma mesma espécie tem aumentado e com isso tem crescido a compreensão a respeito da transmissão, patogênese e filogenia de muitas espécies bacterianas (Foxman *et al.*, 2005).

Os métodos tradicionais de tipagem bacteriana são baseados em características fenotípicas, como sorotipo, biotipo, fagotipo e susceptibilidade a antimicrobianos, entre outros. Entretanto, tais métodos de tipagem são, muitas vezes, limitados por sua baixa capacidade de diferenciação entre linhagens de uma determinada espécie e também por sua baixa reprodutibilidade (Olive; Bean, 1999). Dessa maneira, métodos genotípicos têm sido cada vez mais utilizados na identificação, caracterização e estudos epidemiológicos e taxonômicos bacterianos complementando os métodos convencionais baseados em características fenotípicas e auxiliando na compreensão da estrutura genômica de diferentes patógenos (Cooper; Feil, 2004).

O sucesso da implementação de um método de tipagem molecular depende do seu poder discriminatório, que mede a capacidade de um método em atribuir um padrão molecular específico para um isolado, a proporção de linhagens distintas designadas por um método e a reprodutibilidade do método (Hunter, 1990; Maslow *et al.*, 1993). A concordância epidemiológica, ou seja, a similaridade entre o agrupamento de determinadas linhagens por

um determinado método, as informações epidemiológicas disponíveis para essas linhagens, e a possibilidade de automação para que se tenha um elevado rendimento também são considerações importantes (van Belkum *et al.*, 2007)

Vários métodos de tipagem molecular, tais como *pulsed field gel electrophoresis* (PFGE), sequenciamento da pequena região variável (*short variable region, SVR*) do gene *flaA*, *clustered, regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR), *high resolution melting analysis* (HRMA), *multilocus sequence typing* (MLST) entre outros, têm sido utilizados nos estudos epidemiológicos e na caracterização da diversidade genotípica de bactérias do gênero *Campylobacter* (Price *et al.*, 2007; Aquino *et al.*, 2010; Ahmed *et al.*, 2012; Wieczorek *et al.*, 2013).

1.6.1. *Pulsed field gel electrophoresis* (PFGE)

A técnica de PFGE foi descrita pela primeira vez em 1984 por Schwartz e Cantor como uma ferramenta para estudar o DNA cromossômico de organismos eucariotos. É considerada a técnica de escolha para a tipagem de patógenos causadores de doenças de origem alimentar em investigações epidemiológicas. E tem se mostrado um método de genotipagem altamente eficaz (Tenover *et al.*, 1997) e com um bom poder discriminatório sendo utilizado com sucesso em estudos epidemiológicos de vários patógenos, dentre eles, o *Campylobacter coli* (Fitzgerald *et al.*, 2001; Ribot *et al.*, 2001; Karenlampi *et al.*, 2007; Ragimbeau *et al.*, 2008; Behringer *et al.*, 2011; Melero *et al.*, 2012; Wieczorek *et al.*, 2013).

Esta técnica baseia-se na construção de *plugs* de agarose a partir de uma suspensão bacteriana. Posteriormente, a bactéria inteira que se encontra embebida no *plug* é lisada através do uso de detergentes e proteinase K, obtendo-se assim, o DNA bacteriano livre, que é então digerido com uma enzima de restrição que possui poucos sítios de reconhecimento gerando um perfil com aproximadamente 10 a 30 fragmentos de restrição que variam de 10 a 800 Kb em tamanho. De maneira geral, todos esses fragmentos podem ser separados em um padrão de bandas distintas por PFGE quando submetidos a uma corrente elétrica em diferentes ângulos pré-determinados por curtos períodos de tempo (pulsos). Nessa técnica a corrente elétrica é aplicada, primeiramente, em uma direção a partir de um conjunto de eletrodos, em seguida, a corrente migra para um segundo conjunto de eletrodos por um curto período de tempo e então, migra para um terceiro conjunto de eletrodos. Assim, o DNA migra de forma serpentina através do gel e os fragmentos gerados pela digestão da enzima são separados com eficiência (Tenover *et al.*, 1997).

A análise do padrão de bandas das diferentes linhagens é realizado por *softwares* especializados que comparam as linhagens estabelecendo a similaridade genômica entre elas (Singh *et al.*, 2006).

Assim, o PFGE é uma das técnicas de tipagem molecular que possui um grande poder discriminatório e vem sendo aplicada com sucesso na tipagem de uma quantidade numerosa de espécies bacterianas, incluindo linhagens de *Campylobacter coli* e *Campylobacter jejuni*, isoladas no Brasil e em outros locais do mundo (Tenover *et al.*, 1997; Ribot *et al.*, 2001; Denis *et al.*, 2008; Goering, 2010; O’Leary *et al.*, 2011; Abley *et al.*, 2012; Wieczorek *et al.*, 2013).

1.6.2. Sequenciamento da pequena região variável (*short variable region*, SVR) do gene *flaA*

O sequenciamento de genes específicos tem se mostrado altamente eficiente no estudo da variabilidade genética das espécies bacterianas. No que se refere ao gênero *Campylobacter*, o sequenciamento da pequena região variável (*short variable region*, SVR) do gene *flaA* é comumente utilizado para tipagem de linhagens isoladas de diversas origens e vários estudos mostram que esta metodologia vem sendo utilizada com sucesso para tal finalidade (Meinersmann *et al.*, 1997; Ragimbeau *et al.*, 2008; Schweitzer *et al.*, 2011; Giacomelli *et al.*, 2012).

O flagelo das espécies de *Campylobacter* tem sido considerado um importante fator de virulência devido ao alto poder imunogênico da proteína flagelina e por desempenhar um importante papel na secreção de fatores de virulência (Konkel *et al.*, 2004). O *locus* do gene que codifica a flagelina é composto por dois genes, *flaA* e *flaB*, os quais estão dispostos em *tandem* dentro do genoma de *Campylobacter* e suas sequências são 95% homólogas. Ambos os genes possuem aproximadamente 1730 pb e estão separados por uma região intergênica de aproximadamente 200 pb altamente variável (Nuijten *et al.*, 1990; Wassenaar; Newell, 2000). Enquanto a expressão do gene *flaA* parece ser extremamente importante para o processo de colonização, mutações no gene *flaB* refletem em uma pequena diferença nos processos de motilidade e colonização (Wassenaar *et al.*, 1991; Guerry, 2007). Dessa maneira, o sequenciamento da SVR do gene *flaA* tem sido descrito como uma metodologia simples e altamente reprodutível, sendo amplamente utilizada em estudos de caracterização molecular de espécies de *Campylobacter* (Meinersmann *et al.*, 1997). Ademais, a utilização dessa técnica torna possível a comparação das linhagens estudadas com outras linhagens isoladas no

mundo todo, através dos genótipos presentes no banco de dados disponível *online*: <http://pubmlst.org/campylobacter/flaA/>.

Torna-se importante salientar que, até o momento não existem estudos publicados, realizados no Brasil, que utilizaram essa metodologia para comparar linhagens isoladas de diferentes fontes e ao longo de vários anos.

1.6.3. Análise do *locus* CRISPR por HRMA

A análise da hipervariação do *locus* CRISPR (*clustered, regularly interspaced short palindromic repeats*) de *Campylobacter* spp. através da técnica de HRMA (*high resolution melting analysis*) foi uma metodologia recentemente desenvolvida por Price e colaboradores (2007). O sistema CRISPR é formado por sequências repetidas contendo de 23 a 47 pb separadas por espaçadores de tamanho similar. Os espaçadores são porções de ácidos nucleicos não pertencentes à célula bacteriana, como por exemplo, DNA de fagos ou até mesmo de plasmídeos. Tais elementos podem proteger a bactéria contra elementos genéticos móveis, em particular os bacteriófagos, plasmídeos e transposons (Sorek *et al.*, 2008; Garneau *et al.*, 2010; Bikard *et al.*, 2012). Devido ao alto polimorfismo característico das sequências CRISPRs, as mesmas vêm sendo utilizadas com sucesso para subtipar linhagens de *Mycobacterium tuberculosis* (Groenen *et al.*, 1993), *Yersinia pestis* (Pourcel *et al.*, 2005), *Salmonella enterica* de diversas sorovariedades (Wehnes *et al.*, 2014), *Campylobacter jejuni* (Schouls *et al.*, 2003; Kovanen *et al.*, 2014), entre outros.

O HRMA consiste em uma técnica pós-reação de polimerase em cadeia (PCR), que detecta a variação da sequência de nucleotídeos no *locus* específico através da análise dos perfis das temperaturas de *melting* (Levesque *et al.*, 2011). É considerado o método mais simples para genotipagem e determinação de mutações, pois não são necessárias separações ou processamento de amostras posteriormente a PCR. Após a amplificação por PCR, as curvas de *melting* são geradas por monitoramento da fluorescência de um corante (*dye*) intercalante de dupla-fita de DNA que não inibe a PCR quando usado em uma alta concentração garantindo, dessa maneira, uma completa intercalação aos *amplicons* gerados (Reed *et al.*, 2007; Hofinger *et al.*, 2009). O *dye* possui alta fluorescência quando ligado às moléculas de DNA e baixa fluorescência quando não ligado. A amplificação é seguida pela etapa de desnaturação térmica do produto da PCR. Nesse momento, as moléculas do agente intercalante de DNA são liberadas levando a mudanças na fluorescência. O resultado é um perfil de *melting* característico de cada *amplicon* (Ruskova; Raclavsky, 2011).

Assim, a análise do *locus* CRISPR por HRMA pode ter um alto poder discriminatório entre as linhagens, uma vez que as sequências CRISPRs são altamente variáveis (Price *et al.*, 2007; Merchant-Patel *et al.*, 2010). Ademais, a eficiência de tal metodologia foi utilizada com sucesso na tipagem de *Campylobacter jejuni* (Price *et al.*, 2007). Entretanto, a adequação da metodologia para a tipagem de *Campylobacter coli* ainda não foi avaliada.

1.6.4. Multilocus sequence typing (MLST)

A metodologia do MLST foi proposta por Maiden e colaboradores como uma metodologia capaz de superar os problemas de reprodutibilidade inter-laboratoriais e a grande dificuldade de se analisar as relações genéticas entre isolados de diferentes locais do mundo em laboratórios distintos (Maiden *et al.*, 1998).

Essa metodologia baseia-se no sequenciamento de alguns genes essenciais ou de manutenção, denominados genes *housekeeping*. Após o sequenciamento, as sequências são depositadas em um banco de dados *online* sendo cada sequência correspondente a um alelo. Sequências distintas são caracterizadas como diferentes alelos e recebem, arbitrariamente, um número de identificação. O conjunto de alelos de cada amostra bacteriana dá origem ao *sequence typing* (ST) que é utilizado em análises filogenéticas, populacionais e evolucionárias (Maiden *et al.*, 1998; Urwin; Maiden, 2003).

O MLST possui a vantagem de ser altamente reprodutível além do fato de que seus resultados podem ser disponibilizados em bancos de dados *online*, o que possibilita a análise comparativa da diversidade genética de bactérias isoladas em diferentes regiões do mundo (Maiden *et al.*, 1998).

Para as espécies de *Campylobacter*, especialmente, *Campylobacter jejuni*, a padronização dessa técnica foi realizada por Dingle e colaboradores no ano de 2001. Desde então, essa técnica vem sendo utilizada com êxito na subtipagem de linhagens de *Campylobacter* spp., sendo considerada, atualmente, o método de tipagem “padrão ouro” para esse gênero (Dingle *et al.*, 2001; Schouls *et al.*, 2003; Ragimbeau *et al.*, 2008; Asakura *et al.*, 2012; Duarte *et al.*, 2014).

1.7. Epidemiologia

Zoonoses transmitidas por alimentos são uma importante causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que mais de

dois milhões de pessoas morrem a cada ano de doenças diarreicas causadas principalmente pela ingestão de alimentos contaminados (WHO, 2005; EFSA, 2007).

A campilobacteriose é uma zoonose de distribuição mundial com repercussões significativas no nível da Saúde Pública e com um elevado impacto socioeconômico (CDC, 2015). De acordo com a *European Food Safety Authority* (EFSA, 2009) esta doença tem adquirido uma crescente importância a partir do início dos anos 2000, sendo mais frequentemente reportada do que a salmonelose.

Recentemente, a *European Food Safety Authority* (EFSA, 2015) descreveu os possíveis fatores que influenciam a ocorrência das infecções por *Campylobacter* sendo eles: a idade, com predominância em crianças menores de 5 anos de idade; a temporada, uma vez que, um número mais elevado de casos de campilobacteriose é relatado durante os meses de verão; a linhagem infectante, pois algumas estirpes são menos patogênicas do que outras e a imunidade do hospedeiro.

Segundo dados do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, 2015) dos Estados Unidos, bactérias do gênero *Campylobacter* são a principal causa de gastroenterite em humanos no país, afetando cerca de 2,4 milhões de pessoas a cada ano. Da mesma maneira, a União Europeia estima que ocorram cerca de nove milhões de casos ao ano, apesar de apenas 200.000 casos serem reportados. O custo da campilobacteriose na Europa devido à perda de produtividade e gastos com o sistema de Saúde Pública é estimado em torno de 2,4 bilhões de euros por ano (EFSA, 2015).

No Japão, o *Campylobacter* é uma das causas mais comuns de gastroenterite em humanos, da mesma maneira no Canadá estima-se a ocorrência de mais de 600 mil casos ao ano (Thomas *et al.*, 2006). Na Austrália, a estimativa é de que ocorram mais de 200.000 casos anualmente (Stafford *et al.*, 2008) e os gastos com infecções entéricas excedem 1,2 bilhões de dólares anualmente (Abelson *et al.*, 2006).

A significativa diferença entre o número de casos reportados e a estimativa da ocorrência de infecções por bactérias do gênero *Campylobacter*, principalmente as espécies *C. coli* e *C. jejuni*, se justifica pelo difícil reconhecimento do patógeno nas doenças gastrointestinais, devido às exigências nutricionais e atmosféricas de crescimento. Além disso, a infecção por esse patógeno não é de notificação obrigatória em muitos países incluindo o Brasil (Jore *et al.*, 2010; Havelaar *et al.*, 2013; EFSA, 2015).

No Brasil, assim como em muitos países em desenvolvimento, o isolamento e o estudo de *Campylobacter*, especialmente *C. coli*, não são muito frequentes, além de pontuais e

dispersos pelo país, o que dificulta avaliar a dimensão do envolvimento dessa bactéria como causadora de doença nos seres humanos e em animais, bem como, determinar o impacto de sua presença em alimentos e no meio ambiente (Scarcelli *et al.*, 2005; Franchin *et al.*, 2007; Aquino *et al.*, 2010; Blasi *et al.*, 2011).

Relevância do estudo

2. RELEVÂNCIA DO ESTUDO

O *Campylobacter* é a causa mais comum de doença bacteriana veiculada por alimento na Europa, Estados Unidos e alguns outros locais do mundo (Stafford *et al.*, 2008; EFSA, 2015; CDC, 2015) representando um enorme desafio para a saúde e um elevado impacto socioeconômico. Entretanto, reconhecimento do patógeno nas doenças gastrointestinais é dificultado tanto pelas condições de crescimento do microrganismo como pela subnotificação da doença (Jore *et al.*, 2010; Havelaar *et al.*, 2013; EFSA, 2015).

Especificamente, 1 a 25% de todas as doenças causadas por bactérias do gênero *Campylobacter* são atribuídas a espécie *C. coli* (Friedman *et al.*, 2004; Gurtler *et al.*, 2005). Além disso, dados da literatura reportam *C. coli* como a causa de diversas manifestações extra-gastrointestinais tais como bacteremia, sepse, meningite, aborto, dentre outras (Blaser *et al.*, 1986; Selander, 1993; Man, 2011).

No Brasil, o isolamento e o estudo de *C. coli* não são muito frequentes, o que dificulta avaliar a dimensão do envolvimento dessa bactéria como causadora de doença nos seres humanos e em animais, bem como, determinar o impacto de sua presença em alimentos e no meio ambiente (Scarcelli *et al.*, 2005; Franchin *et al.*, 2007; Aquino *et al.*, 2010; Biasi *et al.*, 2011).

Estudos publicados realizados no Brasil utilizaram, em sua maioria, técnicas fenotípicas com enfoque no isolamento e na ocorrência de *C. coli*. (Gomes *et al.*, 2006; Franchin *et al.*, 2010). Assim, há uma escassez de estudos que utilizaram técnicas moleculares para tipar linhagens de *C. coli* em nosso país (Scarcelli *et al.*, 2005; Aquino *et al.*, 2010). Dessa maneira, estudos que caracterizem molecularmente linhagens de *C. coli*, isoladas de humanos, animais, ambiente e alimentos ao longo de vários anos no Brasil são inéditos e de grande importância pois permitirão uma melhor caracterização das linhagens de *C. coli* circulantes no país além de possibilitarem a comparação dessas linhagens estudadas entre si e com outras linhagens isoladas no mundo todo.

Assim, a investigação da presença de importantes genes relacionados à virulência por PCR, análise da susceptibilidade a antimicrobianos e avaliação da similaridade genotípica entre as linhagens de *C. coli* de diversas fontes através das técnicas moleculares de PFGE, sequenciamento da pequena região variável (*short variable region*, SVR) do gene *flaA*, análise das sequências CRISPR por HRMA e MLST poderão ajudar no entendimento da diversidade genotípica e do potencial patogênico e fornecerão importantes informações sobre o perfil de sensibilidade a antimicrobianos das linhagens estudadas.

Objetivos

“O mais importante de tudo é nunca deixar de se perguntar. A curiosidade tem sua própria razão de existir.” (Albert Einstein)

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Caracterizar molecularmente linhagens de *Campylobacter coli* isoladas de humanos, animal, alimentos e ambiente no Brasil pela pesquisa de genes relacionados à virulência por PCR, perfil de sensibilidade a antimicrobianos e análise da similaridade genotípica por métodos de tipagem molecular.

3.2. Objetivos específicos

- Investigar o potencial patogênico das linhagens, de diversas origens estudadas, pela pesquisa dos genes *flaA*, *flhA*, *cadF*, *docA*, *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*, *ciaB*, *iamA*, *wlaN*, *virB11*, *racR*, *dnaJ*, *pldA*, *sodB* e *crsA* por PCR;
- Determinar a susceptibilidade das linhagens de *C. coli* estudadas frente aos antibióticos eritromicina, ciprofloxacina, tetraciclina e doxaciclina por Etest®;
- Analisar a diversidade genotípica entre as linhagens de *C. coli* estudadas por PFGE, comparando os isolados de humanos, animal, ambiente e alimentos;
- Analisar a diversidade genotípica das linhagens de *C. coli* estudadas pelo sequenciamento da pequena região variável (*short variable region*, SVR) do gene *flaA*, comparando os isolados de humanos, animal, ambiente e alimentos entre si e com outras linhagens isoladas em diferentes locais do mundo através dos genótipos presentes no banco de dados;
- Analisar a diversidade genotípica de linhagens de *C. coli* estudadas pela análise do *locus* CRISPR por HRMA, comparando os isolados de humanos, animal, ambiente e alimentos;
- Analisar a diversidade genotípica de linhagens de *C. coli* estudadas por MLST, comparando os isolados de humanos, animal, ambiente e alimentos no Brasil, entre si, e com outras linhagens isoladas em diferentes locais do mundo;
- Avaliar o poder discriminatório dos métodos utilizados.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Linhagens bacterianas

Foram estudadas 63 linhagens de *Campylobacter coli* provenientes da coleção de *Campylobacter* da Fiocruz-RJ (CCAMP) e do Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto isoladas de humanos (12), animais (21), alimentos (10) e ambiente (20) da região metropolitana do Rio de Janeiro-RJ, região metropolitana de Belo Horizonte- MG e região metropolitana de Ribeirão Preto – SP, no período de 1995 a 2011 (Tabela 2).

Essas linhagens foram selecionadas a partir de coleções microbiológicas cujos acervos são compostos por linhagens de *Campylobacter* spp. originárias de diferentes fontes, locais e anos, de modo a garantir que não haja mais de um isolado bacteriano por amostra. Todas as linhagens foram cultivadas, caracterizadas e estocadas por equipes especializadas de cada uma dessas instituições e após a transferência foram armazenados em freezer -80°C.

As linhagens *Campylobacter jejuni subsp. jejuni* ATCC 33291 e *Campylobacter coli* WHOC 7.2, cedidas pelo Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto, foram utilizadas como controle positivo na reconfirmação da espécie e na pesquisa dos genes relacionados à virulência por PCR.

A Tabela 2 traz de forma mais detalhada as características das 63 linhagens de *C. coli* utilizadas nesse estudo.

Tabela 2. Características das 63 linhagens de *C. coli* estudadas.

Linhagem	Ano de Isolamento	Origem	Material	Estado de Isolamento
CCAMP 840	1995	Ambiente	Esgoto	RJ
CCAMP 771*	1995	Ambiente	Esgoto	RJ
CCAMP 773	1995	Ambiente	Esgoto	RJ
CCAMP 820	1995	Animal	Fezes não diarreicas	RJ
CCAMP 821	1995	Animal	Fezes não diarreicas	RJ
CCAMP 774	1996	Ambiente	Esgoto	RJ
CCAMP 769	1996	Ambiente	Esgoto	RJ
CCAMP 787	1996	Ambiente	Esgoto	RJ
CCAMP 819	1996	Ambiente	Esgoto	RJ
CCAMP 764	1996	Ambiente	Esgoto	RJ
CCAMP 765	1996	Ambiente	Esgoto	RJ
CCAMP 761	1996	Ambiente	Esgoto	RJ
CCAMP 767	1996	Ambiente	Esgoto	RJ
CCAMP 825	1996	Animal	Fezes não diarreicas	RJ

Continua

Linhagem	Ano de Isolamento	Origem	Material	Continuação
				Estado de Isolamento
CCAMP 768	1996	Animal	Fezes não diarreicas	RJ
CCAMP 625	1996	Animal	Fezes não diarreicas	RJ
CCAMP 775	1997	Ambiente	Esgoto	RJ
CCAMP 818*	1997	Ambiente	Esgoto	RJ
CCAMP 791*	1997	Animal	Fezes não diarreicas	RJ
CCAMP 490	1998	Humana	Fezes diarreicas	RJ
CCAMP 494*	1998	Humana	Fezes diarreicas	RJ
CCAMP 495	1998	Humana	Fezes diarreicas	RJ
CCAMP 841	1998	Animal	Fezes não diarreicas	RJ
CCAMP 975	1999	Animal	Fezes não diarreicas	RJ
CCAMP 988	1999	Animal	Fezes não diarreicas	RJ
CCAMP 498	1999	Humana	Fezes diarreicas	RJ
CCAMP 502*	1999	Humana	Fezes diarreicas	RJ
CCAMP 834	2000	Ambiente	Água de Bebedouro	RJ
CCAMP 726	2000	Animal	Fezes não diarreicas	RJ
CCAMP 503	2000	Humana	Fezes diarreicas	RJ
CCAMP 595	2001	Humana	Fezes diarreicas	RJ
Cc 01*	2002	Humana	Fezes diarreicas	SP
CCAMP 667	2002	Animal	Fezes não diarreicas	RJ
Cc 04	2003	Humana	Fezes diarreicas	SP
Cc 05	2003	Humana	Fezes diarreicas	SP
Cc 10*	2003	Humana	Fezes diarreicas	SP
Cc 03*	2003	Humana	Fezes diarreicas	SP
CCAMP 73	2003	Animal	Fezes não diarreicas	RJ
CCAMP 182*	2003	Animal	Fezes não diarreicas	RJ
CCAMP 165*	2003	Animal	Fezes não diarreicas	RJ
CCAMP 170	2003	Animal	Fezes não diarreicas	RJ
CCAMP 464	2004	Ambiente	Água	MG
CCAMP 465	2004	Ambiente	Água	MG
CCAMP 466	2004	Ambiente	Água	MG
CCAMP 467	2004	Ambiente	Água	MG
CCAMP 469*	2004	Ambiente	Água	MG
CCAMP 394*	2004	Animal	Fezes não diarreicas	RJ
CCAMP 446*	2004	Animal	Fezes não diarreicas	RJ
CCAMP 463*	2004	Ambiente	Bebedouro de aves	MG
CCAMP 392	2007	Animal	Fezes não diarreicas	RJ
CCAMP 1010*	2007	Animal	Fezes não diarreicas	RJ

Continua

Linhagem	Ano de Isolamento	Origem	Material	Conclusão
				Estado de Isolamento
CCAMP 1000*	2007	Animal	Fezes não diarreicas	RJ
CCAMP 1117	2009	Animal	Fezes não diarreicas	RJ
CCAMP 1062*	2010	Alimento	Cortes de frango (asa)	RJ
CCAMP 1064*	2010	Alimento	Cortes de frango (asa)	RJ
CCAMP 1063*	2010	Alimento	Cortes de frango (moela)	RJ
CCAMP 1066	2010	Alimento	Cortes de frango (fígado)	RJ
CCAMP 1067*	2010	Alimento	Cortes de frango (fígado)	RJ
CCAMP1068	2010	Alimento	Cortes de frango (asa)	RJ
CCAMP 1071	2011	Alimento	Cortes de frango (asa)	RJ
CCAMP 1073	2011	Alimento	Cortes de frango (asa)	RJ
CCAMP 1074	2011	Alimento	Cortes de frango (moela)	RJ
CCAMP 1075	2011	Alimento	Cortes de frango (fígado)	RJ

* Linhagens tipadas por MLST (item 4.11)

4.2. Verificação da pureza

A verificação da pureza foi realizada para as 63 linhagens de *C. coli* listadas na Tabela 2, conforme descrito a seguir.

As linhagens foram cultivadas em meio BBL™ Agar Base Columbia (BD) suplementado com 0,4% (m/v) de carvão ativado (Neon) e 5% (m/v) de solução redutora de oxigênio FBP (0,05% de sulfato ferroso (Labsynth), 0,05% de piruvato de sódio (Vetec) e 0,05% de metabisulfito de sódio (Lasynth) diluído em água estéril). Após a semeadura, as culturas foram incubadas por 24 horas, a 42°C em jarra sob condições de microaerofilia, que foi obtida através da técnica de passivação do cobre descrita por Filgueiras e Hofer (1989), com modificações. Para uma jarra de 3,5 L foi utilizada 1 pastilha de carbonato de cálcio (Sonrisal®) triturada, 10g de esponja de aço (Bombril®) embebida em 100 mL de solução acidulada de cobre [(Sulfato de cobre II P.A (Vetec), Ácido sulfúrico P. A. (Pro- Analysis) e Tween 80 (Merck) diluído em água destilada)]. A mistura foi colocada em um recipiente e inserida na jarra imediatamente, e esta vedada para que os níveis gasosos atingissem as proporções desejáveis.

4.3. Extração e verificação da pureza do DNA genômico

O DNA genômico bacteriano foi extraído de todas as 63 linhagens de *Campylobacter coli* listadas na Tabela 2, e das duas linhagens de referência descritas no item 4.1 segundo

protocolo descrito por Campioni e Falcao (2014), com algumas modificações, e utilizado nos experimentos de reconfirmação da espécie por PCR, pesquisa dos genes relacionados à virulência por PCR, sequenciamento da pequena região variável (SVR) do gene *flaA*, análise do *locus* CRISPR por HRMA e MLST.

As linhagens foram crescidas em ágar Columbia suplementado com carvão ativado e FBP a 42°C por 24 horas em microaerofilia. O crescimento foi adicionado a 250 µL de solução I (20% de sacarose, 50mM Tris-HCl pH 8,0 e 50mM EDTA) a 4°C. Após 10 minutos de incubação no gelo, as células foram lisadas com 500 µL de solução II (50mM NaCl, 1% sarcosil) adicionados de 0,05 mg/mL de proteinase K e incubadas em banho de água a 37°C por 2 horas.

Posteriormente, as linhagens foram submetidas à purificação do DNA genômico com 750 µL de uma mistura de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugadas a 14000 rpm por 10 minutos, em centrífuga 5810 R da marca Eppendorf. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo plástico cônico de 2,0 mL e a este foi adicionado 750 µL de uma solução de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), e em seguida centrifugado a 14000 rpm por 10 minutos em centrífuga 5810 R da marca Eppendorf. O sobrenadante foi coletado e novamente transferido para um novo tubo plástico cônico de 2,0 mL e a este foi adicionado 1 mL de etanol a 4°C e mantido em gelo *overnight*.

Após 18 horas, o DNA foi sedimentado por centrifugação a 4°C e 14000 rpm durante 60 minutos em centrífuga 5810 R da marca Eppendorf. O sobrenadante foi cuidadosamente desprezado e o sedimento seco a vácuo em *Speed Vac* (Concentrator 5301, Eppendorf) e posteriormente, suspenso em 400 µL de água destilada ultra pura livre de DNase e RNase (Invitrogen). Aos 400 µL de suspensão de DNA, foram adicionados 2 µL de RNase 50 µg/mL e incubados em banho de água a 37°C por 1 hora.

A integridade do DNA extraído foi avaliada em eletroforese horizontal em gel de agarose 0,8% preparado com TAE (Tris Acetato EDTA) 1X. A 5 µL do DNA extraído foram adicionados 3 µL de solução de azul de bromofenol (40% de sacarose, 0,25% de azul de bromofenol e água destilada q.s.p.). A eletroforese foi conduzida a 80 volts por 90 minutos. O gel foi corado com solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por 30 minutos, observado em transluminador ultravioleta (Gel Doc XR, Bio-Rad) e registrado em *software* fotográfico (Quantity One 4.6.1, Bio-Rad).

A concentração e a pureza do DNA genômico extraído foram analisadas no espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®) com comprimentos de onda em 260

nm e 280 nm. Foram consideradas como boas as extrações de pureza $> 1,8$ ($A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$), uma vez que esses valores demonstram que a amostra de DNA está com baixo nível de impurezas. Para amostras acima ou abaixo desses valores, uma nova extração do DNA genômico foi realizada.

4.4. Reconfirmação da espécie por PCR

A reconfirmação da espécie foi realizada para todas as 63 linhagens de *C. coli* descritas na Tabela 2 através de uma Multiplex PCR conforme descrito por Denis *et al.* (2001). Os DNAs genômicos foram extraídos e quantificados conforme descrito no item 4.3. Os genes utilizados para a identificação do gênero *Campylobacter*, *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* foram: o gene 16S rRNA (Linton *et al.*, 1997), o gene *mapA* (Stucki *et al.*, 1995) e o gene *ceuE* (Gonzalez *et al.*, 1997), respectivamente.

As sequências dos três pares de *primers* utilizados, para a amplificação dos genes, estão descritas na Tabela 3.

A reação de PCR foi realizada utilizando reagentes para o volume final de 20 μL descritos mais detalhadamente na Tabela 4 e as condições utilizadas para a PCR foram as previamente descritas por Denis *et al.* (1999).

Tabela 3. *Primers* utilizados na PCR para amplificação dos genes 16S rRNA, *mapA* e *ceuE* e tamanho dos produtos de amplificação gerados.

Genes	<i>Primers</i>	Sequência dos <i>primers</i> (5' – 3')	<i>Amplicon</i> (pb)
16S rRNA	MD16S1	ATC TAA TGG CTT AAC CAT TAA AC	857
	MD16S2	GGA CGG TAA CTA GTT TAG TAT T	
<i>mapA</i>	MDmapA1	CTA TTT TAT TTT TGA GTG CTT GTG	589
	MDmapA2	GCT TTA TTT GCC ATT TGT TTT ATT A	
<i>ceuE</i>	COL3	AAT TGA AAA TTG CTC CAA CTA TG	462
	MDCOL2	TGA TTT TAT TAT TTG TAG CAG CG	

Tabela 4. Descrição dos reagentes utilizados na reconfirmação da espécie por PCR.

Componentes	Volume (µL)	Concentração Final
10x Tampão “PCR Buffer” ^a	2	1X
10mM “dNTP Mixture” ^a	0,4	0,2Mm de cada dNTP
<i>Primer forward</i> MD16S1 ^b	1	25pmol
<i>Primer reverse</i> MD16S2 ^b	1	25pmol
<i>Primer forward</i> MDmapA1 ^b	1	25pmol
<i>Primer reverse</i> MDmapA2 ^b	1	25pmol
<i>Primer forward</i> COL3 ^b	1	25pmol
<i>Primer reverse</i> MDCOL2 ^b	1	25pmol
50mM MgCl ₂ ^a	1,6	2mM
DNA genômico (10ng/µL)	2	20ng
Taq DNA Polimerase ^a 5U	0,4	1U
H ₂ O destilada ultra pura livre de DNase e RNase ^a	q.s.p. 20	

^a Produto da Life Technologies ^b Produto da Integrated DNA Technologies (IDT)

Reações sem a adição do DNA genômico foram utilizadas como branco, as linhagens *Campylobacter jejuni subsp. jejuni* ATCC 33291 e *Campylobacter coli* WHOC 7.2 foram utilizadas como controle positivo e uma linhagem de *Yersinia* spp. foi utilizada como controle negativo. O termociclador DNAEngine® Peltier Thermal Cycler (Bio- Rad) foi utilizado para a realização dos experimentos.

Inicialmente o DNA genômico foi desnaturado por aquecimento a 95°C por 10 minutos, seguido de 35 ciclos constituídos de:

- Separação das fitas de DNA: 95°C por 30 segundos.
- Hibridização dos *primers*: 59°C por 1minuto e 30 segundos.
- Extensão: 72°C por 1minuto.

Após os 35 ciclos, foi realizada uma etapa de extensão final a 72°C por 10 minutos.

O produto amplificado foi visualizado em gel de agarose 1,5% preparado em tampão TAE 1X. O marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder - Invitrogen foi aplicado ao gel e a eletroforese foi conduzida a 80 volts por 90 minutos. Após a eletroforese, os géis foram corados em solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por 30 minutos, visualizados em transluminador ultravioleta (Gel Doc XR, Bio-Rad) e registrados em *software* fotográfico (Quantity One 4.6.1, Bio-Rad).

4.5. Armazenamento das linhagens bacterianas

Após a verificação da pureza e realização da PCR para a reconfirmação da espécie, as 63 linhagens de *C. coli* foram ressemeadas em ágar Base Columbia suplementado com carvão ativado e FBP para posterior estocagem.

Após a incubação por 24 horas a 42°C em condições de microaerofilia, uma quantidade de bactéria suficiente para turvar 1,5 mL de meio para a criopreservação das linhagens foi adicionada ao tubo de crioestoque, homogeneizada em aparelho Vortex e levada ao freezer -80°C o mais rápido possível.

As linhagens foram criopreservadas em água peptonada e glicerol (Anexo I). Quando necessário, alíquotas das culturas armazenadas a -80°C foram semeadas em ágar Base Columbia suplementado com carvão ativado e FBP.

4.6. Pesquisa dos genes relacionados à virulência por PCR

A pesquisa dos genes relacionados à virulência por PCR foi realizada para as 63 linhagens de *C. coli* listadas na Tabela 2. Os DNAs genômicos utilizados na PCR foram extraídos e quantificados conforme descrito no item 4.3. A PCR foi realizada utilizando reagentes para o volume final de 20 µL. A Tabela 5 traz de forma detalhada os reagentes utilizados para a amplificação dos genes relacionados à virulência.

Tabela 5. Descrição dos reagentes utilizados na pesquisa dos genes relacionados à virulência por PCR.

Componentes	Volume (µL)	Concentração Final
10X Tampão “PCR Buffer” ^a	2	1X
10mM “dNTP Mixture” ^a	0,4	0,2 mM de cada dNTP
Primer forward ^b	1	25 pmol
Primer reverse ^b	1	25 pmol
50mM MgCl ₂ ^a	1,6	2 mM
DNA Genômico (10ng/µL)	2	20 ng
Taq DNA Polimerase ^a 5U	0,4	1U
H ₂ O destilada ultra pura livre de DNase e RNase ^a	q.s.p. 20	

^a Produto da Life Technologies ^b Produto da Integrated DNA Technologies (IDT)

Os genes pesquisados foram: *flaA* (Wassenaar; Newell, 2000), *flhA*, *iamA*, *docA* (Muller *et al.*, 2006), *ciaB* (Rivera-Amill *et al.*, 2001), *cdtA* (Hichey *et al.*, 2000), *cdtB*, *cdtC*, *virB11*, *racR* *dnaJ*, *pldA*, (Datta *et al.*, 2003), *cadF* (Konkel *et al.*, 1999), *wlaN* (Wassenaar *et*

al.,2002), *sodB* (Biswas *et al.*,2011) e *crsA* (Fields; Thompson, 2008), cujas sequências dos *primers* utilizados estão na Tabela 6.

Tabela 6. *Primers* utilizados na PCR para a amplificação dos genes relacionados à virulência estudados, tamanho dos produtos de amplificação gerados e temperatura de hibridação.

Genes	<i>Primers</i>	Sequência dos <i>primers</i> (5' - 3')	<i>Amplicon</i> (pb)	Temp. (°C) Hibridação
<i>flaA</i>	FlaA1 FlaA2	ATG GGA TTT CGT ATT AAC AC CTG TAG TAA TCT TAA AAC ATT TTG	1713	45
<i>flhA</i>	CinvA22 CinvA3	GGA AGC GGC ACT TGG TTT GC GCT GTG AGT GAG ATT ATA GCA GC	735	54
<i>ciaB</i>	CiaB-F CiaB-R	TTT CCA AAT TTA GAT GAT GC GTT CTT TAA ATT TTT CAT AAT GC	1165	48
<i>iamA</i>	Cia3f Cia5r	GCA CAA AAT ATA TCA TTA CAA TTC ACG ACT ACT ATG AGG	518	52
<i>cdtA</i>	CDTAF CDTAR	CCT TGT GAT GCA AGC AAT C ACA CTC CAT TTG CTT TCT G	370	55
<i>cdtB</i>	CDTBF CDTBF	CAG AAA GCA AAT GGA GTG TT AGC TAA AAG CGG TGG AGT AT	620	55
<i>cdtC</i>	CDTCF CDTCR	CGA TGA GTT AAA ACA AAA AGA TA TTG GCA TTA TAG AAA ATA CAG TT	182	55
<i>cadF</i>	CadF-F2B CadF-R1B	TTG AAG GTA ATT TAG ATA TG CTA ATA CCT AAA GTT GAA AC	400	45
<i>docA</i>	docA1 docA2	ATA AGG TGC GGT TTT GGC GTC TTT GCA GTA GAT ATG	725	50
<i>wlaN</i>	Cj1139cF Cj1139cR	TGC TGG GTA TAC AAA GGT TGT G AAT TTT GGA TAT GGG TGG GG	330	60
<i>virB11</i>	VIRBF VIRBR	GAA CAG GAA GTG GAA AAA CTA GC TTCCGCATTGGGCTATATG	708	60
<i>racR</i>	racR-f racR-r	GAT GAT CCT GAC TTT G TCT CCT ATT TTT ACC C	584	45
<i>dnaJ</i>	dnaJ-f dnaJ-r	AAG GCT TTG GCT CAT C CTT TTT GTT CAT CGT T	720	46
<i>sodB</i>	sodB-f sodB-r	ATG ATA CCA ATG CTT TTG GTG ATT T TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC ATT TGC ATA AAA GCT AAC TGA TCC	638	50
<i>crsA</i>	csrAFW csrARV	CAC AGT CAG TGA AGG TGC TT ACT CGC ACA ATC GCT ACT TC	878	58
<i>pldA</i>	pldA-f pldA-r	AAG CTT ATG CGT TTT T TAT AAG GCT TTC TCC A	913	45

Reações sem a adição do DNA genômico foram utilizadas como branco, as linhagens *Campylobacter jejuni subsp. jejuni* ATCC 33291 e *Campylobacter coli* WHOC 7.2 foram utilizadas como controle positivo e o termociclador DNAEngine® Peltier Thermal Cycler (Bio- Rad) foi utilizado para a realização dos experimentos.

Inicialmente o DNA genômico foi desnaturado por aquecimento a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos constituídos de:

- Separação das fitas de DNA: 94°C por 45 segundos.
- Hibridização dos *primers*: X°C por 45 segundos.
- Extensão: 72°C por 1 minuto.

Após os 30 ciclos, foi realizada uma etapa de extensão final a 72°C por 15 minutos.

A temperatura X°C foi estabelecida de acordo com a temperatura de hibridação dos *primers* de cada um dos 16 genes pesquisados. O produto amplificado foi visualizado em gel de agarose 1,5% preparado em tampão TAE 1X. O marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder - Invitrogen foi aplicado ao gel e a eletroforese foi conduzida a 80 volts por 90 minutos. Após a eletroforese, os géis foram corados em solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por 30 minutos, visualizados em transluminador ultravioleta (Gel Doc XR, Bio-Rad) e registrados em *software* fotográfico (Quantity One 4.6.1, Bio-Rad).

4.7. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM foi realizada para as 63 linhagens de *C. coli* listadas na Tabela 2, de acordo com as normas e procedimentos do documento M45-A2, contido no CLSI 2010 (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), no qual estão presentes informações e critérios a serem usados para bactérias fastidiosas e isoladas com menor frequência. Após crescimento em ágar Columbia suplementado com carvão ativado e FBP a 42°C por 24 horas sob condições de microaerofilia, o crescimento bacteriano foi ressuspensionado em solução salina 0,8% até que a escala 0,5 de MacFarland fosse atingida. Utilizando um *swab* estéril, a suspensão bacteriana foi semeada, em placa de 145mm contendo ágar Muller-Hinton suplementado com 5% de sangue de carneiro (Biomerieux), em quatro campos sobrepostos de maneira a formar um “tapete bacteriano” homogêneo. O Etest® dos antibióticos eritromicina, ciprofloxacina, tetraciclina e doxaciclina, da marca Biomerieux, foram dispostos sobre a placa de maneira a permitir a posterior leitura dos halos. As placas foram incubadas em jarra, sob condições de microaerofilia por 24 horas a 42°C. A cepa padrão *Campylobacter jejuni* ATCC 33560 foi utilizada como controle de qualidade das fitas de Etest® utilizadas.

4.8. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)

4.8.1. Preparo das amostras

O ensaio de PFGE foi feito seguindo o protocolo do PulseNet para *Campylobacter jejuni* (Ribot *et al.*, 2001), com algumas modificações. Foi realizado para as 63 linhagens de *Campylobacter coli* listadas na Tabela 2.

As linhagens foram crescidas ágar base Columbia (BD) suplementado com carvão ativado e FBP, em jarra sob condições de microaerofilia, a 42°C por 24 horas. O crescimento bacteriano foi adicionado, utilizando um *swab* estéril, a 2,0 mL de PBS (0,01M, pH 7,4) até que atingisse uma D.O._{610nm} de 0,68 (faixa de 0,57 a 0,82). Em seguida, 200 µL dessa suspensão de células foram transferidos para um tubo plástico cônico de 2,0 mL e colocados em gelo para cessar o crescimento bacteriano.

Para a confecção dos *plugs* da *Salmonella* Thyphimurium ATCC 13311, utilizada como grupo externo e da *Salmonella* sorotipo Braenderup linhagem H9812, utilizada como marcador de peso molecular, as linhagens foram crescidas em caldo BHI (Oxoid) a 37°C por 24 horas. Em seguida foram semeadas em placas contendo ágar TSA (*tryptone soya agar*) da marca Himedia e incubadas a 37°C durante 24 horas. O crescimento bacteriano foi adicionado a 2,0 mL de PBS (0,01M, pH 7,4) até que atingisse uma D.O._{610nm} de 1,0 (faixa de 0,8 a 1,0). Em seguida, 200 µL dessa suspensão de células foram transferidos para um tubo plástico cônico de 2,0 mL e os passos descritos a seguir foram iguais para todas as linhagens. A cada tubo contendo a suspensão de células, foram adicionados 10 µL de proteinase K (20 mg/mL) e então os tubos foram colocados em banho seco a 60°C. Em seguida foram adicionados 200 µL de agarose 1% *Seakem Gold* (Lonza) em cada tubo e aproximadamente 70 µL da mistura foram transferidos para cada poço do molde apropriado para a confecção dos *plugs* de agarose.

Após a solidificação dos *plugs*, estes foram transferidos para tubos de prolipropileno de fundo cônico de 15 mL contendo 5 mL de tampão de lise celular (50 mM Tris; 50 mM EDTA pH 8,0; 1% Sarcosil) e 25 µL de proteinase K (20 mg/mL) e incubados em banho de água a 54°C por duas horas. Após isso, os tubos foram agitados em agitador por 30 minutos. Em seguida, o tampão de lise celular foi removido e os *plugs* foram lavados duas vezes com 10 mL de água MilliQ pré-aquecida a 54°C por 15 minutos em cada lavagem. Posteriormente às lavagens com água MilliQ, os *plugs* foram lavados quatro vezes com 10 mL de tampão de lavagem TE (10 mM Tris; 1 mM EDTA, pH 8,0) pré-aquecido a 54°C por 15 minutos cada

lavagem. Após o término das lavagens, os *plugs* foram estocados em 1 mL de tampão de lavagem TE em tubo plástico cônico de 2 mL a 4°C.

4.8.2. Digestão dos *plugs*

A digestão dos *plugs* foi feita separando-se 1 *plug* em um tubo plástico cônico de 2,0 mL, seguido de quatro lavagens por 15 minutos com tampão de lavagem TE pré-aquecido a 54°C. Em seguida, foi preparado uma mistura para cada enzima de restrição a ser utilizada (*Sma*I e *Xba*I) contendo o tampão comercial de restrição 10X e água MilliQ na proporção 1:10. Os *plugs* das linhagens de *C. coli* a serem estudadas e da linhagem de *Salmonella* Thyphimurium ATCC 13311 foram digeridas com a enzima *Sma*I e portanto, nessa etapa foi adicionado 300 µL da mistura contendo o tampão comercial de restrição desta enzima a cada tubo e incubou-se a 25°C por 15 minutos. Os *plugs* das linhagens de *Salmonella* Braenderup foram digeridos com *Xba*I, dessa maneira foi adicionado 300 µL da mistura contendo o tampão comercial de restrição desta enzima a cada tubo e incubou-se a 37°C por 15 minutos. Após a incubação o tampão da enzima foi removido e uma mistura contendo a enzima de restrição foi preparada. A Tabela 7 traz de maneira mais detalhada os reagentes que acompanham a enzima no processo de digestão.

Tabela 7. Mistura utilizada para a digestão dos *plugs*

Reagentes (<i>Sma</i> I)/ (<i>Xba</i> I)	µL/ <i>plug</i>
H ₂ O MilliQ	263
10X “Buffer de restrição” ^a	30
BSA (10mg/mL) ^a	3
<i>Sma</i> I (40 U/µL) / <i>Xba</i> I (30 U/µL) ^a	4
Volume Total	300

^a Produto Life Technologies

A cada *plug* foi adicionado 300µL da mistura contendo a enzima de restrição específica para cada linhagem e foram incubadas por no mínimo duas horas. Os *plugs* digeridos com *Sma*I foram incubados a 25°C enquanto que os digeridos com *Xba*I foram incubados a 37°C.

4.8.3. Corrida eletroforética

Após a digestão, o tampão com a enzima foi removido e 300 µL de tampão TBE (1 mM EDTA, pH 8,0; 45 mM Tris; 45 mM ácido bórico) 0,5X foram adicionados e os *plugs* foram lavados sob leve agitação por 10 minutos. Em seguida, estes foram transferidos para um gel de agarose *Seakem Gold* 1% preparado com TBE 0,5X, selados com uma fina camada de agarose *Seakem Gold* 1% e submetidos à corrida no aparelho CHEF-DRIII System (Bio-Rad), sob as seguintes condições de corrida:

- Tempo de corrida: 19 horas
- Voltagem: 6 V/cm
- Pulso inicial: 6,8 segundos
- Pulso final: 35,4 segundos
- Ângulo: 120°
- Temperatura da corrida: 14°C

Após as corridas, os géis foram corados em solução de brometo de etídeo (0,5 mg/mL) por 30 minutos, descorados em água MilliQ por 80 minutos, visualizados em transluminador ultravioleta (Gel Doc XR, Bio-Rad) e registrados em *software* fotográfico (Quantity One 4.6.1, Bio-Rad).

4.8.4. Análise do padrão de bandas gerados com os dados de PFGE

A análise dos dados foi feita utilizando-se o *software* BioNumerics versão 5.1 (Applied Maths, Keijkstraat, Belgium). Para a técnica de PFGE, somente os fragmentos entre 20,5 e 1135 Kb em tamanho foram incluídos na análise. A *Salmonella* Braenderup H9812, utilizada como padrão de peso molecular, foi incluída três vezes em cada gel com o intuito de normalizar as imagens para a validação da técnica nos diferentes géis obtidos por PFGE.

4.8.5. Construção do dendrograma de similaridade genômica gerado com os dados de PFGE

A construção do dendrograma de similaridade genômica foi realizada pelo *software* BioNumerics versão 5.1 (AppliedMaths) utilizando-se o método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) e o cálculo de similaridade utilizando-se o índice DICE, segundo as instruções do manual do programa.

4.9. Sequenciamento da pequena região variável (SVR) do gene *flaA*.

O sequenciamento da SVR do gene *flaA* foi realizada para as 63 linhagens listadas na Tabela 2. Os DNAs genômicos foram extraídos e quantificados conforme descrito no item 4.3. Inicialmente, foi realizada a amplificação do gene *flaA* utilizando reagentes para um volume final de reação de 50 µL. A Tabela 8 traz de forma detalhada os reagentes utilizados para a amplificação do gene *flaA*.

Tabela 8. Descrição dos reagentes utilizados para a amplificação do gene *flaA*

Componentes	Volume (µL)	Concentração Final
10X Tampão “PCR Buffer” ^a	5	1X
10mM “dNTP Mixture” ^a	1	0,2 mM de cada dNTP
<i>Primer forward</i> ^b	2,5	25 pmol
<i>Primer reverse</i> ^b	2,5	25 pmol
50mM MgSO ₄ ^a	2	2 mM
DNA Genômico (10ng/µL)	5	50 ng
Taq DNA Polymerase “ <i>High Fidelity</i> ” (1U/µL)	1	1U
H ₂ O destilada ultra pura livre de DNase e RNase ^a	q.s.p. 50	

^a Produto da Life Technologies ^b Produto da Integrated DNA Technologies (IDT)

O par de *primer* utilizado para a amplificação do fragmento de 1713 pb do gene *flaA* está descrito na Tabela 6, item 4.6. Reações sem DNA foram utilizadas como branco e as condições da corrida foram as mesmas utilizadas no item 4.6. O produto amplificado foi visualizado em gel de agarose 1,5% preparado em tampão TAE 1X. O marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder - Invitrogen foi aplicado ao gel e a eletroforese foi conduzida a 80 volts por 90 minutos. Após a eletroforese, os géis foram corados em solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por 30 minutos, visualizados em transluminador ultravioleta (Gel Doc XR, Bio-Rad) e registrados em *software* fotográfico (Quantity One 4.6.1, Bio-Rad). Após verificar a amplificação do fragmento desejado, estes foram submetidos a purificação através da utilização do Kit PureLinkTM Quick PCR Purification (Life Technologies), seguindo as recomendações do fabricante.

Em seguida, os *amplicons* purificados foram submetidos à amplificação da SVR do gene *flaA*, em placa de 96 poços, utilizando reagentes para um volume final de reação de 10µL sendo, 4µL de água destilada ultra pura livre de DNase e RNase (Life Technologies), 2µL Big Dye terminator v1.1, v 3.1-5X Sequencing Buffer (Life Technologies), 2µL Big Dye terminator v3.1(Life Technologies), 1 µL do *amplicom* e 1µL do *primer* 5’ -CTA TGG ATG

AGC AAT T(AT)A AAA T -3' e 5' - CAA G(AT)C CTG TTC C(AT)A CTG AAG -3', conforme descrito por Meinersmann *et al.* (1997). Em seguida, a reação foi submetida à amplificação no termociclador DNAEngine® Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad), onde as condições de corrida foram as seguintes: 95° por 1 minuto, 95°C por 10 segundos, 51°C por 5 segundos, 60°C por 4 minutos, repetindo essas três últimas condições por 35 vezes.

O DNA foi precipitado, seguindo-se o protocolo de precipitação sugerido pelo manual do *kit* de sequenciamento. O sequenciamento foi realizado no Hemocentro de Ribeirão Preto no sequenciador ABI 3500xL (Life Technologies) e os resultados foram salvos em eletroferogramas na extensão *abl*.

Os eletroferogramas são as representações gráficas dos sequenciamentos realizados, sendo que cada pico no gráfico representa a intensidade luminosa emitida pelas bases fluorescentes quando ocorre a incidência do *laser* de leitura, detectadas pela câmara de cromatografia em camada delgada (CCD), havendo assim a montagem das sequências em bases.

Para cada uma das linhagens estudadas foi feita uma reação de sequenciamento com o *primer forward* e uma reação com o *primer reverse*.

4.9.1. Análise do sequenciamento da SVR do gene *flaA*

Os resultados salvos em eletroferogramas na extensão *abl* foram analisados individualmente através do programa *ChromasPro* versão 1.41 (Technelysium Pty Ltd). Em seguida, essas sequências foram depositadas no banco de dados <http://pubmlst.org/campylobacter/flaA>, que permite a comparação com outras sequências depositadas através de um número de alelo específico gerado para cada sequência.

4.9.2. Construção do dendrograma de similaridade genômica gerado com os dados do sequenciamento da SVR do gene *flaA*

Após o alinhamento das sequências o dendrograma foi construído utilizando-se o método UPGMA, baseado no critério de máxima parcimônia com o modelo de correção de distância de dois parâmetros de Jukes & Cantor, no *software BioNumerics* versão 5.1 (Applied Maths). Visando aumentar a confiabilidade dos resultados das análises filogenéticas, foi utilizado o valor de bootstrap (1.000 replicatas) para agregar maior confiança ao dendrograma de similaridade genética construído.

4.10. Análise do locus CRISPR por HRMA

A análise do locus CRISPR por HRMA foi realizada para as 63 linhagens listadas na Tabela 2. Os DNAs genômicos foram extraídos e quantificados conforme descrito no item 4.3. Primeiramente, foi realizada uma PCR em tempo real (qPCR) utilizando-se o termociclador 7500 FAST Real-Time PCR System (Life Technologies) com o auxílio do software 7500 versão 2.0.5 (Life Technologies). As reações foram realizadas em placa de 96 poços MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate (Life Technologies) cobertas com adesivo ótico MicroAmp® Optical Adhesive Film (Life Technologies). A Tabela 9 mostra os reagentes utilizados para as reações de qPCR.

Tabela 9. Descrição dos reagentes utilizados para as reações de PCR em tempo real

Componentes	Volume (µL)
MeltDoctor™ HRM Master Mix ^a	10,0
Primer Forward (5 pmol/µL) ^b	1,2
Primer Reverse (5 pmol/µL) ^b	1,2
DNA genômico (4,5 – 5,5 ng/µL)	4,0
Água destilada ultra pura livre de DNase e RNase ^a	3,6

^aProduto Life Technologies; ^b Produto Integrated DNA Technologies

As condições das reações de qPCR foram as seguintes:

- Desnaturação e ativação enzimática – 95°C por 10 minutos
- Em seguida, 45 ciclos constituídos de:
- Desnaturação – 95°C por 15 segundos
- Hibridação e extensão – 58°C por 1 minuto

Todas as reações foram realizadas em duplicata. Reações sem DNA foram utilizadas como branco.

A etapa de HRMA foi realizada imediatamente após a reação de qPCR. Os *amplicons* foram aquecidos a 95°C por 10 segundos e, então, resfriados a 60°C por 1 minuto. As curvas de *melting* de cada *amplicon* foram geradas a partir do aumento gradual de temperatura de 60 a 95°C com incrementos de 1,6°C/s e detecção da fluorescência a cada 0,1 segundo. A fim de uniformizarem-se os dados, as curvas de *melting* brutas anteriormente obtidas foram normalizadas a partir da seleção manual de duas regiões, uma delas ocorrendo anteriormente ao início da dissociação do *amplicon* (100% de fluorescência) e outra, após a completa separação da dupla fita de DNA (0% de fluorescência). As curvas de *melting* normalizadas foram analisadas com o software HRM versão 2.0.1 (Life Technologies) de acordo com as

instruções do fabricante. O *software* agrupa *amplicons* que possuem curvas de *melting* normalizadas similares e, dessa maneira, diferenças entre grupos distintos de *amplicons* podem ser facilmente identificadas.

4.11. Multilocus sequence typing (MLST)

4.11.1. Escolha das linhagens

Para a metodologia de MLST foram escolhidas 20 linhagens, destacadas com um asterisco (*) na Tabela 2. A escolha dessas linhagens baseou-se na análise da diversidade genotípica pelas metodologias de PFGE e sequenciamento da SVR do gene *flaA*, análise da presença de genes de virulência e perfil de sensibilidade a antimicrobianos. Além disso, os diferentes anos e fontes de isolamento também foram utilizados como parâmetros para tal escolha.

4.11.2. Amplificação dos genes *housekeeping*

Para os experimentos de MLST, foi tomada como base a metodologia previamente padronizada e disponível no banco de dados de MLST para *Campylobacter coli* (*Campylobacter* MLST Home page: <http://pubmlst.org/campylobacter/info/primers.shtml>). As linhagens estudadas foram cadastradas e seus dados disponibilizados no referido banco de dados de MLST. Esses dados foram utilizados para compará-las entre si e com as linhagens de *Campylobacter coli* disponibilizadas *online*, provenientes de diferentes partes do mundo.

Para isso, foram amplificados sete genes de manutenção (*housekeeping genes*) de *Campylobacter coli*, sendo eles:

- *aspA* (*aspartase*);
- *glnA* (*glutamine synthetase*);
- *gltA* (*citrate synthase*);
- *glyA* (*serine hydroxy methyl transferase*);
- *pgm* (*phospho glucomutase*);
- *tkt* (*transketolase*);
- *uncA* (*ATP synthase alpha subunit*);

As sequências dos pares de *primers*, nomeados de acordo com os *loci* a serem analisados, tamanho dos fragmentos amplificados (*amplicons*) e temperatura de hibridação estão descritos na Tabela 10.

Tabela 10. Dados gerais sobre os *primers* utilizados na amplificação dos genes *housekeeping* utilizados na técnica de MLST.

Genes	Primers	Sequência dos <i>primers</i> (5' – 3')	Amplicon (pb)	Temp. Hibridação (°C)
<i>aspA</i>	Aspcoli S1	CAACTTCAAGATGCAGTACC	447	50
	Aspcoli S2	ATCTGCTAAAGTATGCATTGC		
<i>glnA</i>	Glncoli S1	TTCATGGATGGCAACCTATTG	447	50
	Glncoli S2	GCTTTGGCATAAAAAGTTGCAG		
<i>gltA</i>	Gltcoli S1	GATGTAGTGCATCTTTTACTC	399 a 402	50
	Gltcoli S2	AAGCGCTCCAATACCTGCTG		
<i>glyA</i>	Glycoli S1	TCAAGGCGTTTATGCTGCAC	507	50
	Glycoli S2	CCATCACTTACAAGCTTATAC		
<i>pgm</i>	Pgmcoli S1	TTATAAGGTAGCTCCGACTG	498	50
	Pgmcoli S2	GTTCCGAATAGCGAAATAACAC		
<i>tkt</i>	Tktcoli S1	AGGCTTGTGTTTTTCAGGCGG	459	50
	Tktcoli S2	TGACTTCCTTCAAGCTCTCC		
<i>uncA</i>	Unccoli S1	AAGCACAGTGGCTCAAGTTG	489	50
	Unccoli S2	CTACTTGCCTCATCCAATCAC		

Fonte: <http://pubmlst.org/campylobacter/info/primers.shtml>

As reações de amplificação foram realizadas para cada gene separadamente conforme descrito na Tabela 11.

As condições das reações de amplificação foram de desnaturação inicial do DNA genômico por aquecimento: 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos constituídos de:

- Separação das fitas de DNA: 94°C por 2 minutos.
- Hibridização dos *primers*: 50°C por 1 minuto.
- Extensão: 72°C por 1 minuto.

Após os 35 ciclos, foi realizada uma etapa de extensão final a 72°C por 15 minutos. O termociclador utilizado foi o *DNAEngine® Peltier Thermal Cycler* (Bio-Rad). O produto amplificado foi visualizado por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, preparado em tampão TAE 1X. Cada corrida eletroforética continha um marcador de peso molecular (1Kb Plus DNA Ladder – Life Technologies). Após a eletroforese, os géis foram corados em solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL por 30 minutos), visualizados em transluminador de luz U.V. (Gel Doc XR, Bio-Rad) e registrados com o *software* fotográfico (Quantity One 4.6.1, Bio-Rad).

Tabela 11. Descrição dos reagentes utilizados para a amplificação dos sete genes *housekeeping* utilizados na técnica do MLST.

Componentes	Volume (µL)	Concentração Final
10X Tampão “PCR Buffer” ^a	5	1X
10mM “dNTP Mixture” ^a	1	0,2 mM de cada dNTP
Primer forward ^b	2,5	25 pmol
Primer reverse ^b	2,5	25 pmol
50mM MgSO ₄ ^a	2	2 mM
DNA Genômico (10ng/µL)	5	50 ng
Taq DNA Polymerase “High Fidelity” (1U/µL)	1	1U
H ₂ O destilada ultra pura livre de DNase e RNase ^a	q.s.p. 50	

^a Produto da Life Technologies ^b Produto da Integrated DNA Technologies (IDT)

4.11.3. Sequenciamento

O Sequenciamento foi realizado no Hemocentro de Ribeirão Preto no sequenciador ABI 3500xL (Life Technologies) conforme descrito, anteriormente, no item 4.9.

4.11.4. Análise das sequências obtidas

Através dos eletroferogramas é possível avaliar visualmente a qualidade das sequências. Para uma sequência ser considerada ótima, picos devem estar altos, agudos e regularmente separados, garantindo que a base nitrogenada registrada esteja correta.

Após o sequenciamento e análise visual da qualidade das sequências, cada conjunto de sequências de um mesmo gene e de uma mesma linhagem foi analisado individualmente, pelo programa *ChromasPro* versão 1.41 (Technelysium Pty Ltd). Pela análise dos eletroferogramas foram gerados *contigs*, ou seja, sequências sobrepostas do gene em questão, a fim de obter-se a sequência consenso para cada gene de cada linhagem sequenciada.

Foram utilizadas sequências padrões dos genes *housekeeping*, disponíveis no banco de dados de *C. coli*, que serviram de molde para delimitar o tamanho (pb) das sequências. A delimitação do tamanho das sequências evitou a perda da qualidade das sequências obtidas, uma vez que é comum após o sequenciamento, obter-se sequências de má qualidade em suas extremidades.

4.11.5. Construção do diagrama de similaridade genética com os dados do MLST

O diagrama de similaridade genética foi construído através do programa *eBURSTv3*, disponível *online* (<http://eburst.mlst.net/>). O diagrama foi construído baseado no ST das linhagens de *C. coli* estudadas e das linhagens de *Campylobacter* spp. disponíveis no banco

de dados. O programa *eBURSTv3* permite a análise das linhagens estudadas em relação às linhagens, de diversas localidades geográficas, contidas no banco de dados possibilitando assim uma análise global.

4.12. Cálculo do índice de discriminação

Para o cálculo do índice de discriminação das metodologias de tipagem molecular utilizadas no presente trabalho, foi utilizada uma variação do índice de diversidade de Simpson (Simpson, 1949). O índice de discriminação (D) utilizado (Hunter; Gaston, 1988) baseia-se na probabilidade de que duas linhagens não relacionadas escolhidas aleatoriamente dentro de uma população, se localizem dentro de grupos de tipagem distintos. O índice D é obtido através da seguinte fórmula:

$$D = 1 - [1/N(N-1)] \sum_{j=1}^s n_j(n_j - 1)$$

Onde N representa o número total de linhagens estudadas, s é o número total de tipos obtidos no dendrograma e n_j é o número de amostras que pertencem ao tipo j .

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. Verificação da pureza das linhagens

As 63 linhagens de *Campylobacter coli* estudadas foram confirmadas como puras, sem contaminantes.

5.2. Extração e verificação da pureza do DNA genômico

Todas as 63 linhagens de *Campylobacter coli* listadas na Tabela 2, bem como as linhagens de *Campylobacter jejuni subsp. jejuni* ATCC 33291 e *Campylobacter coli* WHOC 7.2 utilizadas como controle positivo na reconfirmação da espécie e pesquisa dos genes relacionados à virulência por PCR apresentaram DNA íntegro após a extração. A Figura 1 traz um gel representativo de uma eletroforese para a avaliação da integridade dos DNAs genômicos. Todas as 63 linhagens de *Campylobacter coli* estudadas apresentaram pureza > 1,8 e seus DNAs satisfatórios para a utilização na pesquisa dos genes relacionados à virulência por PCR e nas técnicas de sequenciamento da pequena região variável (SVR) do gene *flaA*, análise do *locus* CRISPR por HRMA e MLST.

Figura 1. Gel representativo dos produtos da extração do DNA genômico seguido de eletroforese horizontal em gel de agarose 0,8%. M: marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaletas de 1 a 18, linhagens representativas de *C. coli* estudadas: CCAMP 490 (1), CCAMP 494 (2), CCAMP 495 (3), CCAMP 498 (4), Cc 01 (5), Cc 04 (6), Cc 05 (7), Cc 10 (8), Cc 03 (9), CCAMP 595 (10), CCAMP 840 (11), CCAMP 771 (12), CCAMP 773 (13), CCAMP 774 (14), CCAMP 769 (15), CCAMP 787 (16), CCAMP 819 (17), CCAMP 764 (18).

5.3. Reconfirmação da espécie por PCR

Todas as 63 linhagens de *Campylobacter coli* listadas na Tabela 2 foram confirmadas como pertencentes a tal espécie por uma multiplex PCR conforme descrito no item 4.4. Os *amplicons* foram analisados após eletroforese horizontal para confirmar a presença de dois fragmentos com peso molecular de 857 pb e 462 pb característicos do gênero *Campylobacter* e da espécie *Campylobacter coli*, respectivamente. A Figura 2 traz o gel representativo da reação de reconfirmação da espécie.

Figura 2. Gel representativo da reação de reconfirmação da espécie seguido de eletroforese em gel de agarose 1,5 %. M: marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaletas de 1 a 8, linhagens representativas de *C. coli* estudadas: CCAMP 595 (1), CCAMP 787 (2), Cc 03 (3), Cc 04 (4), Cc 05 (5), Cc 10 (6), CCAMP 771 (7), CCAMP 764 (8). Controle positivo: *C. coli* WHOC 7.2 (9), controle positivo: *C. jejuni* ATCC 33291 (10), controle negativo: *Yersinia* spp. (11), Branco (12).

5.4. Pesquisa dos genes relacionados à virulência por PCR

A Tabela 12 demonstra a frequência dos genes relacionados à virulência pesquisados para as 63 linhagens de *Campylobacter coli* listadas na Tabela 2.

Todas as 63 linhagens de *Campylobacter coli* estudadas apresentaram os genes *flaA*, *cadF* e *sodB*. O gene *cdtB* foi detectado em 20 (31,7%) linhagens, sendo 11 (55%) linhagens de origem animal, quatro (20%) linhagens de origem humana, três (15%) linhagens de origem ambiental e duas (10%) linhagens de alimentos. O gene *flhA* foi detectado em 11 (17,5%) linhagens, sendo seis (54,5%) linhagens de origem humana, quatro (36,4%) linhagens de origem ambiental e uma (9,1%) linhagem de origem animal. O gene *dnaJ* foi detectado em 10 (15,9%) linhagens, sendo sete (70%) linhagens de origem animal, duas (20%) linhagens de origem humana, uma (5%) linhagem de origem ambiental e uma (5%) linhagem de alimento. O gene *pldA* foi detectado em sete (11,1%) linhagens, sendo quatro (57,1%) linhagens de origem animal, duas (28,6%) linhagens de origem ambiental e uma (14,3%) linhagem de origem humana. O gene *iamA* foi detectado em três (4,8%) linhagens, sendo duas (66,7%) linhagens de origem humana e uma (33,3%) linhagem de alimento. Os genes *cdtC* e *docA*

foram detectados em duas (3,2%) linhagens de origem humana e os genes *crsA* e *cdtA* foram encontrados em apenas uma (1,6%) linhagem isolada de humano. Os genes *ciaB*, *virB11*, *wlaN*, *racR* não foram detectados em nenhuma das 63 linhagens de *Campylobacter coli* estudadas.

Tabela 12. Frequência dos genes relacionados à virulência pesquisados nas 63 linhagens de *Campylobacter coli* estudadas.

Genes	Total n= 63 (%)	Número de linhagens positivas (%)			
		Ambiente n=20	Animal n=21	Alimento n=10	Humano n=12
<i>flaA</i>	63(100)	20 (100)	21 (100)	10 (100)	12 (100)
<i>cadF</i>	63 (100)	20 (100)	21 (100)	10 (100)	12 (100)
<i>sodB</i>	63 (100)	20 (100)	21 (100)	10 (100)	12 (100)
<i>cdtB</i>	20 (31,7)	3 (15)	11(55)	2 (10)	4 (20)
<i>flhA</i>	11 (17,5)	4 (36,4)	1 (9,1)	ND	6 (54,5)
<i>dnaJ</i>	10 (15,9)	1 (5)	7 (70)	1 (5)	2 (20)
<i>pldA</i>	7 (11,1)	2 (28,6)	4 (57,1)	ND	1 (14,3)
<i>iamA</i>	3 (4,8)	ND	ND	1 (33,3)	2 (66,7)
<i>cdtC</i>	2 (3,2)	ND	ND	ND	2 (100)
<i>docA</i>	2 (3,2)	ND	ND	ND	2 (100)
<i>cdtA</i>	1 (1,6)	ND	ND	ND	1 (100)
<i>crsA</i>	1 (1,6)	ND	ND	ND	1 (100)
<i>ciaB</i>	ND	ND	ND	ND	ND
<i>wlaN</i>	ND	ND	ND	ND	ND
<i>virB11</i>	ND	ND	ND	ND	ND
<i>racR</i>	ND	ND	ND	ND	ND

ND- Não Detectado

5.5. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Tabela 13 traz o perfil de resistência encontrado nas linhagens estudadas frente aos antimicrobianos eritromicina, ciprofloxacina, tetraciclina e doxamiclina. Dentre as 63 linhagens estudadas, 42 foram susceptíveis a todos os antimicrobianos testados. Das 21 linhagens resistentes, 10 (15,9%) foram resistentes aos antimicrobianos tetraciclina e doxamiclina (CCAMP 818, CCAMP 834, CCAMP 463, CCAMP 464, CCAMP 465, CCAMP 466, CCAMP 467, CCAMP 469, CCAMP 73 e Cc01), seis (9,5%) foram resistentes a ciprofloxacina (CCAMP 495, CCAMP 498, CCAMP 502, CCAMP 595, CCAMP 667 e CCAMP 1067) e uma (1,6 %) foi resistente a eritromicina (CCAMP 1074). Somente quatro (6,3%) linhagens, CCAMP 761, Cc 03, CCAMP 1010 e CCAMP 1062, foram resistentes a pelo menos duas diferentes classes de antibióticos testados simultaneamente (Apêndice I). A Figura 3 é representativa do ensaio realizado com o Etest®, sendo a Figura 3A representativa

de uma linhagem sensível a todos os antibióticos testados e a Figura 3B é representativa de uma linhagem sensível a apenas um antibiótico testado.

Tabela 13. Perfil de resistência aos antimicrobianos eritromicina, ciprofloxacina, tetraciclina e doxaciclina das 63 linhagens de *Campylobacter coli* isoladas de humanos, animais, alimentos e ambiente.

Antimicrobiano	Número de linhagens (%)				Total de linhagens
	Humanos n=12	Animal n=21	Alimentos n=10	Ambiente n=20	
TET + DOX	1 (1,6)	1 (1,6)	ND	8 (12,7)	10 (15,9)
CIP	4 (6,4)	1 (1,6)	1 (1,6)	ND	6 (9,5)
ERI	ND	ND	1 (1,6)	ND	1 (1,6)
ERI+CIP+TET*	1 (1,6)	1 (1,6)	1 (1,6)	1 (1,6)	4 (6,3)

ND- Não Detectado; TET- Tetraciclina; DOX- Doxaciclina; CIP- Ciprofloxacina; ERI- Eritromicina; *- Resistente a pelo menos duas diferentes classes de antimicrobianos.

Fig. 3A

Fig. 3B

Figura 3. Placas representativas do ensaio com o Etest® para os antibióticos eritromicina, ciprofloxacina, tetraciclina e doxaciclina. **Fig. 3A.** Linhagem Campy 1000. **Fig. 3B.** Linhagem Campy 1010.

5.6. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)

A Figura 4 traz um gel representativo, após eletroforese em campo pulsado, de algumas linhagens de *Campylobacter coli* estudadas.

Figura 4. Gel de agarose 1% representativo do ensaio de PFGE de algumas linhagens de *Campylobacter coli* estudadas digeridas com a enzima *Sma*I. M: marcador de peso molecular (*Salmonella* ser. Braenderup H9812) digerido com *Xba*I. Canaletas de 1 a 12, linhagens representativas de *Campylobacter coli* estudadas: CCAMP 975 (1), CCAMP 834 (2), CCAMP 498 (3), CCAMP 392 (4), CCAMP 667 (5), CCAMP 765 (6), CCAMP 764 (7), CCAMP 1000 (8), CCAMP 1071 (9), CCAMP 1073 (10), CCAMP 1074 (11) e Cc 01 (12).

5.6.1. Construção do dendrograma de similaridade genômica gerado com os dados de PFGE

A Figura 5 ilustra o dendrograma de similaridade genômica gerado a partir da análise do perfil de bandas de PFGE para as 63 linhagens de *Campylobacter coli* listadas na Tabela 2.

A análise do dendrograma revelou 45 diferentes PFGE-tipos e agrupou as 63 linhagens estudadas em dois grupos principais denominados PFGE-A e PFGE-B com similaridade genômica de 44,9% entre eles. As linhagens CCAMP 1000 e CCAMP 502 não

foram agrupadas a nenhuma outra linhagem e apresentaram uma diversidade genômica acima de 42,3% em relação as outras linhagens.

O PFGE-A agrupou 45 linhagens com 48,4% de similaridade genômica, sendo que 9 linhagens foram isoladas de humanos, 16 linhagens foram isoladas de animal, 12 linhagens foram isoladas de ambiente e 8 linhagens foram isoladas de alimentos no período de 1995 a 2011. Embora esta análise tenha demonstrado uma alta diversidade genômica entre as linhagens estudadas, algumas linhagens apresentaram uma alta similaridade genotípica de mais de 80% entre elas e, foram agrupadas em sete subgrupos denominados PFGE-A1, PFGE-A2, PFGE-A3, PFGE-A4, PFGE-A5, PFGE-A6 e PFGE-A7 (Figura 5).

O subgrupo PFGE-A1 agrupou nove linhagens, exibindo similaridade acima de 81,6%, isoladas de humanos (2), animais (2), ambiente (5), entre os anos de 1996 e 2004, nos Estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais. O PFGE-A2 agrupou três linhagens, indistinguíveis, isoladas de alimentos no Estado do Rio de Janeiro em 2010. O subgrupo PFGE-A3 agrupou quatro linhagens, com similaridade acima de 85,7%, isoladas de humano (1), animais (2) e ambiente (1), entre os anos de 1996 e 2004 no Estado do Rio de Janeiro. O subgrupo PFGE-A4 agrupou duas linhagens, indistinguíveis, isoladas de ambiente e animal, nos anos de 1997 e 1998, no Estado do Rio de Janeiro. O PFGE-A5 agrupou 11 linhagens, com similaridade acima de 81,4%, isoladas de humanos (4), animais (2) e alimentos (5) entre os anos de 1996 e 2011, no Estado do Rio de Janeiro. O PFGE-A6 agrupou três linhagens, com similaridade acima de 88,9%, duas linhagens presentes neste subgrupo foram indistinguíveis entre si, sendo uma isolada de ambiente no ano de 1995 e a outra isolada de animal no ano de 1996. A terceira linhagem foi isolada de animal no ano de 2003 e todas as linhagens pertencentes a esse subgrupo foram isoladas no Estado do Rio de Janeiro. O PFGE-A7 agrupou duas linhagens, apresentando similaridade acima de 94,7%, isoladas de ambiente, em 2004, no Estado de Minas Gerais.

O grupo PFGE-B agrupou 16 linhagens (25,4%), exibindo similaridade de 55,5%, isoladas de humanos (2), alimentos (2), animais (4) e ambiente (8), durante os anos de 1995 e 2010, nos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro. Da mesma maneira, as linhagens que exibiram similaridade genômica acima de 80% foram agrupadas em três subgrupos denominados PFGE-B1, PFGE-B2 e PFGE-B3. O PFGE-B1 agrupou duas linhagens, com similaridade acima de 94,7%, isoladas de humanos, em 2003, no Estado de São Paulo. O PFGE-B2 agrupou duas linhagens, indistinguíveis, isoladas de ambiente e animal, em 1995, no Estado do Rio de Janeiro e o PFGE-B3 agrupou nove linhagens, com similaridade acima

de 84,1%, isoladas de animais (3), e ambiente (6), entre os anos de 1995 e 2000, no Estado do Rio de Janeiro (Figura 5).

Figura 5. Dendrograma de similaridade genotípica gerado pelo método UPGMA e coeficiente de similaridade DICE a partir do padrão de bandas obtido pelo PFGE com a enzima *SmaI* para 63 linhagens de *Campylobacter coli* estudadas

5.7. Sequenciamento da SVR do gene *flaA*

Os resultados salvos em eletroferogramas foram analisados individualmente através do programa *ChromasPro* (Technelysium Pty Ltd). Em seguida, essas sequências foram depositadas no banco de dados <http://pubmlst.org/campylobacter/flaA>, o que gerou um número de alelo específico para cada sequência distinta como pode ser observado na Figura 6.

O presente estudo revelou 22 diferentes SVR-*flaA* alelos dentre as 63 linhagens de *Campylobacter coli* estudadas e sete desses alelos não estavam descritos no banco de dados, sendo eles: o alelo 1647, o 1648, o 1649, o 1650, o 1651, o 1652, o 1653.

Os alelos mais frequentemente detectado no nosso estudo foram o alelo 30, com 14 (22,2%) linhagens, o 1647, com 9 (14,3%) linhagens, o 1650 e o 66, com 5 (7,9%) linhagens cada, o 17, com 4 (6,3%) linhagens, o 910 e o 1651, com 3 (4,8%) linhagens cada e o 769, o 16, o 964 e o 1648, com 2 (3,2%) linhagens cada. Os alelos 1649, 1652, 1523, 530, 236, 1653, 343, 23, 719, 49 e 319 foram detectados em apenas uma linhagem. Ademais, as sequências obtidas foram analisadas no banco de dados de *Campylobacter coli* do programa BioNumerics versão 5.1 (Applied Maths) permitindo que um dendrograma de similaridade genômica fosse gerado (Figura 6).

5.7.1. Construção do dendrograma de similaridade gerado com os dados do sequenciamento da SVR do gene *flaA*

O dendrograma de similaridade genômica gerado, a partir do alinhamento das sequências da SVR do gene *flaA*, pelo programa BioNumerics versão 5.1 revelou a presença de 26 SVR-tipos e agrupou as 63 linhagens de *Campylobacter coli* estudadas em dois grupos principais designados SVR-A e SVR-B, com similaridade de 83,1 % entre eles como pode ser observado na Figura 6.

O grupo SVR-A agrupou sete (11,1%) linhagens, com similaridade acima de 86,3%, isoladas de humano (1), animais (4) e ambiente (2), entre os anos de 1996 e 2004, no Estado do Rio de Janeiro e foi subdividido em dois subgrupos denominados SVR-A1 e SVR-A2. O subgrupo SVR-A1 agrupou 6 linhagens, com similaridade acima de 98,7%, isoladas de animais (4) e ambiente (2), entre os anos de 1996 e 2004 e o subgrupo SVR-A2 foi composto por uma linhagem isolada de humano no ano de 1999.

O grupo SVR-B agrupou 56 (88,9%) linhagens, com similaridade acima de 93,9%, isoladas de humanos (11), animais (17), ambiente (18) e alimento (10), durante os anos de 1995 e 2011, nos Estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais e foi subdividido em

dois subgrupos denominados SVR-B1 e SVR-B2. O SVR-B1 agrupou 38 (60,3%) linhagens, com similaridade acima de 97,3%, isoladas de animais (12), ambiente (17), alimentos (5) e humanos (4), entre os anos de 1995 e 2010, nos Estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais. O SVR-B2 agrupou 18 (28,6%) linhagens, com similaridade acima de 99,5%, isoladas de alimentos (5), humanos (7) e animais (5), entre os anos de 1995 e 2011, nos Estados do Rio de Janeiro e São Paulo.

Figure 6. Dendrograma gerado a partir dos dados do sequenciamento da SVR do gene *flaA* utilizando o modelo de correção de distância de dois parâmetros de Jukes & Cantor e o algoritmo UPGMA. O valor do Bootstrap encontra-se na frente do nó enquanto que os valores de similaridade estão atrás do nó.

5.8. Análise do *locus* CRISPR por HRMA

A análise do *locus* CRISPR por HRMA dividiu as 63 linhagens de *Campylobacter coli* estudadas em quatro diferentes perfis de *melting*. A Figura 7 traz os 4 perfis de *melting* gerados pela análise do *locus* CRISPR por HRMA.

O perfil 1 agrupou 27 linhagens sendo elas: CCAMP 490, CCAMP 494, Cc 05, Cc 03, CCAMP 819, CCAMP 761, CCAMP 767, CCAMP 775, CCAMP 465, CCAMP 466, CCAMP 469, CCAMP 1066, CCAMP 1071, CCAMP 1073, CCAMP 1074, CCAMP 1075, CCAMP 820, CCAMP 975, CCAMP 988, CCAMP 726, CCAMP 182, CCAMP 446, CCAMP 1010, CCAMP 1117, CCAMP 503, CCAMP 463 e CCAMP 1000. O perfil 2 agrupou 33 linhagens, sendo elas: CCAMP 495, CCAMP 498, Cc 01, Cc 04, Cc10, CCAMP 595, CCAMP 840, CCAMP 771, CCAMP 773, CCAMP774, CCAMP 769, CCAMP 787, CCAMP 764, CCAMP 765, CCAMP 818, CCAMP 834, CCAMP 464, CCAMP 467, CCAMP 1062, CCAMP 1064, CCAMP 1067, CCAMP 1068, CCAMP 821, CCAMP 825, CCAMP 768, CCAMP 791, CCAMP 625, CCAMP 841, CCAMP 667, CCAMP 73, CCAMP 165, CCAMP 170 e CCAMP 392. O perfil 3 agrupou 2 linhagens: a CCAMP 394 e CCAMP 502. O perfil 4 foi representado pela linhagem CCAMP 1063.

Figura 7. Gráfico representativo da curva de *melting* das 63 linhagens de *Campylobacter coli* estudadas.

5.9. Multilocus sequence typing (MLST)

5.9.1. Amplificação dos genes *housekeeping*

Os sete genes *housekeeping* propostos no banco de dados de MLST para *Campylobacter coli* foram amplificados nas 20 linhagens escolhidas para a tipagem, conforme descrito no item 4.11.1.

Após a análise da corrida eletroforética em gel de agarose 1,5%, foi possível observar os tamanhos dos fragmentos obtidos para cada gene, confirmando suas amplificações. A Figura 8 traz um gel representativo da amplificação do gene *glnA* para algumas linhagens tipadas por MLST.

Figura 8. Gel de agarose 1,5%, representativo da amplificação do gene *glnA* em algumas linhagens de *Campylobacter coli* estudadas M: marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaletas de 1 a 18: Cc 03 (1), CCAMP 165 (2), CCAMP 394 (3), CCAMP 1064 (4), CCAMP 1010 (5), CCAMP 469 (6), CCAMP 494 (7), CCAMP 1063 (8), CCAMP 791 (9), CCAMP 182 (10), Cc 01 (11), Cc 10 (12), CCAMP 1067 (13), CCAMP 502 (14), CCAMP 1062 (15), CCAMP 1062 (16), CCAMP 1000 (17), CCAMP 463 (18), respectivamente.

5.9.2. Sequenciamento

Todas as sequências obtidas, referentes aos sete genes *housekeeping* para as 20 linhagens de *Campylobacter coli* destacadas com um asterisco (*) Tabela 2, foram consideradas satisfatórias para análise. Após o alinhamento das sequências *forward* e *reverse* para cada um dos sete genes, obteve-se uma sequência consenso individual de cada linhagem. A Figura 9 é representativa e ilustra esse alinhamento. As setas indicam mutações pontuais que geraram um alelo diferente da sequência padrão.

Figura 9. Alinhamento e análise de sequências do gene *glnA* de uma das linhagens de *Campylobacter coli* estudada (CCAMP 494), pelo programa ChromasPro. As setas indicam uma mutações pontuais.

5.9.3. Diagramas de similaridade genética gerado com os dados de MLST

A sequência consenso de cada gene foi submetida ao banco de dados: http://pubmlst.org/perl/bigssdb/bigssdb.pl?db=pubmlst_campylobacter_seqdef&page=sequence Query. Este procedimento foi realizado para cada gene e linhagem individualmente de forma a obter um número de alelo para cada sequência distinta. A combinação desses alelos deu origem a um número de ST, como pode ser observado na Tabela 14.

Tabela 14. Combinação dos alelos obtidos pelo sequenciamento dos genes *asp*, *gln*, *glt*, *gly*, *pmg*, *tkl* e *unc* e STs gerados pela combinação desses alelos.

Linhagens	Genes							ST	Complexo Clonal
	<i>asp</i>	<i>gln</i>	<i>glt</i>	<i>gly</i>	<i>pmg</i>	<i>tkl</i>	<i>unc</i>		
Cc 01	166	37	30	79	104	47	17	7628	828
CCAMP 494	19	37	30	79	104	85	17	7713	--
Cc 03	166	37	30	174	104	44	17	7714	828
Cc 10	166	39	30	174	104	44	17	7715	828
CCAMP 771	166	39	66	82	104	43	152	7716	828
CCAMP 818	166	37	30	79	104	43	152	7717	--
CCAMP 469	19	51	44	82	104	44	17	7718	--
CCAMP 1062	247	37	134	82	210	35	17	7719	--
CCAMP 1064	166	37	30	79	104	47	17	7628	828
CCAMP 1063	166	39	30	79	104	44	17	7720	828
CCAMP 1067	129	66	30	82	189	47	17	1581	--

Continua

Linhagens	Genes							ST	Conclusão Complexo Clonal
	<i>asp</i>	<i>gln</i>	<i>glt</i>	<i>gly</i>	<i>pmg</i>	<i>tkl</i>	<i>unc</i>		
CCAMP 791	166	39	30	79	113	43	17	7721	828
CCAMP 182	166	51	30	79	104	64	17	7722	828
CCAMP 394	166	39	30	82	113	64	17	7723	828
CCAMP 446	166	38	30	79	104	64	17	7724	828
CCAMP 165	166	38	30	79	104	64	17	7724	828
CCAMP 1010	166	38	30	82	104	43	17	7725	828
CCAMP 502	302	39	44	82	118	43	36	7726	--
CCAMP 463	166	39	30	79	113	47	17	7370	828
CCAMP 1000	166	39	150	82	248	35	17	7727	828

-- Não pertencem a nenhum Complexo Clonal

As combinações dos sete alelos para as 20 linhagens depositadas no banco de dados geraram 18 diferentes STs dos quais apenas dois já existiam no banco de dados, o ST 1581 e o ST 7370. Os 16 STs restantes (ST 7628, ST 7713, ST 7714, ST 7715, ST 7716, ST 7717, ST 7718, ST 7719, ST 7720, ST 7721, ST 7722, ST 7723, ST 7724, ST 7725, ST 7726, ST 7727) não haviam sido previamente descritos no banco de dados. O ST 7723 é *single locus variant* do ST 6818. O ST 7715 é *single locus variant* do ST 2728. O ST 7720 é *single locus variant* do ST 1116. O ST 7725 é *single locus variant* do ST 854. O ST 7727 é *single locus variant* do ST 4309. O ST 7721 é *single locus variant* do ST 832. O ST 7628 *single locus variant* do ST 7374. O ST 7370 é *single locus variant* do ST 860 e *double locus variant* do ST 825 que é descrito como um dentre os vários possíveis ST *Founder*. O ST 7714 é *double locus variant* do ST 2728 (Figura 11).

Os STs 7726, 7718, 7713, 7717, 7719 e 7716 são *Singletons*, ou seja, não estão relacionados a nenhum outro ST depositado no banco de dados.

A Figura 10 traz o diagrama gerado a partir da análise das 7753 linhagens de *Campylobacter* spp. disponíveis no banco de dados juntamente com as 20 linhagens de *Campylobacter coli* tipadas por MLST no presente estudo, que encontram-se circuladas em rosa. A Figura 11 traz o diagrama mais resumido, gerado a partir 20 linhagens de *Campylobacter coli* tipadas por MLST no presente estudo em conjunto com linhagens relacionadas aos STs encontrados.

Figura 10. Diagrama de similaridade genética gerado pelo programa *eBURSTv3* com os dados de todas as 7753 linhagens de *Campylobacter* spp. disponíveis no banco de dados. Em rosa estão representados os STs das 20 linhagens de *Campylobacter coli* estudadas.

Figura 11. Diagrama de similaridade genética gerado pelo programa *eBURSTv3* com os STs das 20 linhagens de *Campylobacter coli* tipadas no presente estudo, destacadas em rosa, em conjunto com linhagens do banco de dados, destacadas em verde, relacionadas aos STs encontrados.

5.10. Índice de Discriminação

O índice de discriminação (D) das metodologias de PFGE, sequenciamento da pequena região variável (*short variable region*, SVR) do gene *flaA*, análise do *locus* CRISPR por HRMA e MLST foi de 0,986, 0,916, 0,550 e 0,989, respectivamente.

Discussão

6. DISCUSSÃO

Zoonoses transmitidas por alimentos são uma importante causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo (Foley *et al.*, 2009; Scallan *et al.*, 2011). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que mais de dois milhões de pessoas morrem a cada ano de doenças diarreicas causadas principalmente pela ingestão de alimentos contaminados (WHO, 2005; EFSA, 2007). Nos Estados Unidos, por exemplo, estima-se que mais de 48 milhões de pessoas adquiram doenças veiculadas por alimentos, sendo que aproximadamente 128.000 pessoas são hospitalizadas e 3.000 morrem a cada ano (CDC, 2012).

As espécies de *Campylobacter*, principalmente *Campylobacter coli* e *Campylobacter jejuni*, tem sido reportadas como uma causa comum de gastroenterite em humanos no mundo todo. A estimativa do número de casos de campilobacteriose reportados anualmente pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), *European Food Safety Authority* (EFSA) dentre outros importantes órgãos mundiais, demonstram que as infecções por essas bactérias causam um elevado impacto socioeconômico e na Saúde Pública (EFSA, 2015; CDC, 2015). No entanto, em comparação com outros patógenos entéricos, os mecanismos determinantes da patogenicidade e virulência das espécies de *Campylobacter* spp. permanecem pouco elucidados. Sabe-se que um grande número de fatores bacterianos que, invariavelmente, estão relacionados com moléculas ou mecanismos envolvidos nos processos de colonização, invasão e secreção de toxinas são importantes para o processo de patogênese e virulência (Crushell *et al.*, 2004).

No presente estudo foram pesquisados, nas 63 linhagens de *Campylobacter coli*, 16 genes relacionados à virulência por PCR, sendo 15 genes cromossômicos *flaA*, *cadF*, *sodB*, *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*, *flhA*, *dnaJ*, *pldA*, *iamA*, *docA*, *crsA*, *ciaB*, *wlaN* e *racR* e um gene plasmidial *virB11*.

Os genes *flaA*, *cadF* e *sodB* foram encontrados em 100% das linhagens de *Campylobacter coli* estudadas (Tabela 12), o que corrobora com dados da literatura que relatam que estes genes são essenciais no processo de colonização (Muller *et al.*, 2006; Wieczorek; Osek, 2008; Fernandes *et al.*, 2010). A enzima codificada pelo gene *sodB* é uma metaloenzima que proporciona proteção contra os efeitos tóxicos dos derivados reativos de oxigênio, pois se os radicais superóxidos não são eficientemente eliminados podem vir a causar danos a componentes vitais das células bacterianas (Fridovich, 1986; Purdy *et al.*, 1999). Por conseguinte, bactérias mutantes que se tornam deficientes na produção de SOD demonstram hipersensibilidade ao oxigênio e aos radicais livres e dessa maneira, são

incapazes de sobreviver em alimentos por longos períodos. Ademais, estudos demonstram que a inativação do gene *sodB* diminui o potencial de colonização de *Campylobacter coli* na medida que compromete a capacidade de sobrevivência ao *stress* oxidativo imposto durante a invasão a células epiteliais (Pesci *et al.*, 1994; Purdy *et al.*, 1999).

Da mesma maneira, estudos com mutantes demonstraram que a deficiência na produção da proteína CadF (*Campylobacter adhesion to fibronectin*) torna a bactéria incapaz de colonizar o intestino do frango, fato esse que pode ser facilmente explicado, pois a CadF é uma proteína de membrana externa que auxilia o processo de adesão de *Campylobacter coli* as células do epitélio intestinal (Konkel *et al.*, 1999; Ziprin *et al.*, 1999). Outros genes relacionados ao processo de adesão foram encontrados em um número menor de linhagens, no presente estudo, como podemos observar pela análise dos genes *dnaJ* e *docA* que foram encontrados em 10 (15,9%) e duas (3,2%) linhagens de *Campylobacter coli*, respectivamente. Estudos realizados com mutantes em linhagens de *Campylobacter jejuni* também demonstraram uma redução na habilidade de colonização dessas linhagens, entretanto poucos estudos referem-se à espécie *Campylobacter coli* (Konkel *et al.*, 1998; Hendrixson; DiRita, 2004; Muller *et al.*, 2006).

A motilidade é um importante fator relacionado à patogenicidade de *Campylobacter coli*. O movimento bacteriano é determinado pela forma em espiral da bactéria e pela localização dos flagelos que são codificados principalmente pelo gene *flaA*, o que a torna capaz de mover-se contra os movimentos peristálticos do intestino, penetrar através da camada de muco que recobre o epitélio intestinal e colonizar as células intestinais. Ademais, estudos recentes demonstraram que *Campylobacter coli* utiliza a maquinaria flagelar para secreção de proteínas relacionadas à virulência. O gene *flhA* foi encontrado em 11 (17,5%) linhagens de *C. coli* (Tabela 2) e está envolvido no processo de regulação dos genes flagelares. Estudos com mutantes demonstraram que a ausência desse gene reduz, substancialmente a habilidade de invasão e colonização (Golden; Acheson, 2002; Carrillo *et al.*, 2004).

Os genes *pldA* e *iamA*, relacionados com o processo de invasão à célula hospedeira, foram encontrados em sete (11,1%) e três (4,8%) linhagens de *Campylobacter coli* estudadas (Tabela 12). De acordo com dados da literatura, esses genes são encontrados na grande maioria das linhagens invasivas de *Campylobacter jejuni* e a ausência deles leva à uma redução significativa na capacidade de colonização (Ziprin *et al.*, 2001; Muller *et al.*, 2006).

A toxina distensora citoletal (CDT) é o fator de virulência de *Campylobacter* spp. mais estudado (Quetz *et al.*, 2012). Os três genes que codificam essa toxina tripartite possuem funções definidas e dados da literatura demonstram uma diferença na prevalência desses genes entre as populações estudadas (Quetz *et al.*, 2010). No presente estudo foi observado uma grande diferença na expressão dos genes relacionados a CDT, os genes *cdtB*, *cdtC* e *cdtA* foram encontrados em 20 (31,7%), duas (3,2%) e uma (1,6%) linhagem de *Campylobacter coli* respectivamente (Tabela 12). De maneira geral, os efeitos tóxicos atribuídos à essa toxina estão relacionados à transferência da subunidade CdtB a célula hospedeira, enquanto que as subunidades CdtA e CdtC estão relacionadas à ligação na célula hospedeira (Lara-Tejero; Galan, 2000; Lara-Tejero; Galan, 2001).

Apesar de estudos recentes sugerirem que o gene *crsA* pode desempenhar um papel vital na regulação de respostas ao *stress* e na virulência de *Campylobacter jejuni*, sendo importante para a formação de biofilme, adesão as células epiteliais do intestino e sobrevivência ao *stress* oxidativo, esse gene foi encontrado em apenas uma (1,6%) linhagem de *Campylobacter coli* do presente estudo (Tabela 12) (Fields; Thompson, 2008; Gonzalez-Hein *et al.*, 2013).

Os genes *ciaB*, *wlaN*, *virB11* e *racR* não foram detectados em nenhuma das 63 linhagens de *Campylobacter coli* estudadas (Tabela 12). O fato do gene *virB11* não ter sido detectado em nenhuma das linhagens estudadas pode estar relacionado a perda do plasmídeo pVir durante o processo de extração do DNA ou pode ser atribuído a fonte de isolamento de *Campylobacter* conforme anteriormente descrito por Louwen *et al.* (2006).

Diante dos dados descritos acima torna-se importante ressaltar a necessidade de estudos que tenham como objetivo a elucidação do processo de patogênese dessas linhagens, pois a maioria dos estudos foram realizados com linhagens de *Campylobacter jejuni* e pouco se sabe sobre as proteínas essenciais para a patogênese de *Campylobacter coli*. Ademais, a ausência de genes ditos essenciais para patogênese de *Campylobacter jejuni* nas linhagens de *Campylobacter coli* sugere que outros genes possam estar envolvidos nesse processo para essa última espécie mencionada.

A gastroenterite causada por *Campylobacter coli* é, normalmente, autolimitada e dispensa o uso de antimicrobianos, necessitando apenas de uma reposição hidroeletrólítica. No entanto, pacientes imunocomprometidos ou infecções sistêmicas e crônicas associadas à infecção por *Campylobacter coli* devem ser tratadas com antibioticoterapia, e nesses casos os

medicamentos de escolha são macrolídeos, tetraciclina e fluoroquinolonas (Silva *et al.*, 2011; Duarte *et al.*, 2014).

Uma alta prevalência de linhagens de *Campylobacter* spp. resistentes a vários antibióticos tem sido relatada por pesquisadores de diversos locais do mundo. Como exemplo, podemos citar o estudo feito por Duarte e colaboradores no qual 192 linhagens de *Campylobacter* spp isoladas em Portugal foram testadas quanto a susceptibilidade a diversos antibióticos e 91,3% das linhagens foram resistentes a ciprofloxacina, 79,6% foram resistentes a tetraciclina e 86% dos isolados foram resistentes a três ou mais classes de antibióticos (Duarte *et al.*, 2014). No ano de 2012, segundo dados da EFSA (EFSA, 2014), 96,9% das linhagens de *Campylobacter jejuni* isoladas de frangos de corte na Espanha eram resistentes a ciprofloxacina e 90,6% eram resistentes a tetraciclina (EFSA, 2014).

Em nosso estudo, foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) para as 63 linhagens de *Campylobacter coli* frente aos antimicrobianos eritromicina, ciprofloxacina, tetraciclina e doxaciclina. A maioria das linhagens (66,7%) apresentaram-se susceptível aos antimicrobianos testados (Tabela 13). Das 21 (33,3%) linhagens resistentes, nove foram isoladas de ambiente, seis foram isoladas de humanos, três foram isoladas de animais e três foram isoladas de alimentos.

Dentre as nove linhagens ambientais resistentes, oito linhagens, isoladas entre os anos de 1998 e 2004, apresentaram resistência aos antimicrobianos tetraciclina e doxaciclina e uma linhagem, isolada no ano de 1996, apresentou resistência a eritromicina e ciprofloxacina simultaneamente. Das seis linhagens resistentes isoladas de humanos, quatro linhagens, isoladas entre os anos de 1998 e 2001, foram resistentes a ciprofloxacina, duas linhagens isoladas nos anos de 2002 e 2003 foram resistentes aos antibióticos tetraciclina e doxaciclina. Dentre as três linhagens de origem animal que foram resistentes, uma linhagem isolada em 2002 foi resistente a ciprofloxacina, a segunda linhagem, isolada no ano de 2003, foi resistente aos antibióticos da classe das tetraciclina e a terceira linhagem, isolada no ano de 2007, foi resistente aos antibióticos tetraciclina, doxaciclina e a ciprofloxacina, simultaneamente. Dentre as três linhagens de alimentos resistentes, duas foram isoladas no ano de 2010 e uma foi resistente somente a ciprofloxacina enquanto a outra foi resistente a ciprofloxacina e aos antimicrobianos da classe das tetraciclina, a terceira linhagem foi isolada no ano de 2011 e apresentou-se resistente a eritromicina. É importante salientar que a classe das tetraciclina e a ciprofloxacina foram os antibióticos com o maior número de

linhagens resistentes e que o aparecimento substancial de linhagens resistentes ocorreu após o ano de 1998.

Diferentemente do que pode ser observado em uma grande variedade de estudos mundiais (Duarte *et al.*, 2014; Lazou *et al.*, 2014; Giannatale *et al.*, 2014), as 63 linhagens de *Campylobacter coli* estudadas apresentaram baixas taxas de resistência frente aos antimicrobianos testados. No entanto, a resistência bacteriana em qualquer escala é uma grande preocupação mundial que vem sendo amplamente discutida. Campanhas ressaltando a necessidade do uso racional dos antimicrobianos têm sido direcionadas à medicina humana e animal, e uma intensa tentativa de conscientização sobre os perigos da utilização de antimicrobianos na agricultura vem sendo realizada (Phillips *et al.*, 2004).

Nos anos 1970 foi descrita a emergência de bactérias resistentes em animais devido ao uso clínico e não clínico dos antimicrobianos em veterinária, no entanto a hipótese dessa resistência tornar-se uma preocupação mundial não foi levada em consideração, pois os dados disponíveis sobre o assunto eram escassos (Mateu; Martin, 2001).

Os antimicrobianos utilizados em animais pertencem essencialmente às mesmas classes de antimicrobianos usados em seres humanos, o que é preocupante, pois as bactérias isoladas podem ser reservatório de genes de resistência, com papel na disseminação desta resistência às bactérias patogênicas e comensais (Srinivasan *et al.*, 2007). Dados da literatura relataram que após a introdução das fluoroquinolonas para uso em medicina veterinária nos anos 1990, houve evidência do aumento da resistência à essa classe de antimicrobianos em bactérias isoladas de seres humanos, inclusive com similaridade genômica a amostras isoladas de animais (Mateu; Martin, 2001).

De acordo com a União Europeia, no ano de 1997, foram consumidos para uso veterinário 3.994 toneladas de antimicrobianos, sendo 2.294 toneladas de tetraciclina, 424 toneladas de macrolídeos, 322 toneladas de penicilinas, 154 toneladas de aminoglicosídeos, 75 toneladas de sulfatrimetoprima e 43 toneladas de fluoroquinolonas, dentre outros antimicrobianos (Schwarz *et al.*, 2001). Além do uso veterinário, alguns ecossistemas como efluentes de hospitais humanos e de fazendas, sofrem com a liberação constante de antimicrobianos, o que pode modificar a atividade metabólica da microbiota desses, sendo que alguns tipos de antimicrobianos não são biodegradáveis, permanecendo longo período no ambiente (Martinez, 2009).

Diante disso, e da alta relação existente entre os animais e seres humanos, esforços coordenados e uma ampla abordagem ecológica devem ser realizados afim de se instituir o

uso racional desses fármacos, implementar medidas adequadas que diminuam a transmissão da resistência na cadeia alimentar, dentre outras medidas. Da mesma maneira, a redução da eliminação desses agentes no meio ambiente é essencial.

Vários métodos de tipagem molecular, tais como *pulsed field gel electrophoresis* (PFGE), sequenciamento da pequena região variável (*short variable region*, SVR) do gene *flaA*, *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR), *high resolution melting analysis* (HRMA), *multilocus sequence typing* (MLST) entre outros, têm sido utilizados nos estudos epidemiológicos e na caracterização da diversidade genotípica de bactérias do gênero *Campylobacter* (Price *et al.*, 2007; Aquino *et al.*, 2010; Ahmed *et al.*, 2012; Wieczorek *et al.*, 2013).

No presente estudo, a análise da diversidade genotípica das 63 linhagens de *Campylobacter coli* isoladas de humanos (12), animais (21), ambiente (20) e alimentos (10), no Brasil, entre os anos de 1995 e 2011, foi realizada pelas metodologias de PFGE, SVR-*flaA*, CRISPR-HRMA e MLST.

O PFGE é uma das metodologias disponíveis mais discriminatórias para a genotipagem de *Campylobacter* spp. (Rozynek *et al.*, 2010; Lazou *et al.*, 2014). Em nosso estudo, o dendrograma de similaridade genética gerado a partir do perfil dos fragmentos obtidos por PFGE revelou 45 diferentes PFGE-tipos e o índice de discriminação foi igual a 0.986. As linhagens estudadas foram agrupadas em dois grupos principais, denominados PFGE-A e PFGE-B, com similaridade genômica de 44,9% entre eles. As linhagens CCAMP 1000 e CCAMP 502 que não foram agrupadas e apresentaram uma diversidade genômica de mais de 42,3% com relação as outras linhagens (Figura 5).

O PFGE-A agrupou 45 linhagens com 48,4% de similaridade genômica, sendo que nove linhagens foram isoladas de humanos, 16 linhagens foram isoladas de animal, 12 linhagens foram isoladas de ambiente e oito linhagens foram isoladas de alimentos no período de 1995 a 2011, nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais. Embora esta análise tenha demonstrado uma alta diversidade genômica entre as linhagens estudadas, algumas linhagens apresentaram uma alta similaridade genotípica de mais de 80% entre elas e foram agrupadas em sete subgrupos denominados PFGE-A1, PFGE-A2, PFGE-A3, PFGE-A4, PFGE-A5, PFGE-A6 e PFGE-A7. O grupo PFGE-B agrupou 16 linhagens (25,4%), exibindo similaridade de 55,5%, isoladas de humanos (2), alimentos (2), animais (4) e ambiente (8), durante os anos de 1995 e 2010, nos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro. Da

mesma maneira, as linhagens que exibiram similaridade genômica de mais de 80% foram agrupadas em três subgrupos denominados PFGE-B1, PFGE-B2 e PFGE-B3 (Figura 5).

Especificamente, a análise dos subgrupos PFGE-A1, PFGE-A3, PFGE-A4, PFGE-A5, PFGE-A6, PFGE-B2 e PFGE-B3 sugerem que, possivelmente, uma contaminação entre fontes clínicas e não clínicas ocorreu, ao longo de 16 anos, no nosso país. O subgrupo PFGE-A1 agrupou nove linhagens, exibindo similaridade de 81,6%, isoladas de humanos (2), animais (2), ambiente (5), entre os anos de 1996 e 2004, nos Estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais. O subgrupo PFGE-A3 agrupou quatro linhagens, com similaridade de 85,7%, isoladas de humano (1), animais (2) e ambiente (1), entre os anos de 1996 e 2004 no Estado do Rio de Janeiro. O subgrupo PFGE-A4 agrupou duas linhagens, indistinguíveis, isoladas de ambiente e animal, nos anos de 1997 e 1998, no Estado do Rio de Janeiro. O PFGE-A5 agrupou 11 linhagens, com similaridade de 81,4%, isoladas de humanos (4), animais (2) e alimentos (5) entre os anos de 1996 e 2011, no Estado do Rio de Janeiro. O PFGE-A6 agrupou três linhagens, com similaridade de 88,9%, duas linhagens presentes neste subgrupo foram indistinguíveis entre si, sendo uma isolada de ambiente no ano de 1995 e a outra isolada de animal no ano de 1996. A terceira linhagem foi isolada de animal no ano de 2003 e todas as linhagens pertencentes a esse subgrupo foram isoladas no Estado do Rio de Janeiro. O PFGE-B2 agrupou duas linhagens, indistinguíveis, isoladas de ambiente e animal, em 1995, no Estado do Rio de Janeiro e o PFGE-B3 agrupou nove linhagens, com similaridade de 84,1%, isoladas de animais (3), e ambiente (6), entre os anos de 1995 e 2000, no Estado do Rio de Janeiro (Figura 5).

Em contraposição, estudos realizados em diferentes países revelaram uma alta diversidade genômica entre as linhagens de *Campylobacter* spp. tipadas por PFGE (Hanninen *et al.*, 2000; Denis *et al.*, 2009; Magnusson *et al.*, 2011; O'Leary *et al.*, 2011; Wiczorek *et al.*, 2013; Lazou *et al.*, 2014).

A alta similaridade genômica observada entre algumas linhagens do nosso estudo sugerem que o meio ambiente e os alimentos possam ter sido uma possível fonte de contaminação para humanos e animais, ao longo de 16 anos, no Brasil.

O sequenciamento da *short variable region* (SVR) do gene *flaA* tem sido descrito como um método simples e confiável para a genotipagem de espécies de *Campylobacter*, fornecendo resultados altamente reprodutíveis (Meinersmann *et al.*, 1997; Wirz *et al.*, 2010). Em nosso estudo, o sequenciamento da SVR do gene *flaA* apresentou um poder discriminatório próximo ao do PFGE com valor do índice de discriminação igual a 0,916. A

análise do dendrograma, construído a partir das sequências da SVR do gene *flaA* das 63 linhagens de *Campylobacter coli* estudadas, agrupou as linhagens em dois principais grupos, denominados SVR-A e SVR-B, exibindo similaridade de 83,1% entre eles (Figura 6).

À semelhança do que foi observado no PFGE, a análise do dendrograma da SVR do gene *flaA* sugere que uma possível contaminação tenha ocorrido entre fontes clínicas e não clínicas, ao longo de 16 anos, no Brasil, como podemos observar através da análise dos subgrupos SVR-A1, SVR-B1 e SVR-B2. O subgrupo SVR-A1 agrupou seis linhagens, com similaridade de 98,7%, isoladas de animais (4) e ambiente (2), entre os anos de 1996 e 2004, no Estado do Rio de Janeiro. O SVR-B1 agrupou 38 (60,3%) linhagens, com similaridade acima de 97,3%, isoladas de animais (12), ambiente (17), alimentos (5) e humanos (4), entre os anos de 1995 e 2010, nos Estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais. O SVR-B2 agrupou 18 (28,6%) linhagens, com similaridade de 99,5%, isoladas de alimentos (5), humanos (7) e animais (5), entre os anos de 1995 e 2011, nos Estados do Rio de Janeiro e São Paulo. É importante salientar que algumas linhagens isoladas de diferentes fontes, anos e Estados foram indistinguíveis por essa metodologia (Figura 6).

A existência de uma alta similaridade entre algumas linhagens isoladas no Brasil difere de estudos anteriores realizados em diversos países do mundo, nos quais as linhagens de *Campylobacter coli* apresentaram uma alta diversidade genômica (Harrington *et al.*, 1997; Magnusson *et al.*, 2011; Giacomelli *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014).

As sequências da SVR do gene *flaA* foram depositadas no banco de dados (<http://pubmlst.org/campylobacter/flaA>) e a cada sequência distinta foi dado um número de alelo, o que permitiu a comparação das linhagens estudadas com os alelos descritos no banco de dados. Sete alelos, dentre os 22 encontrados, não haviam sido previamente descritos.

A prevalência de determinados alelos, obtidos a partir da análise da sequência da SVR do gene *flaA*, na população de *Campylobacter* spp. circulante tem sido utilizada com sucesso por diversos grupos de estudo na análise da diversidade genômica de isolados de *Campylobacter*. Duarte e colaboradores (2014) constataram que o alelo 66 foi predominante entre as linhagens de *C. coli* isoladas em Portugal. Da mesma maneira, Wassenaar e colaboradores (2009) constataram que os alelos 15, 36, 8 e 92 foram os mais frequentemente detectados na Islândia. Os alelos 32, 36, 239 e 70 foram os mais detectados na Noruega, e os alelos 34, 36, 32 e 16 foram os mais frequentemente detectados no País Basco, na Espanha (Wassenaar *et al.*, 2009; Duarte *et al.*, 2014).

Em nosso estudo, os alelos mais frequentemente detectados foram o alelo 30 e o 1647 (Figura 6). O alelo 30 foi detectado em linhagens isoladas de humanos, alimentos e animais, entre os anos de 1996 a 2011, nos Estados do Rio de Janeiro e São Paulo, e o alelo 1647, não havia sido anteriormente descrito e, foi detectado em linhagens isoladas de ambientes e animais, entre os anos de 1995 a 2000, no Estado do Rio de Janeiro. Assim, a referida análise dos alelos prevalentes em nosso país, em comparação com os alelos prevalentes em outros locais do mundo, nos permite concluir que a população de *Campylobacter coli* estudada é genotipicamente diferenciada em relação a população de alguns países Europeus.

De acordo com Price e colaboradores (2007), a metodologia de HRMA poderia ser utilizada como uma alternativa para o sequenciamento do DNA, na análise do *locus* CRISPR das espécies de *Campylobacter coli* e *Campylobacter jejuni*. No referido estudo, o *locus* CRISPR de 29 linhagens de *Campylobacter jejuni* foram analisadas por HRMA e oito perfis de *melting* distintos foram identificados em isolados contendo uma única sequência repetida, sendo que perfis contendo sequências idênticas foram indistinguíveis. Dessa maneira, os autores consideraram que a análise do *locus* CRISPR por HRMA era uma técnica com alto poder de diferenciação e que a sua utilização não estaria limitada a análise do *locus* CRISPR em *Campylobacter jejuni* (Price *et al.*, 2007).

Em contraste com o trabalho descrito acima, os resultados obtidos no nosso estudo revelaram um índice de discriminação de 0,550 para essa metodologia, o que indica um baixo poder discriminatório em comparação ao obtido por PFGE e sequenciamento da SVR do gene *flaA*. No presente estudo a técnica agrupou as 63 linhagens de *Campylobacter coli* em apenas quatro perfis de *melting*, sendo que fragmentos de tamanhos diferentes foram agrupados no mesmo perfil (Figura 7). Ademais, nenhuma correlação epidemiológica entre as linhagens estudadas de acordo com o ano, local de isolamento e perfis de *melting* foi observada.

As vantagens do uso da metodologia de MLST (*multilocus sequence typing*) quando comparada às técnicas de genotipagem descritas acima, são a alta reprodutibilidade, um banco de dados público *online* (<http://pubmlst.org/campylobacter/>) e uma nomenclatura comum que possibilita a comparação de resultados entre estudos realizados no mundo todo (Maiden *et al.*, 1998; Behringer *et al.*, 2011; Kovanen *et al.*, 2014). Assim, o MLST vem sendo amplamente utilizado em estudos de genética populacional e epidemiologia molecular de linhagens de *Campylobacter* spp. (Karenlampi *et al.*, 2007; Sheppard *et al.*, 2009; Behringer *et al.*, 2011; de Haan *et al.*, 2013). A grande maioria desses estudos tem demonstrado que certos MLST tipos estão amplamente distribuídos na natureza, sendo detectados em uma grande variedade

de espécies de animais. Entretanto, alguns STs parecem estar estritamente associados a determinados hospedeiros (McCarthy *et al.*, 2007; Sheppard *et al.*, 2009). Ademais, em alguns países, como por exemplo a Finlândia, dados da literatura demonstram a existência de um ST predominante dentre a população de *Campylobacter* spp. circulante no país (Llarena *et al.*, 2015).

No Brasil, pelo nosso conhecimento, não existem artigos publicados onde se utilizou a metodologia de MLST na tipagem de linhagens de *Campylobacter coli*. Dessa forma, estudos que utilizem essa metodologia são de grande importância para que linhagens isoladas em nosso país possam ser inseridas no banco de dados e então comparadas a linhagens de diversos locais do mundo evidenciando suas possíveis relações epidemiológicas.

No presente estudo, o MLST foi utilizado para tipar 20 linhagens de *Campylobacter coli* dentre as 63 linhagens estudadas (Tabela 2*) e, diferentemente do que foi observado pelos pesquisadores citados acima, nossas linhagens não apresentaram correlações entre ST e hospedeiro e não houve um ST prevalente. As combinações dos 7 alelos para as 20 linhagens depositadas no banco de dados geraram 18 STs diferentes dos quais apenas dois, ST 7370 e ST 1581, já haviam sido previamente descritos no banco de dados e o Complexo Clonal predominante foi o CC 828 (Tabela 14). Os 16 STs restantes (ST 7628, ST 7713, ST 7714, ST 7715, ST 7716, ST 7717, ST 7718, ST 7719, ST 7720, ST 7721, ST 7722, ST 7723, ST 7724, ST 7725, ST 7726, ST 7727) não haviam sido descritos no banco de dados (Tabela 14). Ademais, a metodologia de MLST foi a técnica com maior índice de discriminação dentre as utilizadas nesse projeto apresentando valor de 0,989.

O ST 7370 é formado pela linhagem CCAMP 463 isolada do bebedouro de aves, no ano de 2004, no Estado de Minas Gerais - Brasil e a linhagem FC11353 isolada de frango na China. Esse ST é *single locus variant* do ST 860 (Anexo II) representado por 55 linhagens isoladas de humanos, animais e alimentos, entre os anos de 1999 a 2014, na Europa e nos Estados Unidos e *double locus variant* do ST 825 (Anexo III), descrito como um dentre os possíveis ST *Founder*, composto por 187 isolados de alimentos, animais, humanos e ambiente, entre os anos de 2000 a 2015, na Europa e Estados Unidos.

O ST 1581 é um *singleton*, ou seja, não está relacionado a nenhum outro ST existente no banco de dados, sendo composto pela linhagem CCAMP 1067 desse estudo isolada de alimento em 2010 no Estado do Rio de Janeiro, uma linhagem isolada de humano em 2001 na Dinamarca, uma linhagem isolada de animal em 2004 na Holanda e uma linhagem isolada de alimento em 2009 sem local estabelecido.

O ST 7628 foi associado a duas linhagens do presente estudo, a linhagem Cc 01 isolada de humano, em 2002, no Estado de São Paulo e a linhagem CCAMP 1064 isolada de alimento, em 2010, no Estado do Rio de Janeiro. Esse ST é *single locus variant* do ST 7374 representado por uma linhagem isolada de animal, na China, sem ano de isolamento definido. Da mesma maneira, o ST 7724 foi associado as linhagens CCAMP 446 isolada de ambiente, em 2004, no Estado de Minas Gerais e a linhagem CCAMP 165 isolada de animal, em 2003, no Estado do Rio de Janeiro desse estudo e é *double locus variant* do ST 1595 (Anexo IV) composto por 20 linhagens isoladas de humanos, animais, alimentos e ambiente, entre os anos de 2002 a 2014, na Europa. O ST 7722 associado a linhagem CCAMP 182 isolada de animal, em 2003, no Estado do Rio de Janeiro é *single locus variant* do ST 7724.

O ST 7723 foi associado a linhagem CCAMP 394 isolada de animal, em 2004, no Estado do Rio de Janeiro, sendo *single locus variant* do ST 6819 representado por uma linhagem de origem animal isolada em Portugal no ano de 2012. O ST 7715 foi associado a linhagem Cc 10 isolada de humano, em 2003, no Estado de São Paulo, sendo *single locus variant* do ST 2728 representado por uma linhagem de origem animal isolada no Reino Unido em 2003. O ST 7714 foi associado a linhagem Cc 03 isolada de humano, em 2003, no Estado de São Paulo, sendo *single locus variant* do ST 7715.

O ST 7720 foi associado a linhagem CCAMP 1063 isolada de alimento, em 2010, no Estado do Rio de Janeiro, sendo *single locus variant* do ST 1116 representado por seis linhagens isoladas de animais, sem ano de isolamento definido, nos Estados Unidos. O ST 7725 foi associado a linhagem CCAMP 1010 isolada de animal, em 2007, no Estado do Rio de Janeiro, sendo *single locus variant* do ST 854 que possui 300 linhagens isoladas de animais, humanos, ambiente e alimentos, entre os anos de 2002 a 2015, na Europa e Estados Unidos (Anexo V). O ST 7727 foi associado a linhagem CCAMP 1000 isolada de animal, em 2007, no Estado do Rio de Janeiro, sendo *single locus variant* do ST 4309 representado por seis linhagens de origem humana isoladas, na Holanda e na África, entre os anos de 2003 a 2011. O ST 7721 foi associado a linhagem CCAMP 791 isolada de animal, em 1997, no Estado do Rio de Janeiro, sendo *single locus variant* do ST 832 representado por 39 linhagens isoladas de animais, humanos e alimentos, entre os anos de 2001 a 2013, na Europa e Estados Unidos (Anexo VI).

Os STs 7726, 7718, 7713, 7717, 7719 e 7716 são *singletons*, ou seja, não estão relacionados a nenhum outro ST depositado no banco de dados.

Pela análise da Figura 10 podemos observar a enorme quantidade de ST *versus* linhagens depositadas no banco de dados. No momento em que foi gerado este diagrama existiam no banco de dados 7753 linhagens e 7733 STs, o que torna a análise do diagrama completo bastante complexa, todavia a alta diversidade genética desse gênero fica evidenciada. Dessa maneira, fez-se necessária uma modificação do diagrama para que pudéssemos observar nossas amostras com maior clareza (Figura 11).

Os dados de MLST descritos acima sugerem que as linhagens isoladas de diversas fontes no Brasil, ao longo de 16 anos, possuem uma grande diversidade genética entre si e em comparação com as linhagens isoladas em diferentes locais do mundo. Ademais, o compartilhamento do ST 7724 por linhagens isoladas de ambiente e animal, bem como, o fato de linhagens isoladas de humano e alimentos pertencerem ao mesmo ST corroboram com os dados do PFGE e do sequenciamento da SVR do gene *flaA*, sugerindo que uma possível contaminação tenha ocorrido entre fontes clínicas e não clínicas no Brasil. Vale salientar que, nosso grupo de pesquisa foi o primeiro a depositar linhagens de *Campylobacter coli*, isoladas no Brasil, no referido banco de dados.

A pesquisa de genes relacionados à virulência demonstrou uma baixa prevalência da maioria dos genes, ditos essenciais para a patogênese de *Campylobacter jejuni*, entre as linhagens de *Campylobacter coli* estudadas o que ressalta a necessidade de estudos que tenham como objetivo a elucidação do processo de patogênese de *C. coli* e sugere que outros genes possam estar envolvidos nesse processo quando se trata da espécie estudada. Algumas linhagens apresentaram-se resistentes aos antimicrobianos testados, o que é bastante preocupante na medida que nosso estudo demonstrou a ocorrência de uma possível contaminação entre fontes clínicas e não clínicas de isolamento dessas linhagens. Os resultados gerados pela genotipagem por PFGE e sequenciamento da pequena região variável (*short variable region*, SVR) do gene *flaA* demonstraram uma alta similaridade genotípica entre algumas linhagens de *Campylobacter coli*, sugerindo que uma possível contaminação tenha ocorrido entre linhagens isoladas de fontes clínicas e não clínicas ao longo de 16 anos no Brasil. Ademais, diferentemente dos resultados obtidos por Price e colaboradores (2007), a análise do *locus* CRISPR por HRMA apresentou um baixo poder discriminatório e nenhuma inferência pode ser feita a partir desse resultado para as linhagens de *Campylobacter coli* estudadas (Gomes; Souza; Passaglia; Duque; Medeiros; Falcão, enviado para publicação) .

Dentre as quatro técnicas de tipagem molecular realizadas no presente estudo as técnicas de MLST e PFGE foram as mais eficientes em discriminar as linhagens, o que

corroborar com dados da literatura que as consideram como as metodologias mais adequadas para tipagem de *Campylobacter* spp.

Tomados em conjunto, os resultados obtidos neste estudo possibilitaram ampliar os conhecimentos sobre a presença de genes relacionados à virulência, a susceptibilidade frente a antimicrobianos e na diversidade genética de linhagens de *Campylobacter coli* isoladas de humanos, animais, alimentos e ambiente, entre os anos de 1995 e 2011, no Brasil.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

- O potencial patogênico das linhagens de *Campylobacter coli* estudadas não foi evidenciado o que pode estar relacionado ao fato da maioria dos estudos envolvendo o processo de patogênese de *Campylobacter* terem sido realizados para a espécie *Campylobacter jejuni* e não especificamente para *Campylobacter coli*.
- A resistência a eritromicina, ciprofloxacina, tetraciclina e doxaciclina encontrada em algumas linhagens de *Campylobacter coli* estudadas é preocupante, pois tais bactérias podem disseminar genes de resistência à outras *C. coli* isoladas de fontes clínicas e não clínicas no Brasil.
- Os resultados de PFGE e sequenciamento da pequena região variável (*short variable region*, SVR) do gene *flaA* demonstraram uma alta similaridade genética entre algumas linhagens estudadas, sugerindo que o meio ambiente e os alimentos tem sido uma possível fonte de contaminação para humanos e animais, ao longo de 16 anos, no Brasil.
- A análise dos alelos gerados a partir do sequenciamento da SVR do gene *flaA* nos permite concluir que os alelos prevalentes nas *C. coli* estudadas são diferentes daqueles encontrados nos países Europeus.
- A análise do *locus* CRISPR por HRMA demonstrou ser uma metodologia com baixo poder discriminatório e inadequada para a tipagem de *Campylobacter coli*.
- Os dados de MLST sugerem que as linhagens tipadas isoladas de diversas fontes no Brasil, ao longo de 16 anos, possuem uma grande diversidade entre si e em comparação com outras linhagens isoladas em diferentes locais do mundo.
- As técnicas de MLST e PFGE foram mais eficientes em diferenciar as linhagens em comparação ao sequenciamento da pequena região variável do gene *flaA* e análise do *locus* CRISPR por HRMA, de acordo com o índice de discriminação (*D*).

Referências bibliográficas¹

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

8. REFERÊNCIAS

Aarestrup, F. M.; Engberg, J. Antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter*. **Veterinary Research**, v. 32, n. 3-4, p. 311-321, 2001.

Abelson, P. M.; Potter, F.; Hall, G. The annual cost of Foodborne illnesses in Australia. **Australian Government of health and ageing, Canberra**, 2006.

Abley, M. J.; Wittum, T. E.; Moeller, S. J.; Zerby, H. N.; Funk, J. A. Quantification of *Campylobacter* in swine before, during and after the slaughter process. **Journal of Food Protection**, v.75, p.139-143, 2012.

Ahmed, M. U.; Dunn, L.; Ivanova, E. P. Evaluation of Current Molecular Approaches for Genotyping of *Campylobacter jejuni* strains. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, n. 5, p. 375-385, 2012.

Alfredson, D. A.; Korolik, V. Antibiotic resistance and resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **Fems Microbiology Letters**, v. 277, n. 2, p. 123-132, 2007.

Allos, B. M. *Campylobacter jejuni* infections: Update on emerging issues and trends. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 8, p. 1201-1206, 2001.

Aquino, M. H. C.; Filgueiras, A. L. L.; Matos, R.; Santos, K. R. N.; Ferreira, T.; Ferreira, M. C. S. Diversity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* genotypes from human and animal sources from Rio de Janeiro, Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 88, n. 2, p. 214-217, 2010.

Asakura, H.; Brüggemann, H.; Sheppard, S. K.; Ekawa, T.; Meyer, T. F.; Yamamoto, S.; Igimi, S. Molecular Evidence for the Thriving of *Campylobacter jejuni* ST-4526 in Japan. **Plos One**, v. 7, n. 11, p. 15, 2012.

Asakura, M.; Samosornsuk, W.; Hinenoya, A.; Misawa, N.; Nishimura, K.; Matsuhisa, A.; Yamasaki, S. Development of a cytolethal distending toxin (cdt) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the detection and identification of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter fetus*. **Fems Immunology and Medical Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 260-266, 2008.

Bacon, D. J.; Alm, R. A.; Burr, D. H.; Hu, L.; Kopecko, D. J.; Ewing, C. P.; Trust, T. J.; Guerry, P. Involvement of a plasmid in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 8, p. 4384-4390, 2000.

Bang, D. D.; Nielsen, E. M.; Scheutz, F.; Pedersen, K.; Handberg, K.; Madsen, M. PCR detection of seven virulence and toxin genes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from Danish pigs and cattle and cytolethal distending toxin production of the isolates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, n. 6, p. 1003-1014, 2003.

Batchelor, R. A.; Pearson, B. M.; Friis, L. M.; Guerry, P.; Wells, J. M. Nucleotide sequences and comparison of two large conjugative plasmids from different *Campylobacter* species. **Microbiology-Sgm**, v. 150, p. 3507-3517, 2004.

Behringer, M.; Miller, W. G.; Oyarzabal, O. A. Typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from live broilers and retail broiler meat by flaA-RFLP, MLST, PFGE and REP-PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v. 84, n. 2, p. 194-201, 2011.

Bikard, D.; Hatoum-Aslan, A.; Mucida, D.; Marraffini, L. A. CRISPR Interference can prevent Natural Transformation and Virulence Acquisition during In Vivo bacterial infection. **Cell Host & Microbe**, v. 12, n. 2, p. 177-186, 2012.

Biswas, D.; Hannon, S. J.; Townsend, H. G.; Potter, A.; Allan, B. J. Genes coding for virulence determinants of *Campylobacter jejuni* in human clinical and cattle isolates from Alberta, Canada, and their potential role in colonization of poultry. **International Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 25-32, 2011.

Blaser, M. J. Role of the s-layer proteins of *campylobacter fetus* in serum-resistance and antigenic variation - a model of bacterial pathogenesis. **American Journal of the Medical Sciences**, v. 306, n. 5, p. 325-329, 1993.

Blaser, M. J.; Hardesty, H. L.; Powers, B.; Wang, W. L. Survival of *Campylobacter fetus* subsp *jejuni* in biological milieus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 309-313, 1980.

Blaser, M. J.; Perez, G. P.; Smith, P. F.; Patton, C. Tenover, F. C.; Lastovica, A. J.; Wang, W. I. Extraintestinal *Campylobacter jejuni* and *campylobacter coli* infections - host factors and strain characteristics. **Journal of Infectious Diseases**, v. 153, n. 3, p. 552-559, 1986.

Blaser, M. J.; Smith, P. F.; Hopkins, J. A.; Heinzer, I.; Bryner, J. H.; Wang, W. L. Pathogenesis of *Campylobacter fetus* infections - serum resistance associated with high-molecular-weight surface-proteins. **Journal of Infectious Diseases**, v. 155, n. 4, p. 696-706, 1987.

Blasi, R. S.; Macedo, R. E. F.; Malaquias, M. A. S.; Franchin, P. R.. Prevalence, strain identification and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. isolated from slaughtered pig carcasses in Brazil. **Food Control**, v. 22, n. 5, p. 702-707, 2011.

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

Campioni, F.; Falcao, J. P. Genotypic diversity and virulence markers of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A strains isolated from clinical and non-clinical origins. **Apmis**, v. 122, n. 3, p. 215-222, 2014.

Carrillo, C. D.; Taboada, E.; Nash, J. H.; Lanthier, P.; Kelly, J.; Lau, P. C.; Verhulp, R.; Mykytczuk, O.; Sy, J.; Findlay, W. A.; Amoako, K.; Gomis, S.; Willson, P.; Austin, J. W.; Potter, A.; Babiuk, L.; Allan, B.; Szymanski, C. M. Genome-wide expression analyses of *Campylobacter jejuni* NCTC11168 reveals coordinate regulation of motility and virulence by *flhA*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 19, p. 20327-20338, 2004.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). **National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases**, 2015. Acessado em 23 de junho de 2015, disponível em: <http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/campylobacter>.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet): **FoodNet Surveillance Report for 2011 (Final Report)**. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, 2012.

CLSI. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; Approved Guideline – Second Edition. CLSI document M45-A2. Wayne, P. A. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2010.

Cooper, J. E.; Feil, E. J. Multilocus sequence typing - what is resolved? **Trends in Microbiology**, v. 12, n. 8, p. 373-377, 2004.

Corry, J. E. L.; Post, D. E.; Colin, P.; Laisney, M. J. Culture media for the isolation of *Campylobacters*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 26, n. 1, p. 43-76, 1995.

Crushell, E.; Harty, S.; Sharif, F.; Bourke, B. Enteric *Campylobacter*: Purging its secrets? **Pediatric Research**, v. 55, n. 1, p. 3-12, 2004.

D'Lima, C. B.; Miller, W. G.; Mandrell, R. E.; Wright, S. L.; Siletzky, R. M.; Carver, D. K.; Kathariou, S. Clonal population structure and specific genotypes of multidrug-resistant *Campylobacter coli* from turkeys. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 7, p. 2156-2164, 2007.

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

de Haan, C. P. A.; Lampén, K.; Corander, J.; Hänninen, M. L. Multilocus Sequence Types of Environmental *Campylobacter jejuni* isolates and their similarities to those of Human, Poultry and Bovine *C. jejuni* isolates. **Zoonoses and Public Health**, v. 60, n. 2, p. 125-133, 2013.

Denis, M.; Chidaine, B.; Laisney, M. J.; Kempf, I.; Rivoal, K.; Mégraud, F.; Fravallo, P. Comparison of genetic profiles of *Campylobacter* strains isolated from poultry, pig and *Campylobacter* human infections in Brittany, France. **Pathologie Biologie**, v. 57, n. 1, p. 23-29, 2009.

Denis, M.; Refrégier-Petton, J.; Laisney, M. J.; Ermel, G.; Salvat, G. *Campylobacter* contamination in French chicken production from farm to consumers. Use of a PCR assay for detection and identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 2, p. 255-267, 2001.

Denis, M.; Soumet, C.; Rivoal, K.; Ermel, G.; Blivet, D.; Salvat, G.; Colin, P. Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, n. 6, p. 406-410, 1999.

Dingle, K. E.; Van Den Braak, N.; Colles, F. M.; Price, L. J.; Woodward, D. L.; Rodgers, F. G.; Endtz, H. P.; Van Belkum, A.; Maiden, M. C. Sequence typing confirms that *Campylobacter jejuni* strains associated with Guillain-Barre and Miller-Fisher syndromes are of diverse genetic lineage, serotype, and flagella type. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 9, p. 3346-3349, 2001.

Duarte, A.; Santos, A.; Manageiro, V.; Martins, A.; Fraqueza, M. J.; Caniça, M.; Domingues, F. C.; Oleastro, M. Human, food and animal *Campylobacter* spp. isolated in Portugal: High genetic diversity and antibiotic resistance rates. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 44, n. 4, p. 306-313, 2014.

EFSA. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. **EFSA Journal**, v. 13(1), p. 3991, 2015.

EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. **EFSA Journal** 12, p. 3547–312, 2014.

EFSA. The community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. **The EFSA Journal** 2010, 1–288, 2010.

EFSA. The community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in the European union in 2007. **EFSA Journal** 223, p. 223–440, 2009.

EFSA 2007. The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union 2006. **The EFSA Journal** 2007, 2007.

Engberg, J. Contributions to the epidemiology of *Campylobacter* infections - A review of clinical and microbiological studies. **Danish Medical Bulletin**, v. 53, n. 4, p. 361-389, 2006.

Engberg, J.; Aarestrup, F. M.; Taylor, D. E.; Gerner-Smidt, P.; Nachamkin, I. Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: Resistance mechanisms and trends in human isolates. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 1, p. 24-34, 2001.

Fernandes, M.; Mena, C.; Silva, J.; Teixeira, P. Study of Cytolethal Distending Toxin (cdt) in *Campylobacter coli* using a Multiplex Polymerase Chain Reaction assay and its distribution among clinical and food Strains. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 1, p. 103-106, 2010.

Fields, J. A.; Thompson, S. A. *Campylobacter jejuni* CsrA mediates oxidative stress responses, biofilm formation, and host cell invasion. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 9, p. 3411-3416, 2008.

Filgueiras, A. L. L.; Hofer, E. Occurrence of thermophilic campylobacter in different points of a sewage-treatment station in Rio de Janeiro, RJ. **Revista De Microbiologia**, v. 20, n. 3, p. 303-308, 1989.

Fitzgerald, C.; Helsel, L.O.; Nicholson, M. A.; Olsen, S. J.; Swerdlow, D. L.; Flahart, R.; Sexton, J.; Fields, P. I. Evaluation of methods for subtyping *Campylobacter jejuni* during an outbreak involving a food handler. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 7, p. 2386-2390, 2001.

Foley, S. L.; Lynne, A. M.; Nayak, R. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. **Infection Genetics and Evolution**, v. 9, n. 4, p. 430-440, 2009.

Fouts, D. E.; Mongodin, E. F.; Mandrell, R. E.; Miller, W. G.; Rasko, D. A.; Ravel, J.; Brinkac, L. M.; DeBoy, R. T.; Parker, C. T.; Daugherty, S. C.; Dodson, R. J.; Durkin, A. S.; Madupu, R.; Sullivan, S. A.; Shetty, J. U.; Ayodeji, M. A.; Shvartsbeyn, A.; Schatz, M. C.; Badger, J. H.; Fraser, C. M.; Nelson, K. E. Major structural differences and novel potential virulence mechanisms from the genomes of multiple *Campylobacter* species. **Plos Biology**, v. 3, n. 1, p. 72-85, 2005.

Foxman, B.; Zhang, L.; Koopman, J.S.; Manning, S.D.; MARRS, C. F. Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. **Epidemiologic Perspectives & Innovations**, 2005.

Franchin, P. R.; Battistella, P. M. D.; Vieira, C. R. Evaluation of multi-sequential interventions with water to reduce microbial loading as applied to chicken carcasses during slaughtering - a review. **Worlds Poultry Science Journal**, v.66, p. 203-213, 2010.

Franchin, P. R.; Ogliari, P. J.; Batista, C. R. V. Frequency of thermophilic *Campylobacter* in broiler chickens during industrial processing in a Southern Brazil slaughterhouse. **British Poultry Science**, v. 48, n. 2, p. 127-132, 2007.

Fridovich, I. Superoxide Dismutases. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v. 58, p. 61-97, 1986.

Friedman, C. R.; Hoekstra, R. M.; Samuel, M.; Marcus, R.; Bender, J.; Shiferaw, B.; Reddy, S.; Ahuja, S. D.; Helfrick, D. L.; Hardnett, F.; Carter, M.; Anderson, B.; Tauxe, R. V.; Emerging Infections Program FoodNet Working Group. Risk factors for sporadic *Campylobacter* infection in the United States: A case-control study in FoodNet sites. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, p. S285-S296, 2004.

Gallay, A.; Prouzet-Mauléon, V.; Kempf, I.; Lehours, P.; Labadi, L.; Camou, C.; Denis, M.; de Valk, H.; Desenclos, J. C.; Mégraud, F. *Campylobacter* antimicrobial drug resistance

among humans, broiler chickens, and pigs, France. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 2, p. 259-266, 2007.

Garenaux, A.; Jugiau, F.; Rama, F.; de Jonge, R.; Denis, M.; Federighi, M.; Ritz, M. Survival of *Campylobacter jejuni* strains from different origins under oxidative stress conditions: Effect of temperature. **Current Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 293-297, 2008.

Garneau, J. E.; Dupuis, M. È; Villion, M.; Romero, D. A.; Barrangou, R.; Boyaval, P.; Fremaux, C.; Horvath, P.; Magadán, A. H.; Moineau, S. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, v. 468, n. 7320, p. 67, 2010.

Giacomelli, M.; Andrighetto, C.; Rossi, F.; Lombardi, A.; Rizzotti, L.; Martini, M.; Piccirillo A. Molecular characterization and genotypic antimicrobial resistance analysis of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from broiler flocks in northern Italy. **Avian Pathology**, v. 41, n. 6, p. 579-588, 2012.

Di Giannatale, E.; Di Serafino, G.; Zilli, K.; Alessiani, A.; Sacchini, L.; Garofolo, G.; Aprea, G.; Marotta, F. Characterization of antimicrobial resistance patterns and detection of virulence genes in *Campylobacter* isolates in Italy. **SENSORS**, v.14, p. 3308-3322, 2014.

Gibreel, A.; Taylor, D. E. Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. 2, p. 243-255, 2006.

Gillespie, I. A.; O'Brien, S. J.; Frost, J. A.; Adak, G. K.; Horby, P.; Swan, A. V.; Painter, M. J.; Neal, K. R. *Campylobacter* Sentinel Surveillance Scheme Collaborators. A case-case comparison of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* infection: A tool for generating hypotheses. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 937-942, 2002.

Goering, R. V. Pulsed field gel electrophoresis: A review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. **Infection Genetics and Evolution**, v. 10, n. 7, p. 866-875, 2010.

Golden, N. J.; Acheson, D. W. K. Identification of motility and auto agglutination *Campylobacter jejuni* mutants by random transposon mutagenesis. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 4, p. 1761-1771, 2002.

Gomes, F. R.; Curcio, B. R.; Ladeira, S. R. L.; Fernández, H.; Meireles, M. C. A. *Campylobacter Jejuni* Occurrence In Chicken Fecal Samples From Small Properties In Pelotas, Southern Of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, n.37, p.375-378, 2006.

Gonzalez, I.; Grant, K. A.; Richardson, P. T.; Park, S. F.; Collins, M. D. Specific identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using a PCR test based on the *ceuE* gene encoding a putative virulence determinant. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 759-763, 1997.

Gonzalez-Hein, G.; Huaracán, B.; García, P.; Figueroa, G. Prevalence of virulence genes in strains of *Campylobacter jejuni* isolated from human, bovine and broiler. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1223-1229, 2013.

Goodwin, C. S.; Armstrong, J. A.; Chilvers, T.; Peters, M.; Collins, M. D.; Sly, L.; McConnell, W.; Harper, W. E. S. Transfer of *Campylobacter-pylori* and *Campylobacter-mustelae* to *Helicobacter* gen-nov as *Helicobacter pylori* comb-nov and *Helicobacter mustelae* comb-nov, respectively. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 39, n. 4, p. 397-405, 1989.

Gras, L. M.; Smid, J. H.; Wagenaar, J. A.; Koene, M. G.; Havelaar, A. H.; Friesema, I. H.; French, N. P.; Flemming, C.; Galson, J. D.; Graziani, C.; Busani, L.; VAN Pelt, W. Increased risk for *Campylobacter jejuni* and *C. coli* infection of pet origin in dog owners and evidence for genetic association between strains causing infection in humans and their pets. **Epidemiology and Infection**, v. 141, n. 12, p. 2526-2535, 2013.

Greig, J. R. Quinolone resistance in *Campylobacter*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 3, p. 740-741, 2003.

Groenen, P. M. A.; Bunschoten, A. E.; van Soolingen, D.; van Embden, J. D. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis* - Application for strain differentiation by a novel typing method. **Molecular Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 1057-1065, 1993.

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

Guerry, P.; Ewing, C. P.; Schirm, M.; Lorenzo, M.; Kelly, J.; Pattarini, D.; Majam, G.; Thibault, P.; Logan, S. Changes in flagellin glycosylation affect *Campylobacter* autoagglutination and virulence. **Molecular Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 299-311, 2006.

Gunther, N. W.; Chen, C. Y. The biofilm forming potential of bacterial species in the genus *Campylobacter*. **Food Microbiology**, v. 26, n. 1, p. 44-51, 2009.

Gurtler, M.; Alter, T.; Kasimir, S.; Fehlhäber, K. The importance of *Campylobacter coli* in human campylobacteriosis: prevalence and genetic characterization. **Epidemiology and Infection**, v. 133, n. 6, p. 1081-1087, 2005.

Hanninen, M. L.; Perko-Mäkelä, P.; Pitkälä, A.; Rautelin, H. A three-year study of *Campylobacter jejuni* genotypes in humans with domestically acquired infections and in chicken samples from the Helsinki area. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 5, p. 1998-2000, 2000.

Harrington, C. S.; Thomson-Carter, F. M.; Carter, P. E. Evidence for recombination in the flagellin locus of *Campylobacter jejuni*: Implications for the flagellin gene typing scheme. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 9, p. 2386-2392, 1997.

Havelaar, A. H.; Ivarsson, S.; Lofdahl, M.; Nauta, M. J. Estimating the true incidence of campylobacteriosis and salmonellosis in the European Union, 2009. **Epidemiology and Infection**, v. 141, p. 293-302, 2013.

Hendrixson, D. R.; DiRita, V. J. Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in commensal colonization of the chick gastrointestinal tract. **Molecular Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 471-484, 2004.

Hickey, T. E.; McVeigh, A. L.; Scott, D. A.; Michielutti, R. E.; Bixby, A.; Carroll, S. A.; Bourgeois, A. L.; Guerry, P. *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin mediates release of interleukin-8 from intestinal epithelial cells. **Infection and Immunity**, n. 68, p. 6535-6541, 2000.

Hofinger, B. J.; Jing, H. C.; Hammond-Kosack, K. E.; Kanyuka, K. High-resolution melting analysis of cDNA-derived PCR amplicons for rapid and cost-effective identification of novel alleles in barley. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 119, n. 5, p. 851-865, 2009.

Hunter, P. R. Reproducibility and indexes of discriminatory power of microbial typing methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 9, p. 1903-1905, 1990.

Hunter, P. R.; Gaston, M. A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems - an application of simpsons index of diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 11, p. 2465-2466, 1988.

Igimi, S.; Okada, Y.; Ishiwa, A.; Yamasaki, M.; Morisaki, N.; Kubo, Y.; Asakura, H.; Yamamoto, S. Antimicrobial resistance of *Campylobacter*: prevalence and trends in Japan.

Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment, v. 25, n. 9, p. 1080-1083, 2008.

Jore S, Viljugrein H, Brun E, et al. Trends in *Campylobacter* incidence in broilers and humans in six European countries, 1997-2007. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 93(1), p. 33-41, 2010.

John, A.; Connerton, P. L.; Cummings, N.; Connerton, I. F. Profound differences in the transcriptome of *Campylobacter jejuni* grown in two different, widely used, microaerobic atmospheres. **Research in Microbiology**, v. 162, n. 4, p. 410-418, 2011.

Karenlampi, R.; Rautelin, H.; Hanninen, M. L. Evaluation of genetic markers and molecular typing methods for prediction of sources of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* infections. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 5, p. 1683-1685, 2007.

Karenlampi, R.; Rautelin, H.; Schönberg-Norio, D.; Paulin, L.; Hänninen, M. L. Longitudinal study of Finnish *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolates from humans, using multilocus sequence typing, including comparison with epidemiological data and isolates from poultry and cattle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 1, p. 148-155, 2007.

Ketley, J. M. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. **Microbiology-Uk**, v. 143, p. 5-21, 1997.

Khalid, M. I.; Tang, J. Y.; Baharuddin, N. H.; Rahman, N. S.; Rahimi, N. F.; Radu, S. Prevalence, Antibigram, and cdt Genes of Toxigenic *Campylobacter jejuni* in Salad Style Vegetables (Ulam) at Farms and Retail Outlets in Terengganu. **Journal of Food Protection**, v. 78, n. 1, p. 65-71, 2015.

Kim, J. S.; Kim, J. W.; Kathariou, S. Differential effects of temperature on natural transformation to erythromycin and nalidixic acid resistance in *Campylobacter coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 19, p. 6121-6125, 2008.

Konkel, M. E.; Kim, B. J.; Klena, J. D.; Young, C. R.; Ziprin, R.. Characterization of the thermal stress response of *Campylobacter jejuni*. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 8, p. 3666-3672, 1998.

Konkel, M. E., S. A. Gray, B. J. Kim, S. G. Garvis, and J. Yoon. Identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* based on the cadF virulence gene and its product. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, p. 510–517, 1999.

Konkel, M. E.; Klena, J. D.; Rivera-Amill, V.; Monteville, M. R.; Biswas, D.; Raphael, B.; Mickelson, J. Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is dependent on a functional flagellar export apparatus. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 11, p. 3296-3303, 2004.

Kovanen, S. M.; Kivistö, R. I.; Rossi, M.; Hänninen, M. L. A combination of MLST and CRISPR typing reveals dominant *Campylobacter jejuni* types in organically farmed laying hens. **Journal of Applied Microbiology**, v. 117, n. 1, p. 249-257, 2014.

Lara-Tejero, M.; Galan, J. E. CdtA, CdtB, and CdtC form a tripartite complex that is required for cytolethal distending toxin activity. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 7, p. 4358-4365, 2001.

Lara-Tejero, M. D.; Galan, J. E. A bacterial toxin that controls cell cycle progression is deoxyribonuclease I-like protein. **Molecular Biology of the Cell**, v. 11, p. 433A-433A, 2000.

Lazou, T.; Houf, K.; Soultos, N.; Dovas, C.; Iossifidou, E. *Campylobacter* in small ruminants at slaughter: Prevalence, pulsotypes and antibiotic resistance. **International Journal of Food Microbiology**, v. 173, p. 54-61, 2014.

Levesque, S.; Michaud, S.; Arbeit, R. D.; Frost, E. H. High-Resolution Melting System to Perform Multilocus Sequence Typing of *Campylobacter jejuni*. **Plos One**, v. 6, n. 1, p. 9, 2011.

Linton, D.; Gilbert, M.; Hitchen, P. G.; Dell, A.; Morris, H. R.; Wakarchuk, W. W.; Gregson, N. A.; Wren, B. W. Phase variation of a beta-1,3 galactosyltransferase involved in generation of the ganglioside GM(1)-like lipo-oligosaccharide of *Campylobacter jejuni*. **Molecular Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 501-514, 2000.

Linton, D.; Lawson, A. J.; Owen, R. J.; Stanley, J. PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 10, p. 2568-2572, 1997.

Llarena, A. K.; Huneau, A.; Hakkinen, M.; Hänninen, M. L. Predominant *Campylobacter jejuni* sequence types persist in Finnish chicken production. **Plos One**, v. 10, n. 2, p. 18, 2015.

Logan, S. M.; Trust, T. J.; Guerry, P. Evidence for posttranslational modification and gene duplication of *Campylobacter* flagellin. **Journal of Bacteriology**, v. 171, n. 6, p. 3031-3038, 1989.

Louwen, R. P. L.; van Belkum, A.; Wagenaar, J. A.; Doorduyn, Y.; Achterberg, R.; Endtz, H. P. Lack of association between the presence of the pVir plasmid and bloody diarrhea in *Campylobacter jejuni* enteritis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1867-1868, 2006.

Luangtongkum, T.; Morishita, T. Y.; Ison, A. J.; Huang, S.; McDermott, P. F.; Zhang, Q. Effect of conventional and organic production practices on the prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. in poultry. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 3600–3607, 2006.

Lucey, B.; Cryan, B.; O'Halloran, F.; Wall, P. G.; Buckley, T.; Fanning, S. Trends in antimicrobial susceptibility among isolates of *Campylobacter* species in Ireland and the emergence of resistance to ciprofloxacin. **Veterinary Record**, v. 151, n. 11, p. 317-320, 2002.

Magnusson, S. H.; Guðmundsdóttir, S.; Reynisson, E.; Rúnarsson, A. R.; Harðardóttir, H.; Gunnarson, E.; Georgsson, F.; Reiersen, J.; Marteinson, V. T. Comparison of *Campylobacter jejuni* isolates from human, food, veterinary and environmental sources in Iceland using PFGE, MLST and *fla*-SVR sequencing. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 4, p. 971-981, 2011.

Maiden, M. C. J.; Bygraves, J. A.; Feil, E.; Morelli, G.; Russell, J. E.; Urwin, R.; Zhang, Q.; Zhou, J.; Zurth, K.; Caugant, D. A.; Feavers, I. M.; Achtman, M.; Spratt, B. G. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 6, p. 3140-3145, 1998.

Man, S. M. The clinical importance of emerging *Campylobacter* species. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 8, n. 12, p. 669-685, 2011.

Martinez, J. L. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 11, p. 2893-2902, 2009.

Maslow, J. N.; Mulligan, M. E.; Arbeit, R. D. Molecular epidemiology - Application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. **Clinical Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, p. 153-164, 1993.

Mateu, E.; Martin, M. Why is anti-microbial resistance a veterinary problem as well? **Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 48, n. 8, p. 569-581, 2001.

Mazi, W.; Senok, A.; Al-Mahmeed, A.; Arzese, A.; Bindayna, K.; Botta, G. Trends in antibiotic sensitivity pattern and molecular detection of tet(O)-mediated tetracycline resistance in *Campylobacter jejuni* isolates from human and poultry sources. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 61, n. 1, p. 82-84, 2008.

McCarthy, N. D.; Colles, F. M.; Dingle, K. E.; Bagnall, M. C.; Manning, G.; Maiden, M. C.; Falush, D. Host-associated genetic import in *Campylobacter jejuni*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 2, p. 267-272, 2007.

McDermott, P. F.; Bodeis-Jones, S. M.; Fritsche, T. R.; Jones, R. N.; Walker, R. D. Broth microdilution susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and the determination of quality control ranges for fourteen antimicrobial agents. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 12, p. 6136-6138, 2005.

Meinersmann, R.; Helsel, L. O.; Fields, P. I.; Hiatt, K. L. Discrimination of *Campylobacter jejuni* isolates by *fla* gene sequencing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 11, p. 2810-2814, 1997.

Melero, B.; Juntunen, P.; Hänninen, M. L.; Jaime, I.; Rovira, J. Tracing *Campylobacter jejuni* strains along the poultry meat production chain from farm to retail by pulsed-field gel electrophoresis, and the antimicrobial resistance of isolates. **Food Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 124-128, 2012.

Merchant-Patel, S.; Blackall, P. J.; Templeton, J.; Price, E. P.; Tong, S. Y.; Huygens, F.; Giffard, P. M. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Genotyping by High-Resolution Melting Analysis of a *flaA* Fragment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 2, p. 493-499, 2010.

Moolhuijzen, P. M.; Lew-Tabor, A. E.; Wlodek, B. M.; Agüero, F. G.; Comerici, D. J.; Ugalde, R. A.; Sanchez, D. O.; Appels, R.; Bellgard, M. Genomic analysis of *Campylobacter fetus* subspecies: identification of candidate virulence determinants and diagnostic assay targets. **Bmc Microbiology**, v. 9, p. 11, 2009.

Moore, J. E.; Corcoran, D.; Dooley, J. S.; Fanning, S.; Lucey, B.; Matsuda, M.; McDowell, D. A.; Mégraud, F.; Millar, B. C.; O'Mahony, R.; O'Riordan, L.; O'Rourke, M.; Rao, J. R.; Rooney, P. J.; Sails, A.; Whyte, P. *Campylobacter*. **Veterinary Research**, v. 36, n. 3, p. 351-382, 2005.

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

Nelson, J. M.; Chiller, T. M.; Powers, J. H.; Angulo, F. J. Fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* species and the withdrawal of fluoroquinolones from use in poultry: A public health success story. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, n. 7, p. 977-980, 2007.

Nuijten, P. J. M.; Fons, J. A. M.; Asten, V.; Gaastra, W.; van der Zeijsts, B. A. M. Structural and functional-analysis of 2 *Campylobacter jejuni* flagellin genes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 29, p. 17798-17804, 1990.

O'Leary, A. M.; Whyte, P.; Madden, R. H.; Cormican, M.; Moore, J. E.; Mc Namara, E.; McGill, K.; Kelly, L.; Cowley, D.; Moran, L.; Scates, P.; Collins, J. D.; Carroll, C. V. Pulsed Field Gel Electrophoresis typing of human and retail foodstuff *Campylobacters*: An Irish perspective. **Food Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 426-433, 2011.

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

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

Overell, J. R.; Willison, H. J. Recent developments in Miller Fisher syndrome and related disorders. **Current Opinion in Neurology**, v. 18, n. 5, p. 562-566, 2005.

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

Pei, Z. H.; Ellison, R. T.; Lewis, R. V.; Blaser, M. J. Purification and characterization of a family of high molecular-weight surface-array proteins from *Campylobacter fetus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 13, p. 6416-6420, 1988.

Pesci, E. C.; Cottle, D. L.; Pickett, C. L. Genetic, enzymatic, and pathogenic studies of the iron superoxide-dismutase of *Campylobacter jejuni*. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 7, p. 2687-2694, 1994.

Phillips, I.; Casewell, M.; Cox, T.; De Groot, B.; Friis, C.; Jones, R.; Nightingale, C.; Preston, R.; Waddell, J. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 28-52, 2004.

Pickett, C. L.; Pesci, E. C.; Cottle, D. L.; Russell, G.; Erdem, A. N.; Zeytin, H. Prevalence of cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter* sp cdtB genes. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 6, p. 2070-2078, 1996.

Pollett, S.; Rocha, C.; Zerpa, R.; Patiño, L.; Valencia, A.; Camiña, M.; Guevara, J.; Lopez, M.; Chuquiray, N.; Salazar-Lindo, E.; Calampa, C.; Casapia, M.; Meza, R.; Bernal, M.; Tilley, D.; Gregory, M.; Maves, R.; Hall, E.; Jones, F.; Arriola, C. S.; Rosenbaum, M.; Perez, J.; Kasper, M. *Campylobacter* antimicrobial resistance in Peru: a ten-year observational study. **Bmc Infectious Diseases**, v. 12, p. 7, 2012.

Pourcel, C.; Salvignol, G.; Vergnaud, G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. **Microbiology-Sgm**, v. 151, p. 653-663, 2005.

Price, E. P.; Smith, H.; Huygens, F.; Giffard, P. M. High-resolution DNA melt curve analysis of the clustered, regularly interspaced short-palindromic-repeat locus of *Campylobacter jejuni*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 10, p. 3431-3436, 2007.

Price, L. B.; Lackey, L. G.; Vailes, R.; Silbergeld, E. The persistence of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* in poultry production. **Environmental Health Perspectives**, v. 115, n. 7, p. 1035-1039, 2007.

Purdy, D.; Cawthraw, S.; Dickinson, J. H.; Newell, D. G.; Park, S. F. Generation of a superoxide dismutase (SOD)-deficient mutant of *Campylobacter coli*: Evidence for the significance of SOD in *Campylobacter* survival and colonization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 2540-2546, 1999.

Quetz, J. D.; Lima, I. F.; Havt, A.; de Carvalho, E. B.; Lima, N. L.; Soares, A. M.; Mota, R. M.; Guerrant, R. L.; Lima, A. A. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in children from communities in Northeastern Brazil: molecular detection and relation to nutritional status. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 67, n. 3, p. 220-227, 2010.

Quetz, J. D.; Lima, I. F.; Havt, A.; Prata, M. M.; Cavalcante, P. A.; Medeiros, P. H.; Cid, D. A.; Moraes, M. L.; Rey, L. C.; Soares, A. M.; Mota, R. M.; Weigl, B. H.; Guerrant, R. L.; Lima, A. A. *Campylobacter jejuni* infection and virulence-associated genes in children with

moderate to severe diarrhoea admitted to emergency rooms in northeastern Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 507-513, 2012.

Ragimbeau, C.; Schneider, F.; Losch, S.; Even, J.; Mossong, J. Multilocus sequence typing, pulsed field gel electrophoresis, and fla short variable region typing of Clonal Complexes of *Campylobacter jejuni* strains of human, bovine, and poultry origins in Luxembourg. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 24, p. 7715-7722, 2008.

Reed, G. H.; Kent, J. O.; Wittwer, C. T. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. **Pharmacogenomics**, v. 8, n. 6, p. 597-608, 2007.

Ribot, E.; Fitzgerald, C.; Kubota, K.; Swaminathan, B.; Barrett, T. J. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 5, p. 1889-1894, 2001.

Riley, L.W. Analysis of similarity and relatedness in molecular epidemiology. In: **Riley, L.W. (Ed.), Molecular Epidemiology of Infectious Diseases, Principles and Practices**. ASM Press, Washington DC, p. 91-124, 2004.

Rivera-Amill, V.; Kim, B. J.; Seshu, J.; Konkel, M. E. Secretion of the virulence-associated *Campylobacter* invasion antigens from *Campylobacter jejuni* requires a stimulatory signal. **Journal of Infectious Diseases**, v. 183, n. 11, p. 1607-1616, 2001.

Rozynek, E.; Antos-Bielska, M.; Dzierzanowska-Fangrat, K.; Szczepańska, B.; Trafny, E. A. Genetic Similarity of *Campylobacter* Isolates in Humans, Food, and Water Sources in Central Poland. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 5, p. 597-600, 2010.

Rozynek, E.; Dzierzanowska-Fangrat, K.; Korsak, D.; Wardak, S.; Szych, J.; Dzierzanowska, D. Prevalence of antimicrobial resistance among Polish *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated from humans and chicken meat. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 29, p. S241-S242, 2007.

Ruskova, L.; Raclavsky, V. The potential of high resolution melting analysis (HRMA) to streamline, facilitate and enrich routine diagnostics in medical microbiology. **Biomedical Papers-Olomouc**, v. 155, n. 3, p. 239-252, 2011.

Scallan, E.; Hoekstra, R. M.; Angulo, F. J.; Tauxe, R. V.; Widdowson, M. A.; Roy, S. L.; Jones, J. L.; Griffin, P. M. Foodborne Illness Acquired in the United States-Major Pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 7-15, 2011.

Scarcelli, E.; Piatti, R. M.; Harakava, R.; Miyashiro, S.; Fernandes, F. M. C.; Campos, F. R.; Francisco, W.; Genovez, M. E.; Richtzenhain, L. J. Molecular subtyping of *Campylobacter jejuni* subsp *jejuni* strains isolated from different animal species in the state of Sao Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 378-382, 2005.

Schouls, L. M.; Reulen, S.; Duim, B.; Wagenaar, J. A.; Willems, R. J.; Dingle, K. E.; Colles, F. M.; Van Embden, J. D. Comparative genotyping of *Campylobacter jejuni* by amplified fragment length polymorphism, multilocus sequence typing, and short repeat sequencing: Strain diversity, host range, and recombination. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 15-26, 2003.

Schwarz, S.; Kehrenberg, C.; Walsh, T. R. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 17, n. 6, p. 431-437, 2001.

Schwartz D.C.; Cantor, C.R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. **Cell**, n.37, p.67-75, 1984.

Schweitzer, N.; Dán, Á.; Kaszanyitzky, É.; Samu, P.; Tóth, Á. G.; Varga, J.; Damjanova, I. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates of poultry, swine, and cattle origin collected from slaughterhouses in Hungary. **Journal of Food Protection**, v. 74, n. 6, p. 905-911, 2011.

Selander, B.; Rydberg, J.; Lenner, C.; Hagerstrand, I. Unusual infectious complication in a pregnant woman. Spontaneous abortion caused by *Campylobacter coli*. **Lakartidningen**, v. 90, p. 4356-4357, 1993.

Sheppard, S. K.; Dallas, J. F.; MacRae, M.; McCarthy, N. D.; Sproston, E. L.; Gormley, F. J.; Strachan, N. J.; Ogden, I. D.; Maiden, M. C.; Forbes, K. J. *Campylobacter* genotypes from food animals, environmental sources and clinical disease in Scotland 2005/6. **International Journal of Food Microbiology**, v. 134, n. 1-2, p. 96-103, 2009.

Silva, J.; Leite, D.; Fernandes, M.; Mena, C.; Gibbs, P. A.; Teixeira, P. *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: a review. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, p. 12, 2011.

Simpson, E. H. Measurement of diversity. **Nature**, v. 163, n. 4148, p. 688-688, 1949.

Singh, A.; Goering, R. V.; Simjee, S.; Foley, S. L.; Zervos, M. J. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 3, p. 512, 2006.

Smith, J. L.; Fratamico, P. M. Fluoroquinolone Resistance in *Campylobacter*. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 6, p. 1141-1152, 2010.

Smith, T. The etiological relation of spirilla (*Vibrio fetus*) to bovine abortion. **Journal of Experimental Medicine**, v. 30, n. 4, p. 313-323, 1919.

Snelling, W. J.; Matsuda, M.; Moore, J. E.; Dooley, J. Under the microscope - *Campylobacter jejuni*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 297-302, 2005.

Song, Y. C.; Jin, H.; Louie, D. N.; Lau, Y.; Zhang, R.; Weerasekera, S.; Al Rashid, L. A.; Ward, S. D. FlaC, a protein of *Campylobacter jejuni* TGH 9011 (ATCC 43431) secreted through the flagellar apparatus, binds epithelial cells and influences cell invasion. **Molecular Microbiology**, v. 53 (2), p. 541-553, 2004.

Sorek, R.; Kunin, V.; Hugenholtz, P. CRISPR - a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 181-186, 2008.

Srinivasan, V.; Gillespie, B. E.; Lewis, M. J.; Nguyen, L. T.; Headrick, S. I.; Schukken, Y. H.; Oliver, S. P. Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from dairy cows with mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 124, n. 3-4, p. 319-328, 2007.

Stafford, R. J.; Schluter, P. J.; Wilson, A. J.; Kirk, M. D.; Hall, G.; Unicomb, L.; OzFoodNet Working Group. Population-attributable risk estimates for risk factors associated with *Campylobacter* infection, Australia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 6, p. 895-901, 2008.

Stucki, U.; Frey, J.; Nicolet, J.; Burnens, A. P. Identification of *Campylobacter jejuni* on the basis of a species-specific gene that encodes a membrane-protein. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 855-859, 1995.

Takahashi, M.; Koga, M.; Yokoyama, K.; Yuki, N. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* isolated from patients with Guillain-Barre and Fisher syndromes in Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 335-339, 2005.

Tenover, F. C.; Arbeit, R. D.; Goering, R. V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: A review for healthcare epidemiologists. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 18, n. 6, p. 426-439, 1997.

Thomas, M. K.; Charron, D. F.; Waltner-Toews, D.; Schuster, C.; Maarouf, A. R.; Holt, J. D. A role of high impact weather events in waterborne disease outbreaks in Canada, 1975-2001. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 16, p. 167-180, 2006.

Urwin, R.; Maiden, M. C. J. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 479-487, 2003.

van Belkum, A.; Tassios, P. T.; Dijkshoorn, L.; Haeggman, S.; Cookson, B.; Fry, N. K.; Fussing, V.; Green, J.; Feil, E.; Gerner-Smidt, P.; Brisse, S.; Struelens, M.; European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID); Study Group on Epidemiological Markers (ESGEM). Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, p. 1-46, 2007.

van Vliet, A. H. M.; Ketley, J. M. Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 45S-56S, 2001.

Vandamme, P.; Falsen, E.; Rossau, R.; Hoste, B.; Segers, P.; Tytgat, R.; De Ley, J. Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy - emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen-nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 41, n. 1, p. 88-103, 1991.

Wassenaar, T. M.; Bleuminkpluym, N. M. C.; Vanderzeijst, B. A. M. Inactivation of *Campylobacter jejuni* flagellin genes by homologous recombination demonstrates that *flaA* but not *flaB* is required for invasion. **Embo Journal**, v. 10, n. 8, p. 2055-2061, 1991.

Wassenaar, T. M.; Wagenaar, J. A.; Rigter, A.; Fearnley, C.; Newell, D. G.; Duim, B. Homonucleotide stretches in chromosomal DNA of *Campylobacter jejuni* display high frequency polymorphism as detected by direct PCR analysis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 212, p. 77-85, 2002.

Wassenaar, T. M.; Fernández-Astorga, A.; Alonso, R.; Marteinsson, V. T.; Magnússon, S. H.; Kristoffersen, A. B.; Hofshagen, M. Comparison of *Campylobacter fla*-SVR genotypes

isolated from humans and poultry in three European regions. **Letters in Applied Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 388-395, 2009.

Wassenaar, T. M.; Newell, D. G. Genotyping of *Campylobacter* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2000.

Wehnes, C. A.; Rehberger, T. G.; Barrangou, R.; Smith, A. H. Short communication: Determination of *Salmonella* clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) diversity on dairy farms in Wisconsin and Minnesota. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 10, p. 6370-6377, 2014.

Wieczorek, K.; Denis, E.; Lynch, O.; Osek, J. Molecular characterization and antibiotic resistance profiling of *Campylobacter* isolated from cattle in Polish slaughterhouses. **Food Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 130-136, 2013.

Wieczorek, K.; Osek, J. Identification of virulence genes in *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolates by PCR. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 52, n. 2, p. 211-216, 2008.

Wirz, S. E.; Overesch, G.; Kuhnert, P.; Korczak, B. M. Genotype and antibiotic resistance analyses of *Campylobacter* isolates from ceca and carcasses of slaughtered broiler flocks. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 19, p. 6377-6386, 2010.

World Health Organization (WHO). Who health topics related to foodborne diseases, 2015. Acessado em 23 de junho de 2015, disponível em: http://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/en/.

Young, K. T.; Davis, L. M.; DiRita, V. J. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 9, p. 665-679, 2007.

Zhang, M. J.; Liu, X.; Xu, X.; Gu, Y.; Tao, X.; Yang, X.; Yan, G.; Zhang, J. Molecular subtyping and antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter coli* isolates from diarrheal patients and food-producing animals in China. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 11, n. 8, p. 610-619, 2014.

Zilbauer, M.; Dorrell, N.; Boughan, P. K.; Harris, A.; Wren, B. W.; Klein, N. J.; Bajaj-Elliott, M. Intestinal innate immunity to *Campylobacter jejuni* results in induction of bactericidal human beta-defensins 2 and 3. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 11, p. 7281-7289, 2005.

Ziprin, R. L.; Young, C. R.; Byrd, J. A.; Stanker, L. H.; Hume, M. E; Gray, S. A.; Kim, B. J; Konkel, M. E. Role of *Campylobacter jejuni* potential virulence genes in cecal colonization. **Avian Diseases**, v. 45, n. 3, p. 549-557, 2001.

Ziprin, R. L.; Young, C. R.; Stanker, L. H.; Hume, M. E.; Konkel, M. E. The absence of cecal colonization of chicks by a mutant of *Campylobacter jejuni* not expressing bacterial fibronectin-binding protein. **Avian Diseases**, v. 43, n. 3, p. 586-589, 1999.

Apêndices

Apêndice I. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e interpretação de sensibilidade ou resistência das 63 linhagens de *C. coli* estudadas frente a eritromicina, ciprofloxacina, tetraciclina e doxamiclina.

Linhagem	Origem	Ano	CIM (µg/mL) / Sensibilidade (S)/ Resistência (R)			
			ERI	CIP	TET	DOX
			≤8 S - 16 I ≥32 R	≤1 S - 2 I ≥4 R	≤4 S - 8 I ≥16 R	≤2 S - 4 I ≥8 R
CCAMP 840	Ambiente	1995	3,0 S	0,125 S	0,25 S	0,125 S
CCAMP 771	Ambiente	1995	1,5 S	0,125 S	0,125 S	0,047 S
CCAMP 773	Ambiente	1995	2,0 S	0,25 S	0,25 S	0,125 S
CCAMP 774	Ambiente	1996	2,0 S	0,25 S	1,0 S	1,0 S
CCAMP 769	Ambiente	1996	0,50 S	0,094 S	0,0125 S	0,064 S
CCAMP 787	Ambiente	1996	2,0 S	0,125 S	0,25 S	0,094 S
CCAMP 819	Ambiente	1996	1,5 S	0,94 S	0,25 S	0,047 S
CCAMP 764	Ambiente	1996	0,50 S	0,125 S	0,094 S	0,047 S
CCAMP 765	Ambiente	1996	6,0 S	0,19 S	2,0 S	0,50 S
CCAMP 761	Ambiente	1996	32,0 R	4,0 R	2,0 S	1,0 S
CCAMP 767	Ambiente	1996	0,25 S	0,25 S	0,19 S	1,0 S
CCAMP 775	Ambiente	1997	1,0 S	0,25 S	0,19 S	0,125 S
CCAMP 818	Ambiente	1998	1,0 S	0,19 S	96,0 R	16,0 R
CCAMP 834	Ambiente	2000	0,50 S	0,047 S	48,0 R	12,0 R
CCAMP 464	Ambiente	2004	4,0 S	0,125 S	64,0 R	8,0 R
CCAMP 465	Ambiente	2004	0,75 S	0,064 S	32,0 R	8,0 R
CCAMP 466	Ambiente	2004	0,50 S	0,064 S	64,0 R	8,0 R
CCAMP 467	Ambiente	2004	0,75 S	0,064 S	32,0 R	8,0 R
CCAMP 469	Ambiente	2004	4,0 S	0,125 S	32,0 R	8,0 R
CCAMP 463	Ambiente	2004	0,125 S	0,047 S	24,0 R	4,0 R
CCAMP 820	Animal	1995	1,0 S	0,125 S	0,064 S	0,064 S
CCAMP 821	Animal	1995	0,50 S	0,094 S	0,047 S	0,032 S
CCAMP 825	Animal	1996	0,50 S	0,125 S	0,125 S	0,094 S
CCAMP 768	Animal	1996	0,75 S	0,094 S	0,125 S	0,064 S
CCAMP 625	Animal	1996	0,50 S	0,064 S	0,094 S	0,047 S
CCAMP 791	Animal	1997	3,0 S	0,125 S	0,064 S	0,064 S
CCAMP 841	Animal	1998	0,50 S	0,125 S	0,094 S	0,094 S
CCAMP 975	Animal	1999	2,0 S	0,125 S	0,094 S	0,094 S
CCAMP 988	Animal	1999	0,50 S	0,094 S	0,19 S	0,125 S
CCAMP 726	Animal	2000	1,0 S	0,094 S	0,094 S	0,047 S
CCAMP 667	Animal	2002	6,0 S	>32,0 R	1,0 S	1,0 S
CCAMP 73	Animal	2003	0,50 S	0,094 S	24,0 R	8,0 R
CCAMP 182	Animal	2003	1,0 S	0,094 S	0,19 S	0,19 S
CCAMP 165	Animal	2003	1,0 S	0,094 S	0,125 S	0,047 S
CCAMP 170	Animal	2003	1,0 S	0,094 S	0,125 S	0,047 S
CCAMP 394	Animal	2004	1,0 S	0,094 S	0,094 S	0,047 S
CCAMP 446	Animal	2004	1,0 S	0,125 S	0,094 S	0,047 S
CCAMP 392	Animal	2007	1,5 S	0,125 S	0,032 S	0,047 S
CCAMP 1010	Animal	2007	3,0 S	32,0 R	24,0 R	8,0 R
CCAMP 1000	Animal	2007	1,0 S	0,125 S	0,064 S	0,032 S
CCAMP 1117	Animal	2009	2,0 S	0,064 S	0,0125 S	0,094 S
CCAMP 490	Humano	1998	1,0 S	0,19 S	0,25 S	0,064 S
CCAMP 494	Humano	1998	2,0 S	0,19 S	0,25 S	0,064 S
CCAMP 495	Humano	1998	1,5 S	24,0 R	0,38 S	0,50 S
CCAMP 502	Humano	1999	1,5 S	32,0 R	8,0 S	0,75 S
CCAMP 498	Humano	1999	3,0 S	16,0 R	0,50 S	2,0 S

Continua

Conclusão

Linhagem	Origem	Ano	CIM (µg/mL) Sensibilidade (S)/ Resistência (R)			
			ERI	CIP	TET	DOX
			≤8 S - 16 I ≥32 R	≤1 S - 2 I ≥4 R	≤4 S - 8 I ≥16 R	≤2 S - 4 I ≥8 R
CCAMP 503	Humano	2000	0,19 S	0,016 S	0,064 S	0,32 S
CCAMP 595	Humano	2001	1,0 S	32,0 R	0,125 S	0,064 S
Cc 01	Humano	2002	1,0 S	0,094 S	256,0 R	256,0 R
Cc 04	Humano	2003	0,75 S	0,064 S	0,75 S	0,50 S
Cc 05	Humano	2003	1,5 S	0,025 S	0,19 S	0,19 S
Cc 10	Humano	2003	0,75 S	0,094 S	0,064 S	0,125 S
Cc 03	Humano	2003	192,0 R	0,50 S	128,0 R	48,0 R
CCAMP 1062	Alimento	2010	6,0 S	32,0 R	48,0 R	8,0 R
CCAMP 1064	Alimento	2010	0,75 S	0,125 S	0,125 S	0,064 S
CCAMP 1063	Alimento	2010	0,125 S	0,023 S	0,032 S	0,023 S
CCAMP 1066	Alimento	2010	1,0 S	0,023 S	0,19 S	0,094 S
CCAMP 1067	Alimento	2010	0,50 S	32,0 R	0,094 S	0,023 S
CCAMP1068	Alimento	2010	0,75 S	0,125 S	0,125 S	0,064S
CCAMP 1071	Alimento	2011	0,75 S	0,047 S	0,125 S	0,064 S
CCAMP 1073	Alimento	2011	2,0 S	0,064 S	0,125 S	0,094 S
CCAMP 1074	Alimento	2011	48,0 R	0,064 S	0,025 S	1,0 S
CCAMP 1075	Alimento	2011	1,0 S	0,047 S	0,125 S	0,094 S

ERI- eritromicina; CIP- ciprofloxacina; TET- tetraciclina; DOX-doxaciclina

Anexos

ANEXOS

Anexo I - Meio para a criopreservação das linhagens de *Campylobacter coli*.

Neo - Peptona	1,0 g
Glicerol P.A. (Difco)	25 mL
Cloreto de Sódio	0,5 g
Água destilada	75 mL

O pH do meio foi ajustado para o intervalo de 7,2-7,4. Em seguida, o meio foi esterilizado em autoclave a 121°C durante 20 minutos. O meio foi conservado em geladeira a 4°C.

Anexo II – Linhagens pertencentes ao ST 860

Ano de isolamento	País	Fonte					TOTAL/ ANO
		Humano	Animal	Alimento	Ambiente	SI	
1999	Suíça	1	-	-	-	-	2
1999	EUA	-	1	-	-	-	
2002	Holanda	1	-	-	-	-	1
2003	Reino Unido	14	-	-	-	-	14
2004	Suíça	1	-	-	-	-	1
2005	Suíça	1	-	-	-	-	1
2007	Reino Unido	2	-	-	-	-	3
2007	Alemanha	-	1	-	-	-	
2008	Alemanha	-	1	1	-	-	2
2009	Alemanha	-	-	2	-	-	2
2010	Holanda	2	1	-	-	-	3
2010	Luxemburgo	-	1	1	-	-	2
2011	Luxemburgo	1	-	1	2	-	4
2011	Alemanha	-	2	-	-	-	2
2011	Reino Unido	3	-	-	-	-	3
2012	Reino Unido	1	-	-	-	-	1
2012	Alemanha	-	1	-	-	-	1
2012	Luxemburgo	-	1	2	-	-	3
2013	Reino Unido	4	-	-	-	-	4
2014	Reino Unido	3	-	-	-	-	3
SI	Reino Unido	-		1		-	1
SI	Espanha	-	1	-	-	-	1
SI	Reino Unido	-	-	-	-	1	1
TOTAL	-	34	10	8	2	1	55

SI- Sem Informação; - Nenhuma linhagem.

Anexo III – Linhagens pertencentes ao subgrupo *Founder* do ST 825

Ano de isolamento	País	Fonte					TOTAL/ ANO
		Humano	Animal	Alimento	Ambiente	SI	
2000	EUA	-	3	-	-	-	3
2001	Reino Unido	-	-	5	-	-	9
2001	EUA	-	3	-	-	-	
2001	Holanda	-	-	-	1	-	
2002	Suíça	-	3	-	-	-	12
2002	Holanda	-	-	9	-	-	
2003	Reino Unido	6	-	-	-	-	6
2004	Espanha	-	-	-	2	-	6
2004	Reino Unido	3	-	-	-	-	
2004	Alemanha	1	-	-	-	-	
2005	Espanha	-	-	-	1	-	6
2005	Reino Unido	5	-	-	-	-	
2006	Espanha	-	-	-	1	-	9
2006	Reino Unido	7	-	-	-	-	
2006	Holanda	-	1	-	-	-	
2007	Espanha	-	1	-	-	-	6
2007	Reino Unido	4	-	-	-	-	
2007	Alemanha	-	1	-	-	-	
2008	Reino Unido	1	-	-	-	-	16
2008	Alemanha	-	2	1	-	-	
2008	Suíça	-	11	1	-	-	
2009	Reino Unido	5	-	-	-	-	22
2009	Alemanha	-	2	1	-	-	
2009	Suíça	3	8	3	-	-	
2010	Holanda	2	-	-	-	-	11
2010	Reino Unido	7	-	-	-	-	
2010	Luxemburgo	-	-	2	-	-	
2011	Reino Unido	7	-	-	-	-	9
2011	Holanda	-	1	-	-	-	
2011	Alemanha	1	-	-	-	-	
2012	Reino Unido	11	-	-	-	-	15
2012	Luxemburgo	-	-	-	2	-	
2012	Alemanha	-	2	-	-	-	
2013	Reino Unido	12	-	-	-	-	12
2014	Reino Unido	2	-	-	-	12	13
2015	Reino Unido	3	-	-	-	-	3
SI	Reino Unido	-	-	24	-	-	29
SI	EUA	-	2	-	-	-	
SI	Polônia	-	1	-	-	-	
SI	Espanha	-	2	-	-	-	
Total	-	80	43	46	7	12	187

SI- Sem Informação; - Nenhuma linhagem.

Anexo IV- Linhagens pertencentes ao ST 1595

Ano de isolamento	País	Fonte					TOTAL/ ANO
		Humano	Animal	Alimento	Ambiente	SI	
2002	Dinamarca	1	-	-	-	-	1
2003	Grécia	2	-	-	-	-	2
2006	Espanha	-	1	-	-	-	1
2007	Reino Unido	1	-	-	-	-	1
2008	Alemanha	-	2	-	-	-	2
2011	Luxemburgo	1	-	-	6	-	7
2012	Luxemburgo	-	2	-	1	-	3
2013	Reino Unido	1	-	-	-	-	1
2014	Reino Unido	-	-	-	-	1	1
SI	Reino Unido	-	-	-	-	1	1
Total	-	6	5	-	7	2	20

SI- Sem Informação; - Nenhuma linhagem.

Anexo V - Linhagens pertencentes ao ST 854

Ano de isolamento	País	Fonte					TOTAL/ ANO
		Humano	Animal	Alimento	Ambiente	SI	
2002	Suíça	-	47	-	-	-	50
2002	Holanda	3	-	-	-	-	
2003	Reino Unido	-	-	-	-	112	114
2003	Holanda	-	2	-	-	-	
2004	EUA	-	7	-	-	-	10
2004	Holanda	-	2	-	-	-	
2004	Suíça	-	1	-	-	-	
2005	Espanha	-	-	-	2	-	5
2005	Luxemburgo	-	3	-	-	-	
2006	Luxemburgo	-	1	-	-	-	1
2007	Reino Unido	2	-	-	-	-	3
2007	Alemanha	-	1	-	-	-	
2008	Suíça	-	6	3	-	-	27
2008	França	-	6	-	-	-	
2008	Reino Unido	2	-	-	-	-	
2008	Alemanha	-	10	-	-	-	
2009	Suíça	1	33	-	-	-	
2009	Reino Unido	1	-	-	-	-	39
2009	Alemanha	-	4	-	-	-	
2010	Reino Unido	1	-	-	-	-	3
2010	Alemanha	-	2	-	-	-	
2011	Luxemburgo	-	2	-	5	-	13
2011	Alemanha	6	-	-	-	-	
2012	Reino Unido	1	-	-	-	-	2
2012	Luxemburgo	-	1	-	-	-	

Continua

Conclusão

Ano de Isolamento	País	Fonte					TOTAL/ ANO
		Humano	Animal	Alimento	Ambiente	SI	
2014	Reino Unido	1	-	-	-	-	4
2014	Grenada	-	3	-	-	-	
2015	Reino Unido	-	-	-	-	6	6
SI	Reino Unido	-	1	3	-	-	23
SI	Polonia	-	2	-	-	-	
SI	Espanha	-	4	-	-	-	
SI	EUA	-	13	-	-	-	
Total	-	18	151	6	7	118	300

SI- Sem Informação; - Nenhuma linhagem.

Anexo VI – Linhagens pertencentes ao ST 832

Ano de isolamento	País	Fonte					TOTAL/ ANO
		Humano	Animal	Alimento	Ambiente	SI	
2001	EUA	-	1	-	-	-	1
2003	Reino Unido	3	-	-	-	-	3
2004	Suíça	1	-	-	-	-	1
2005	Reino Unido	1	-	-	-	-	4
2005	Suíça	3	-	-	-	-	
2007	Holanda	-	1	-	-	-	3
2007	Reino Unido	2	-	-	-	-	
2008	Alemanha	-	-	1	-	-	1
2009	Luxemburgo	-	-	3	-	-	4
2009	Alemanha	-	-	1	-	-	
2010	Luxemburgo	1	-	1	-	-	5
2010	Holanda	-	-	1	-	-	
2010	Alemanha	1	-	-	-	-	
2010	Reino Unido	1	-	-	-	-	
2011	Reino Unido	4	-	-	-	-	6
2011	Alemanha	-	-	1	-	-	
2011	Luxemburgo	-	-	1	-	-	
2012	Luxemburgo	-	2	3	-	-	5
2013	Reino Unido	2	-	-	-	-	2
SI	Espanha	-	2	-	-	-	4
SI	Reino Unido	-	-	2	-	-	
Total	-	19	6	14	-	-	39

SI- Sem Definição; - Nenhuma linhagem.