



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

FELIPE PEREIRA DE MELO

Pesquisa de *Campylobacter* spp. e genes de virulência em carcaças de frangos comercializadas em Recife-PE.

Recife
2020



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

FELIPE PEREIRA DE MELO

Pesquisa de *Campylobacter* spp. e genes de virulência em carcaças de frangos comercializadas em Recife-PE.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

Área de Concentração: Biotecnologia na Linha de Microbiologia e Parasitologia Aplicadas.

Orientadora: Profa. Dra. Mércia Rodrigues Barros.

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Mendonça

**Recife
2020**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F315

Melo, Felipe Pereira de Melo

Pesquisa de *Campylobacter* spp. e genes de virulência em carcaças de frangos comercializadas em Recife-PE. / Felipe Pereira de Melo Melo. - 2020.
55 f.

Orientadora: Mercia Rodrigues Barros.

Coorientador: Marcelo Mendonça.

Inclui referências.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, 2020.

1. Campilobacteriose. 2. Biologia molecular. 3. Produtos Avícolas. 4. Virulência. I. Barros, Mercia Rodrigues, orient. II. Mendonça, Marcelo, coorient. III. Título

CDD 636.089

Felipe Pereira de Melo

Pesquisa de espécies de *Campylobacter* e genes de virulência em carcaças de frangos comercializadas em Recife-PE.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

Área de Concentração: Biotecnologia na Linha de Microbiologia e Parasitologia Aplicadas.

Aprovada em 19 de fevereiro de 2020

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Mércia Rodrigues Barros
Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE
(Orientadora)

Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Júnior
Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE
(Membro Titular)

Profa. Dra. Belchiolina Beatriz Fonseca
Universidade Federal de Uberlândia – UFU

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo milagre da vida e por tornar possível tudo que tenho vivido até o dia de hoje.

Agradeço a minha família, aos meus pais Dorgival e Rosangela, pela educação, cuidado e apoio ao longo dessa trajetória. À minha querida irmã, Fernanda por cada palavra de incentivo e oração. Aos demais familiares que de uma forma ou de outra me incentivaram a prosseguir. A minha noiva Thatyane, pelo companheirismo, cuidado, atenção e amor nos momentos mais difíceis vividos.

Agradeço a todos do Laboratório de Inspeção de Carne e Produtos Derivados, bem como, do Laboratório de Doença Infectocontagiosas, nos nomes da Profa. Andrea Paiva, Goretti, Prof. Rinaldo, Prof. Wilton Jr, Renata e Givanildo e tantos outros, pela ajuda e execução desse projeto. A todos os companheiros e companheiras da Ornitopatologia, pelo apoio nas mais diversas formas.

À Profa. Mércia Barros, pela paciência e cuidado durante todo período de orientação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento da bolsa de mestrado.

À Coleção de Campylobacter da FIOCRUZ (CCAMP) pelo envio de cepas.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), por toda a guarida me dada no decorrer da pós-graduação.

De tudo o que se tem ouvido, o fim é: Teme a Deus e guarda os seus mandamentos; porque este é o dever de todo homem.

Eclesiastes 12:13

RESUMO

O presente estudo, avaliou a prevalência de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* e genes de virulência em carcaças de frango *in natura*, resfriadas, congeladas, fígado e moela comercializadas em mercados públicos e supermercados. Foram obtidas 10 amostras de carcaças com fígado e moela comercializadas nas formas *in natura*, resfriadas e congeladas, com duas diferentes marcas comerciais, totalizando 90 amostras. As amostras foram analisadas pelas metodologias de cultura e isolamento e PCR convencional. A PCR foi utilizada em dois momentos distintos. No primeiro, a técnica foi aplicada para detecção de *C. jejuni* e *C. coli* em amostras provenientes do cultivo e isolamento, e no segundo momento, em amostras oriundas do caldo de enriquecimento utilizado para cada amostra. Das 90 amostras analisadas, *C. jejuni* foi a espécie mais prevalente com 28,8% das amostras positivas, já *C. coli* foi positiva em 15,6% das amostras. Na análise de prevalência das espécies em amostras de mercados públicos, *C. coli* foi mais prevalente que *C. jejuni*, apresentando 16,7% de amostras positivas. Nas amostras de supermercados, *C. jejuni* esteve mais prevalente, com 36,7% de positividade. Com relação a forma de comercialização das carcaças, *C. jejuni* foi detectada em todas as formas de comercialização (*in natura*, resfriadas e congeladas), porém, com maior prevalência (43,3%) em amostras resfriadas, diferente de *C. coli* que não foi detectada em amostras congeladas, e apresentou maior prevalência (16,7%) em amostras *in natura*. Entre os diferentes produtos avícolas (carcaça, fígado e moela), ambas as espécies foram detectadas. *C. jejuni* esteve mais prevalente (53,3%) nas amostras de fígado, seguida das amostras de pedaços (36,7%) e moela (33,3%). *C. coli* apresentou menores prevalências comparado a *C. jejuni*, com maior prevalência nas amostras de pedaços (10%) e igual prevalência nas amostras de fígado e moela (3,3%). Foram pesquisados cinco genes de virulência referentes à adesão (*Peb1*, *JlpA*, *CadF*, *CapA*) e invasão (*CiaB*). Em ambas as espécies foi detectado a presença dos diferentes genes. O gene *CiaB* foi o mais prevalente em *C. jejuni* (70,2%) e *C. coli* (71,4%), seguido do gene *CadF* (72,9%) (50%). As demais prevalências detectadas foram: *Peb1* (43,2%) (50%), *JlpA* (48,6%) (42,8%) e *CapA* (21,6%) (28,5%). A partir da detecção dos genes foram traçados 20 perfis de virulência (P-1 a P-20), variando desde a presença de todos os genes até a ausência dos mesmos. A contaminação de carcaças de frango em abatedouros, os tratamentos pós-abate, controle de temperatura, gerenciamento de higiene durante o processamento ou armazenamento constituem os principais fatores associados a infecção pelo patógeno. Os diferentes perfis de virulência somados aos fatores citados potencializam o risco no surgimento de casos e/ou surtos de campilobacteriose, caso medidas apropriadas não sejam implementadas. Portanto, é imprescindível que haja uma vigilância contínua da presença desse patógeno e de seus genes associados nos produtos avícolas, e que medidas de controle devem ser estabelecidas partindo do campo até a indústria, reforçando também que deve haver o monitoramento das medidas e práticas de manipulação no mercado consumidor, afim de reduzir a contaminação dos produtos e iminentes riscos de infecção.

Palavras-chave: Campilobacteriose, Biologia molecular, Produtos Avícolas, Virulência.

ABSTRACT

The present study evaluated the prevalence of *C. jejuni* and *C. coli* and virulence genes in fresh, frozen, frozen chicken, liver and gizzard carcasses sold in public markets and supermarkets. Ten samples of carcasses with liver and gizzard were sold in fresh, chilled and frozen forms, with two different commercial brands, totaling 90 samples. The samples were analyzed using culture and isolation methodologies and conventional PCR. PCR was used at two different times. In the first, the technique was applied to detect *C. jejuni* and *C. coli* in samples from cultivation and isolation, and in the second, in samples from the enrichment broth used for each sample. Of the 90 samples analyzed, *C. jejuni* was the most prevalent species with 28.8% of positive samples, whereas *C. coli* was positive in 15.6% of samples. In the analysis of species prevalence in samples from public markets, *C. coli* was more prevalent than *C. jejuni*, presenting 16.7% of positive samples. In supermarket samples, *C. jejuni* was more prevalent, with 36.7% positivity. Regarding the form of commercialization of the carcasses, *C. jejuni* was detected in all forms of commercialization (in natura, chilled and frozen), however, with a higher prevalence (43.3%) in chilled samples, different from *C. coli* that it was not detected in frozen samples, and had a higher prevalence (16.7%) in fresh samples. Among the different poultry products (carcass, liver and gizzards), both species were detected. *C. jejuni* was more prevalent (53.3%) in liver samples, followed by pieces of pieces (36.7%) and gizzards (33.3%). *C. coli* had lower prevalences compared to *C. jejuni*, with higher prevalence in the samples of pieces (10%) and equal prevalence in the samples of liver and gizzards (3.3%). Five virulence genes related to adherence (*Peb1*, *JlpA*, *CadF*, *CapA*) and invasion (*CiaB*) were investigated. In both species, the presence of different genes was detected. The *CiaB* gene was the most prevalent in *C. jejuni* (70.2%) and *C. coli* (71.4%), followed by the *CadF* gene (72.9%) (50%). The other prevalences detected were: *Peb1* (43.2%) (50%), *JlpA* (48.6%) (42.8%) and *CapA* (21.6%) (28.5%). From the detection of the genes, 20 virulence profiles were drawn (P-1 - P-20), ranging from the presence of all genes to the absence of them. Contamination of chicken carcasses in slaughterhouses, post-slaughter treatments, temperature control, hygiene management during processing or storage are the main factors associated with infection by the pathogen. The different virulence profiles added to the aforementioned factors increase the risk in the appearance of cases and/or outbreaks of campylobacteriosis, if appropriate measures are implemented. Therefore, it is essential that there is a continuous surveillance of the presence of these pathogens and their associated genes in poultry products, and that control measures must be established starting from the field to the industry, also reinforcing that there must be monitoring of handling measures and practices. in the consumer market, in order to reduce product contamination and imminent infection risks.

Keywords: Campylobacteriosis, Molecular Biology, Poultry Products, Virulence.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Agente etiológico	13
2.2 Mecanismos de Virulência	15
2.3.1 Motilidade e Quimiotaxia.....	16
2.3.2 Adesão	17
2.3.3 Invasão	19
2.3 Campilobacteriose Humana e Saúde Pública.....	20
2.4 Métodos para detecção e identificação de <i>Campylobacter</i> spp.	22
2.4.1 Cultivo	23
2.4.2 Biologia Molecular	24
3. OBJETIVOS	27
3.1 Geral	27
3.2 Específicos.....	27
4. REFERÊNCIAS	28
5. ARTIGO	40

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
CDT	Toxina Citoletal Distensiva
DMV	Departamento de Medicina Veterinária
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
EFSA	European Food Safety Authority
EUA	Estados Unidos da América
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FSA	Food Standards Agency
ISO	International Organization for Standardization
LDIC	Laboratório de Doenças Infecto-contagiosas
LICPD	Laboratório de Inspeção de Carne e Produtos Derivados
LPS	Lipopolissacarídeos
mCCDA	modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate
OMP'S	Proteínas da Membrana Externa
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
SGB	Síndrome de Guillan-Barré
TGI	Trato Gastrointestinal
UE	União Européia
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
USDA	United States Departemant Agriculture
VNC	Viável mas Não Cultivável

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Primers utilizados nas reações de PCR para detecção de <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> .	43
Tabela 2.	Deteccção de <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> em carcaças de frango de acordo com o tipo de estabelecimento.	43
Tabela 3.	Utilização da PCR para deteccção de <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> em carcaças de frango provenientes de mercados públicos e supermercados.	44
Tabela 4.	Resultados da deteccção de <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> em carcaças de frango in natura, resfriadas e congeladas	45
Tabela 5.	Resultados da deteccção de <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> em amostras de pedaços de carcaças de frango, fígado e moela.	46
Tabela 6.	Deteccção de genes de virulência em amostras positivas para <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> .	47
Tabela 7.	Associação dos perfis de virulência em relação aos genes detectados nas espécies <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> .	49

1. INTRODUÇÃO

A cadeia produtiva de frango de corte ocupa posição relevante na economia mundial e brasileira. Atualmente, a produção mundial de carne de frango encontra-se estimada em torno de 100.000 milhões de toneladas (ABPA, 2019). Dentro do montante produzido, os Estados Unidos (EUA), Brasil e China destacam-se como os maiores produtores respondendo por cerca de 60% da produção mundial, sendo 40% da produção mundial efetuada por inúmeros outros países (USDA, 2019). Nesse cenário, o Brasil está classificado como segundo maior produtor, e maior exportador de carne de frango, produzindo cerca de 13,3 milhões toneladas em 2019 (EMBRAPA, 2019).

A busca por melhorias nos parâmetros sanitários é de fundamental importância, para assim obter um produto com alta qualidade e livre de patógenos, assegurando a saúde dos consumidores e atendendo as exigências dos mercados externo e interno. Dentro da indústria avícola como em outras atividades do ramo alimentício, falhas nos processos de higienização constituem um desafio para manutenção da inocuidade dos alimentos, pois podem favorecer a permanência de microrganismos e a contaminação do produto final (MELO et al., 2017).

Dentre os vários microrganismos patogênicos transmitidos por alimentos que estão presentes na produção avícola destacam-se os representantes do gênero *Campylobacter*. As principais espécies associadas às infecções de origem alimentar em humanos são *Campylobacter jejuni* subs. *jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* (HOUNG et al., 2001; FOSTER et al., 2004). As espécies *C. jejuni* e *C. coli* são identificadas predominantemente em surtos desse tipo de infecção, que por sua vez é reconhecida como um problema de saúde pública em várias partes do mundo (MARINOU et al., 2012; EFSA, 2015).

A infecção causada por *Campylobacter* spp., denominada campilobacteriose, é considerada uma zoonose, tendo como reservatórios animais selvagens e domésticos. As aves, especialmente os frangos de corte, são os principais reservatórios naturais de *Campylobacter* spp. Estudos epidemiológicos indicam que a carne de frango é a principal via de transmissão deste microrganismo para humanos (OH et al., 2015; PRACHANTASENA et al., 2016).

Os métodos convencionais de isolamento de *Campylobacter* spp. de amostras de alimentos utilizam meios de enriquecimento seletivo com posterior cultivo em meios sólidos seletivos. Tais métodos requerem tempo e, após o isolamento é necessário o uso de testes bioquímicos, sorológicos ou moleculares adicionais para identificação do microrganismo (CORRY et al., 1995).

Os métodos moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), vêm sendo extensivamente aplicada para detecção, identificação e quantificação de agentes infecciosos, e neste caso em especial *Campylobacter* (OLIVEIRA et al., 2005). A técnica da PCR permite à amplificação de uma região pré-selecionada de DNA, unindo rapidez, sensibilidade e especificidade no diagnóstico (MOORE et al., 2005).

Mundialmente, as notificações de campilobacteriose em humanos são escassas, e estima-se que a taxa real de infecção seja muito superior à relatada. No Brasil não existem programas nacionais de vigilância que investiguem a campilobacteriose a campo ou os padrões microbiológicos e moleculares para detectar *Campylobacter* spp. em alimentos, possibilitando dessa forma a ocorrência de surtos de origem alimentar com esse microrganismo (CISCO et al., 2017). Sendo assim, o uso de técnicas de detecção e identificação deste microrganismo são ferramentas que podem e devem ser utilizadas para sinalizar sobre a qualidade microbiológica de produtos avícolas, sendo importante a implementação de medidas de controle durante os processos de abate e pós-abate, de prevenção nas granjas, além de ações educativas junto ao mercado consumidor a respeito do consumo seguro dos produtos avícolas e assim evitar possíveis problemas de saúde pública.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Agente etiológico

O gênero *Campylobacter* junto com os gêneros *Arcobacter* e *Sulfurospirillum* constituem a família *Campylobacteraceae*, composta por microrganismos com baixo percentual de Guanina e Citosina (G+C) em seu DNA (VANDAME; DE LEY, 1991). Atualmente, já foram identificadas 34 espécies e 14 subespécies no gênero *Campylobacter*, sendo *C. jejuni* subsp. *jejuni*, *C. jejuni* subsp. *doylei*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* e *C. helveticus* as principais espécies patogênicas para o homem (LPSN, 2015).

Campylobacter spp. são bastonetes Gram negativos, curvos e delgados que medem 0,2µm a 0,8µm por 0,5µm a 5µm de diâmetro. Possuem morfologia curva típica em espiral, vírgula, “S” ou asa de gaivota e são móveis por flagelação monopolar ou bipolar por um único flagelo (monotríquia). A presença desse único flagelo confere movimentação à bactéria em forma de “saca rolha” ou “vai e vem” (MOORE; MADDEN, 2000).

As bactérias do gênero são caracterizadas como oxidase positivo, não hemolíticas, não esporuladas e não crescem em meios com concentração de 3,5% de NaCl ou a 25°C, além disso são microaerófilas, o que faz com que necessitem de pequenas quantidades de oxigênio (3-6%) e concentração de 2 a 10% de dióxido de carbono para seu desenvolvimento (HUMPHREY et al., 2007; QUETZ, 2009).

A maior parte das espécies de *Campylobacter* cresce a 37°C, no entanto, as espécies patogênicas para os seres humanos possuem melhor crescimento a 42°C e são denominadas termofílicas ou termotolerantes (BLACKWELL, 2010).

Bactérias do gênero *Campylobacter* não são formadoras de esporos, em condições adversas de cultivo, como, estresse causado pela presença de oxigênio, temperatura baixa ou falta de nutrientes, as células *Campylobacter* spp. podem retrair seu citoplasma, assumindo a forma cocóide, que mesmo caracterizando-se como forma degenerativa, pode não perder seu poder infectante (LEE; NEWELL, 2006; OLIVER, 2010). Essa característica confere à bactéria a capacidade de entrar em um estado que se pode descrever como “viável não cultivável” (VNC), que lhe permite sobreviver às alterações de estresse ambiental de forma a manter sua virulência. Quando as condições do meio se tornam novamente favoráveis, é

possível a reversão para a forma espiral, bem como a multiplicação (KEUM-IL et al., 2007; NACHAMKIN, 2007).

Apresentam um crescimento lento e são extremamente fastidiosos, requerendo condições de culturas específicas. Não fermentam nem oxidam os carboidratos, obtendo a sua energia a partir de aminoácidos ou de compostos intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico. As reações bioquímicas típicas incluem a redução do fumarato a succinato, bem como as reações para produção de acetoina e indol. A maioria das espécies reduz o nitrato a nitrito. A diferenciação das espécies mais importantes em saúde pública (*C. jejuni* e *C. coli*) pode ser feita com base na hidrólise do hipurato (GUNTHER; CHEN, 2009).

Os membros do gênero colonizam naturalmente o trato gastrointestinal de grande parte dos animais de sangue quente, como aves, suínos e bovinos, bem como, répteis e mariscos (HAMIDIAN et al., 2011). A infecção em humanos tem sido atribuída principalmente às espécies de *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* e *C. upsaliensis*. Sendo *C. jejuni* a espécie mais bem descrita, e a maior causadora de gastroenterites em humanos, seguida por *C. coli*, responsável por cerca de 1-25% dos casos (MAN, 2011; TABOADA et al., 2013).

A via alimentar é a principal forma de transmissão para o homem, com o consumo de carne e seus derivados mal cozidos e água contaminada, podendo haver também infecção pelo consumo de leite não pasteurizado e outros produtos alimentícios (BRONOWSKI et al., 2014). A frequência de casos de campilobacteriose relacionada à carne de frango está ligada ao fato de a temperatura corporal das aves ser mais elevada, em torno de 42°C, o que favorece o desenvolvimento das espécies patogênicas para os seres humanos (JAY et al., 2005).

Devido ao pequeno tamanho de seu genoma (1600 Kb a 1700 Kb) *Campylobacter* spp. multiplica-se de forma lenta, sendo considerado uma bactéria fastidiosa. O fato de possuir o genoma pequeno também reflete no menor número de genes que bactérias do gênero *Campylobacter* apresentam comparado com outros microrganismos patogênicos (VANDAMME, 2000; BHUNIA, 2008).

Análises moleculares de eletroforese em campo pulsado determinaram que o tamanho do genoma de *C. jejuni* e *C. coli* tem cerca de 1700 Kb, correspondendo a um terço do tamanho do genoma da bactéria *Escherichia coli* (NACHAMKIN, 2007).

Parkhill et al. (2000) iniciaram estudos com sequenciamento de DNA de *Campylobacter*, sequenciando o DNA da cepa de referência de *C. jejuni* NCTC 11168 e identificaram o valor de 1640 Kb. E logo em seguida, as sequências de genoma de três outras estirpes de referência (81-176, 81116, RM1221) foram determinadas de maneira a permitir a detecção de regiões conservadas e distintas em vários pontos. Atualmente, 1628 genomas de *C. jejuni*, dos quais 176 completos, e 955 genomas de *C. coli*, com 31 genomas completos, foram sequenciados e depositados no Genbank (NCBI, 2019; PUBMLST, 2019).

2.2 Mecanismos de virulência

Apesar dos mecanismos de patogenicidade de *Campylobacter* spp. ainda não se encontrarem completamente esclarecidos, sabe-se que os potenciais fatores de virulência pelos quais *Campylobacter* spp. causa doença em seres humanos são a mobilidade, quimiotaxia, adesão, invasão e produção de toxinas (SNELLING et al., 2005; BHAVSAR; KAPADNIS, 2007).

Para *Campylobacter* spp. desenvolver uma infecção suficiente para causar a doença, é necessário sobreviver aos estresses fisiológicos associados com os ambientes externos e internos, tais como, as variações de temperatura e de pH nos diferentes hospedeiros, além do estresse oxidativo e do limitado fornecimento de nutrientes (DU et al., 2016).

Estudos *in vitro*, utilizando células humanas, e *in vivo* com modelo animal têm sido desenvolvidos no sentido de elucidar quais os mecanismos de patogênese da *Campylobacter* e a forma com que se articula ao estilo de vida dos diversos hospedeiros que coloniza (HAVELAAR et al., 2013).

Modelos de cultura de célula já demonstraram que espécies de *Campylobacter* têm seus mecanismos de infecção baseados no ataque e invasão de células epiteliais, gerando toxinas que destroem as células do hospedeiro (MAN, 2011). Essas espécies também podem comprometer a integridade e fisiologia da barreira intestinal, secretando proteínas efetoras para as células do hospedeiro através de sistemas de secreção especializados (FERNANDES et al., 2010; CHANDRASHEKHAR et al., 2015).

A capacidade de adaptação da *Campylobacter* a diferentes hospedeiros é conferida por diversos mecanismos, dentre eles a manipulação da resposta

imunitária, permitindo-lhe estabelecer uma infecção crônica, mas assintomática. Dentre os múltiplos fatores de virulência destacam-se: a variação genética, os lipooligosacarídeos e a cápsula polissacarídica, o flagelo e o sistema de secreção associado a este, a toxina citolética distensiva (CDT) e os diversos fatores implicados na adesão do microrganismo à célula-alvo (YOUNG et al., 2007).

Uma das portas de entrada de bactérias ao hospedeiro humano é através do trato gastrointestinal (TGI), o sucesso da colonização ocorre quando as bactérias são capazes de sobreviver ao ambiente estomacal ácido e assim alcançar o trato intestinal inferior (YOUNG et al., 2007).

No interior do TGI a primeira linha de defesa que a bactéria encontra é camada de muco, fazendo uso da motilidade para permitir sua penetração e interação com as células epiteliais (JANSSEN et al., 2008). As bactérias podem então invadir as células epiteliais através da polimerização dos microtúbulos e microfilamentos. Após a internalização, a bactéria se mantém dentro de vesículas, local onde expressa as atividades envolvidas na patogênese da doença (CHENG et al., 2003).

Dois mecanismos utilizados por *Campylobacter* durante o curso da infecção foram propostos: o primeiro refere-se à adesão das bactérias ao intestino seguida da produção de toxinas que alteram a capacidade de absorção intestinal, gerando episódios de diarreia. O outro mecanismo envolve a invasão, proliferação e colonização das bactérias dentro da mucosa intestinal, o que levaria a respostas inflamatórias e eventualmente à ocorrência de diarreia com sangue (DASTI et al., 2010).

2.2.1 Motilidade e Quimiotaxia

A motilidade de *Campylobacter* spp. é um fator determinante para a colonização, adesão e invasão das células intestinais, para tanto, a bactéria requer a presença de flagelo. A combinação entre o flagelo, a forma em espiral da célula e o movimento em saca-rolhas são responsáveis pela mobilidade do microrganismo em ambientes viscosos (FERRERO; LEE, 1988).

Jagannathan e Penn (2005) citam que a motilidade é essencial para a sobrevivência em diferentes condições quimiotáticas encontradas no trato gastrointestinal e para a colonização do intestino delgado. A presença de flagelos

polares por sua vez confere ao microrganismo rápida motilidade, possibilitando a superação do peristaltismo intestinal e facilitando a travessia pela camada de muco. Estes flagelos são cruciais para o desencadeamento da doença sendo um dos mais importantes fatores de virulência envolvido na patogênese da infecção por *Campylobacter* (GUERRY, 2007). Experimentos envolvendo mutações flagelares demonstraram a importância dos mesmos nos processos de aderência e invasão (LODGE, 2007).

Os flagelos realizam o transporte tanto de proteínas flagelares como não flagelares, desempenhando um importante papel no processo de secreção de proteínas de virulência, bem como, na quimiotaxia, auto aglutinação, formação de micro colônias e apresentam atividade de adesão e invasão (KONKEL et al., 2004; SONG, et al., 2004).

A quimiotaxia é a forma mais comum de bactérias flageladas direcionarem sua locomoção para os locais onde as condições de sobrevivência são mais favoráveis, como locais com maiores concentrações de fontes de energia e baixas quantidades de substâncias bacteriotóxicas (KHAN et al., 2000).

Os pré-requisitos gerais para a quimiotaxia são quimiorreceptores, um sistema de transdução de sinais para o aparato flagelar da bactéria. *Campylobacter* spp. é quimiotático a boa parte dos componentes da camada de muco intestinal do hospedeiro, como mucina, aminoácidos e ácidos orgânicos, essa característica em associação com a motilidade flagelar desse patógeno facilita sobremaneira a colonização do hospedeiro (ZAUTNER et al., 2012).

2.2.2 Adesão

A adesão às células epiteliais é um importante passo na patogenicidade de muitas bactérias e estabelecimento da infecção. A adesão bacteriana envolve a interação de proteínas especializadas que podem se ligar aos receptores na superfície celular do hospedeiro (PIZARRO-CERDA; COSSART, 2006).

De um modo geral a adesão de bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. às células hospedeiras é mediada pela produção de diferentes apêndices membranares, como exemplo fimbria ou pili. Em relação ao *Campylobacter*, não foram identificados apêndices responsáveis pela adesão deste microrganismo às células do hospedeiro, entretanto, já foram identificadas diversas

proteínas que contribuem para este processo (PARKHILL et al., 2000, FOUTS et al., 2005).

Elementos estruturais como o flagelo, algumas proteínas de membrana externa e lipopolissacarídeos (LPS) permitem a travessia do muco intestinal e adesão da bactéria à célula epitelial por meio de adesinas presentes nesses elementos (JAWETS et al., 1998; FERNADEZ, 2008).

Algumas adesinas de *Campylobacter jejuni* incluem CadF (*Campylobacter adhesion to fibronectin*), JlpA (*jejuni lipoprotein A*), CapA (*Campylobacter adhesion protein*) (JIN et al., 2001), e PEB1 (*Protein Pei, Ellison and Blaser*) (PEI et al., 1998; FLANAGAN et al., 2009). Estas adesinas são proteínas da membrana externa (OMP's) e, portanto, estão direta ou indiretamente associadas com a superfície celular (KONKEL et al., 2004).

A adesina CadF é codificada pelo gene cromossomal *cadF*, que é altamente conservado. A proteína CadF é necessária para a adesão e posterior invasão de *C. jejuni in vitro*, sendo verificado em estudo que mutantes para este tipo de proteína apresentaram reduzidas taxas de colonização em galinhas, quando comparadas com a estirpe selvagem (ZIPRIN et al., 1999, MONTEVILLE et al., 2003). Estudos já demonstraram que há uma significativa redução da internalização de *C. jejuni* em células epiteliais humanas INT 407, quando estes são infectados com cepas mutantes para o gene *cadF* (KONKEL et al., 1999). A função da proteína CadF é semelhante à da proteína de membrana OmpA da *E. coli*, formando canais de membrana celular do hospedeiro. Mas o mecanismo de ação para isso ainda não foi estabelecido (MAMELLI et al., 2006).

A adesina JlpA, codificada pelo gene *jlpA*, é uma lipoproteína de 43kDa envolvida na adesão de células a células HEP-2 (KONKEL et al., 2001; YOUNG et al., 2007). Estudo realizado por Jin et al. (2001) mostrou que uma mutação para o gene *jlpA* e conseqüentemente na expressão da proteína, resultou numa redução de aproximadamente 20% na adesão da bactéria em células epiteliais humanas HEP-2 em relação a estirpes selvagens de *C. jejuni*, porém, não se observou qualquer perda de capacidade de invasão das células.

Outra lipoproteína expressa à superfície das células é a proteína CapA, codificada pelo gene *CapA*. Sua função está associada ao autotransporte e adesão a células Caco-2 (HERMANS et al., 2011). De acordo com Ashgar et al. (2007) foi

observado que a inserção de um gene *CapA*-mutante reduziu de forma significativa a capacidade de adesão e invasão de células *Caco-2*, comprometendo a colonização e persistência de *Campylobacter* spp. em galinhas.

A adesina PEB1, também conhecida como fator de ligação celular, é uma proteína localizada no periplasma, sua função está relacionada com a adesão a linhagem celular do tipo HeLa (PEI et al., 1998).

2.2.3 Invasão

A invasão da mucosa parece ser um dos primeiros mecanismos pelo qual *Campylobacter* spp. causa lesão intestinal. Sua capacidade invasiva é dependente de células epiteliais do cólon intestinal, que pode estar relacionado com o aumento da permeabilidade intestinal, ou com a morte celular (BELTINGER et al., 2008).

Uma das primeiras barreiras encontradas por *Campylobacter* spp. para invasão celular é a camada de muco das células epiteliais no hospedeiro. Mas a bactéria pode efetivamente penetrar essa barreira, sem entrar em contato com as criptas intestinais, podendo ser encontrada livremente na camada mucosa (FERRERO; LEE, 1988). A mucina é uma forte quimio atrativo para *C. jejuni*, pois em vez de ser transportada para fora do intestino pela camada de muco, a bactéria se move livremente em paralelo ao fluxo na mucosa. Essa mobilidade pode ser atribuída ao formato espiral da bactéria e a presença de enzimas que degradam a mucina (POLY; GUERRY, 2008; VAN PUTTEN et al., 2009).

Diferentes mecanismos de invasão são usados por *Campylobacter* spp., como o encapsulamento da bactéria dentro de um vacúolo, evitando assim a ação de células de defesa do hospedeiro e de agentes antimicrobianos, prolongando sua sobrevivência intracelular. Essa é umas das principais estratégias utilizadas pela bactéria para persistir na colonização do trato gastrointestinal do hospedeiro (WATSON; GALAN, 2008).

Para a efetiva invasão da bactéria, algumas proteínas são necessárias, como a CiaB (*Campylobacter invasion antigen B*), proteína com 73kDa, codificada pelo gene *ciaB* (KONKEL et al., 1999). Essa proteína está ligada à destruição de microtúbulos da célula hospedeira de maneira a permitir a entrada e a mobilidade da bactéria no ambiente intracelular. O mecanismo de invasão produzido por CiaB induz a desestruturação de microtúbulos motores e microfilamentos celulares, além

da fosforilação de proteínas citoplasmáticas, que são sinalizadoras de reações em cascata, promovendo distúrbios celulares de forma a potencializar a motilidade intracitoplasmática sem restrições (RIVERA-AMILL et al., 2001).

Estudos de Konkel et al. (1999) demonstraram que cepas mutantes, que não apresentaram *ciaB*, tiveram redução significativa da adesão e invasão de *C. jejuni* em células INT 047. O mecanismo responsável pela secreção da proteína CiaB e o seu papel na invasão, tem sido associado ao sistema de secreção do tipo III, através dos quais as proteínas são injetadas diretamente na célula hospedeira (RIVERA-AMILL et al., 2001).

2.3 Campilobacteriose Humana e Saúde Pública

A campilobacteriose é a infecção causada por *Campylobacter* spp., cujos reservatórios são animais domésticos e silvestres (COLLETTE, 2005; HALD et al., 2016). Dentre os principais reservatórios primários de *Campylobacter* spp. podem ser citados pombos, gaivotas, pardais, patos, perus e, especialmente, o frango de corte. Sabe-se que nas aves, a colonização é geralmente assintomática, podendo ser encontrados níveis de 10^8 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/g de fezes sem sinais clínicos da doença (FORSYTHE, 2002; KEENER et al., 2004).

O trato intestinal das aves possui uma temperatura superior à dos mamíferos, cerca de 42°C, que coincide com a temperatura ótima de multiplicação de espécies de *Campylobacter* termofílicos (*C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari*), o que pode explicar a alta incidência deste microrganismo em frangos de corte (KEENER et al., 2004). A alta densidade populacional utilizada na criação destes animais, se tornou um fator importante para a disseminação desse agente entre as aves (ZHANG, 2008).

A transmissão de *Campylobacter* spp. entre aves ocorre principalmente por via horizontal, por intermédio de cama do aviário, moscas, água de bebida, pessoas e do contato com ratos, equipamentos contaminados, entre outros fatores (SHANE; STERN, 2003). Cerca de 90% de um lote de aves torna-se infectado dois a quatro dias após o início da eliminação da bactéria no ambiente, devido à alta transmissão por via horizontal desse agente entre aves e por estas eliminarem o microrganismo por semanas após a infecção (CDC, 2013).

O fato de as aves serem criadas em lotes, que em sua maioria são bastante adensados, propicia a propagação e permanência de *Campylobacter* no ambiente. Uma vez introduzido em um lote, o patógeno se propaga rapidamente entre os

frangos de corte. De modo que, quando há infecção em um lote de frangos de corte, a prevalência do microrganismo entre as aves desse lote é alta, atingindo muitas vezes 100% dos animais (KEENEL et al., 2004; WHO, 2013).

A tecnologia empregada no processo de abate, pode favorecer a contaminação das carcaças com o próprio conteúdo fecal dos intestinos das aves. Existe uma grande percentagem de carcaças que são contaminadas com matéria fecal durante as etapas do processo de abate contribuindo para a disseminação do patógeno na planta de processamento de frangos de corte (NAUTA et al., 2009). Em estudo desenvolvido por Wagenaar et al. (2006) se constatou também que os isolados identificados tanto das carcaças quanto do material fecal eram idênticos.

Considerada um grave problema de saúde pública, a campilobacteriose é uma das principais gastroenterites de origem alimentar em todo o mundo (WHO, 2013; VONDRAKOVA et al., 2014), principalmente nos Estados Unidos da América (EUA), sendo mais frequente que salmoneloses, shigeloses e colibacilose (ALLOS, 2015).

Esse tipo de infecção, pode provocar desde casos de enterite aguda, infecções extraintestinais, como bacteremia e meningite, até complicações pós-infecciosas (COLLETTE, 2005). Apesar das possíveis complicações provocadas pela instauração do agente, a campilobacteriose geralmente não tem caráter agressivo, sendo autolimitante, onde a recuperação ocorre sem auxílio de tratamento (MOORE et al., 2005).

A sintomatologia da campilobacteriose se assemelha com doenças causadas por diversos outros patógenos entéricos. O período de incubação do microrganismo normalmente é de dois a cinco dias, com ocorrência de sintomatologia de dois a três dias, podendo perdurar por até 10 dias (MOORE et al., 2005). Os principais sintomas observados são febre, diarreia, dores de cabeça e abdominal, podendo ocorrer também náuseas, vômitos e indisposição. A diarreia pode variar de aquosa, moderada e autolimitante a disenteria sanguinolenta, mucoide ou purulenta (ACMSF, 2005; WHO, 2015).

Entretanto, o que chama a atenção é a baixa dose infectante, cerca de 400 a 500 células do patógeno são capazes de desencadear a doença, variando de acordo com a estirpe e suscetibilidade do hospedeiro (BUTZLER, 2004; ACMSF, 2005).

Após a infecção por *Campylobacter* spp., a recuperação costuma ser rápida. O tratamento, na maioria das vezes, é sintomático e, em poucos, casos há a necessidade do uso de antimicrobianos (HADDEN; GREGSON, 2001). Porém, em alguns casos, podem ocorrer complicações e manifestações a longo prazo. Dentre as complicações, citam-se artrite reativa, meningite, osteomielite, bacteremia, sepse, endocardite e miocardite, complicações no trato reprodutivo e alterações neurológicas (BECKER et al., 2007).

A Síndrome de Guillain-Barré (SGB) e de Miller-Fisher se caracterizam como as alterações neurológicas mais frequentes após o processo infeccioso por *C. jejuni* (KUWABARA; YUKI, 2013; BRASIL, 2015). Já a síndrome de Miller-Fisher é uma variante da SGB e é caracterizada por oftalmoparesia, arreflexia e ataxia (KAAKOUSH et al., 2014).

A SGB afeta o sistema nervoso periférico resultando em paralisia flácida generalizada, podendo comprometer os músculos que auxiliam a respiração e anualmente para cada 100.000 habitantes, quatro pessoas podem ser acometidas (KEITHLIN et al., 2014). A correlação entre infecção por *Campylobacter* seguida da ocorrência de SGB foi comprovada em estudo realizado na Nova Zelândia, que após a implementação de medidas de higiene mais rigorosas na produção avícola ocasionou queda no número de casos de campilobacteriose e de SGB. Além disso, surtos de SGB têm sido associados a surtos de infecção por *C. jejuni* em diversos outros países (SIVADON-TARDY et al., 2014).

2.4 Métodos para detecção e identificação de *Campylobacter* spp.

As análises de alimentos para detecção de microrganismos patogênicos específicos apresentam vários problemas. Um dos fatores que exercem grande influência na detecção e no isolamento de patógenos é o número de microrganismos presentes em alimentos (VOSS-RECH; VAZ, 2012). Segundo Cason et al. (1997) quando um alimento está contaminado com bactérias patogênicas, elas frequentemente estão em números baixos, com distribuição heterogênea e a competitividade com outras espécies não patogênicas é alta, necessitando assim da análise de um grande número de amostras para que haja confiabilidade nos resultados negativos.

2.4.1 Cultivo

Os métodos de cultura utilizados para o isolamento, a identificação e a diferenciação de bactérias do gênero *Campylobacter* são demorados e difíceis devido a sua natureza fastidiosa, fazendo com que cresçam mais lentamente que outros enteropatógenos, requerendo condições especiais de cultivo (OYOFU et al., 1992; SANDERS, 1998).

Os métodos para cultivo usualmente incluem etapas de pré-enriquecimento, enriquecimento e plaqueamento em ágar seletivo, seguindo com a identificação bioquímica. Procedimentos de enriquecimento seletivo e incubação prolongada são utilizados para reduzir a multiplicação da microbiota contaminante, com prazo de quatro dias para obtenção de um resultado negativo e em torno de sete dias para confirmar um resultado positivo (GIESENDORF; QUINT, 1995; SHIH, 2000).

Outros métodos como a filtração e enriquecimento em meio semi-sólido estão descritos na literatura. Os suplementos antibióticos são utilizados em combinação com meios seletivos para inibição da microbiota competitiva (JEFFREY et al., 2000). Os antimicrobianos utilizados com maior frequência na preparação dos meios de cultura para *Campylobacter* spp. são trimetropim, polimixina B, vancomicina e cefalosporinas. Outros agentes tais como sangue e carvão são adicionados às formulações para proteger o microrganismo contra derivados tóxicos do oxigênio (CORRY et al., 1995; JACOBS-REITSMA, 2000).

A utilização de uma fase de pré-enriquecimento com incubação a 37°C por quatro horas permite a recuperação das células de *Campylobacter* spp. injuriadas pela desidratação, aquecimento, falta de nutrientes, congelamento ou exposição a radicais de oxigênio. Portanto, a incubação a 37°C por quatro horas é recomendada antes da incubação a 42°C por mais 20 a 44h. Ultrapassar quatro horas de pré-enriquecimento pode favorecer a multiplicação da microbiota contaminante (DONNISON, 2003).

Garrity et al. (2005) e Vandamme et al. (2005) utilizando temperaturas de 42°C a 43°C, respectivamente, perceberam o aumento na seletividade microbiana, com inibição do crescimento de outros microrganismos intestinais, sendo um critério adicional de seletividade de espécies termotolerantes.

Diferentes meios de enriquecimento foram desenvolvidos para o isolamento de *Campylobacter* spp. a partir de amostras de alimento, como os caldos *Preston*,

Exeter, *Bolton*, e *Park e Sanders* (CORRY et al., 1995). Os meios seletivos mais comumente empregados para o cultivo do microrganismo são Skirrow, Campy-Cefex, Butzler, Preston e Exeter. Estes contêm sangue desfibrinado de cavalo ou carneiro na proporção de 5% a 15%, porém o sangue é um suplemento considerado como não seletivo. Já os meios *modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar* (mCCDA) e Karmali não contêm sangue, mas sim carvão ativado (BOLTON et al., 1984; KARMALI et al., 1986).

Mesmo havendo uma diversidade de meios para o isolamento de *Campylobacter* spp., ainda há uma grande dificuldade na execução dessas técnicas em alimentos (SANTOS, 2016). Segundo Borck et al. (2002) o emprego das metodologias convencionais geralmente apresenta uma redução no isolamento devido a presença de baixa quantidade de bactérias do gênero, a alta carga de competidores e o estresse elevado ao qual esses microrganismos são submetidos.

Em 2006, a “*International Organization for Standardization*” (ISO) divulgou as especificações técnicas 10272-1/2006 para detecção e 10272-2/2006 para enumeração de colônias de *Campylobacter* spp. a fim de estabelecer um padrão técnico. Estas especificações preconizam o enriquecimento seletivo da amostra diluída em caldo Bolton suplementado com sangue equino. Essa etapa ocorre a 37°C por 4h a 6h, para que haja a recuperação das células injuriadas, e posteriormente a 41,5°C durante 40h a 48h (ISO, 2006).

2.4.2 Biologia Molecular

Desde a década de 1970, a biologia molecular vem sendo utilizada sobremaneira no estudo da diversidade microbiana, sendo possível a identificação de microrganismos responsáveis pelas doenças transmitidas por alimentos (JUSTE et al., 2008). Cada vez mais as ferramentas moleculares estão sendo implementadas dentro da indústria de alimentos para controle e manutenção da segurança dos alimentos, sendo que, aplicação dessas ferramentas é capaz de identificar microrganismos em alimentos em curto espaço de tempo, gerando resultados rápidos (CEUPPENS et al., 2014).

A Reação da Cadeia da Polimerase (PCR) tem sido uma técnica amplamente utilizada para o diagnóstico laboratorial de *Campylobacter* em diversos substratos, visto que, é capaz de associar as variáveis sensibilidade e especificidade no padrão

requerido, além de ser de fácil execução (BUTZLER, 2004; GOERING, 2010). Esse método é baseado no princípio da replicação enzimática de ácidos nucleicos e amplificação de sequências predeterminadas do DNA alvo, pelo uso de dois fragmentos específicos, e complementares do mesmo, denominados iniciadores ou *primers*, e posterior análise do produto amplificado (KONEMAN et al., 2001; STANEK, 2013).

Os iniciadores são sequências do processo de síntese e correspondem a curtas cadeias de nucleotídeos complementares à região inicial (*primer forward*) e região final (*primer reverse*) da sequência que se deseja amplificar, chamada sequência alvo (KUBISTA et al., 2006).

A reação ocorre em três etapas: desnaturação (melting), anelamento (annealing) e extensão (extesion). Na primeira etapa, ocorre a separação da dupla fita do DNA a ser amplificado, na segunda, ocorre a ligação do iniciador ao DNA a ser amplificado, e na terceira, ocorre a síntese da nova fita de DNA. Ao final dos ciclos, são obtidas milhões de cópias de DNA alvo, que poderão ser detectadas posteriormente por meio de eletroforese em gel de agarose (KUBISTA et al., 2006; SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

Segundo He et al. (2010), as abordagens moleculares têm contribuindo com pesquisas para determinação a presença de *C. jejuni* e *C. coli* na produção comercial de frangos de corte em todo mundo. Um dos fatores que exacerba o uso da técnica da PCR para detecção de *Campylobacter* spp. está no fato da PCR ser aplicada nas diferentes matrizes alimentares, além da sensibilidade da técnica em detectar o DNA de células mortas do patógeno (POSTOLLEC, et al., 2011).

Diferentes autores desenvolveram técnicas de PCR e suas variantes para detecção de *Campylobacter*. Estas técnicas incluem PCR convencional (MORENO et al., 2001), PCR *nested* ou *seminested* (WAGGE et al., 1999) PCR *nested* ou *seminested* (WAGGE et al., 1999), PCR multiplex (CASARIL et al., 2010), RT-PCR (SAILS et al., 1998) e PCR em Tempo Real (POSTOLLEC et al., 2011).

Em estudo, Gonzalez et al. (1997) propuseram uma PCR multiplex utilizando iniciadores baseados no gene *ceuE* para detectar e diferenciar *C. jejuni* e *C. coli* e obtiveram fragmentos de DNA de 793-pb e 894-pb, respectivamente.

Stucki et al. (1995) e Gonzalez et al. (1997) utilizaram o gene *mapA* codificador de uma proteína de membrana espécie-específica de *C. jejuni* chamada

mapA e o gene *ceuE* que codifica um polipeptídeo envolvido no transporte de sideróforos usando-os como alvos na PCR para identificação específica de *C. jejuni* e *C. coli*, respectivamente. Casaril (2010) propôs um ensaio multiplex fazendo uso dos primers *mapA* e *ceuE* para diferenciar *C. jejuni* e *C. coli*, obtendo os produtos de PCR de 202pb e 889pb, respectivamente, e a especificidade foi de 100% para as amostras positivas.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Pesquisar espécies de *Campylobacter* e presença dos genes de virulência em carcaças de frangos *in natura*, resfriadas, congeladas, fígado e moela.

3.2 Específicos

- Isolar *Campylobacter* spp de carcaças de frangos *in natura*, resfriadas, congeladas, fígado e moela.
- Utilizar a PCR para detecção de *C. jejuni* e *C. coli* em carcaças de frangos, fígado e moela.
- Utilizar a PCR para detecção dos genes de virulência *Peb1*, *JlpA*, *CadF* e *CiaB*, *CapA*;
- Associar a detecção as espécies de *Campylobacter* e genes de virulência com a forma de comercialização das carcaças, fígado e moela.
- Determinar a ocorrência das espécies de *Campylobacter* nos diferentes produtos avícolas

4. REFERÊNCIAS

- ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual 2018. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/storage/files/relatorio-anual-2018.pdf>>. Acesso em: 27 de junho de 2019.
- ACMSF. ADVISORY COMMITTEE ON THE MICROBIOLOGICAL SAFETY OF FOOD. *Second Report on Campylobacter*. Advises the food standards agency on the microbiological safety of food. **Food Standards Agency**, p. 195, 2005.
- ALLOS, B. M. *Campylobacter jejuni* Infections: Update on Emerging Issues and Trends. **Clinical Infectious Disease**, v. 61, n. 2, p. 1201-1206, 2015.
- ASHGAR, S.S.; OLDFIELD, N.J., WOOLDRIDGE, K.G.; JONES, M.A.; IRVING, G. J.; TURNER, D.P.; ALA'ALDEEN, D.A. CapA, an autotransporter protein of *Campylobacter jejuni*, mediates association with human epithelial cells and colonization of the chicken gut. **Journal Bacteriology**, v.189, n. 5, p. 1856-65, 2007.
- BECKER, S.; EJLERTSEN, T.; KRISTENSEN, B.; NORGAARD, M.; NIELSEN, H. Is the incidence of perimyocarditis increased following *Campylobacter jejuni* infection? **European Journal Clinical Microbiology Infectious Diseases**, v. 26, n. 12, p. 927–929, 2007.
- BELTINGER J.; DEL BUONO, J.; SKELLY, M. M.; THORNLEY, J.; SPILLER, R. C.; STACK, W. A.; HAWKEY, C. J. Disruption of colonic barrier function and induction of mediator release by strains of *Campylobacter jejuni* that invade epithelial cells. **World Journal Gastroenterology**, v, 14, n. 28, p. 7345-7352, 2008.
- BHAVSAR, S.; KAPADNIS, B. Virulence factors of *Campylobacter*. **The Internet Journal of Microbiology**, v. 3 n. 2, p. 1-7, 2007.
- BHUNIA, A. K. Foodborne microbial pathogens: mechanisms and pathogenesis. **Purdue University**, v. 26, n.1, p. 217-225, 2008.
- BLACKWELL, G. **Regulation of flagellin glycosylation genes in Campylobacter jejuni: influence of NssR, the nitrosative stress response regulator**. 2010. 278 f. Thesis (Doctor of Philosophy School of Biosciences) - University of Birmingham, Birmingham, 2010.
- BOLTON, F. J.; HUTCHINSON, D. N.; COATES, D. Blood-Free selective medium for isolation of *Campylobacter jejuni* from feces. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 19, n. 2, p. 169-171, 1984
- BORCK, B.; STRYHN, H.; ERSBÜLL, A. K. Thermophilic *Campylobacter* spp. in turkey samples: evaluation of two automated enzyme immuno assays and conventional microbiological techniques. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n. 3, p. 574-582, 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas. Síndrome de Guillain-Barré**. Portaria SAS/MS nº 1171, de 19 de novembro de 2015.

BRONOWSKI, C.; JAMESC. E., WINSTANLEY, C. Role of environmental survival in transmission of *Campylobacter jejuni*. **FEMS Microbiologys Letters**, v. 356, n. 1, p. 8–19, 2014.

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

CASARIL, K. B. P. B. **Padronização de PCR tradicionale em tempo real para detecção de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* em alimentos**. 2010. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Curso de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. Universidade Estadual de Londrina, Londrina – Paraná.

CASON, J. A.; BAILEY, J. S.; STERN, N. J. et al. Relationship between aerobic bacteria, Salmonella and *Campylobacter* on broiler carcasses. **Poultry Science**, v. 76, n. 7, p. 1037–1041, 1997.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Multistate outbreak of *Campylobacter jejuni* infections associated with under cooked chicken liverse northe astern United States, 2012. **MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report**. Disponível em: 6. <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6244a2.htm>>. Acesso em: 17 julho 2019.

CDC. Center Disease and Control. Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of *Campylobacter jejuni*. **PulseNet USA**. The National Molecular Subtyping Network for Foodborne Disease Survellance, p.15, 2013.

CEUPPENS, S.; LI, D.; UYTTENDAELE, H.; RENAULT, P.; ROSS, P.; RANST, M. V.; COCOLIN, G.; DONAGHY, J. Molecular Methods in Food Safety Microbiology: Interpretation and Implications of Nucleic Acid Detection. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n.4, p. 551-577, 2014.

CHANDRASHEKHAR, K. et al. Transducer like proteins of *Campylobacter jejuni* 81176: role in chemotaxis and colonization of the chicken gastrointestinal tract. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 5, n. 46, p. 1-12, 2015.

CHENG, Z.; GRIFFITHS, M. W. Rapid detection of *Campylobacter jejuni* in chicken rinse water by melting-peak analysis of amplicons in real-time polymerase chain reaction. **Journal Food Protection**, v. 66, n. 8, p. 1343-52, 2003.

CISCO, I. C.; TEDESCO, D.; PERDONCINI, G.; SANTOS, S. P.; RODRIGUES, L. B; SANTOS, L. R. *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* em carcaças de frango resfriadas e congeladas. **Ciência Animal Brasileira**. v. 18, n. 1, p. 1-6, 2017.

COLLETTE, F. *Campylobacter*. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 146, n. 5, p. 289–298, 2005.

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.

DASTI, J. I.; TAREEN, A. M.; LUGERT, R.; ZAUTNER, A.; GROSS, U. *Campylobacter jejuni*: a brief overview on pathogenicity-associated factors and disease mediating mechanisms. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n. 4, p. 205-211, 2010.

DONNISON, A. Isolation of thermotolerant *Campylobacter* - review and methods for New Zealand Laboratories. **Wellington: Ministry of Health**, p. 83, 2003.

DU, X.; WANG, N.; REN, F.; TANG, H.; JIAO, X.; HUANG, J. cj0371: A Novel Virulence-Associated Gene of *Campylobacter jejuni*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 1094-1102, 2016.

EFSA Journal. European Food Safety Authority. Trends summary report on zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks 2015. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3991.pdf>. Acesso em: 11 de julho de 2019.

EMBRAPA (2019). **Estatísticas/ Brasil / Frango de Corte**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas/frangos/brasil>>. Acesso em: 14 de jan. de 2020.

FERRERO, R. L.; LEE, A. Motility of *Campylobacter jejuni* in a viscous environment: comparison with conventional rod-shaped bacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 134, n. 1, p. 53–59, 1988.

FERNANDES, M.; MENA, C.; SILVA, J.; TEIXEIRA, P. Study of cytolethal distending toxin (cdt) in *Campylobacter coli* using a multiplex polymerase chain reaction assay its distribution among clinical and food strains. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 1, p. 103-106, 2010.

FERNÁNDEZ, H.; VERA, F.; VILLANUEVA, M.P.; GARCIA, A. Occurrence of *Campylobacter* species in healthy well-nourished and malnourished children. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n.1, p. 1-3, 2008.

FLANAGAN, R.C., NEAL-MCKINNEY, J.M., DHILLON, A.S., MILLER, W.G., KONKEL, M.E. Examination of *Campylobacter jejuni* putative adhesins leads to the identification of a new protein, designated FlpA, required for chicken colonization. **Infection Immunology**, v. 77, n. 6, p. 2399-2407, 2009.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. 2ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424 p.

FOSTER, G.; HOLMES, B.; STEINGERWALT, A.G. *Campylobacter insulaenigrae* sp. nov., isolated from marine mammals. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 2369-2373, 2004.

FOUTS, D. E.; MONGODIN, E. F.; MANDRELL, R.; MILLER, W. G.; RASKO, D. A.; RAVEL, J.; BRINKAC, L. M.; DEBOY, R. O. T.; PARKER, C. T.; DAUGHERTY, S. C.; DODSON, R. J.; SCOTT DURKIN, A.; MADUPU, R.; SULLIVAN, S. A.; SHETTY, J. U.; AYODEJI, M. A.; SHVARTSBEYN, A.; SCHATZ, M. C.; BADGER, J. H.;

FRASER, C. M.; KAREN; NELSON, 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.

GARRITY, G.M.; BELL, J.A.; LILBURN, T. *Order I. Campylobacterales ord. nov.* In: G.M. Garrity (Ed.) 2005. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**: Volume Two: the Proteobacteria. 2 ed. New York: Springer, 2005. 1203p.

GIESENDORF, B. A. J.; QUINT, W. G. V. Detection and identification of *Campylobacter* spp. using the polymerase chain reaction. **Cellular and Molecular Biology**, v. 41, n. 5, p. 625-638, 1995.

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.

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.

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

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

HADDEN, R. D. M.; GREGSON, N. A. Guillain-Barré syndrome and *Campylobacter jejuni* infection. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n. 30, p. 145-154, 2001.

HALD, B.; SKOV, M. N.; NIELSEN, E. M.; RAHBEK, C.; MADSEN, J. J.; WAINO, M.; CHRIÉL, M.; NORDENTOFT, S.; BAGGESEN, D. L.; MADSEN, M. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in wild birds on Danish livestock farms. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 58, n. 11, p. 1-10, 2016.

HAMIDIAN, M.; SANAEI, M.; BOLFION, M.; DABIRI, H.; ZALI, M. R.; WALTHER-RASMUSSEN, J. Prevalence of putative virulence markers in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from hospitalized children, raw chicken, and raw beef in Tehran, **Canadian Journal of Microbiology**, v.57, n.2, p. 143–148, 2011.

HAVELAAR, A. H.; IVARSSON, S.; LÖFDAHL, M.; NAUTA, M. J. Estimating the true incidence of campylobacteriosis and salmonellosis in the European Union, 2009. **Epidemiology and Infection**, v. 141, n. 2, p. 293-302, 2013.

HE, Y.; YAO, X.; GUNTHER IV, N. W.; XIE, Y.; SHI, S. T. X. Simultaneous Detection and Differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, and *C. lari* in Chickens Using a Multiplex Real-Time PCR Assay. **Food Analytical Methods**, v. 3, n. 1, p. 321-329, 2010.

HERMANS, D.; DEUN, K. V.; MARTEL, A.; IMMERSEEL, F. V.; MESSENS, W.; HEYNDRIKX, M.; HAESEBROUCK, F.; PASMANS, F. Colonization factors of *Campylobacter jejuni* in the chicken gut. **Veterinary Research**, v.42, n. 1, p. 82, 2011.

HOUNG, H. S.; SETHABUTR, O.; NIRDNOY, W. et al. Development of a ceuE-based multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay for direct detection and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Thailand. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 40, n. 12, p. 11–19, 2001.

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

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION (ISO). 10272-1:2006. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of Campylobacter spp. Part 1: Detection method*. 16 p.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION (ISO). 10272-2:2006. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of Campylobacter spp. Part 2. Colony count technique*. 13 p.

JACOBS-REITSMA, W. *Campylobacter* in the food supply. In: Nachamkin, I; BLASER, M. J. (Eds) *Campylobacter*, 2nd ed. Washington, DC: ASM, Pres, p. 467-482, 2000.

JAGANNATHAN, A.; PENN, C. Motility in *Campylobacter*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, n. 1, p. 331-347, 2005.

JANSSEN, R.; KROGFELT, K. A.; CAWTHRAW, S. A; VAN PELT, W.; WAGENAAR, J. A.; OWEN, R. J. Host-pathogen interactions in *Campylobacter* infections: the host perspective. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 3, p. 505-518, 2008.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. **Modern food microbiology**. 7. ed. New York: Springer, 790 p, 2005.

JAWETS, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. Microbiologia médica. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, p.161-169, 1998.

JEFFREY, J. S.; HUNTER, A; ATWILL, E. R. A fied-suitable, semisolid aerobic enrichment medium for isolation of *Campylobacter jejuni* in small numbers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 1668-1669, 2000.

JIN, S.; JOE, A.; LYNETT, J.; HANI, E. K.; SHERMAN, P.; CHAN, V. L. JlpA, a novel surface-exposed lipoprotein specific to *Campylobacter jejuni*, mediates adherence to host epithelial cells. **Molecular Microbiology**, v. 39, n. 5, p. 1225–1236, 2001.

JUSTE, A.; THOMMA, B. P. H. J.; LIEVENS, B. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. **Food Microbiology**, v. 25, n. 6, p. 745-761, 2008.

- KAAKOUSH, N. O.; CASTAÑO-RODRÍGUEZ, N.; MITCHELL, H. M.; MAN, S. M. Global Epidemiology of *Campylobacter* Infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 687-720, 2014.
- KARMALI, M. A.; SIMON, A. E.; ROSCOE, M.; FLEMING, P. C.; SMITH, S. S.; LANE, J. Evaluation of a blood-free, charcoal-based, selective médium for the isolation of *Campylobacter* organisms from feces. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 23, n. 3, p. 456-459, 1986.
- KEENEL, K. M.; BASHOR, M. P.; CURTIS, P. A.; SHELDON, B. W.; KATHARIOU, S. Comprehensive review of *Campylobacter* and poultry processing. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 3, n. 2, p. 105-116, 2004.
- KEENER, K.M. AND BASHOR, M.P. AND CURTIS, P.A. AND SHELDON, B.W. AND KATHARIOU, S. Comprehensive Review of *Campylobacter* and Poultry Processing. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 3, n. 2, p. 105-116, 2004.
- KEITHLIN, J.; SARGEANT, J.; KATE THOMAS, M.; FAZIL, A. Systematic review and meta-analysis of the proportion of *Campylobacter* cases that develop chronic sequelae. **BMC Public Health**, v. 14, n. 1203, p. 1-19, 2014.
- KEUM-IL, J.; KIM, M. G.; HÁ, S. D.; KIM, K. S.; LEE, K. H.; CHUNG, D. H.; KIM, C.CH.; KIM, K. Y. Morphology and adhesion of *Campylobacter jejuni* to chicken skin under varying conditions. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 202-206, 2007.
- KHAN, S.; PIERCE, D.; D VALE, R. Interactions of the chemotaxis signal protein CheY with bacterial flagellar motors visualized by evanescent wave microscopy. **Current Biology**, v. 10, n. 15, p. 927-930, 2000.
- KONEMAN, E.W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M; SCHREKENBERGER, P. C. *Diagnóstico microbiológico. Texto e atlas colorido*. 5. Ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2001.
- KONKEL, M.E.; GRAY, S.A.; KIM, B.J.; GARVIS, S.G.; YOON, J. Identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* based on the cadF virulence gene and its product. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n.3, p. 510-517, 1999.
- KONKEL, M.E.; MONTEVILLE, M.R.; RIVERA-AMILL, V.; JOENS, L.A. The Pathogenesis of *Campylobacter Jejuni*-Mediated Enteritis. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 55-71, 2001.
- 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.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J.M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONÁK, J.; LIND K, SINDELKA, R, SJÖBACK R.; SJÖGREEN B.; STRÖMBOM L.; STÅHLBERG, A.; ZORIC, N. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects Medicine**, v. 27, n. 3, p. 95-125, 2006.

KUWABARA, S; YUKI, N. Axonal Guillain-Barre syndrome: concepts and controversies. **The Lancet Neurology**, v. 12, n. 12, p. 1180–1188, 2013.

LEE, M.D.; NEWELL, D.G. *Campylobacter* in poultry: filling an ecological niche. **Avian diseases**. v. 50, n. 1, p. 1-9, 2006.

LODGE, K. A. Molecular Investigation of *Campylobacter jejuni* Pathogenesis. [online], 2007. **School of Applied Sciences University**, Australia, 2007. Disponível em: <http://researchbank.rmit.edu.au/view/rmit:9874>. Acesso em: 08 de agosto de 2019.

LPSN - List of Prokaryotic Names with standing in nomenclature, 2015. Disponível em: <http://www.bacterio.net/campylobacter.html>. Acesso em: 02 de julho de 2019.

MAMELLI, L.; PAGES, J. M.; KONKEL, M. E.; BOLLA, J. M. Expression and purification of native and truncated forms of CadF, an outer membrane protein of *Campylobacter*. **International Journal Biology Macromolecules**, v. 39, n.1, p. 135–140, 2006.

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

MARINOU, I.; BERSIMIS, S.; IOANNIDIS, A.; NICOLAOU, C.; MITROUSSIAZIOUVA, A.; LEGAKIS, J.L.; CHATZIPANAGIOTOU, S. Identification and antimicrobial resistance of *Campylobacter* species isolated from animal sources. **Frontiers in Microbiology**. v. 3, n. 58, p. 1-6, 2012.

MELO R. T; MENDONÇA, E. P.; MONTEIRO, G. P.; SIQUEIRA, M. C.; PEREIRA, C. B.; PERES, P. A. B. M.; FERNANDEZ, H.; ROSSI, D. A. Intrinsic and Extrinsic Aspects on *Campylobacter jejuni* Biofilms. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n.1, p. 1332-1346, 2017.

MONTEVILLE, M. R.; YOON, J. E.; KONKEL, M. E. Maximal adherence and invasion of INT 407 cells by *Campylobacter jejuni* requires the CadF outer-membrane protein and microfilament reorganization. **Microbiology**, v.149, n.1, p.153-165, 2003.

MOORE, J.; MADDEN, R. The effect of thermal stress on *Campylobacter coli*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 5, p. 892-899, 2000.

MOORE, J.; 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.; VELAS, U. M.; WHYTE, P. *Campylobacter*. **Veterinary Research**, v. 36, n. 30, p. 351–382, 2005.

MORENO, Y.; HERNÁNDEZ, M.; FERRÚS, M.A.; ALONSO, J.L.; BOTELLA, S.; MONTES, R.; HERNÁNDEZ, J. Direct detection of thermotolerant *Campylobacters* in chicken products by PCR and in situ hybridization. **Research Microbiology**, v. 152, n. 6, p. 577-582, 2001.

NACHAMKIN, I. Microbiologic approaches for studying *Campylobacter* in patients with Guillain- Barré syndrome. **Journal of Infectious Diseases**, v. 176, n. 2, p. 106-114, 2007.

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

NCBI - National Center for Biotechnology Information. GenBank, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/149?>>. Acesso: 06 de agosto de 2019.

OH, E.; MCMULLEN, L.; JEON, B. High prevalence of hyper-aerotolerant *Campylobacter jejuni* in retail poultry with potential implication in human infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 1263, p.1-8, 2015.

OLIVER, J.D. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria, **FEMS Microbiology Reviews**, v. 34, n. 4, p. 415–425, 2010.

OLIVEIRA, T.C.R.M; BARBUT, S.; GRIFFITHS, M.W. Detection of *Campylobacter jejuni* in naturally contaminated chicken skin by melting peak analysis of amplicons in realtime PCR. **International Journal Food Microbiology**, v. 104, n. 1, p. 105-111, 2005.

OYOFO, B.A.; ORNTON, S.A.; BURR, D.H.; TRUST, T.J.; PAVLOVSKIS, O.R.; GUERRY, P. Specific Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by Using Polymerase Chain Reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 10, p. 2613-2619, 1992.

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

PARKHILL, J.; WREN B.W.; MUNGALL, K.; KETLEY, J.M.; CHURCHER, C.; BASHAM, D.; CHILLINGWORTH, T.; DAVIES, R.M.; FELTWELL, T.; HOLROYD, S.; JAGELS, K.; KARLYSHEV, A.V.; MOULE, S.; PALLAN, M. J. PENN, C. W.; CODORNIZ, M. A.; RAJANDREAM, M.A.; RUTHERFORD, K. M.; VAN VLIET, A. H.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B. G. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. **Nature Research Journal**, v. 403, n. 67, p. 665-688, 2000.

PEI, Z.; BURUCOA, C.; GRIGNON, B.; BAQAR, S.; HUANG, Z.X.; KOPECKO, D.J.; BOURGEOIS, A.L.; FAUCHERE, J.L.; BLASER, M.J. Mutation in the *peb1A* locus of

Campylobacter jejuni reduces interactions with epithelial cells and intestinal colonization of mice. **Infection and Immunity**, v. 66, n.3, p. 938–943, 1998.

PIZARRO-CERDA, J.; COSSART, P. Bacterial adhesion and entry into host cells. **Cell Press**, v. 124, n.4, p. 715–727, 2006.

POLY, F.; GUERRY, P. Pathogenesis of *Campylobacter*. **Current Opin in Gastroenterology**, v. 24, n.1, p. 27-31, 2008.

POSTOLLEC, F.; FALENTIN, H.; PAVAN, S.; COMBRISSE, J.; SOHIER, D. Recent Advances in Quantitative PCR (qPCR) Applications in Food Microbiology. **Food Microbiology**, v. 28, n. 5, p. 846-861, 2011.

PRACHANTASENA, S.; CHARUNUNTAKORN, P.; MUANGNOICHARON, S.; HANKLA, L.; TECHAWAL, N.; CHAVEERACH, P.; TUITEMWONG, P.; CHOKESAJJAWATEE, N.; WILLIAMS, N.; HUMPHREY, T.; LUANGTONGKUM, T. Distribution and genetic profiles of *Campylobacter* in commercial broiler production from breeder to slaughter in Thailand. **PLoS One**, v. 11, n. 2, p. 1-16, 2016.

PUBMLST - Public databases for molecular typing and microbial genome diversity. Disponível em: <<http://pubmlst.org/>> Acesso em: 06 de agosto de 2019.

QUETZ, J.D. **Estudo sobre *Campylobacter coli* em crianças da área urbana de Fortaleza, CE/Brasil: identificação genética, inflamação intestinal e impacto no estado nutricional.** 2009. 141f. Dissertação (Mestrado em farmacologia) Universidade Federal do Ceara. Fortaleza-CE.

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. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 183, n. 11, p. 1607-1016, 2001.

SANTOS, E.L.S. **Detecção e identificação de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango de corte produzidas no estado de Minas Gerais.** 2016. 58f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais-Escola de Veterinária. Belo Horizonte – MG.

SAILS, A. D.; BOLTON, F. J.; FOX, A. J.; WAREING, D. R. A.; GREENWAY, D. L. A. A reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for the detection of thermophilic *Campylobacter* spp. **Molecular and Cellular Probes**, v. 12, n. 5, p. 317-322, 1998.

SAILS, A.D.; FOX, A.J.; BOLTON, F.J.; WAREING, D.R.A.; GREENWAY, D.L.A.; BORROW, R. Development of a PCR ELISA assay for the identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **Molecular and Cellular Probes**, v. 15, n. 5, p. 291-330, 2001.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Molecular Cloning. 3. Ed. v. 2. Cold Spring Harbor **Laboratory Press**, Nova Iorque, 210 p., 2001.

SANDERS, G. Isolation of *Campylobacter* from food. In: Warbuton D (Ed.). **Compedium of analytical methods**, Québec: Polyscience Publications, 495 p.,1998.

SHANE, S.M.; STERN, N. J. *Campylobacter* infection. In.: SAIF, Y. M. Diseases of poultry. 11. Ed. **Ames: Iowa State Press**, 2003. Cap.17, p. 615-625.

SIVADON-TARDY, V.; PORCHER, R.; ORLIKOWSKI, D.; RONCO, E.; GAULT, E.; ROUSSI, J.; DURAND, M.C.; SHARSHAR, T.; ANNANE, D.; RAPHAEL, J.C.; MEGRAUD, F.; GAILLARD, J.L. Increased incidence of *Campylobacter jejuni* associated Guillain-Barre syndromes in the Greater Paris area. **Epidemiology and Infection**, v. 142, n. 8, p. 1609-1613, 2014.

SNELLING, W.J.; MATSUDA, M.; MOORE, J.E.; DOODLEY, J.S. Under the microscope. *Campylobacter jejuni*. **Letters in Applied Microbiology**. v. 41, n. 4, p. 297-302, 2005.

SONG, Y.C.; JIN, S.; LOUIE, H.; NG, D.; LAU, R.; ZHANG, Y.; WEERASEKERA, R.; AL RASHID, S.; WARD, L.A.; DER, S.D.; CHAN, V.L. FlaC, uma proteína de *Campylobacter jejuni* TGH9011 (ATCC43431) secretada pelo aparelho flagelar, liga células epiteliais e influencia a invasão celular. **Molecular Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 541-553, 2004.

STANEK, L. Polymerase Chain Reaction: Basic Principles and Applications in Molecular Pathology. **The Czech And Slovak Of Pathology**, v. 49, n. 3, p. 119-121, 2013.

STUCKI, U.; FREY, J.; ICOLET, 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.

TABOADA, E.N.; CLARK, C.G.; SPROSTON, E.L.; CARRILLO, C.D. Current methods for molecular typing of *Campylobacter* species. **Journal of Microbiological Methods**, v. 95, n.1, p. 24–31, 2013.

USDA - United States Department of Agriculture. **Poultry and Products Annual**. Disponível em: <<http://usdabrazil.org.br/pt-br/reports/poultry-and-products-annual-report-2019.pdf>>. Acesso em: 14 de jan. de 2020.

VANDAMME, P. Taxonomy of the family *Campylobacteraceae*. *Campylobacter*, Washington, 2. Ed, p. 43-44, 2000.

VANDAMME, P.; DE LEY, J. Proposal of a new family, *Campylobacteraceae*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 41, n. 3, p. 451-455, 1991.

VANDAMME, P.; DEWHIRST, F.E.; PASTER, B.J.; ON, S.L.W. Family *Campylobacteriaceae*. 2. Ed. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2005. p. 145-146.

VAN PUTTEN, J.P.; VAN ALPHEN, L.B.; WOSTEN, M.M.; DE ZOETE, M.R. Molecular mechanisms of *Campylobacter* infection. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 337, n. 1, p. 197-229, 2009.

VONDRAKOVA, L.; PAZLAROVA, J.; DEMNEROVA, K. Detection, identification and quantification of *Campylobacter jejuni*, *coli* and *lari* in food matrices all at once using multiplex qPCR. **Gut Pathogens**, v. 6, n. 12, p. 1-9, 2014.

VOSS-RECH, D.; VAZ, E.S.L. Técnicas laboratoriais para isolamento de *Campylobacter* em material avícola. Anais do Workshop de Diagnóstico Microbiológico de *Campylobacter* Aplicado à Avicultura. **Embrapa**. p. 21-28, 2012.

WAAGE, A. S.; VARUND, T.; LUND, B.; KAPPERUD, G. Detection of small numbers of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in environmental water, sewage, and food samples by a semi-nested PCR assay. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, n.4, p. 1636-1643, 1999.

WAGENAAR, J.A.; MEVIUS, D.J.; HAVELAAR, A.H. *Campylobacter* in Primary Animal Production and Control Strategies to Reduce the Burden of Human Campylobacteriosis. **Revue Scientifique Et Technique**, v. 25, n.3, p. 581-594, 2006.

WATSON, R.O.; GALÁN, J.E. *Campylobacter jejuni* Survives within Epithelial Cells by Avoiding Delivery to Lysosomes. **PLOS Pathogens**. v. 4, n. 1, p. 69-83, 2008.

WHO. World Health Organization. Water-related diseases, 2015. Disponível em: < http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/campylobacteriosis/en/>. Acesso em: 20 dez 2019.

WHO. World Health Organization. **Health topics**.Diarrhoea. Geneva, 2013. Disponível em: < <http://www.who.int/topics/diarrhoea/en/> > Acesso em: 30 de dez de 2019.

WINTERS, D.K.; SLAVIK, M. F. Multiplex PCR detection of *Campylobacter jejuni* and *Arcobacter butzleri* in food products. **Molecular and Cellular Probes**, v. 14, n. 2, p. 95–99, 2000.

SHIH, D.Y. Isolation and identification of enteropathogenic *Campylobacter* spp. from chicken samples in Taipei. **Journal Food Protection**, v. 63, n. 3, p. 304-308, 2000.

YOUNG, K.T.; DAVIS, L.M; DIRITA, V.J. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**. v. 5, n. 9, p. 665-676, 2007.

ZAUTNER, A.E.; TAREEN, A.M.; GROB, U.; LUGERT, R. Chemotaxis in *Campylobacter jejuni*. **European Journal Microbiology Immunology**, v. 2, n. 1, p. 24–31, 2012.

ZHANG, Q. Campylobacteriosis. In: SAIF, Y. M. (Ed.). Diseases of poultry. 12. Ed. Iowa: **Brackwell Publishing**, 2008. p.675-690.

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, p. 586–589, 1999.

5. ARTIGO CIENTÍFICO

5.1. Artigo 1

Detecção de *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* e genes de virulência em produtos avícolas comercializados na região nordeste do Brasil.

Felipe Pereira de Melo^a, Mércia Rodrigues Barros^a.

^a Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brasil.

ABSTRACT

This study evaluated the prevalence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* and virulence genes in fresh, frozen, frozen chicken, liver and gizzard carcasses sold in public markets and supermarkets. Of the 90 samples analyzed, *C. jejuni* was the most prevalent species with 28.8% of positive samples, whereas *C. coli* was positive in 15.6% of samples. In public market samples, *C. coli* was more prevalent than *C. jejuni*, with 16.7% of positive samples. In supermarket samples, *C. jejuni* was more prevalent, with 36.7% positivity. Regarding the form of commercialization of the carcasses, *C. jejuni* was detected in all forms of commercialization, however, with a higher prevalence (43.3%) in chilled samples, differently from *C. coli* that was not detected in frozen samples, and showed a higher prevalence (16.7%) in fresh samples. Among the different poultry products, both species were detected. *C. jejuni* was more prevalent (53.3%) in liver samples. *C. coli* showed a higher prevalence in the samples of pieces (10.0%). Five virulence genes related to adherence (*Peb1*, *JlpA*, *CadF*, *CapA*) and invasion (*CiaB*) were investigated. The presence of genes occurred in both species of *Campylobacter*.

Keywords: *Campylobacter*, carcass, broiler chickens, microbiological, PCR.

1. Introdução

Dentre os patógenos envolvidos em surtos de origem alimentar e relacionados à carne de frango, podem ser citadas espécies do gênero *Campylobacter* spp. (Camino et al., 2017; Gourley et al., 2017). A infecção por *Campylobacter* spp. é conhecida como campilobacteriose, uma zoonose de distribuição mundial, que causa gastroenterite em humanos, caracterizando um grave problema de saúde pública, sendo o consumo de carne de aves mal cozida um dos principais fatores de risco associado a infecção (Freitas e Noronha, 2007; Sharma et al., 2016).

Em todo o mundo, bactérias do gênero *Campylobacter* estão entre os principais patógenos que causam gastroenterite bacteriana (Li et al., 2018). São bactérias Gram negativas, microaerófilas com metabolismo respiratório (Gorman e Adley, 2004; Wainwright et al., 2005). As espécies *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* são, há muito tempo, as espécies mais comuns associadas aos casos de campilobacteriose e outras infecções bacterêmicas (Iraola et al., 2014; Maziero e Oliveira 2010). A dose infecciosa de *Campylobacter* é de cerca de 500 unidades formadoras de colônias/g, dependendo das condições físicas do indivíduo ou da idade (Granić et

al., 2009) e a infecção é causada pelos mecanismos de virulência envolvidos na produção de toxinas, motilidade flagelar, adesão e invasão epitelial (Modi et al., 2015).

Mundialmente, diferentes órgãos de saúde e segurança alimentar, como a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), têm relatado a campilobacteriose como a doença transmitida por alimentos mais reportada, expressando índices superiores aos casos de salmonelose e shigelose (Platts-Mills et al., 2014; WHO, 2013). Sendo gerado um ônus tanto para o setor alimentício, pela necessidade de monitoramento e realização de análises dos produtos cárneos para manter o padrão de segurança alimentar, quanto para saúde pública, com os gastos com diagnóstico e tratamento (Naravaneni e Jamil, 2005).

No Brasil, as pesquisas de *Campylobacter* são menos frequentes, quando comparadas a países desenvolvidos e em desenvolvimento, contudo, ao longo dos anos, estudos vêm sendo desenvolvidos em diferentes regiões apresentando taxas de variação entre 11% e 98% de positividade (Carvalho et al., 2013, Franchin et al. 2007, Kuana et al. 2008, Azeredo et al., 2010, Feistel et al. 2012, Silva et al. 2016). Mesmo a campilobacteriose sendo enquadrada como doença de origem alimentar e existindo um sistema de informação específico para a investigação e notificação de surtos e doenças, não existe legislação brasileira específica para o controle da *Campylobacter* (Brasil, 2010). Devido à falta de controle quanto a contaminação da carne de frango pela *Campylobacter* pode comprometer a segurança alimentar desse tipo de alimento, haja vista, a carne de frango ser uma das carnes mais consumidas no Brasil e no mundo. Objetivou-se pesquisar espécies de *Campylobacter* e genes de virulência em carcaças de frango comercializadas em diferentes estabelecimentos comerciais em um município de Pernambuco, no Nordeste do Brasil.

2. Material e Métodos

2.1 Local e Colheita de Amostras.

As amostras de carcaças de frangos de corte foram adquiridas em dois tipos de estabelecimentos comerciais: sendo três mercados públicos e três supermercados do Distrito Sanitário III em Recife-PE.

As carcaças adquiridas nos mercados públicos não possuíam nenhum Selo de Inspeção (Municipal, Estadual ou Federal), já as carcaças adquiridas em supermercados possuíam Selo de Inspeção Federal (SIF). Foram obtidas 10 amostras de carcaças com fígado e moela, comercializadas nas formas *in natura*, resfriadas e congeladas, totalizando 90 amostras.

As amostras foram transportadas em caixas isotérmicas com gelo reciclável e mantidas em 2-8°C até o Laboratório de inspeção de carne e leite (LICAL) do Departamento de Medicina Veterinária (DMV) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

As amostras *in natura* e resfriadas de carcaças com fígado e moela eram processadas no momento de chegada ao laboratório, enquanto as amostras congeladas, previamente ao início das análises eram mantidas sob temperatura de refrigeração por 24 horas com o objetivo de promover o seu descongelamento.

2.2 Análise microbiológica das amostras

As amostras de carcaças de frango com fígado e moela foram analisadas seguindo as diretrizes da *International Organization for Standardization - ISO 10272-1* para isolamento e identificação de espécies de *Campylobacter* (ISO, 2006), com modificações.

A metodologia recomenda o enriquecimento de 25 gramas da amostra em caldo Bolton e submetidas as condições de microaerofilia e incubação em estufa de 37°C a 42°C durante 24h a 48h. No presente estudo, foi adotado a diluição de 1:10, sendo que 25g foram coletadas de carne e pele do pescoço, asa, peito e região cloacal; enquanto fígado e moela foram pesados 10g de cada amostra e posteriormente transferidos para saco plástico estéril de *stomacher*, e em seguida, foram adicionados 90ml de caldo Bolton meio de enriquecimento seletivo, contendo 5% (v/v) de sangue de sangue lisado e desfibrinado de equino e suplemento seletivo composto por vancomicina, cefoperazona, trimetropim.

Os sacos utilizados no *stomacher*, contendo as amostras preparadas e o meio de enriquecimento seletivo, passaram por uma etapa de pré-enriquecimento em condições de microaerofilia a 37°C por 4h ± 1h e por uma etapa de enriquecimento sob as mesmas condições de microaerofilia a 42°C por 48h. Após o período de enriquecimento, cada amostra foi homogeneizada, retirada uma alçada e repicada para isolamento em placas de Ágar Charcoal Cefoperazona Desoxicolato Modificado (mCCDA) e Campy Cefex ambas suplementadas por composto de cefoperazona e anfotericina B, posteriormente foram incubadas sob as mesmas condições citadas acima.

Posteriormente, colônias suspeitas de serem *Campylobacter* spp. baseadas na morfologia das colônias para cada meio utilizado foram selecionadas e repicadas para o ágar Columbia Sangue (CBA) suplementada com sangue de ovino desfibrinado, seguindo o mesmo padrão de incubação.

As colônias obtidas a partir dos meios de cultura foram estocadas, uma parte foi congelada a -20°C em microtubos eppendorf contendo água ultrapura para posterior extração de DNA e confirmação das espécies de *Campylobacter* por meio de PCR e outra parte congelada sob as mesmas condições de temperatura em microtubos eppendorf contendo 1ml de caldo Brain-Heart Infusion Broth (BHI) com 20% de glicerol (v/v) e estocados em freezer.

Todas as análises foram conduzidas em paralelo com cepas controle de *Campylobacter jejuni* (ATCC 29428) e *Campylobacter coli* (CCAMP 1068).

2.3 Extração de DNA

O DNA extraído a partir das colônias, provenientes dos isolados foi feita por extração térmica. Os tubos foram colocados em banho seco a 90°C por 15 min, depois levados ao freezer durante 15 min e centrifugados por 5 min 14 000 × g. Os sobrenadantes foram armazenados em freezer a -20°C e usados posteriormente na PCR.

O processo de extração a partir de alíquotas de 15 ml do caldo de enriquecimento foi feito pelo uso do “kit” comercial Wizzard® Genomic DNA Purification (Promega®) utilizando protocolo do fabricante. E armazenado em freezer a -20°C até o momento de realização da PCR.

2.4 Identificação molecular das espécies de *Campylobacter*

Para confirmação da espécie a partir dos isolados e do caldo de enriquecimento foram utilizados os primers específicos para *C. jejuni* e *C. coli* (Tabela 1). E as reações de PCR seguiu a metodologia preconizada por Casaril (2010), com modificações. Posteriormente, foi realizada a transferência de 6µl do produto de DNA amplificado, adicionado de 0,5µl de Bluegreen® e 1µl de Tampão em gel de agarose a 1,5% ou 2%, junto com marcador de peso molecular 100pb Ladder® e submetidas às condições de eletroforese sob luz ultravioleta e fotodocumentado pelo sistema de documentação de gel.

Tabela 1. Primers utilizados nas reações de PCR para detecção de *C. jejuni* e *C. coli*.

Primers ^a	Sequência (5' - 3')	Produto	Referência
<i>mapA</i> -F	AGTCCTGGTGGTTTGAAGC	202 pb	Casari, 2010
<i>mapA</i> -R	CCGCATTAATAATTCACATCG		
<i>CeuE</i> -F	ATGAAAAAATCTTTAGTTTTTGGCA	889pb	Casari, 2010
<i>CeuE</i> -R	ATTTTATTATTTGTAGCAGCG		

^aF= Forward, R= Reverse.

2.5 Detecção Molecular de Genes de Virulência

A detecção dos genes de virulência foi realizada de acordo as metodologias preconizadas pelos autores, utilizando as seguintes sequências de primers: *Peb1* (5'-GCAGAAGGTAAACTTGAGTCTATT-3') e (5'-TTATAAACCCCATTTTTTCGCTA A-3') (PEI et al., 1993); *JlpA* (5'-CACAGGGAATCGACAGCATAGA-3') e (5'-ACGCTCCGCCCATTAACATA-3') (VERAS et al. 2016); *CadF* (5'-TTGAAGGTAATTTAGATATG-3') e (5'-CTAATACCTAAAGTTGAAAC-3'); *CiaB* (5'-TCATGCGGTGGCATTAGAATGGG-3') e (5'-AGGTCTAACTTCATCAACCCTTTGCCA-3') (KONKEL et al., 1999); *CapA* (5'-GGATCCATGGGTGTAATGTTCGTTTC-3') e (5'-GTGCACTTACCAAAGATAATTAAC TGAGC-3') (ASHGAR et al. 2007), com modificações.

As reações de PCR constaram de um volume final de 12,5µL e todos os perfis térmicos de cada reação tiveram uma etapa inicial de 15' a 95°C, e uma etapa final de extensão de 10' a 72°C. Como controle positivo utilizou-se as cepas de *C. jejuni* (ATCC 29428) e *C. coli* (CCAMP 1068), e para controle negativo foi utilizado um composto de todos os constituintes do mix da reação sem a adição de DNA e submetidas às condições de eletroforese anteriormente citada.

3. Resultados e Discussão

3.1 Detecção de *C. jejuni* e *C. Coli* em carcaças de frangos comercializadas de acordo com o tipo de estabelecimento

Os resultados das análises utilizando a técnica de PCR para detecção de *C. jejuni* e *C. coli* em carcaças de frango comercializadas nos diferentes tipos de estabelecimentos comerciais estão apresentados nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2. Detecção de *C. jejuni* e *C. coli* em carcaças de frango de acordo com o tipo de estabelecimento.

Tipo de Estabelecimento	Quantidade de amostra	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>
Mercado público	30	4 (13,3%)	5 (16,7%)
Supermercado	60	22(36,7%)	9 (15,0%)
Total	90	26 (28,8%)	14 (15,6%)

Observamos maior prevalência de *C. jejuni* em carcaças de frango comercializadas em estabelecimentos comerciais quando comparado a *C. coli*. Diferentes relatórios mundiais sobre a prevalência de *Campylobacter* em produtos avícolas, apontam *C. jejuni* como a principal espécie envolvida nos casos de campilobacteriose em seres humanos, tendo taxas de detecção de até 90% (EFSA, 2019). Por sua vez *C. coli* é relatada como segunda espécie mais prevalente, apresentando percentuais de detecção entre 5-10% (CDC, 2018).

Tabela 3. Utilização da PCR para detecção de *C. jejuni* e *C. coli* em carcaças de frango provenientes de mercados públicos e supermercados

Estabelecimentos	Quantidade de amostras	<i>C. jejuni</i>	<i>C.coli</i>
Mercado 1	10	0	1 (10,0%)
Mercado 2	10	4 (40,0%)	3 (30,0%)
Mercado 3	10	0	1 (10,0%)
Total	30		
Supermercado 1	24	8 (33,3%)	5 (20,8%)
Supermercado 2	24	8 (33,3%)	1 (4,2%)
Supermercado 3	12	5 (41,7%)	3 (25,0%)
Total	60		

Com relação a presença das duas espécies de acordo com o tipo de estabelecimento, *C. coli* esteve mais prevalente nas amostras *in natura* de mercados públicos comparado a *C. jejuni*. Uma grande parte dos estudos associa a maior prevalência de *C. jejuni* quando comparado a *C. coli*, nas carcaças de frango, contudo, é importante mencionar que a depender do tipo de material amostrado, origem das amostras e condições de armazenamento, as taxas de detecção podem variar de forma considerável (Melo et al., 2013).

Estudos demonstram que *C. coli* é menos resistente as condições de armazenamento como refrigeração ou congelamento, quando comparada a *C. jejuni* (Suzuky e Yamamoto, 2009; Wei et al., 2016), sendo assim, sugere-se que a maior positividade de *C. coli*, neste estudo, esteja associada a comercialização das carcaças em temperatura ambiente.

A maior ocorrência de *C. coli* em relação a *C. jejuni* nos mercados públicos, podem estar associados a dois fatores: origem e status sanitário dos lotes e temperatura de comercialização das amostras. De acordo com Wegener (2010) em regiões das cidades é comum a chegada de produtos oriundos de lotes de aves com status sanitário inferior ao de lotes que são comercializados em supermercados. Verificamos que os estabelecimentos públicos eram localizados em regiões periféricas. Em relação ao fator temperatura, nos locais de colheita, a comercialização de carcaças em temperatura ambiente era predominante, fator que favorece o crescimento de *C. coli*, *C. jejuni* por sua vez, mesmo crescendo em temperatura ambiente, resiste melhor as condições de armazenamento empregadas (CDC, 2014).

Nas amostras de supermercados, verificamos que *C. jejuni* teve taxas de detecção superiores às de *C. coli*. Diferentes relatórios apontam *C. jejuni* como espécie mais prevalente (EFSA, 2019; Kudirkiene et al., 2013; Praakle-Amin et al., 2007). Vale ressaltar que mesmo existindo diferença entre os percentuais de positividade entre as espécies, um dos fatores mais importantes que implica em maiores taxas de prevalência é a contaminação das carcaças de frango por *Campylobacter* spp.

3.2 Detecção de *C. jejuni* e *C. Coli* em carcaças de frangos comercializadas nas formas *in natura*, resfriadas, congeladas

Os resultados das análises utilizando a técnica de PCR para detecção de *C. jejuni* e *C. coli* em amostras de carcaças de frango *in natura*, resfriadas e congeladas e o tipo de amostra de carcaças de frango (pedaços), fígado e moela estão apresentados nas Tabelas 4 e 5, respectivamente.

Tabela 4. Resultados da detecção de *C. jejuni* e *C. coli* em carcaças de frango *in natura*, resfriadas e congeladas com fígado e moela, respectivamente.

Amostras	Quantidade	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>
<i>In natura</i>	30	4 (13,3%)	5 (16,7%)
Resfriada	30	13 (43,3%)	4 (13,3%)
Congelada	30	9 (30,0%)	0
Total	90		

O perfil de ocorrência de *C. jejuni* nas diferentes formas de comercialização das amostras, demonstrou a maior taxa de detecção em carcaças resfriadas, seguida das carcaças congeladas e menor taxa em carcaças *in natura* (frescas), demonstrando assim a viabilidade de *C. jejuni* nas três diferentes formas de comercialização. Segundo Sampers et al. 2010 e CDC (2014) a temperatura de armazenamento das carcaças pode reduzir as contagens finais de *Campylobacter* spp. neste tipo de alimento, fato esse que pode explicar o decréscimo das taxas de detecção entre as carcaças resfriadas e congeladas, uma vez que nas carcaças congeladas o tratamento térmico aplicado é mais intenso.

Analisando de modo comparativo as taxas de detecção de *C. jejuni* entre amostras submetidas a tratamento térmico (resfriamento e congelamento) e as carcaças mantidas em temperatura ambiente, foi verificado menor taxa de detecção em amostras *in natura*, mesmo essas últimas estando em condições favoráveis para multiplicação da bactéria. Lee et al. (1998) apontam para a capacidade que *Campylobacter* spp. tem de replicar-se a 4°C e à temperatura ambiente, o que justifica a taxa de detecção superior de *C. jejuni* em amostras resfriadas.

Segundo Birk et al. (2004) a carne de frango apresenta compostos protetores, como peptídeos e lipídeos, que prolongam a viabilidade de *C. jejuni* durante armazenagem, além disso o emprego de resfriamento potencializa ainda mais essa característica, o que pode explicar o maior percentual de detecção obtido para as carcaças resfriadas neste estudo.

Verificou-se redução na taxa de detecção de *C. jejuni* em carcaças congeladas quando comparadas as carcaças resfriadas. Segundo ISO (2006), bactérias do gênero *Campylobacter* spp. são altamente sensíveis ao congelamento, contudo, devido a sua capacidade de assumir a forma viável mas não cultivável (VNC) podem permanecer nos alimentos e ao sinal de condições favoráveis podem sair desse estado. Como no processamento das amostras foi utilizado o caldo de enriquecimento para recuperação células, acredita-se que as células do microrganismo presentes nas carcaças congeladas foram sobremaneira estimuladas pelas condições fornecidas, favorecendo sua detecção.

É importante ressaltar que a maior ou menor taxa de detecção em carcaças congeladas pode estar associado a origem e estado sanitário dos lotes de frango. Na Dinamarca, Wegener (2010) em estudo constatou que, os lotes de frango positivos para *Campylobacter* eram geralmente usados na produção de aves congeladas, sendo uma das formas de controle de *Campylobacter* spp. utilizadas no país. No Brasil, diferentemente do que ocorre em outros países, o controle de *Campylobacter* spp não é realizado, evidenciando que aves de lotes positivos podem chegar ao mercado consumidor nas três diferentes formas de comercialização.

O tipo de abate empregado pode ser um fator comprometedor com relação a maior ou menor contaminação das carcaças. Verificamos menor contaminação com *C. jejuni* das carcaças *in natura* comparadas as amostras resfriadas e congeladas, que pode ser explicado pelo abate empregado nos mercados públicos para obtenção desse tipo de amostra ser manual, além do quantitativo de aves abatidas ser menor, enquanto as carcaças resfriadas e congeladas passam por plataforma de abate e a escala de abate é sobremaneira maior, o que pode favorecer a

contaminação por *Campylobacter* spp. pelo tempo que as carcaças passam na linha de abate (Wei et al., 2016).

O perfil de ocorrência de *C. coli* nas três diferentes formas de comercialização se deu de forma descendente, apresentando taxa de detecção de 16,7% em amostras *in natura*, com redução do percentual para 13,3% de amostras positivas em carcaças submetidas ao resfriamento e nenhuma detecção em carcaças onde o congelamento foi empregado, mostrando assim a eminente sensibilidade de *C. coli* ao estresse térmico gerado pelo emprego dos métodos de conservação. Corroborando com estudo semelhante a este Maziero e Oliveira (2010) avaliou o mesmo quantitativo de amostras congeladas e não obteve positividade para *C. coli*.

Abd El-Aziz e Abd-Allah (2017) obtiveram resultados superiores ao avaliarem a presença de *C. coli* em carcaças *in natura* com 87,5% das amostras positivas. Os autores Igwaran e Okoh (2020) em um de seus estudos, avaliando a presença de diferentes espécies de *Campylobacter* em diferentes tipos de carnes resfriadas no varejo e de abatedouros incluindo carne de frango, obtiveram taxa de prevalência de 22,08% para espécie *C. coli*.

Tabela 5. Resultados da detecção de *C. jejuni* e *C. coli* em amostras de pedaços de carcaças de frango, fígado e moela.

Amostras	Quantidade	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>
Pedaços*	30	11 (36,7%)	3 (10%)
Fígado	30	16 (53,3%)	1 (3,3%)
Moela	30	10 (33,3%)	1 (3,3%)
Total	90		

* Os pedaços foram extraídos com pele, das áreas do pescoço, asa, peito e região cloacal de cada carcaça.

As taxas de detecção de *C. jejuni* foram superiores as de *C. coli* entre os diferentes produtos avícolas. Analisando gradativamente, as amostras de fígado apresentaram maior percentual para *C. jejuni*, com 53,3% de amostras positivas. Whyte et al. (2006) analisando o mesmo quantitativo de amostras de fígados do presente estudo, obtiveram 100% das amostras para *Campylobacter*, e ao identificarem as espécies, relataram percentual superior para *C. jejuni*, com 98% de positividade, e apenas 1,75% de amostras positivas para *C. coli*, percentual menor do verificado no nosso estudo. Firleyanti et al. (2016), ao avaliarem 109 amostras de fígado refrigeradas do varejo, detectaram 42,5% de amostras positivas para *C. jejuni* e 57,5% para *C. coli*. As taxas de detecção das espécies *C. jejuni* e *C. coli* em fígado de galinha variam de 10 a 100% (Chaloneret al., 2014, Whyte et al., 2006), sendo que a infecção está associada com a quantidade de células do microrganismo presente no tipo de alimento.

Os pedaços de carcaças foi o segundo produto avícola com maior prevalência para as espécies, com 36,7% de positividade para *C. jejuni* e 10% para *C. coli*. A maioria dos estudos que pesquisam espécies de *Campylobacter* em carcaças de frango sejam inteiras ou pedaços de carcaças fazem uso da metodologia de enxaguadura ou cortes de pedaços. Segundo Hansson et al. (2014) a presença de pele nas amostras influencia sobremaneira a obtenção de resultados positivos. Semelhantemente Sampers et al. (2010) ao analisar preparados cárneos de aves com pele perceberam alta incidência para a bactéria. Os dados expostos corroboram com a prevalência encontrada neste estudo, visto que, os fragmentos de carcaças coletados para compor as amostras de pedaços eram coletados com pele.

Amostras de moela foi o terceiro produto avícola detectado, com taxas de detecção de 33,3% para *C. jejuni*, enquanto Bouffleur (2009) obteve taxa de detecção superior ao do presente

estudo, com 44,4% das amostras positivas, e Trassi (2012) também obteve percentual superior ao analisar amostras de moela provenientes de abatedouro, obtendo 50,0% de positividade. Mas percentual menor ao do nosso estudo foi verificado por Chaves et al. (2010), que analisando o mesmo quantitativo de moelas, obteve apenas 3,3% de amostras positivas para *C. jejuni*.

A taxa de detecção do estudo para *C. coli* em amostras de moela foi 3,3%, percentual consideravelmente menor do verificado para *C. jejuni*, percentual semelhante (3,3%) foi relatado por Chaves et al. (2010) ao analisarem o mesmo quantitativo de amostras. Marasini e Fakhr (2012) avaliando a prevalência de *Campylobacter* em amostras de moela obtiveram 33% de amostras positivas, desse percentual *C. coli* esteve presente em 7% das amostras positivas, percentual este maior do que o presente estudo.

A taxas de detecção de *C. coli* nos três diferentes produtos foram de 10,0% para amostras de pedaços e 3,3% para fígado e moela, respectivamente. De modo geral, os estudos relatam taxas de detecção de *C. coli* inferiores comparadas a *C. jejuni* nos diferentes produtos avícolas. O fato de a maior prevalência para a espécie ter sido em amostras de pedaços só ratifica ainda mais que a presença de pele nas amostras favorece a detecção da bactéria.

O menor percentual de positividade tanto para *C. coli* quanto para *C. jejuni* pode ser associado a baixa população do microrganismo nas diferentes amostras e sua natureza fastidiosa (Vandamme 2000), retardando o crescimento de *Campylobacter* que passa a sofrer ação da microbiota competidora. Sendo assim, sugere-se que o crescimento dessa microbiota competidora sobressaia a de *Campylobacter* e que ao fazer uso das técnicas para detecção, neste caso a PCR, a quantidade de DNA alvo das espécies em questão não apresente níveis detectáveis na reação.

A evisceração tem sido apontada como ponto crítico para contaminação no abate das carcaças e produtos de frango (fígado e moela) (Rosenquist, 2006). Uma vez contaminados os produtos percorrem todo fluxo de abate sendo expedido para o mercado. Pesquisas também apontam a sobrevivência de *Campylobacter* spp. por longos períodos em produtos de frango comercializados no varejo (Birk et al., 2006, El-Shibiny et al., 2009, Solow et al., 2003). O que explica os surtos relatados associados ao consumo desse tipo de alimento (Tompkins et al., 2013, Hanson et al., 2014, Scott et al., 2015, Glashower et al., 2017).

3.3 Detecção de genes de virulência em amostras positivas para *C. jejuni* e *C.coli*

Na Tabela 6 estão descritos os resultados obtidos das análises utilizando a técnica de PCR para detecção dos genes de virulência *Peb1*, *JlpA*, *CadF*, *CiaB* e *CapA* das 26 amostras positivas para *C. jejuni* e 14 para *C. coli*.

Tabela 6. Detecção de genes de virulência em amostras positivas para *C. jejuni* e *C. coli*

Gene de Virulência	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>
<i>Peb1</i>	13 (43,2%)	7 (50%)
<i>JlpA</i>	18 (48,6%)	6 (42,8%)
<i>CadF</i>	27 (72,9%)	7 (50,0%)
<i>CiaB</i>	26 (70,2%)	10 (71,4%)
<i>CapA</i>	8 (21,6%)	4 (28,5%)

Os genes de virulência estudados estão associados à virulência das espécies de *Campylobacter*, tais genes codificam proteínas envolvidas na adesão, invasão e colonização. A presença de cada um dos genes sugere uma atuação biológica e potencialmente patogênica envolvida na infecção por espécies de *Campylobacter*, e o mecanismo pelo qual causam doenças em humanos é multifatorial (Chukwu et al., 2019, Silva et al. 2011).

Analisando molecularmente a presença de cinco genes de virulência para a espécie *C. jejuni*, o gene *CadF* e *CiaB* apresentaram taxas de detecção mais altas e semelhantes, 72,9% e 70,2% de positividade, respectivamente. Na espécie *C. coli*, a expressão do gene *CadF* foi verificada em 50% das amostras, e maior percentual para o gene *CiaB*, com 71,4% de amostras positivas. Ambos os genes estão associados a invasão e colonização de células do intestino de hospedeiros (Cróinín et al. 2012, Wieczorek et al. 2012). Diferentes estudos relataram desde a ausência do gene *CiaB*, ao analisarem amostras de carne de frango no varejo positivas para *C. jejuni* e *C. coli* (Igwara e Okoh, 2020) até 100% de prevalência em amostras de fezes de crianças com diarreia positivas para *C. jejuni* (Ghorbanalizadgan et al. 2014). Enquanto, para o gene *CadF* há relatos de 100,0% de prevalência para ambas as espécies (Biswas et al. 2011, Ghunaim et al. 2015, Koolman et al. 2015).

Outro gene detectado foi o gene *Peb1*, este codifica a proteína *Peb1*, uma adesina localizada no periplasma, cuja função está relacionada com a adesão as células do hospedeiro (Pei et al. 1998). A prevalência deste, nas amostras de *C. jejuni* e *C. coli* foi de 43,2% e 50,0%, respectivamente. Kim et al. (2019) relatam taxas de detecção do gene em amostras de carne de frango no varejo positivas para *C. jejuni* de 93,3%, não sendo incluso no estudo a espécie *C. coli*.

A prevalência do gene *JlpA* em amostras de *C. jejuni* e *C. coli* foram semelhantes, com percentuais de 48,6% e 42,8% de positividade, respectivamente. Há relatos de detecção para o gene com detecção entre 43,1% até 96,1% (Biswas et al. 2011; Koolman et al. 2015; Veras et al. 2016), contudo, os estudos foram feitos apenas com amostras positivas para *C. jejuni*. Já no presente estudo, o gene *JlpA* foi detectado tanto em *C. jejuni* quanto em *C. coli* e com percentuais similares, 48,6% e 42,8%, respectivamente, ressaltando que a maioria dos estudos pesquisam a expressão desse e de outros genes apenas na espécie *C. jejuni*. O gene *JlpA* é responsável pela secreção de lipoproteínas que atuam como adesinas, ligando o microrganismo as células epiteliais (Jin et al. 2001).

A menor taxa de detecção foi para o gene *CapA*, com percentual de 21,6% para *C. jejuni* e 28,5% para *C. coli*. Os relatos da expressão do gene *CapA* em espécies de *Campylobacter* ainda são escassos. Ashgar et al. (2007) foi o primeiro grupo a identificar e caracterizar *CapA* como gene codificante de proteínas relacionadas a adesão às células epiteliais, e atua como fator de colonização de células. Os autores colonizaram células intestinais de frango a partir da identificação da adesina produzida pelo gene. No presente estudo, foi verificado a expressão do gene para ambas as espécies, sugerindo que mesmo com menores taxas de detecção em relação aos outros genes avaliados e o que é relatado nas pesquisas de genes virulência para *Campylobacter*, sua expressão junto com outros genes pode contribuir para a colonização de células do hospedeiro.

3.5 Descrição dos perfis de virulência para as espécies de *C. jejuni* e *C. coli*

A descrição dos perfis de virulência para as 26 amostras de *C. jejuni* e 14 de *C. coli* estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7. Associação dos perfis de virulência em relação aos genes detectados nas espécies *C. jejuni* e *C. coli*.

Perfil de virulência	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>
P-1: <i>Peb1, JlpA, CadF, CiaB, CapA</i>	0 (0,0 %)	1 (7,1%)
P-2: <i>Peb1, JlpA, CadF, CiaB</i>	4 (15,3%)	2 (14,2%)
P-3: <i>Peb1, JlpA, CadF</i>	0 (0,0%)	1 (7,1%)
P-4: <i>Peb1, JlpA, CiaB</i>	3 (11,55%)	0 (0,0%)
P-5: <i>Peb1, CadF, CiaB</i>	1 (3,8%)	1 (7,1%)
P-6: <i>Peb1, CadF</i>	2 (7,6%)	1 (7,1%)
P-7: <i>Peb1, CiaB</i>	1 (3,8%)	1 (7,1%)
P-8: <i>Peb1, CapA</i>	0 (0,0%)	0 (0,0%)
P-9: <i>Peb1</i>	0 (0,0%)	1 (7,1%)
P-10: <i>JlpA, CadF, CiaB, CapA</i>	1 (3,8%)	1 (7,1%)
P-11: <i>JlpA, CadF</i>	1 (3,8%)	0 (0,0%)
P-12: <i>JlpA, CadF, CiaB</i>	0 (0,0%)	0 (0,0%)
P-13: <i>JlpA, CiaB, CapA</i>	0 (0,0%)	2 (14,2%)
P-14: <i>JlpA, CapA</i>	0 (0,0%)	1 (7,1%)
P-15: <i>CadF, CiaB</i>	1 (3,8%)	2 (14,2%)
P-16: <i>CadF, CiaB, CapA</i>	0 (0,0%)	0 (0,0%)
P-17: <i>CadF</i>	2 (7,6%)	0 (0,0%)
P-18: <i>CiaB, CapA</i>	1 (3,8%)	1 (7,1%)
P-19: <i>CiaB</i>	2 (7,6%)	0 (0,0%)
P-20: Ausência de todos os genes	2 (7,6%)	2 (14,2%)

A partir da detecção dos genes foram construídas 20 associações de perfis de virulência para as espécies. Os perfis continuam desde a presença dos cinco genes até a ausência de todos eles.

O perfil P-1 (*Peb1, JlpA, CadF, CiaB, CapA*) merece destaque por agrupar os cinco genes, embora tenha sido detectado apenas em amostras de *C. coli*, estando ausente nas amostras de *C. jejuni*. O achado desse perfil mostra que existe variação na expressão dos fatores de virulência entre *C. jejuni* e *C. coli*. Vale ressaltar que não há descrição na literatura da detecção do perfil de genes descritos neste estudo, sendo importante o estudo desses, visto que, como descrito ao longo da discussão, esses genes estão associados a capacidade de adesão e colonização das células do hospedeiro (Silva et al. 2011).

O perfil P-2 (*Peb1, JlpA, CadF, CiaB*) foi o segundo mais prevalente, e diferentemente do perfil P-1, ocorreu em ambas as espécies, sendo verificado a presença de quatro dos genes detectados. A presença desses genes confere as espécies a capacidade de aderir e colonizar as células do hospedeiro (Veras et al. 2016).

Houve variação nos demais perfis com relação a sua detecção para ambas as espécies. Todavia, vale ressaltar a presença dos perfis: P-5 (*Peb1, CadF, CiaB*), P-6 (*Peb1, CadF*), P-7 (*Peb1, CiaB*), P-10 (*JlpA, CadF, CiaB, CapA*), P-15 (*CadF, CiaB*) e P-18 (*CiaB, CapA*), todos esses, mesmo com diferentes taxas de detecção entre as espécies, estiveram presentes tanto em *C. jejuni* quanto em *C. coli*. Além disso, em todas as associações de perfis houve a presença do gene *CiaB* e

em quatro deles a presença do gene *CadF*, sinalizando assim de que a expressão desses genes pelas espécies são mecanismos que lhe conferem acentuada virulência.

Foi verificada notada variação quanto a presença dos demais perfis para *C. jejuni* e *C. coli*. Sete perfis de virulência (P-3, P-8, P-9, P-12, P-13, P-14, P-16) não tiveram percentuais de detecção para a espécie *C. jejuni*, porém, para espécie *C. coli* apenas três desses perfis (P-3, P-12, P-16) não tiveram percentuais de detecção. Os perfis P-3 e P-9 apresentaram 7,1% de positividade nas amostras de *C. coli* e o perfil P-13 apresentou 14,2% de detecção. Já os perfis P-4, P-11, P-17, P-19 apresentaram percentuais de detecção variando entre 3,8% a 11,55% nas amostras de *C. jejuni* e nenhum percentual de detecção para *C. coli*.

A ausência dos cinco genes foi representada pelo perfil P-20 sendo expresso para ambas as espécies. Mesmo havendo a ausência dos genes detectados, não é possível afirmar que as espécies não são virulentas, haja vista, a diversidade de outros genes de virulência existentes e que podem conferir capacidade ainda maior, do que os detectados nos nossos resultados.

Nos últimos anos, as espécies de *Campylobacter* vem sendo reconhecidas como patógenos emergentes e indiciadores de gastroenterites em todo o mundo. Os principais riscos associados a infecções por este patógeno, são carcaças de frango contaminada em abatedouros, controle de temperatura, gerenciamento de higiene durante o processamento ou armazenamento (Rozynek et al. 2005, Stern et al. 2001). O conjunto desses fatores associados a presença de espécies de *Campylobacter* com os diferentes perfis de virulência detectados, alerta para o risco potencial para os seres humanos no surgimento de casos e/ou surtos de infecção por espécies de *Campylobacter*, caso medidas apropriadas não sejam implementadas.

4. Conclusões

Há ocorrência de *C. jejuni* e *C. coli* nos diferentes produtos avícolas (carcaças, fígado e moela) comercializados nos diferentes estabelecimentos do nordeste brasileiro, sendo *C. jejuni* a espécie mais prevalente.

Foi verificado que mesmo com o emprego do resfriamento e congelamento nos alimentos é possível detectar espécies de *Campylobacter*, demonstrando que os métodos agem como limitante, mas não eliminando a bactéria do produto.

A PCR demonstrou ser um dos métodos adequados para a detecção das espécies tanto pelo método direto através do caldo de enriquecimento, bem como, pelo método indireto através do cultivo microbiológico, além da pesquisa dos genes de virulência. A presença dos genes de virulência configura a capacidade que as espécies *C. jejuni* e *C. coli* tem de se manterem viáveis nos alimentos.

É imprescindível que haja uma vigilância contínua da presença desses patógenos e de seus genes associados aos produtos avícolas, e que medidas de controle devem ser estabelecidas partindo do campo até a indústria.

Ressaltando também que deve haver o monitoramento das medidas e práticas de manipulação no mercado consumidor, afim de reduzir a contaminação dos produtos e iminentes riscos de infecção. Além disso, ações de conscientização sobre os riscos associados ao consumo de carnes mal cozidas e aos cuidados por parte do consumidor ao manipular esse tipo de alimento para evitar possíveis contaminações cruzadas, afim de preservar sua segurança alimentar.

Referências

- Abd El-Aziz, D.M.; Abd-Allah, S.M.S. 2017. Incidence of *Campylobacter* species in wholesale chicken carcasses and chicken meat products in Assiut city, Egypt. *International Food Research Journal*, 24(6): 2660-2665. doi:10.3855/jidc.11860.
- Ashgar, S.S., Oldfield, N.J., Wooldridge, K.G., Jones, M.A., Irving, G.J., Turner, D.P.E, Ala'aldeen, D.A. 2007. CapA, an autotransporter protein of *Campylobacter jejuni*, mediates association with human epithelial cells and colonization of the chicken gut. *Journal Bacteriology* 189(5):1856-65. doi: 10.1128 / JB.01427-06.
- Azeredo L.I., Luchese, R.H., Lauria-Filgueira, A.L. 2010. *Campylobacter* spp em carne de ave crua: avaliação da etapa de resfriamento. *Revista Instituto Adolfo Lutz.*, 69, (4):518-24. doi: S0073-9852010000400012.
- Birk, T., Ingmer, H., Andersen, M. Y., Jørgensen, K., Brøndsted, L. 2004. Chicken juice, a food-based model system suitable to study survival of *Campylobacter jejuni*. *Letters in Applied Microbiology* 2004, 38, 66–71. doi:10.1046/j.1472-765X.2003.01446.x.
- Birk, T., Rosequist, H., Bronsted, L., Ingmer, H., Bysted, A., Christensen, B.B. 2006. A comparative study of two food model systems to test the survival of *Campylobacter jejuni* at –18 degrees C. *Journal Food Protection*, 69, 2635–2639. doi: 10.4315/0362-028x-69.11.2635.
- Biswas D., Hannon J.S., Townsend H.G.G., Potter A., Allan B.J. 2011. 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*, 14:25-32. doi: 10.2436/20.1501.01.132 ISSN: 1139-6709.
- Bouffleur, R. 2009. *Campylobacter jejuni* em frango de corte, carne e vísceras de frango no Rio Grande do Sul e efeito do congelamento sobre a contaminação nos cortes. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Programa de Pós-Graduação de Ciências Veterinárias, UFSM. Santa Maria. 47p.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010. 158 p.
- Chaloner, G., Wigley, P., Humphrey, S., Kemmett, K., Lacharme-Lora, L., Humphrey, T., Williams, N. 2014. Dynamics of dual infection with *Campylobacter jejuni* strains in chickens reveals distinct strain-to-strain variation in infection ecology. *Applied Environmental Microbiology*, 80:6366–6372. doi: 10.1128/aem.01901-14.
- Camino, F.M.M., Ariseto-Bragotto, A.P., Block, J.M. 2017. Food quality, food-borne diseases, and food safety in the Brazilian food industry. *Food Qual. Saf.*;1:1327. doi: 10.1093/fqs/fyx003.
- Carvalho, A.F., Daniela Martins da Silva, D.M.S., Azevedo, S.A., Rosa Maria Piatti, R.M., Genovez, M.E., Scarcelli, E. 2013. Detection of CDT toxin genes in *Campylobacter* spp. strains isolated from broiler carcasses and vegetables in São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(3):693-699. doi.org/10.1590/S1517-83822013000300005.
- Casari, K.B.P.B. Padronização de PCR tradicional e em tempo real para detecção de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* em alimentos. 2010. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Curso de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. Universidade Estadual de Londrina, Londrina – Paraná.
- CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. 2012. *Campylobacter* investigation Guideline. *Kansas Disease Investigation Guidelines*. 16 p.

- CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. 2018. *Campylobacter* investigation Guideline. Kansas Disease Investigation Guidelines. Version. 16 p.
- Chukwu, M.O., Luther King Abia, A., Ubomba-Jaswa, E., Obi, L., Dewar, J.B. 2019. Characterization and Phylogenetic Analysis of *Campylobacter* Species Isolated from Paediatric Stool and Water Samples in the Northwest Province, South Africa. *International Journal Environmental. Researche Public Health*, 16:2205. doi: 10.3390/ijerph16122205.
- Cróinín T.Ó., Steffen B. 2012. Host epithelial cell invasion by *Campylobacter jejuni*: trigger or zipper mechanism?. *Front. Cells Infectious Microbiology*, 2:1-13. doi: 10.3389/fcimb.2012.00025.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2019. Scientific report on the European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 2019;17(12):5926, 276pp. Disponível em: <<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5926>>.
- El-Shibiny, A., Connerton, P., Connerton, I. 2009. Survival at refrigeration and freezing temperatures of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* on chicken skin applied as axenic and mixed inoculums. *International Journal Food Microbiology*, 131:197–202. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.02.024
- Feistel, J.C., Sola, M.C., Medeiros, N.X., Trassi, A.M.C., Mesquita, S.Q.P., Silva Junior, M.C., Rezende, C.S.M.D.E. 2012. Identificação e biotipificação de cepas de *Campylobacter* spp. isoladas de produtos avícolas. *Anais do Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão - CONPEEX (2012)*.
- Firleyanti, A.S., Connerton, P.L., Connerton, I.F. 2016. *Campylobacters* and their bacteriophages from chicken liver: The prospect for phage biocontrol. *International Journal Food Microbiology*, 237:121–127. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.026.
- Freitas, J.A., Noronha, G.N. 2007. Ocorrência de *Campylobacter* spp. em carne e miúdos de frango expostos ao consumo em Belém, Pará. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 59, n. 3, p. 813-815. doi: 10.1590/S0102-09352007000300038
- Ghorbanalizadgan, M., Bakhshi, B., Kazemnejad, L.A., Najar-peerayeh, S., Nikmanesh, B. 2014. A molecular survey of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* virulence and diversity. *Iranian Biomedical Journal*, 18(3):158-64. doi: 10.6091/ibj.1359.2014.
- Ghunaim H., Behnke J.M., Aigha I., Sharma A., Doiphode S. H., Deshmukh A., Abu-Madi, M.M. 2015. Analysis of resistance to antimicrobials and presence of virulence/stress response genes in *Campylobacter* isolates from patients with severe diarrhoea. *PLoS One*. 10(3): e0119268. doi: 10.1371.
- Glashower, D., Snyder, J., Welch, D., McCarthy, S. 2017. Notes from the field: Outbreak of *Campylobacter jejuni* associated with consuming undercooked chicken liver mousse - Clark County, Washington, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 66:1027. doi: <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm6638a4>
- Gorman, R., Adley, C.C. 2004. An evaluation of five preservation techniques and conventional freezing temperatures of -20°C and -85°C for long-term preservation of *Campylobacter jejuni*. *Lett. Appl. Microbiol.* v. 38, n. 4, 306-10. doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01490.x.
- Hanson, H., Hancock, W.T., Harrison, C., Kornstein, L., Waechter, H., Reddy, V., Luker, J., Malavet, M., Huth, P., Gieraltowski, L., Balter, S. 2014. Creating student sleuths: How a team of graduate students helped solve an outbreak of *Salmonella* Heidelberg infections associated with kosher broiled chicken livers. *Journal Food Protection*, 77:1390–1393. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-13-564.
- Igwaran, A., Okoh, A.I. 2020. *Campylobacteriosis* Agents in Meat Carcasses Collected from Two District Municipalities in the Eastern Cape Province, South Africa. *Foods*. 16;9(2):203. doi: 10.3390/foods9020203.

- INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION (ISO). 10272-1:2006. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Campylobacter* spp. Part 1: Detection method. 16 p.
- INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION (ISO). 10272-2:2006. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Campylobacter* spp. Part 2. Colony count technique. 13 p.
- Iraola, G., Pérez, R., Naya, H., Paolicchi, F., Pastor, E., Valenzuela, S., Calleros, L., Velilla, A., Hernández, M., Morsella, C. 2014. Genomic Evidence for the Emergence and Evolution of Pathogenicity and Niche Preferences in the Genus *Campylobacter*, *Genome Biology and Evolution*, Volume 6, Issue 9, September 2014, Pages 2392–2405. doi: 10.1093/gbe/evu195.
- Jin, S., Joe, A., Lynett, J., Hani, E.K., Sherman, P., Chan, V.L. 2001. JlpA, a novel surface-exposed lipoprotein specific to *Campylobacter jejuni*, mediates adherence to host epithelial cells. *Molecular Microbiology*, 39:(5),1225-1236. doi.org/10.1111/j.1365-2958.2001.02294.x
- Kim, J., Park, H., Kim, J., Kim, J.H., Jung, J.I., Cho, S., Ryu, S., Jeon, B. 2019. Comparative Analysis of Aerotolerance, Antibiotic Resistance, and Virulence Gene Prevalence in *Campylobacter jejuni* Isolates from Retail Raw Chicken and Duck Meat in South Korea. *Microorganisms*, 7, 433; doi:10.3390/microorganisms7100433.
- Koolman, L., Whyte, P., Burgess, C., Bolton, D. 2015. Distribution of virulence associated genes in a selection of *Campylobacter* isolates. *Foodborne Pathogene Diseases*, 12(5):424-32. doi: 10.1089/fpd.2014.1883.
- Konkel, M.E., Gray, S.A., Kim, B.J., Garvis, S.G., Yoon, J. 1999. Identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* based on the cadF virulence gene and its product. *Journal of Clinical Microbiology*, 37:510-517.
- Kudirkiene, E; Buneviciene, J.; Šerniene, L.; Ramonaite, S.; Olsen, J.E.; Malakauskas, M. 2013. Importance of the producer on retail broiler meat product contamination with *Campylobacter* spp. *J. Sci. Food Agric*, 93:2293-2298. doi.org/10.1002/jsfa.6042.
- Lee, A., Snith, S.C, Coloe, P.J. 1998. Survival and growth of *Campylobacter jejuni* after artificial inoculation onto chicken skin as a function of temperature and packaging conditions. *Journal Food Protection*, 61:1609-1614. doi: 10.4315/0362-028x-61.12.1609
- Li, Y., Zhang, S., He, M., Zhang, Y., Fu, Y., Liang, H., Jing, H., Li, Y., Ma, H., Zhang, M. 2018. Prevalence and molecular characterization of *Campylobacter* spp. isolated from patients with diarrhea in Shunyi, Beijing. *Front. Microbiol.* 9:1–8. doi:10.3389/fmicb.2018.00052.
- Marasini, D., Fakhr, M.K. Complete Genome Sequences of *Campylobacter jejuni* Strains Isolated from Retail Chicken and Chicken Gizzards. *Genome Announcements*. 2017 Nov;5(47). doi: 10.1128/genomea.01351-17.
- Maziero, M.T.; Oliveira, T.C.R. M. 2010. Efect of refrigeration and frozen storage on the *Campylobacter jejuni* recovery from naturally contaminated broiler carcasses. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v. 41, n. 2, p. 501-505. doi.org/10.1590/S1517-83822010000200034.
- Melo, R.T., Nalevaiko, P.C., Mendonça, L.P., Borges, L.W., Fonseca, B.B., Beletti, M.E., Rossi, D.A. 2013. *Campylobacter jejuni* strains isolated from chicken meat harbour several virulence factors and represent a potential risk to humans. *Food Control*, 33:(1), 227-231. doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.02.032.
- Modi, S., Brahmabhatt, M.N., Chatur, Y.A., Nayak, J.B. 2015. Prevalence of *Campylobacter* species in milk and milk products, their virulence gene profile and anti-biogram. *Vet. World*. 8:1–8. doi: 10.14202/vetworld.2015.1-8.

- Naravaneni, R., Jamil, K. 2005. Rapid detection of food-borne pathogens by using molecular techniques. *J. Med. Microbiol.* 54:51–54. doi: 10.1099/jmm.0.45687-0.
- Pei, Z., Blaser, M.J. 1993. PEB1, the major cell-binding factor of *Campylobacter jejuni*, is a homolog of the binding component in gram-negative nutrient transport systems. *Journal Biology Chemical*, 268:18717–18725.
- Pei, Z., Burucoa, C., Grignon, B., Baqar, S., Huang, Z.X.; Kopecko, D.J., Bourgeois, A.L., Fauchere, J.L., Blaser, M.J. 1998. Mutation in the *peb1A* locus of *Campylobacter jejuni* reduces interactions with epithelial cells and intestinal colonization of mice. *Infection and Immunity*, Nashville, 66(3):938–943. doi:10.1128 / IAI.66.3.938-943.1998.
- Platts-Mills, J.A., Kosek, M. 2014. Update on the burden of *Campylobacter* in developing countries. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 27:444–450. doi:10.1097/QCO.000000000000091.
- Praakle-Amin, K., Roasto, M., Korkeala, H., Hänninen, M.L. 2007. PFGE genotyping and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* in retail poultry meat in Estonia. *Int J. Food Microbiol*, 114:105-112.
- Rozynek, E., Dzierzanowska-Frangat, K., Jozwiak, P. 2005. Prevalence of potential virulence markers in Polish *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates obtained from hospitalized children and from chicken carcasses. *Journal Medical Microbiology.*, 54:615-619. doi: 10.1099/jmm.0.45988-0.
- Rosenquist, H., Sommer, H.M., Nielsen, N.L., Christensen, B.B. 2006. The effect of slaughter operations on the contamination of chicken carcasses with thermotolerant *Campylobacter*. *Internacional Journal of Food Microbiology*, 108(2):226-232. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.12.007.
- Sampers I, Habib I, De Zutter L, Dumoulin A, Uyttendaele M. 2010. Survival of *Campylobacter* spp. in poultry meat preparations subjected to freezing, refrigeration, minor salt concentration, and heat treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 137 (3): 147-153. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.013.
- Scott, M.K., Geissler, A., Poissant, T., DeBess, E., Melius, B., Eckmann, K., Salehi, E., Cieslak, P.R. 2015. Notes from the field: *Campylobacteriosis* outbreak associated with consuming undercooked chicken liver pâté—Ohio and Oregon, December 2013–January 2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 64:399.
- Sharma, K.P., Chattopadhyay, U.K., Naskar, K. 2016. Prevalence of *Campylobacter* species in raw meat samples sold in open markets of Kolkata city. *Int. J. Agric. Environ. Biotechnol.* 9:535–539. doi: 10.5958/2230-732X.2016.00070.X.
- Silva, J., Leite, D., Fernandes, M., Mena, C., Gibbs, P.A., Teixeira, P. 2011. *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: A review. *Frontiers Microbiology*, 2:1–12. doi: 10.3389/fmicb.2011.00200.
- Silva, D.T., Tejada, T.S., Blum-Menezes, D., Alves, P.D., Timm, C.D. *Campylobacter* species isolated from poultry and humans, and their analysis using PFGE in Souther Brazil. 2016. *International Journal of Food Microbiology*, 217:(1), 189-194. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.025.
- Solow, B.T., Cloak, O.M., Fratamico, P.M. 2003. Effect of temperature on viability of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* on raw chicken or pork skin. *Journal. Food Protection*, 66, 2023–2031. doi: 10.4315/0362-028x-66.11.2023.
- Santos, E. L. S. 2016. Detecção e identificação de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango de corte produzidas no estado de Minas Gerais. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 58p.

- Stern, N.J., Line, J.E., Chen, H-C. *Campylobacter* in: DOWNES, F.P.; ITO, K. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, Washington, DC: APHA, 2001. Chapter 31, p. 301-310.
- Suzuki, H., Yamamoto, S. 2009. *Campylobacter* contamination in retail poultry meats and by-products in the world: a literature survey. The Journal of veterinary medical Science, v. 71, n. 3, p. 255-61. doi: 10.1292/jvms.71.255.
- Tompkins, B.J., Wirsing, E., Devlin, V., Kamhi, L., Temple, B., Weening, K., Cavallo, S., Allen, L., Brinig, P., Goode, B., Fitzgerald, C., Heiman, K., Stroika, S., Mahon, B. 2013. Multistate outbreak of *Campylobacter jejuni* infections associated with undercooked chicken livers - Northeastern United States, 2012. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 62:874-876.
- Trassi, Agna Miranda Castro. Ocorrência de *Campylobacter* spp. em carne de frango. 2012. 44 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal (EVZ)) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.
- Vandamme, P. 2000. "Taxonomy of the family Campylobacteraceae", in *Campylobacter*, eds. Namchamkin I., Blaser MJ (Washington, DC: ASM;), 3-27.
- Veras, H.N., Quetz, J.S., Lima, I.F.N., Rodrigues, T.S., Havt, A., Rey, L.C., Mota, R.M.S., Soares, A.M., Singhal, M., Weigl, B., Guerrant, R., Lima, A.A.M. 2016. Combination of different methods for detection of *Campylobacter* spp. in young children with moderate to severe diarrhea. Journal of Microbiological Methods, 128(1):7-9. doi.org/10.1016/j.mimet.2016.06.026.
- Wainwright, L.M., Elvers, K.T., Park, S.F., Poole, R.K. 2005. A truncated haemoglobin implicated in oxygen metabolism by the microaerophilic food-borne pathogen *Campylobacter jejuni*. Microbiology. 151:4079-4091. doi: 10.1099/mic.0.28266-0.
- Wegener, H.C. 2010. Danish initiatives to improve the safety of meat products. Meat Science, 84(2):276-283. doi: 10.1016/j.meatsci.2009.06.025.
- Wei, B., Cha, S.Y., Yoon, R.H., Kang, M., Roh, J.H., Seo, H.S., Lee, J.A., Jang, H.K. 2016. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. isolated from retail chicken and duck meat in South Korea. Food Control, 62:63-68. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.10.013
- Whyte, R., Hudson, J.A., Graham, C. 2006. *Campylobacter* in chicken livers and their destruction by pan frying. Letters Applied Microbiology, 43:591-595. doi: 10.1111/j.1472-765X.2006.02020.x.
- World Health Organization (WHO). 2013. The global view of campylobacteriosis: report of an expert consultation, Utrecht, Netherlands, 9-11 July. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/80751/9789241564601_eng.pdf?sequence=1>.
- Wieczorek, K., Denis, E., Lynch, O., Osek, J. 2012. Molecular characterization na antibiotic resistance profiling of *Campylobacter* isolated from cattle in Polish slaughterhouses. Food Microbiology, 34(1):130- 136. doi:10.1016/j.fm.2012.12.00.