

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Detecção e análise dos genes *cadF* e *flaA* de *Campylobacter* spp. em caixas de transporte de frango de corte após processo de lavagem e desinfecção em matadouro-frigorífico de aves no Sul do Brasil.

Dissertação de Mestrado

Rafaela Bom Morgan

Porto Alegre

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Detecção e análise dos genes *cadF* e *flaA* de *Campylobacter* spp. em caixas de transporte de frango de corte após processo de lavagem e desinfecção em matadouro-frigorífico de aves no Sul do Brasil.

Autora: Rafaela Bom Morgan

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na Área de Sanidade Avícola

Orientador: Vladimir Pinheiro do Nascimento

Porto Alegre

2015

CIP - Catalogação na Publicação

Bom Morgan, Rafaela

Detecção e análise dos genes cadF e flaA de
Campylobacter spp. em caixas de transporte de frango
de corte após processo de lavagem e desinfecção em
matadouro-frigorífico de aves no Sul do Brasil. /
Rafaela Bom Morgan. -- 2015.

82 f.

Orientador: Vladimir Pinheiro do Nascimento.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,
Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Campylobacter spp.. 2. genes flaA e cadF. 3.
caixas de transporte. 4. desinfecção. 5. aves. I.
Pinheiro do Nascimento, Vladimir, orient. II. Título.

Rafaela Bom Morgan

DETECÇÃO E ANÁLISE DOS GENES *cadF* e *flaA* DE *Campylobacter* SPP. EM
CAIXAS DE TRANSPORTE DE FRANGO DE CORTE APÓS PROCESSO DE
LAVAGEM E DESINFECÇÃO EM MATADOURO-FRIGORÍFICO DE AVES NO
SUL DO BRASIL.

Aprovada em 06/03/2015

APROVADO POR:

Prof. Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dra. Anderlise Borsoi
Membro da Comissão

Prof. Dr. Hamilton Luiz de Souza Morais
Membro da Comissão

Prof. Dra. Luciana Ruchel dos Santos
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus sem Ele nada é possível. Agradeço por guiar meus caminhos e colocar pessoas especiais em minha vida.

Aos meus pais Helena e Leoberto, pelo amor incondicional, pelos incontáveis esforços para minha formação e realização dos meus sonhos. À minha irmã, Renata pelo carinho, conselhos, palavras de conforto e compreensão. Aos meus avós, Maria e Dolfir que sempre dedicaram a mim um amor fraternal e estiveram sempre ao meu lado dando força e apoio. Amo vocês.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento, pela confiança em mim depositada e pela oportunidade de realizar este estudo. Agradeço por todos os ensinamentos repassado e paciência durante a confecção deste projeto. És para mim uma referência profissional e pessoal, muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Marcos J.P. Gomes, pelo privilégio em poder trabalhar ao lado de um profissional tão dedicado ao que se propõe. Obrigada por acreditar em meu projeto, pelas inúmeras conversas e por compartilhar sua experiência.

Agradecimento especial ao Marco Aurélio Cesco, pelo incentivo inicial e fundamental para a realização deste grande sonho.

Aos meus colegas Yuli Melisa e Gustavo, por sempre estarem ao meu lado ao longo do desenvolvimento deste trabalho, pela oportunidade de trabalhar em um grupo dedicado e entusiasmado com o que faz. Também agradeço pela dedicação e imensurável ajuda à mim fornecida e paciência.

Aos estagiários Bruna, Isadora, Gabriel, André e Alessandra, pelo empenho na produção daquelas quantidades inacabáveis de meios de cultivo, extrações de DNA e coletas ao frigorífico. Por todas as risadas, companheirismo, conversas e pela disponibilidade, inclusive em feriados e finais de semana.

Aos queridos colegas do CDPA, Gabriela, Karen, Flávia, Juliana, Sara, Bruna, Zico, Ricardo, Prof. Hamilton e Prof. Tadeu por estarem sempre à disposição e auxiliarem em tudo o que era preciso. Agradeço em especial ao Sílvio e Thales, pelos ensinamentos e estarem sempre disponíveis para esclarecer dúvidas, orientar e corrigir.

Agradeço a Diane pela amizade construída, companheirismo em todos os momentos de minha vida, pelas orientações, paciência e carinho. À minha amiga Yuli, pela linda amizade, carinho, ensinamentos e risadas. Agradeço as minhas amigas de

faculdade Jéssica Crocetti e Luciana Dalla Vecchia, minhas primas Mariana Bom e Patrícia Bom, por serem amigas inseparáveis, pacientes, amorosas e que, apesar da distância, sempre estiveram ao meu lado.

A Prof. ^a Dra. Luciana Ruschel, por estar sempre disposta a ajudar e aconselhar mesmo estando em outra cidade. Obrigada pelo carinho.

A equipe do SIF, FFA e demais colegas, por sempre se disponibilizarem a colaborar para o desenvolvimento desse projeto e acreditarem na sua importância.

RESUMO

Caixas de transporte de frango de corte são apontadas como importantes veículos de transmissão de *Campylobacter* spp. entre granjas e matadouros-frigoríficos, pois são reutilizadas várias vezes em um mesmo dia, adentrando em diferentes granjas. O método de lavagem utilizado pelas empresas pode não ser eficaz na eliminação de *Campylobacter* spp. Frente à estas questões, este trabalho teve por objetivos avaliar a contaminação por *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* em caixas de transporte antes e após o procedimento de lavagem e desinfecção realizado em matadouro-frigorífico de aves no Sul do Brasil. Além disso, foi verificada a viabilidade de *Campylobacter* em caixas de transporte com 24 horas de secagem em temperatura ambiente. Os quatro meios de culturas utilizados para estudo qualitativo foram avaliados quanto a eficiência para o isolamento desta bactéria. Nas amostras isoladas foi avaliada a presença dos genes de adesão *flaA* e *cadF*. Foram isoladas *Campylobacter* spp. em 80% (8/10) dos lotes analisados, sendo a espécie prevalente a *C. jejuni* identificada em todos os lotes positivos e 20% de *C. jejuni* e *C. coli* concomitantemente. A frequência obtida depois da lavagem (21/30) foi maior em relação as amostras antes (19/30) da lavagem. No entanto, o estudo quantitativo mostrou uma redução na contagem bacteriana entre antes (8,2 NMP/g) e depois (5,2 NMP/g), embora não haja diferença estatística significativa. Já as amostras com 24h de secagem, apresentaram uma redução significativa na contagem (0 NMP/g) e frequência (14/30) de *Campylobacter* spp. em caixas de transporte. Entretanto, as caixas continuaram contaminadas e com células viáveis do patógeno. Dos meios de cultura utilizados, o ágar mCCDA com suplemento demonstrou uma melhor eficiência (28,6%) para o isolamento de *C. jejuni* e *C. coli*, seguido do ágar Skirrow (13,3%) e ágar mCCDA com ácido nalidíxico (11,1%). Entretanto, o uso de membrana de acetato (0,45 µm) em ágar mCCDA demonstrou uma baixa frequência de isolamento (1,1%). Com relação aos genes *flaA* e *cadF*, importantes para a invasão e aderência nas células epiteliais intestinais no hospedeiro, as amostras antes do procedimento de lavagem e desinfecção tiveram uma frequência de 75 e 87,5%, respectivamente. Em relação as amostras depois da lavagem 66,6% apresentavam o gene *flaA* e 100% foram positivas para o gene *cadF*. As amostras com 24 horas apresentaram 100% de positividade para ambos os genes. A partir destes dados, foi observada uma alta ocorrência de *Campylobacter* spp. em caixas de transporte nos lotes avaliados. Apesar da lavagem e desinfecção utilizada nos matadouros-frigoríficos, verificou-se que estes processos não foram eficientes na eliminação do agente, comprovando o papel das caixas de transportes como carreadores de *Campylobacter* spp. da indústria para o campo. Desta forma, torna-se necessário aprimorar o processo de limpeza e desinfecção a fim de diminuir a contaminação cruzada e possibilitar a redução de *Campylobacter* spp. entre os lotes de aves.

Palavras-chave: *Campylobacter* spp., genes *cadF* e *flaA*, caixas de transporte, desinfecção, aves.

ABSTRACT

The transport crates have been reported as important sources of transmission of *Campylobacter* spp. between farms and slaughterhouses, because they are reused several times in one day and this can lead to the transference of pathogen to different farms. The washing method employed by companies may not be effective in eliminating *Campylobacter* spp. The aim of this study was to evaluate the contamination levels by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in transport crates before and after the cleaning and disinfection procedures performed at slaughterhouses located in Southern Brazil as well as to evaluate the capacity of this pathogen to survive on the crates after 24 hours of drying. The four culture media used for qualitative study were evaluated for their efficiency to detect this bacterium. The isolated samples were evaluated for the presence of adhesion and also the invasion genes *flaA* and *cadF*. *Campylobacter* spp. was isolated in 80% (8/10) of the batches analyzed. The most prevalent species *C. jejuni* identified in all batches and *C. jejuni* and *C. coli* concomitantly in 20%. The frequency after washing (21/30) was higher than the samples before it (19/30). Nevertheless, the quantitative study showed a reduction in bacterial counts between before (8.2 MPN/g) and after washing (5.2 MPN/g), although there was no statistical significant difference. However, the samples collected after 24 hours of drying showed a significant decrease in the bacterial counts (0 MPN/g) and also in the frequency of isolates of *Campylobacter* spp. (14/30) in transport crates although they were still contaminated with viable pathogen cells. The culture media used (supplemented mCCDA agar) showed a better efficiency (28.6%) for the isolation of *C. jejuni* and *C. coli*, followed by Skirrow agar (13.3%) and agar mCCDA with nalidixic acid (11.1%). However, the use of membrane acetate (0.45 μ m) in mCCDA agar showed a low frequency of isolation (1.1%). Regarding the genes *flaA* and *cadF*, important for invasion and adhesion in intestinal epithelial cells in the host, the samples before washing and disinfecting procedure had a frequency of 75% and 87.5%, respectively. Concerning the samples after washing, 66.6% showed *flaA* gene and 100% were positive for *cadF* gene. The samples after 24 hours showed 100% positivity for both genes. The results of the present study show a high prevalence of *Campylobacter* spp. isolated from poultry transport crate. Although the slaughterhouse is used to clean and disinfection the transport crate this process was not effective to completely eliminate the *Campylobacter* spp. contamination, and so these findings indicate that cages are important vehicles of transmission of this bacteria from the farm to the factory and vice-versa, which makes it necessary to improve the cleaning process to reduce cross-contamination and enable the reduction of *Campylobacter* spp. in flocks.

Key words: *Campylobacter*, *cadF* and *flaA* genes, transport crates, disinfection, poultry.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Ilustração do sentido do suabe realizado para as coletas das amostras de caixas de transporte de frango de corte coletadas antes e após o procedimento de lavagem e desinfecção e, em amostras de caixas de transporte expostas 24 horas de secagem em temperatura ambiente para estudo qualitativo e quantitativo.....	37
FIGURA 2 -	Ilustração da primeira etapa do processamento para o isolamento de <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> para estudo qualitativo em amostras de caixas de transporte de frango de corte coletadas antes e após o procedimento de lavagem e desinfecção e, em amostras de caixas de transporte expostas 24 horas de secagem em temperatura ambiente.....	40
FIGURA 3 -	Ilustração da segunda etapa do processamento para o isolamento de <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> para estudo qualitativo em amostras de caixas de transporte de frango de corte coletadas antes e após o procedimento de lavagem e desinfecção e, em amostras de caixas de transporte expostas 24 horas de secagem em temperatura ambiente.....	40
FIGURA 4 -	Ilustração do processamento para o isolamento de <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> para estudo quantitativo em amostras de caixas de transporte de frango de corte coletadas antes e após o procedimento de lavagem e desinfecção e, em amostras de caixas de transporte expostas 24 horas de secagem em temperatura ambiente.....	41
FIGURA 5 -	Quantificação bacteriana através do NMP/g das amostras antes e depois do procedimento de lavagem e desinfecção de caixas de transporte para frango de corte, e após 24 horas de secagem em temperatura ambiente.....	47
FIGURA 6 -	Gráfico de dispersão dos valores de NMP das amostras de caixas de transporte para frango de corte com 24h de secagem em temperatura ambiente versus a influência da temperatura (A) e umidade relativa (B).....	49
FIGURA 7 -	Frequência relativa (%) de isolamento de <i>Campylobacter</i> spp. nos diferentes meios de cultura utilizados para estudo qualitativo em amostras de caixa de transporte para frango de corte.....	50

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Sequência dos <i>primers</i> utilizados na identificação de <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>	43
TABELA 2 -	Sequência de <i>primers</i> e condições de PCR para a detecção dos genes <i>flaA</i> e <i>cadF</i>	44
TABELA 3 -	Frequência de amostras de caixas de transporte de frango de corte positivas para <i>Campylobacter</i> spp. antes e depois do procedimento de lavagem e desinfecção realizada em matadouro-frigorífico no Sul do Brasil.....	47
TABELA 4 -	Frequência de amostras de caixas de transporte de frango de corte positivas para <i>Campylobacter</i> spp. depois do procedimento de lavagem e desinfecção e em amostras com 24 horas de secagem em temperatura ambiente realizados em matadouro-frigorífico no Sul do Brasil.....	48
TABELA 5 -	Temperaturas e umidade relativa mensuradas durante as coletas em matadouro-frigorífico no interior das caixas de transporte de frango de corte, de acordo com as etapas de coleta das amostras.....	48
TABELA 6 -	Frequência relativa e absoluta dos genes <i>flaA</i> e <i>cadF</i> em cepas de <i>Campylobacter jejuni</i> isoladas antes e depois do processo de lavagem e desinfecção de caixas de transporte e 24 horas após este procedimento.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS

AAG	Autoaglutinação
AJs	Junções aderentes
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CAD	<i>Campylobacter Adhesion to Fibronectin</i>
CDPA	Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária
CDT	Citotoxina Letal Distensiva
CPs	Polissacarídeos capsulares
CO ₂	Gás carbônico
ECDC	European Centre of Disease Prevention and Control
EFSA	European Food Safety Authority
FBP	Piruvato de Sódio
FAs	Adesões focais
SGB	Síndrome de Guillain-Barré
H ₂ S	Gás Sulfídrico
HDs	Hemidesmossomos
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
LABACVET	Laboratório de Bacteriologia Veterinária
Log	Logarítimo
LOS	Lipo-oligosacarídeos
mL	Mililitro
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
mCCDA	<i>Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Modified</i>
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
N ₂	Nitrogênio
nM	Nanomolar
NMP	Número mais provável
O ₂	Oxigênio
Pb	Par de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed field gel electrophoresis</i>
pH	Potencial hidrogeniônico

ppm	Parte por milhão
qPCR	<i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i>
RAPD	<i>Random amplification of polymorphic</i>
REP-PCR	<i>Repetitive polymerase chain reaction</i>
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
Rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase</i>
SPF	<i>Specific Pathogen free</i>
TJ	Junções laterais compactas
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
VBNC	<i>Viable but non-culturable cells</i>
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	Histórico	15
2.2	O Gênero <i>Campylobacter</i>	16
2.2.1	Isolamento e Identificação.....	18
2.3	Campilobacteriose	20
2.3.1	Campilobacteriose em humanos.....	20
2.3.2	Campilobacteriose em aves.....	22
2.4	Patogenicidade e Fatores de Virulência	24
2.5	Importância em Saúde Pública e Epidemiologia	27
2.6	Ocorrência de <i>Campylobacter</i> spp. em granjas de frango de corte	29
2.7	Ocorrência de <i>Campylobacter</i> spp. no ambiente	30
2.7.1	Mecanismos de adaptação de <i>Campylobacter</i> spp. no ambiente.....	31
2.8	Ocorrência de <i>Campylobacter</i> spp. em caixas de transporte	33
2.9	Ocorrência de <i>Campylobacter</i> spp. em carcaças de frango	34
3	MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1	Cepas de microrganismos controle	36
3.2	Local de coleta e amostragem	36
3.3	Coleta de amostras de caixas de transporte para frangos de corte	36
3.3.1	Protocolo de higienização de caixas de transporte de frango de corte utilizado pelo matadouro-frigorífico.....	38
3.4	Métodos Microbiológicos e de Identificação	39
3.4.1	Processamento das amostras para isolamento de <i>Campylobacter</i> spp. (adaptado de ISO-10272-1:2006).....	39
3.4.2	Processamento para quantificação das amostras de <i>Campylobacter</i> spp....	41
3.5	Identificação de <i>Campylobacter</i> spp. por multiplex PCR	41
3.5.1	Extração de DNA.....	42
3.5.2	<i>Primers</i> e protocolo da multiplex PCR para <i>Campylobacter</i> spp.....	42
3.6	Armazenamento de amostras confirmadas	43
3.7	Pesquisa de gentes de aderência <i>flaA</i> e <i>cadF</i>	44
3.7.1	Deteção do gene <i>flaA</i> e <i>cadF</i> em isolados de <i>C. jejuni</i> por PCR.....	44
3.8	Análise Estatística	44

4	RESULTADOS	46
5	DISCUSSÃO	51
6	CONCLUSÕES	61
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
	APÊNDICE A - Colônias de <i>Campylobacter</i> spp. (destacadas) nos diferentes meios de culturas utilizados para estudo qualitativo em amostras de caixas de transporte de frango de corte coletadas em matadouro-frigorífico no Sul do Brasil.....	77
	APÊNDICE B – Colônias de <i>Campylobacter jejuni</i> isoladas de caixas de transporte de frango de corte coletadas em matadouro-frigorífico no Sul do Brasil.....	78
	ANEXO 1 – Protocolo para formulação do meio de cultura seletivo para <i>Campylobacter</i> termófilos (42°C) ágar Skirrow.....	79
	ANEXO 2 – Protocolo para formulação do meio de cultura mCCDA com adição de ácido nalidíxico para isolamento de <i>Campylobacter jejuni</i> e <i>Campylobacter coli</i>	80
	ANEXO 3 – Protocolo para formulação da coloração de Brain & Frank (1955) para visualização da motilidade de <i>Campylobacter</i> spp. em microscópio de contraste de fase.....	81

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o Brasil ganhou destaque como um dos maiores exportadores mundiais de carne do frango. Em 2011, atingiu uma produção *record* de 12,8 milhões de toneladas, exportando para mais de 150 países. Entretanto, no ano de 2012 com a alta no preço de *commodities* agrícolas e a paralização de diversas empresas, houve uma diminuição de 3,17% da produção brasileira. De forma semelhante, em 2013 observou-se uma queda de 2,6% em relação ao ano anterior, correspondendo cerca de 12,4 milhões de toneladas do produto (UBABEF, 2014).

No entanto, 2013 foi considerado pela União Brasileira de Avicultura um ano de reabilitação e superação da avicultura brasileira, alcançando em 2014 um aumento de 2,9% acima do produzido no ano anterior, equivalente a 12,69 milhões de toneladas. Apesar desses desafios, o Brasil conseguiu manter a posição de maior exportador mundial e terceiro maior produtor de carne do frango (AVISITE, 2015).

A produção e o consumo de carne de aves têm aumentado consideravelmente, tanto pelas suas fontes nutricionais proteicas benéficas, como por ter um melhor custo econômico em relação às demais. Devido à esta demanda, a avicultura brasileira precisou expandir sua produção tanto em quantidade, como em qualidade. No entanto, este aumento na produção resultou em uma maior concentração de aves por metro quadrado e, conseqüentemente, gerando um aumento no risco para a disseminação de doenças. Frente a este cenário, o controle e prevenção de patógenos tornaram-se essenciais para garantir o *status* sanitário das aves.

Assim como a *Salmonella* é uma importante doença vinculada a carne de frango e ovos, outros agentes têm chamado a atenção pelo seu elevado potencial patogênico, como a *Listeria monocytogenes* e bactérias do gênero *Campylobacter*. Esta última, vem sendo reconhecida como patógeno emergente, considerado um dos maiores causadores de doenças transmitidas por alimentos em muitos países industrializados, representando um grave problema em saúde pública (VAZ et al., 2008).

Nos últimos anos, o número de casos de campilobacteriose tem aumentado nos Estados Unidos, sendo o segundo maior agente isolado em casos de doenças de origem alimentar e o primeiro na União Europeia (CDC, 2009). Frente a importância deste agente para saúde pública e pela possibilidade de tornar-se uma barreira ao livre comércio de produtos avícolas, uma comissão internacional em conjunto com o *Codex Alimentarius* e a Organização Mundial de Saúde (FAO/WHO), desenvolvem propostas

de diretrizes para o controle de *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp. em carne de frango (FAO/WHO, 2009).

Sabe-se que as aves chegam negativas para *Campylobacter* na granja e tornam-se positivas entre a segunda ou terceira semana de idade. A rota de infecção dentro das granjas é muito questionada, porém até o momento, a via horizontal é apontada como a mais importante na transmissão deste patógeno, podendo estar relacionada a entrada de aves silvestres, roedores, trabalhadores avícolas, caixas de transporte, e outros (HANSSON et al., 2005).

As caixas de transporte são apontadas com uma das principais fontes de contaminação tanto no ambiente da granja como para o matadouro-frigorífico. Por ser reutilizada diversas vezes em um mesmo dia, adentrando em diferentes granjas, este utensílio pode carrear o agente e infectar lotes previamente negativos. O método de lavagem utilizado pelas empresas é questionável e pode não ser eficaz na eliminação de *Campylobacter*. Além disso, questiona-se a viabilidade deste microrganismo em caixas de transporte se estas passassem por processo de secagem em temperatura ambiente por tratar-se de bactérias que crescem em microaerofilia (BERRANG; NORTHUTT, 2005a).

Sendo as caixas de transporte uma fonte de transmissão de *Campylobacter* spp., o emprego de ações sanitárias não deve ficar restrita às granjas, a verificação dos métodos de lavagem e desinfecção de caixas de transporte realizada em matadouro-frigorífico também deve ser avaliada. Frente à estas questões, este trabalho teve por objetivos avaliar a contaminação por *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* em caixas de transporte antes e após o procedimento de lavagem e desinfecção realizado em matadouro-frigorífico de aves no Sul do Brasil. Além disso, foi verificada a viabilidade de *Campylobacter* em caixas de transporte com 24 horas de secagem em temperatura ambiente. Os meios de cultura utilizados no processo qualitativo foram avaliados quanto a sua eficiência para o isolamento desta bactéria. Nas amostras isoladas foi avaliada a presença dos genes de adesão e invasão *flaA* e *cadF*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico

No final do século XIX, relatos da campilobacteriose começaram a surgir com implicações em saúde pública. Acredita-se que o primeiro relato sobre *Campylobacter* foi realizado pelo médico Theodore Escherich em 1886, que observou uma bactéria de forma espiral, chamando de *Cholera infantum* isolada de amostras de crianças com diarreia (BUTZLER, 2004; KING; ADAMS, 2008; VANDAMME, 2010; SILVA *et al.*, 2011). McFaydean e Stockman (1913) encontraram microrganismos semelhantes em ovelhas com aborto, sendo denominados como *Vibrio jejuni*. Já em 1944, Doyle isolou vibrios de suínos com doença gastrointestinal, que mais tarde os classificou como *Vibrio coli*. Nos anos seguintes, estes agentes também foram identificados em bovinos com disenteria invernã e novamente em suínos com diarreia (VANDAMME, 2000; VANDAMME 2010).

Posteriormente, Elizabeth King, uma das primeiras pesquisadoras a estudar esta bactéria em amostras oriundas de pacientes humanos, reconheceu os parâmetros fundamentais para o seu crescimento *in vitro*, como a necessidade de temperatura a 42°C, chamando-os de *related vibrios*. Além disso, apontou que o sintoma mais proeminente entre os pacientes era a diarreia. Esta associação também foi constatada por outros autores (KING, 1957; BUTZLER *et al.*, 1973; SKIRROW, 1977).

Mas somente em 1963, Sebald e Véron propuseram o gênero *Campylobacter* para que estes microrganismos fossem distinguidos dos verdadeiros *Vibrio spp.*; pois, apresentavam características peculiares como a necessidade de crescimento em microaerofilia e metabolismo não-fermentativo (ON, 2001). Nesta época, o desenvolvimento de novas técnicas e meios de cultura para o isolamento ajudaram no estudo deste agente. Dekeyser *et al.* (1972), conseguiu isolar o microrganismo a partir de fezes de paciente com enterite aguda, através de um método de filtração com posterior inoculação em meios de cultura.

Em 1973, Véron e Chatelain incluíram no gênero *Campylobacter* novas espécies, tendo como base suas características fenotípicas, sendo divididas em três grupos: *Campylobacter* catalase positivo e H₂S negativo; *Campylobacter* catalase positivo e H₂S positivo; e *Campylobacter* catalase negativo. Em 1980, essas diferentes

espécies foram listadas no *Approved Lists of Bacterial Names*. Após, muitas mudanças ocorreram neste gênero, incluindo a descrição de novas espécies e suas semelhanças, reagrupando-as em outros gêneros como *Arcobacter* e *Helicobacter* (ON, 2001).

Desde 1909, *Campylobacter* é reconhecido como causador de doenças em animais. No entanto, somente por volta de 1980 foi reconhecido como potencial patógeno para humanos (SILVA *et al.*, 2011).

Atualmente, o gênero *Campylobacter* está na *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*, que cita 32 espécies e 13 subespécies.

2.2 O gênero *Campylobacter*

O gênero *Campylobacter* pertence à ordem *Campylobacterales* e à família *Campylobacteraceae*. As bactérias pertencentes a este gênero apresentam forma típica de bastonetes curvos, espiralados, formando um “S” ou em formato de asa de gaivota. São bactérias Gram negativas e de pequeno tamanho (de 0,2 μm a 0,9 μm de largura e 0,2 μm a 0,5 μm de comprimento (QUINN *et al.*, 2002; BUTZLER, 2004; JOES *et al.* 2010).

Uma característica que pode ser facilmente visualizada através de um microscópio de contraste de fase ou em campo escuro é sua alta motilidade, atribuída à presença de flagelo em uma ou em ambas as extremidades, conferindo-lhes o movimento de “saca-rolha” ou “vaivém” (QUINN *et al.*, 2002; SNELLING, 2005; HUMPHREY *et al.*, 2007; JOES *et al.*, 2010).

Variantes de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* imóveis, podem ocorrer, apresentando ausência flagelar ou com flagelo incompleto. Dessa forma, estas cepas não conseguem colonizar ou requerem maiores quantidades de inóculo, em relação às cepas móveis (flagelo completo). *Campylobacter coli* possui uma fase antigênica (P1) de flagelina e fase dois (P2) de flagelina (MISHU *et al.*, 1992). Esta variação flagelar antigênica do *C. coli* e *C. jejuni* é acompanhado pelo rearranjo reversível do DNA, envolvendo genes de flagelina (*flaA* e *flaB*) (GUERRY *et al.*, 1991).

Campylobacter spp. requer meios de cultivo seletivos e um ambiente específico para seu crescimento. A maioria das espécies necessita de um ambiente de microaerofilia, com baixas concentrações de oxigênio. Sendo assim, o ambiente

considerado ideal para seu crescimento deve conter 5% de oxigênio, 10% de dióxido de carbono e 85% de nitrogênio. Entretanto, algumas espécies como *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter hyointestinalis*, *Campylobacter showae* e *Campylobacter sputorum* crescem em condições de anaerobiose (GUNTHER; CHEN, 2009).

A temperatura considerada ótima para seu cultivo varia entre 37°C e 42°C, sendo as espécies *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* e *C. upsaliensis* consideradas termotolerantes (LEVIN et al., 2007). São bactérias com requerimentos nutricionais elevados e sobrevivem no intestino de aves e de animais domésticos (KEENER et al., 2004; SNELLING, et al., 2005; JOES et al., 2010). Foi proposto por Lee et al. (1998) que bactérias deste gênero podem ser inativadas em uma temperatura de congelamento a partir de -15 °C; entretanto, o congelamento pode ou não promover a eliminação do patógeno. Entretanto, a capacidade de sobrevivência da *Campylobacter* em baixas temperaturas é investigada, pois esta foi isolado em carcaças de frango congeladas em temperaturas como -7 °C e -22 °C por até 220 dias (GEORGSSON et al., 2006).

O pH ótimo para o desenvolvimento do gênero *Campylobacter* situa-se entre 6,5-7,5 ficando inativas a um pH inferior a 4,9 ou acima de 9,0 (HAZELEGER et al., 1995). Com exceção do *C. jejuni* subespécie *doylei* e *C. fennelliae*, são bactérias que reduzem nitrato a nitrito. Na sua maioria, as espécies possuem atividade oxidase, exceto *C. gracilis*. Não fermentam nem oxidam carboidratos, sendo a sua energia obtida pela utilização de aminoácidos ou de ácidos intermediários do ciclo do ácido tricarbóxico (VANDAMME, 2000). Podem ou não produzir a enzima catalase e, portanto, podem ser catalase positiva ou negativa (STERN et al, 2001).

Quando submetidas a condições adversas como temperatura baixa, falta de nutrientes, altas concentrações de oxigênio ou meios de cultivos velhos, *Campylobacter* spp. podem modificar sua morfologia, passando para forma cocóide, através de uma retração citoplasmática. Assim, as células apresentam-se viáveis, porém não cultiváveis (VBNC – *Viable but non-culturable cells*). Mesmo apresentado a forma VBNC, a bactéria pode ser transmitida e causar infecções em seres humanos (PORTENER et al., 1995; FORSYTHE, 2002; KEENER et al., 2004). Quando as condições ambientais se tornam novamente favoráveis, é possível que a bactéria retorne a sua forma espiral, bem como a se multiplicar (KEUM-IL et al., 2007).

2.2.1. Isolamento e Identificação

As bactérias do gênero *Campylobacter* possuem um crescimento mais lento (48 horas) do que os demais patógenos bacterianos entéricos e requerem condições especiais para seu crescimento, as quais foram citadas anteriormente (CORRY et al., 1995; KUANA et al., 2005; KIESS et al., 2010). Deste modo, o uso de meios seletivos, incubação em atmosfera com adequada microaerofilia e temperatura, são fundamentais (CORRY et al., 1995; KUANA et al., 2005; ISO, 2006).

Existem três principais fatores que dificultam o isolamento de *Campylobacter*: amostras com alta contaminação da flora competitiva; amostras com baixo número de células de *Campylobacter* e bactérias injuriadas por variações de temperatura, nutrientes, acidificação do meio e exposição ao oxigênio, aos quais bactérias deste gênero podem ser submetidas durante o processamento e armazenamento em ambiente laboratorial (THEOPHILO; JAKABI, 2008; ACMSF, 2010).

Portanto, é importante que os meios de cultura sejam suplementados com componentes que aumentem a aerotolerância através da redução dos componentes tóxicos derivados do oxigênio, como peróxido de hidrogênio, oxigênio simples e íons superóxido. Geralmente os meios são suplementados com sulfato ferroso, metabissulfito de sódio, piruvato de sódio (FBP) e carvão bacteriológico. Os meios podem apresentar um ou mais desses componentes associados (CORRY et al., 1995; KUANA et al., 2005).

O uso de antimicrobianos e antifúngicos são indispensáveis para a redução da flora contaminante em amostras. Dentre os principais utilizados estão trimetoprim, vancomicina, anfotericina B, cefalotina, polimixina B, cefoperazone e rifamicina (CORRY et al., 1995; KUANA et al., 2005).

Segundo a Organização Internacional para Padronização (ISO - *International Organization for Standardization*), é necessário um enriquecimento de amostras a uma temperatura de 37 °C por 4 a 6 h, seguido de 41,5 °C por 48 h para a detecção horizontal de *Campylobacter* spp. (ISO, 2006). Após este pré-enriquecimento, deve ser realizado o cultivo em dois meios sólidos seletivos, sendo um deles diferente do princípio do Ágar carvão cefoperazona desoxicolato modificado (mCCDA), e incubado a uma temperatura de 41,5 °C por 48 h. Entretanto, estudos demonstram que o método para o isolamento deste agente, irá depender da origem das amostras, levando em consideração

o grau de contaminantes das mesmas (MASON et al., 1999; SILVA et al., 2011; VOZ-RECH; VAZ, 2012).

A técnica da membrana filtrante de acetato (0,45 μm - 0,65 μm) tem sido utilizada desde 1977 por Skirrow, para o isolamento de *Campylobacter* spp., principalmente a partir de amostras oriundas de alimentos. Devido ao seu tamanho e sua alta motilidade, essas bactérias conseguem passar pelos poros, ao contrário de bactérias indesejáveis de maior tamanho, facilitando assim o isolamento (SKIRROW, 1977; BOLTON et al., 1984; VOSS-RECH; VAZ, 2012).

A identificação é feita principalmente pela morfologia e motilidade, observada através de microscopia de contraste de fase (HINDIYEH, M. et al., 2000; DESISTE et al., 2003; ISO, 2006). As reações bioquímicas realizadas para as bactérias deste gênero incluem a redução do fumarato à succinato e vermelho de metila, assim como as reações para redução de cetona e indol. A diferenciação das espécies pode ser realizada através da prova de hipurato e da sensibilidade ao ácido nalidíxico (ISO, 2006; WALLER; OGATA, 2000).

A diferenciação bioquímica através do teste de hidrólise de hipurato é utilizada para diferenciar as espécies *C. jejuni* e *C. coli*, uma vez que somente *C. jejuni* possui a enzima hipuricase. Entretanto, pesquisas têm mostrado que algumas cepas desta espécie não expressam a enzima para esta reação (MILLER et al., 2009). Portanto, devido à existência de linhagens atípicas bioquimicamente, estes testes geram interpretações inespecíficas, sendo necessária a utilização de técnicas moleculares para a identificação das espécies (LINTON et al., 1996).

A principal técnica molecular empregada para a identificação e diferenciação das espécies deste gênero é a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Esta ferramenta consiste em um método preciso, que requer um curto tempo de execução e possui uma alta sensibilidade na detecção de sequências específicas de DNA (DEBRETSION et al., 2007; BUTZLER, 2014). Além disso, pode-se realizar um mesmo protocolo para a pesquisa de vários genes, chamado multiplex PCR (mPCR), possibilitando a amplificação simultânea de diferentes sequências de DNA (KONEMAN et al., 2001). Outra técnica bastante empregada é o PCR tempo real (qPCR), utilizada em pesquisas quantitativas através da amplificação com sondas fluorescentes, sem a necessidade da utilização da eletroforese para a visualização dos resultados (GANDA et al., 2008).

Técnicas como a Transcriptase Reversa (RT-PCR) (GANDRA et al., 2008), Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso (RAPD), Polimorfismo de Comprimento por Fragmento de Restrição (RFLP), Eletroforese por Campo Pulsado (PFGE) (WALLER; OGATA, 2000; DEBRETSON et al., 2007; SILVA et al., 2011), Tipagem de Sequências Multilocus (MLST), Reação em Cadeia Polimerase Repetitiva (REP-PCR) (BEHRINGER et al., 2011), e outras, são utilizadas cada vez mais com o intuito de estabelecer estruturas e parâmetros genéticos entre amostras, pesquisas de genes, diferenciações de linhagens e para estudos epidemiológicos.

2.3 Campilobacteriose

2.3.1 Campilobacteriose em Humanos

A infecção por *Campylobacter* spp. é uma zoonose de distribuição mundial, que representa um grave problema de saúde pública com impacto socioeconômico significativo (WINGSTRAND et al., 2006). Em humanos, pode manifestar-se de diferentes maneiras, sendo a gastroenterite a mais comum. As principais espécies associadas a esta patologia são as termofílicas *C. jejuni*, *C. coli*, *C. upsaliensis* e *C. lari*, sendo as duas primeiras de maior ocorrência e com sintomatologia indistinguível (KONEMAM et al., 2001; EFSA, 2011).

A transmissão para humanos ocorre mais comumente através do consumo e da manipulação de produtos de origem animal contaminados. Contudo, a principal fonte citada para infecção é a carne de frango contaminada, através do consumo da carne mal cozida. Porém, sendo este um hábito não comum, a contaminação cruzada durante a manipulação da carne de frango é a forma de contaminação mais importante para humanos (HERMANS et al., 2012). Outras formas importantes de contaminação, porém menos frequentes, podem ocorrer através da ingestão de água, leite cru não pasteurizado, carne ovina, bovina e suína crua ou mal cozida, e de produtos de origem animal embutidos (EVANS et al., 2000; STANLEY; JAMES, 2003).

A sintomatologia da patologia causada por *Campylobacter* spp. é semelhante as demais causadas por outros agentes entéricos. Contudo, o seu maior agravante é a baixa dose infectiva, estimada entre 400-800 células para manifestação da doença. O período de incubação varia entre dois a cinco dias, podendo prolongar-se por até dez dias

(BUTZLER, 2004).

O desenvolvimento e progressão dos sintomas podem variar de acordo com idade, estado de saúde de cada indivíduo e dose ingerida. Os indivíduos de todas as idades podem ser afetados, entretanto, crianças, idosos e pessoas com doenças imunodepressoras são as mais susceptíveis (KONEMAM et al., 2001).

A doença caracteriza-se pela presença de diarreia líquida com febre baixa ou alta e dores abdominais (WHO, 2011; CDC, 2013). A diarreia pode ser sanguinolenta, contendo leucócitos e muco. Outros sintomas como náuseas, dores musculares, dor de cabeça e raramente vômitos, podem ocorrer (KONEMAM et al., 2011; WHO, 2011; EFSA 2014). A fase aguda da doença pode durar de dois ou três dias, no entanto, as dores abdominais podem persistir por até três semanas (NACHAMKIN, 2007). Pacientes convalescentes podem continuar excretando o microrganismo nas fezes em um período de duas semanas a um mês (KONEMAM et al., 2001).

Geralmente, a recuperação ocorre dentro de uma semana, sendo na maioria dos casos necessária somente a reposição hidro-eletrolítica, somente 20% dos casos necessitam de uma terapia com antimicrobianos (WHO, 2011). Quando esta se faz necessária, a principal droga utilizada é a eritromicina seguido pelas fluoroquinolonas, sendo esta última frequentemente usadas devido ao seu amplo espectro de atividade contra patógenos (PIDDOCK, 1995; SNELLING et al., 2005).

Existem cepas de *Campylobacter* spp. que são resistentes naturalmente a um determinado tipo de antimicrobiano e outras que adquirem essa resistência. Até alguns anos atrás *C. jejuni* e *C. coli* eram susceptíveis ao ácido nalidíxico, um antimicrobiano pertencente ao grupo das fluoroquinolonas, sendo esta característica muitas vezes utilizada a nível laboratorial para caracterizar este tipo de bactéria. Entretanto, o uso indiscriminado destes antimicrobianos tem levado à resistência cepas de *Campylobacter* (EFSA, 2015). Dados atuais da EFSA (2015), demonstraram que *Campylobacter* em amostras de aves (suabe de cloaca), carne de frango, suíno e bovinos possui alta resistência às fluoroquinolonas como ciprofloxacina e ácido nalidíxico, e também para tetraciclina. Sendo assim, estes antimicrobianos não seriam uma opção eficaz no tratamento da campilobacteriose em humanos. Entretanto, foram observados níveis muito mais baixos de resistência para eritromicina e gentamicina.

Complicações não são frequentes, apesar de ter sido relatado casos de bacteremia, septicemia, artrite reativa, endocardites, peritonite, meningite, infecção urinária, septicemia neonatal e aborto após enterite (BUTZLER, 2004). A taxa de

letalidade é de 0,1 óbitos por mil casos. Fatalidades, apesar de serem incomuns, podem ocorrer em pacientes com doenças debilitantes (WHO, 2009).

Infecções causadas por *Campylobacter jejuni* podem levar a uma grave neuropatia periférica conhecida como Síndrome de Guillain-Barré (SGB). A SGB é uma doença inflamatória aguda que consiste em uma polineuropatia inflamatória desmielinizante, gerando uma paralisia neuromuscular flácida que compromete os músculos da respiração, podendo levar o paciente ao óbito. Acredita-se que a presença de anticorpos autoimunes para *C. jejuni* atuem contra a mielina do sistema nervoso periférico através de mimetismo celular (GILBERT et al., 2004; VUCIC et al., 2009; POROPATICH et al., 2010).

Estima-se que casos de SGB ocorram em 0,01% dos pacientes com campilobacteriose. Cerca de 40% dos pacientes que tiveram esta síndrome apresentaram infecção recente por *Campylobacter jejuni*, 20% permaneceram com sequelas e 5% morreram devido à complicação respiratória. Desde a erradicação da poliomielite, a SGB é a causa mais frequente de paralisia neuromuscular em países industrializados (HADDEN; GREGSON, 2001; VUCIC et al., 2009). Outra síndrome que pode ser desencadeada por infecções de *C. jejuni* é a Síndrome de Miller Fisher, caracterizada pela perda dos reflexos oculomotores e pela perda de força nas extremidades do tronco. (OVERELL; WILLISON, 2005).

2.3.2 Campilobacteriose em Aves

A presença de *Campylobacter* em aves ocorre geralmente durante a segunda e a terceira semana de idade em sistemas intensivos, sendo este agente geralmente detectado entre o sétimo e décimo dia pós-infecção (NEWELL; FEARNLEY, 2003; BUTZLER, 2014). Por esta razão, acredita-se que a transmissão vertical não contribua para a colonização de *Campylobacter* em lotes de frango de corte. Entretanto, *Campylobacter* foi isolado em incubatório de frango de corte, em amostras de penas, embriões e pintos recém eclodidos, sendo portanto, questionado se a via de transmissão vertical não possui um papel importante para a colonização desta bactéria em aves (CLARK et al. 1985; FONSECA et al. 2014).

Quando ovos SPF foram inoculados com *C. coli*, apresentaram uma alta mortalidade embrionária, o que pode estar relacionado a presença da bactéria (ROSSI et

al., 2012). Hiatt et al. (2013), identificaram *Campylobacter* no interior do trato gastrointestinal de embriões de frango de corte com sete, 14 e 19 dias de incubação.

Quando inoculado *C. coli* em matrizes e avaliado seus respectivos embriões, houve uma contaminação de 25% identificada através da técnica RT-PCR (ROSSI et al., 2012). Neste estudo e no de Hiatt et al. (2013) citado anteriormente, não foi possível a identificação da *Campylobacter* através do método microbiológico convencional. Está dificuldade no isolamento pode estar relacionado com o fato de que estas bactérias estariam na forma VBNC. Contudo, maiores estudos são necessários para investigar a patogenicidade de *Campylobacter* em aves.

Desta forma, a transmissão vertical é comumente discutida como uma rota de importância epidemiológica de infecção em aves, não sendo considerada a principal delas. Através de estudos epidemiológicos e comparações entre padrões genéticos de bactérias isoladas em reprodução e seus descendentes, evidenciam que a transmissão vertical pode ser uma importante via de transmissão de *Campylobacter* em aves (COX et al., 2002),

É importante destacar que embora possa ocorrer transmissão pela via transovariana, este não seria o único meio de contaminação dos ovos. As fezes podem facilmente contaminar a superfície de um ovo, uma vez que este passa pela cloaca. Quando ocorre a eclosão o pinto também pode ser contaminado por *Campylobacter* presente nas membranas da casca e tornar-se colonizados; ele pode, em seguida, espalhar esta contaminação para o restante do lote (COX et al., 2012).

Os estudos à respeito de *Campylobacter* ainda são muito recentes quando comparados com outros patógenos, como por exemplo, *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*. Com relação a patogenicidade deste agente, geralmente observa-se uma grande invasão em células epiteliais intestinais de humanos e uma baixa invasão em células epiteliais intestinais de aves, sendo a *Campylobacter* classificadas como comensais em frangos de corte (GUERRY et al, 2007).

Através de infecção experimental de quatro linhagens comerciais de frangos de corte, Humphrey et al. (2014) demonstraram que o tipo de linhagem pode exercer um efeito significativo em relação a infecção e a resposta imune de *C. jejuni*. Neste estudo, todas as linhagens apresentaram uma resposta imune inata e aquelas das quais não houve aumento de IL-10, manifestaram resposta inflamatória intensa, diarreia levando a danos na mucosa intestinal. Sendo assim, algumas linhagens podem manifestar a doença clínica da campilobacteriose e, portanto, *Campylobacter* parece não ser comensais

inofensivos.

Geralmente as aves apresentam-se assintomáticas para *Campylobacter* spp. nas granjas (RIDLEY et al., 2008). Quando a doença é manifestada, os sinais clínicos como apatia, prostração, perda de peso e diarreia intensa podem ocorrer (HUMPHREY et al., 2014). Acredita-se que anticorpos maternos para *Campylobacter* também exerçam um papel importante para as aves não apresentarem sinais clínicos da campilobacteriose. Segundo Sahin et al. (2003), anticorpos maternos contra esta bactéria desempenham um papel parcial na proteção para aves jovens. Neste estudo, aves com 21 dias com anticorpos maternos para *Campylobacter* tiveram uma resposta imunológica mais rápida e combateram a doença quando comparado com grupo controle.

As lesões observadas no exame *post-mortem* podem apresentar distensão do trato intestinal à partir da região distal do duodeno, com acúmulo de muco e líquido aquoso. Hemorragias podem estar presentes dependendo das propriedades citotóxicas da espécie de *Campylobacter* envolvido. Manchas vermelhas ou amareladas no parênquima do fígado também podem ocorrer quando a infecção ocorrer por cepas toxigênicas. Histologicamente, o íleo e o ceco podem apresentar um aumento de células inflamatórias, heterofilos e linfócitos. Danos a mucosa e às vilosidades intestinais podem ser observados, geralmente apresentando edema e espessamento (SHANE; STERN, 2008; HUMPHREY et al., 2014).

2.4 Patogenicidade e fatores de virulência

Campylobacter jejuni e *Campylobacter coli* são as espécies bacterianas mais isoladas em aves, possuindo uma alta colonização intestinal. O ceco é o local preferencial para sua colonização (10^6 a 10^8 UFC/g) (LEE; NEWELL, 2006; YOUNG et al., 2007). Conforme Hermans (2011), a ingestão de somente 35 UFC pode ser suficiente para a colonização intestinal bem sucedida em pintos.

Os mecanismos específicos de virulência do *Campylobacter* spp. não foram totalmente elucidados, provavelmente, por ser diferente dos demais patógenos (GUERRY, 2007; YOUNG et al., 2007). Fatores como motilidade flagelar, aderência bacteriana na mucosa intestinal, capacidade de invasão e de produção de toxina já foram identificados como importantes mecanismos para a virulência do agente, principalmente a partir de estudos com inoculações em animais e modelos celulares *in vitro*

(SZYMANSKI et al., 1995; GUERRY, 2007; YOUNG et al., 2007; SILVA et al., 2011). O aprofundamento do conhecimento sobre *Campylobacter* spp. em relação a sua genética e patogenia começaram a ser elucidados a partir da disponibilidade de sequências genômicas completas (BACKERT et al., 2013).

A motilidade conferida a *Campylobacter* pela presença de flagelo auxilia a bactéria na colonização da mucosa. A quimiotaxia flagelar parece ser importante para a comensalidade bacteriana em células epiteliais intestinais em aves e também para a patogenia no hospedeiro (MARCHANT et al., 2002). Estudos revelaram que mutantes com atividade flagelar reduzida foram inoculados em galinhas, tiveram uma colonização normal e não causaram danos à mucosa intestinal quando inoculados em coelhos. Por outro lado, mutantes com ausência total de motilidade não obtiveram sucesso na colonização (WASSENAAR et al., 1993).

A estrutura flagelar não é requerida somente para a motilidade do *Campylobacter*. Mediante este mecanismo secretam proteínas flagelares e não-flagelares que são necessárias para colonização, invasão e migração entre as células, contribuindo a virulência bacteriana (KONKEL et al., 2005). A expressão flagelar deve-se principalmente pela presença dos genes: *flaA*, *flaB* e *flaC* (GUERRY, 2007).

Uma vez dentro dos enterócitos, este patógeno atinge tecidos adjacentes, como por exemplo, a lâmina própria, entrando na corrente sanguínea e migrando para outros órgãos como baço, fígado e linfonodos mesentéricos. Entretanto, os mecanismos moleculares da ligação bactéria e hospedeiro, são pouco conhecidos. Invadindo os tecidos adjacentes e a submucosa, as bactérias não ficam sujeitas aos movimentos peristálticos do intestino e podem ter acesso a nutrientes diferenciados, como o ferro. Além disso, estando dentro de células epiteliais intestinais, podem ficar protegidas da ação de antimicrobianos (YOUNG et al., 2007; ZILBAUER et al., 2008).

Aderência e invasão das células epiteliais são um dos mais importantes mecanismos para o desenvolvimento da diarreia por *Campylobacter*. A fibronectina é uma glicoproteína de 220 kDa que está presente nas regiões de contato célula-a-célula no epitélio gastrointestinal, proporcionando assim um potencial local de ligação para agentes patogênicos (Ó CRÓININ; BACKTER, 2012). Algumas adesinas de *C. jejuni*, como a CADF (*Campylobacter Adhesion to Fibronectin*) são fundamentais para promover a adesão através da ligação à fibronectina, influenciando a organização dos microfilamentos celulares para facilitar a invasão (KONKEL et al., 2005).

A diferença entre a infecção de *Campylobacter* spp. em galinhas e humanos,

ainda não foi completamente esclarecida, mas duas principais rotas de invasão celular estão sendo pesquisadas, a via transcelular e a via paracelular (SEARS, 2000; KAZMIERCZAK et al., 2001; BACKERT, 2013). Foi proposto por Konkel e colaboradores (1992), que *C. jejuni* consegue invadir células epiteliais cultivadas de origem humana com maior eficácia quando comparadas com culturas celulares que não são de origem humana, sugerindo assim, que a bactéria é um patógeno especializado em infectar e gerar doença em humanos.

Assim como outros patógenos, *Campylobacter* spp. consegue desenvolver mecanismos de adaptação para explorar as estruturas de células epiteliais que compõem as grandes junções intercelulares, como por exemplo, as junções laterais compactas (TJs), junções aderentes (AJs), bem como a integrina que faz ligação com a matriz celular, tais integrinas como adesões focais (FAs) e hemidesmosomos (HDs) Estes microrganismos conseguem assim permanecer no local, sobreviver, multiplicar e, às vezes, persistir (BACKERT; KÖNIG, 2005; WESSLER; BACKTER, 2008).

Quando *Campylobacter* invade os enterócitos pela via paracelular, as células epiteliais intestinais têm suas estruturas laterais fragmentadas, aumentando a permeabilidade celular para a passagem de *C. jejuni* (NOVIK et al., 2010). A expressão da adesina *cadF* é requerida para a invasão pela via paracelular, para a ligação da fibronectina ao complexo de integrina permitindo a entrada da bactéria pela superfície basolateral das células epiteliais intestinais. Quando a invasão ocorre pela via transcelular, *Campylobacter* entra pela superfície apical dos enterócitos e deixa a célula pela membrana basal (BACKERT et al., 2013).

Pesquisas revelam que existem diferentes fenótipos entre as cepas de *Campylobacter* spp. Dessa forma, podem apresentar potencial para transmigrar e invadir células, sendo que algumas cepas podem apresentar capacidade somente para uma destas funções, ambas ou para nenhuma das atividades. Estas características são importantes para definição da via de entrada nas células epiteliais e, conseqüentemente, estar correlacionados com surtos de colites (BRÁS; KETLEY, 1999; BOEHM et al., 2010).

Somente a invasão celular por *Campylobacter* spp. não é suficiente para causar as lesões citopáticas na doença entérica. A liberação de toxinas é considerada um dos fatores mais importantes para explicar a patogenicidade deste agente. A Citotoxina Letal Distensiva (CDT) age interferindo na fase do ciclo de divisão celular, pois impede as células de entrar em mitose, assim ocorrendo a sua morte. A produção de citotoxina

destrói células brancas intracelularmente e, através da formação de vacúolos celulares, inibe a síntese protéica (HASSANE et al., 2003).

A produção desta proteína é codificada pelos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*. Acredita-se que o *cdtB*, quando expressado codifica a toxina, e em ambiente intracelular, transfere-a para o núcleo celular. Um ou ambos, *cdtA* e *cdtC*, devem codificar as ligações com o hospedeiro, mediando a ligação e subsequente internalização celular. Entretanto, para que ocorra a ação citotóxica, é necessária a presença dos três genes (HASSANE et al., 2003). Sabe-se que mutações nos genes *cdt* podem causar perda da produção de citotoxinas, impedindo, assim, as lesões celulares que causam a sintomatologia clínica (YOUNG et al., 2007). Além disso, o cluster CDT pode ter um papel importante nas infecções assintomáticas ou comensais, o que proporciona uma maneira de evitar mecanismos de resposta imune no hospedeiro ou redirecioná-las para uma intolerância (HICKEY et al., 2005).

O polissacarídeo capsular (CPSs) é uma estrutura comum em superfícies bacterianas e possui um importante papel para sobrevivência e persistência do *Campylobacter* no ambiente, contribuindo para sua patogênese. O estudo realizado por Bacon et al. (2001) revelaram que esta cápsula, formada por lipo-oligossacarídeos (LOS), ajuda também na resistência sérica, invasão epitelial e na manifestação da doença entérica. Pesquisas utilizando mutantes com cápsulas deficientes demonstraram uma diminuição da invasão e da aderência celular de *C. jejuni* (ZILBAUER et al., 2008).

Várias estruturas de LOS de *C. jejuni* assemelham-se aos gangliosídeos neuronais humano. Por esse motivo, as células de memória geradas pela infecção de *C. jejuni* poderão agir contra as estruturas dos gânglios neuronais, ocasionando a SGB (GUERRY, 2007).

2.5 Importância em Saúde Pública e Epidemiologia

As espécies *C. jejuni* e *C. coli* são reconhecidas como as mais importantes e com maior potencial patogênico do ponto de vista alimentar. Os reservatórios deste agente são animais domésticos, silvestres e principalmente aves, que normalmente atuam como hospedeiros (WHO, 2013).

Dados revelam que nos Estados Unidos, a cada ano, ocorram 9,4 milhões de

casos de infecções alimentares, com 55.961 hospitalizações e 1.351 mortes. Deste total, 11% dos casos têm como agente *Salmonella* spp. e 9% *Campylobacter* spp. Nas últimas décadas, na maioria dos países industrializados, houve um aumento nos casos de campilobacteriose, sendo uma das doenças mais reportadas nos Estados Unidos (SCALLAN et al., 2011). Em 2012, foi o segundo maior agente isolado em casos de doenças transmitidas por alimentos, correspondendo a 31% dos casos de hospitalização no país e 0,2% das mortes (CDC, 2013). Além disso, houve um aumento de 13% no número de casos de campilobacteriose quando comparados com os anos de 2006 e 2008, sendo estimado que para cada caso notificado nos Estados Unidos, existam 30 casos não notificados (CDC, 2013).

Aproximadamente, 76 milhões de pessoas adquirem doenças causadas por microrganismos de origem alimentar nos Estados Unidos. Cerca de 20 a 30% dos casos em humanos são causados por produtos de origem avícola, especialmente carne de frango. Destes, 90% são relacionados à espécie *C. jejuni* e 10% à espécie *C. coli* (HANNIS et al., 2008). Segundo Davis e Conner (2003), *Campylobacter* sp. possui a capacidade de sobreviver na pele de frangos por ser um microrganismo termofílico.

No final de setembro de 2014, foi divulgado pela *Food Safety News*, um surto por *Campylobacter* na escola *Durand School District* no estado Wisconsin dos EUA. Foram hospitalizadas 22 pessoas confirmadas com campilobacteriose. A origem deste surto ainda não foi divulgada, mas as investigações têm como foco principal a origem alimentar.

Segundo relatório anual sobre zoonoses e surtos de origem alimentar na União Européia (EFSA e ECDC, 2013), a campilobacteriose continua sendo a doença zoonótica mais relatada em seres humanos, com aumento de casos nos últimos cinco anos, e uma redução no número de salmonelose nos últimos sete anos. No ano de 2011, houve um total de 220.209 casos de *Campylobacter* spp. em humanos, 2,2% a mais do que em 2010.

Na Europa, países como Inglaterra e como País de Gales, registraram surtos de *Campylobacter*, com 27% dos casos relacionados a doenças transmitidas por alimentos (DTA) (ADAK et al., 2005). Em 2003 na Espanha, um caso de campilobacteriose ocorreu em uma escola infantil de Madri devido a contaminação cruzada através da carne de frango, contaminada com *C. jejuni*, para o leite (JIMENÉZ et al., 2005). Na Dinamarca, em 2005, um surto de campilobacteriose foi associado à ingestão de carne de frango servida em refeições de uma empresa (MAZICK et al., 2006).

Desde 2001, a Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization – WHO*) e a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (*Food and Agriculture Organization – FAO*) iniciaram um trabalho de avaliação internacional de risco para *Campylobacter* spp. Em 2009, um novo estudo com *Salmonella* sp. e *Campylobacter* sp. em frangos foi iniciado para apoiar o trabalho conduzido pelo *Codex Alimentarius* sobre a gestão destes patógenos em frangos (FAO/WHO, 2009).

No Brasil, os dados epidemiológicos sobre este agente ainda são muitos escassos, porém, foram registrados no Estado de São Paulo em 2003 dois surtos: o primeiro relacionado ao consumo de carne de frango e outro devido à ingestão de ovos de Páscoa contaminados. Em 2005, também houve a notificação de surto com *Campylobacter* transmitida por água contaminada (CEV, 2005).

Um levantamento oficial do Ministério de Saúde do Brasil mostrou que *Campylobacter* é o agente menos frequente nas infecções transmitidas por alimentos a humanos, sendo responsável por 0,13% dos surtos notificados em 2009 (SVS, 2009). Quando analisados os casos os surtos relatados em 2000 a 2013, *Campylobacter* representou 0,08%, correspondendo um total de três surtos relatados nesse período (SVS, 2014). Assim como em outros países em desenvolvimento, no Brasil, não existem programas nacionais de vigilância que verifiquem a incidência de infecções causadas por *Campylobacter* spp., e por essa razão, os dados são escassos.

2.6 Ocorrência de *Campylobacter* spp. em granjas de frango de corte

As aves geralmente apresentam-se assintomáticas, sendo um fator problemático para a detecção do agente nos lotes (RIDLEY et al., 2008). Carvalho et al. (2001) isolaram este microrganismo em amostras de fezes (17,7%) somente a partir do 28º dia de vida das aves, e somente a partir do 35º dia, isolaram *Campylobacter* spp. em amostras de suabe cloacal (16,7%), cama (1,8%) e ração (0,6%).

A disseminação da infecção através de aves portadoras em um lote pode ser muito rápida, sugerindo que a infecção também ocorre pelo contato entre aves e por fontes comuns de infecção horizontal, principalmente a transmissão fecal-oral por coprofagia. Uma vez havendo aves positivas, é possível detectar níveis de contaminação microbiológica em diversos pontos de abate (McDOWELL et al., 2008). Sendo *Campylobacter* spp. um microrganismo presente em granjas, estas aves podem ser

infectadas e carregá-lo para dentro das plantas frigoríficas. Avaliações de risco sugerem que as reduções da concentração desse agente em granjas impactam diretamente no número de casos humanos de campilobacteriose (BOYSEN et al., 2007).

A colonização em lotes de frangos por *Campylobacter* spp. é bastante variável, apresentando taxas de positividade entre 0 e 100% (CARVALHO, 2006). A probabilidade de um lote ser contaminado durante a fase de criação em granjas é de 60% a 80%, e geralmente ocorre um aumento da prevalência desta bactéria perto da idade de abate (KUANA et al., 2008b). Em 2008, quase todos os frangos de corte de alguns países do norte da Europa, como Estônia, Noruega e Finlândia, eram livres para *C. jejuni*, enquanto que, em Luxemburgo, foi relatada uma prevalência de 100% (JONSSON et al., 2010).

No Brasil, Kuana et al. (2008b) avaliaram a ocorrência desse agente em 22 lotes de frangos de corte a partir de 3 semanas de idade, com análise de 110 aves. Dos lotes avaliados, quatro não estavam contaminados, e os positivos obtiveram um nível médio de colonização de conteúdo cecal de 7.0 log UFC/g.

Em outro trabalho, Kuana et al. (2009) verificaram quais as espécies mais isoladas, e concluíram que das 546 amostras analisadas dos 22 lotes de frangos de corte, 68.8% eram *C. jejuni* subsp *jejuni*, seguido de 8.3% de *Campylobacter coli*, 6.3% de *Campylobacter jejuni* subsp *doylei*, 4.2% de *Campylobacter upsaliensis* e 2.1% de *Campylobacter fetus* subsp *fetus*.

2.7 Ocorrência de *Campylobacter* spp. no ambiente

Tendo em vista que a transmissão horizontal é a mais importante para a contaminação de um lote de frango de corte, fontes como: água, ração, cama, roedores, funcionários de empresas avícolas, animais domésticos e de produção, caixas de transporte de aves, entre outros, são possíveis veículos de transmissão. Estas fontes de contaminação estão, entre outros fatores, relacionadas principalmente com baixos níveis de biossegurança (HERMANS et al., 2012).

Campylobacter spp. pode se inserir no abastecimento de água, associado com protozoários ou também pode formar biofilmes (GUERRY et al., 2007). Chavez (2007), isolou *Campylobacter* spp. de amostras de água em apenas uma das três granjas (3,3%) avaliadas e não houve isolamento de amostras de ração. Já Carvalho et al. (2001)

isolaram a bactéria em 0,6% das amostras de ração e em nenhuma das amostras de água analisadas. A ração pode ser uma fonte de contaminação; porém, a baixa prevalência do agente pode estar relacionada com a pouca disponibilidade de água neste meio e com a utilização de alguns antimicrobianos.

A criação de outros animais de produção também pode ser uma importante fonte de contaminação para frangos de cortes em uma mesma propriedade rural. Pesquisas mostram que cepas de *C. jejuni* isoladas de alguns lotes de frango de corte possuem o mesmo genótipo de cepas recuperadas de bovinos, suínos ou até mesmo de galinhas poedeiras presentes em uma mesma propriedade rural. Também, roedores, moscas e suas larvas, animais domésticos, utensílios e outros, podem ser importantes fontes de transmissão desta bactéria (HALD et al., 2010).

Estudo que avaliou a presença de *Campylobacter* spp. em granjas com diferentes padrões de biossegurança. Pode-se notar que nas granjas que não possuem práticas de biossegurança adequadas, houve uma prevalência maior de *Campylobacter* spp. que aquelas que possuem, independente da presença de outros animais de produção (HALD et al., 2010).

2.7.1 Mecanismos de adaptação de *Campylobacter* spp. no ambiente

Os níveis atmosféricos de oxigênio e espécies reativas de oxigênio (ROS) são uns dos principais fatores estressores para o *Campylobacter* sp. fora do hospedeiro. Se esta bactéria não for capaz de neutralizar estes compostos tóxicos, danos à membrana plasmática, ao ácido nucléico e às proteínas poderão ocorrer (PURDY et al., 2011).

Todavia, genes responsáveis para esta função já foram identificados, entre eles, o *sodB* que codifica a enzima superóxido dismutase, considerado a primeira linha de defesa contra os efeitos tóxicos de ROS (PURDY et al., 1999; BISWAS et al., 2011). Diferente da maioria das bactérias que apresentam os dois tipos de superóxido dismutase codificadas por *sodA* e *sodB*, *C. jejuni* possui somente o *sodB* (PURDY et al., 1999). Outro importante gene é o *AhpC* (Alquil hidroperoxidase), que confere aerotolerância e defesa contra o estresse oxidativo ao *C. jejuni* (PALYADA et al., 2004). *C. jejuni* e *C. coli* também utilizam a catalase para se defender dos efeitos oxidativos. (BISWAS et al., 2011).

A formação de biofilme é uma estratégia comum para a sobrevivência de

bactérias em condições ambientais adversas. Tem sido demonstrado que em condições nutricionais deficientes e em ambientes aeróbicos pode ocorrer a formação de biofilme por *C. jejuni* e que esta espécie pode sobreviver em sistemas de água e sobre uma variedade de superfícies. Contudo, a compreensão molecular dos mecanismos subjacentes à formação de biofilme por *Campylobacter* spp. ainda são muito escassos. (ICA et al., 2012).

A estrutura flagelar também está envolvida na resistência bacteriana, tais como: quimiotaxia, secreção de proteínas de virulência, escape da resposta do sistema imune do hospedeiro, formação de microcolônias e na autoaglutinação (AAG). Estes dois últimos são requeridos para formação de biofilmes e, conseqüentemente, para sobrevivência desta bactéria em ambientes desfavoráveis (GUERRY, 2007).

Outro mecanismo, conforme citado anteriormente, é a forma VBNC. Neste estado, a bactéria perde sua habilidade de formar colônias e reduz sua atividade metabólica, mas em ambiente favorável podem ser recuperadas (PATRONE et al., 2013). Durante este estado, o gene *cadF* continua sendo expresso, demonstrando que este agente terá capacidade de infectar um novo hospedeiro. Nesta forma *Campylobacter* spp. também consegue aderir em carcaças de frangos, permanecendo nas fissuras da pele (MURPHY et al., 2006; PATRONE et al., 2013).

Foi descrito que o *Campylobacter* possui mecanismos de respostas para exposição a temperaturas acima daquelas consideradas ótimas para seu crescimento. Foram identificadas a produção de 24 proteínas utilizadas na resposta para esta condição (KONKEL et al., 1998). Estas proteínas também possuem um papel importante para a termoregulação e crescimento deste patógeno no intestino de galinhas (BRONOWSKI et al., 2014; DASTI et al., 2010).

Campylobacter também produz proteínas para auxiliar na sua sobrevivência em temperaturas baixas. Tem sido relatado que este microrganismo consegue sobreviver melhor a temperatura de 4 °C do que a 25 °C. A capacidade de adaptação e regulação da expressão de genes de *C. jejuni* em resposta a condições de frio não são completamente compreendidas. Estudos mostram que o número de genes envolvidos no metabolismo de energia foram regulados positivamente em 5°C do que quando comparados com 25°C, indicando que este microrganismo necessita de mais energia em baixas temperaturas (MOEN et al., 2005). Além disso, possui mecanismos de defesa contra os raios UV, dessecação, pH ácido e outros.

Portanto, mesmo em condições adversas, *Campylobacter* spp. consegue

promover mecanismos de sobrevivência, diminuindo o estresse ambiental, até conseguir encontrar um ambiente favorável para seu crescimento. Todas estas estratégias e mecanismos de adaptação ao ambiente podem explicar a ampla distribuição deste patógeno e o aumento do número de casos por campilobacteriose (HAZELEGER et al., 1998).

2.8 Ocorrência de *Campylobacter* spp. em caixas de transporte

Uma vez que se tem uma ave colonizada por *Campylobacter* spp., ela irá secretar grandes quantidades deste microrganismo nas fezes, podendo contaminar todo o lote. Contudo, a contaminação externa pode ocorrer não só em granjas, mas também durante o processo de transporte da ave da granja para o abatedouro (BERRANG et al., 2011a). Se existir a presença de aves colonizadas por *Campylobacter*, mesmo não tendo uma prevalência alta no lote, aves não colonizadas poderão ser contaminadas (WHO/FAO, 2009).

Segundo Slader et al. (2002) e Hansson et al. (2005), a etapa de transporte para o matadouro-frigorífico aumenta o estresse das aves, tornando-as mais susceptíveis às infecções, além da alteração da consistência das fezes, que ficam mais líquidas, facilitando a contaminação externa de outras aves, caminhão e caixas de transporte.

O empilhamento das caixas de transporte no caminhão durante a etapa de carregamento, transporte, bem como o período de descarregamento, resulta em contaminação cruzada pelas fezes para gaiolas adjacentes (TAKAHASHI et al., 2006). A contaminação externa de pés, penas e pele dos frangos com fezes recém-excretadas durante o período de transporte, provavelmente, seja uma das principais causas de carcaças de frango apresentar *Campylobacter* spp. Ainda, equipamentos e utensílios do frigorífico tornarem-se contaminados e lotes que eram negativos tornem-se positivos pela contaminação cruzada (HANSSON et al., 2005).

Segundo o estudo de Mead et al. (1995), veículos e caixas de transporte podem ser uma fonte adicional de contaminação entre lotes de frangos e entre granjas. Além disso, a eficiência da lavagem e desinfecção realizadas rotineiramente em matadouros-frigorífico é questionável (SLADER et al., 2002; BERRANG et al., 2005a; BERRANG 2011).

A prática da retirada parcial das aves de um galpão ou *thinning* (remoção

precoce de uma parte das aves de um lote de frangos de corte comercial) é comumente praticada em alguns países como Estados Unidos e União Européia e está sendo considerada um fator de risco para a colonização de *Campylobacter*, devido à dificuldade em manter a biossegurança durante o processo (HAVELAAR et al., 2006). Em estudo, 27/51 lotes analisados tornaram-se positivos para o agente entre dois a seis dias após a despopulação. Além disso, em avaliação das amostras por PFGE comprovou que a contaminação ocorreu de uma granja para as demais, sendo uma das principais fontes, as caixas de transporte (ALLEN et al., 2008).

Quando frangos previamente negativos foram colocados em caixas de transporte contaminadas por *Campylobacter* após duas, quatro e seis horas de exposição, mais de 50% das carcaças avaliadas após a etapa de depenagem, estavam positivas para o agente. Estes dados demonstram que o transporte de um lote negativo pode resultar em carcaças contaminadas e, conseqüentemente, oferecer risco ao consumidor (BERRANG et al., 2003). Newell et al. (2001) e Takahashi et al (2006), confirmaram através da técnica de RFLP que lotes negativos, apresentaram carcaças contaminadas com o mesmo subtipo presente nas caixas de transporte contaminadas onde foram transportados.

Através da técnica molecular de PFGE, também foi possível identificar que o perfil genético das espécies de *Campylobacter* spp. de amostras isoladas da superfície das penas e carcaças eram as mesmas daquelas encontradas em amostras oriundas das caixas de transporte, suportando a hipótese de contaminação a partir das caixas para frangos negativos (SLADER et al., 2002; HANSSON et al. 2005).

2.9 Ocorrência de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango

A média de contaminação em carcaças por *Campylobacter* spp. em frigoríficos pode variar de 15% a 78,5%, sendo mais elevada, geralmente, na etapa de pré-escaldagem e pré-chiller (ARSENAULT et al., 2007; SON et al., 2007). No estudo conduzido por Son et al. (2007) foi encontrada a presença de *Campylobacter* spp. em 92% das carcaças avaliadas na pré-escaldagem e em 100% das carcaças avaliadas na etapa de pré-chiller. Esta alta prevalência pode ser explicada pela ruptura de alças intestinais na etapa de evisceração e pela contaminação cruzada entre as etapas do processamento da carne.

No ano de 2008, uma pesquisa com a participação de instituições de 26 países da União Europeia buscou isolar *Campylobacter* spp. de amostras oriundas de lotes e de carcaças de frango. Foi analisado um total de 10.132 lotes amostrados a partir de 561 matadouros-frigoríficos. Houve uma prevalência de *Campylobacter* spp. de 71,2% em lotes e de 75,8% em carcaças de frangos. Sendo destas, dois terços identificadas como *C. jejuni* e o restante como *C. coli* (EFSA, 2010).

Neste mesmo estudo destacou-se que um lote já contaminado por *Campylobacter* spp. tem a probabilidade de resultar em carcaças contaminadas cerca de trinta vezes mais do que em lotes negativos. Estes resultados indicam um efeito importante da colonização de *Campylobacter* em lotes de frangos, tanto para a sua frequência de ocorrência, bem como para os níveis de contaminação em carcaças (EFSA, 2010).

Em carcaças de frango de varejo, a incidência do agente pode variar entre 10% a 100%. (HARRISON et al., 2001). Na Itália, um estudo encontrou *Campylobacter* spp. em 81,3% das 155 carcaças avaliadas (PEZOTTI et al., 2003), e no Japão, foi observada positividade em 64,7% das 170 carcaças amostradas (SALLAM, 2007).

No Brasil, Kuana et al. (2008b) avaliaram a contaminação de carcaças no estado do Rio Grande do Sul, encontrando uma contaminação de 99% em 96 carcaças avaliadas. No Estado de Santa Catarina, Franchin et al. (2007), observaram uma contaminação de 68% de 72 carcaças pós-depenagem. Em São Paulo, foram detectadas 6,75% em 74 carcaças de frangos contaminadas (SCARCELLI et al., 2005).

É importante destacar que a contaminação de carcaças depende de muitas variáveis, como idade das aves, nível de contaminação dos lotes, fatores relacionados a produção, transporte e processamento dentro do frigorífico. Determinar o nível de contaminação em produtos avícolas é fundamental para garantir um produto seguro para o consumidor, além de ter implicações na saúde pública, sendo assim, essencial a rastreabilidade desses animais, tanto vivos, nas carcaças de frango e em seus produtos (KUANA et al., 2008b).