

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

Ocorrência de *Campylobacter* em carne de frango, fezes de frango e humanas e pesquisa dos genes *cdt*

Daiani Teixeira da Silva

Pelotas, 2012

DAIANI TEIXEIRA DA SILVA

Ocorrência de *Campylobacter* em carne de frango, fezes de frango e humanas e pesquisa dos genes *cdt*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Veterinária Preventiva).

Orientador: Cláudio Dias Timm

Pelotas, 2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S586o Silva, Daiani Teixeira da
Ocorrência de *campylobacter* em carne de frango, fezes de frango e humanas e pesquisa dos genes *cdt* / Daiani Teixeira da Silva; orientador Cláudio Dias Timm. - Pelotas, 2012.
26 f.; il.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2012.

1. Veterinária. 2. *Campylobacter*. 3. Genes *cdt*. 4. Fezes de frango.
5. Fezes humanas. 6. Produtos de frango. I. Timm, Cláudio Dias, orient.
II. Título.

CDD: 636.5

Banca examinadora:

Prof. Dr. Cláudio Dias Timm, Orientador (Faculdade de Veterinária, UFPel)

Prof^a. Dr^a. Eduarda Hallal Duval (Faculdade de Veterinária, UFPel)

Prof^a. Dr^a. Gladis Aver Ribeiro (Instituto de Biologia, UFPel)

Prof. Dr. Gilberto D'Avila Vargas (Faculdade de Veterinária, UFPel)

Agradecimentos

Agradeço a todos os professores, pós-graduandos e estagiários do laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal por toda ajuda e dedicação para a realização deste trabalho. Em especial, a meu orientador, pela orientação e confiança no desenvolvimento do trabalho.

Agradeço pessoal dos laboratórios clínicos de Pelotas e São Lourenço, como também do abatedouro de Morro Redondo, por terem gentilmente nos cedido amostras para trabalhar.

Também ao pessoal do Centro de Biotecnologia e Instituto de Biologia da UFPel, por cederem espaço de trabalho e estarem dispostos a ajudar.

Agradeço ao pessoal do setor de *Campylobacter* do Instituto Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro, por terem me recebido e compartilhado seus conhecimentos para que eu pudesse trabalhar com este micro-organismo.

Agradeço ao meu grande amor, por ter me incentivado a fazer o curso de mestrado e por todo apoio, estímulo, dedicação e compreensão durante este tempo.

Aos meus pais e irmãos, por todo apoio, carinho e suporte para que eu pudesse atingir meus objetivos. E toda a família que sempre me incentivou em qualquer circunstância.

Ao meu pequeno cão, que tornou meus dias sempre mais alegres.

Agradeço a todos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo

SILVA, Daiani Teixeira. **Ocorrência de *Campylobacter* em carne de frango, fezes de frango e humanas e pesquisa dos genes *cdt***. 2012. 25f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Campylobacter é uma bactéria relacionada a doenças transmitidas por alimentos. É uma das causas mais comuns de diarreia em humanos em todo o mundo. Raramente, pode causar a Síndrome de Guillain-Barré, que ataca as células do sistema nervoso periférico, causando paralisia muscular. Algumas cepas desta bactéria podem produzir uma toxina citolética distensiva (CDT) capaz de agravar os quadros diarreicos. As aves são o principal reservatório do micro-organismo, do qual são portadoras assintomáticas. Durante o abate de frangos de corte pode ocorrer a contaminação da carne e seus produtos, que são os principais responsáveis pelas infecções em humanos. O objetivo do trabalho foi verificar a presença de *C. jejuni* e *C. coli* em carne de frango, fezes de frango e humanas e pesquisar a presença dos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* nos isolados. Foram coletadas 100 amostras de conteúdo fecal de aves de corte, 100 de produtos de frango no comércio varejista e 100 de fezes de humanos. Os produtos de frango foram lavados com Caldo Brucella e semeados em placas de Agar Columbia. As amostras de fezes foram diretamente semeadas nas placas com este meio. A confirmação dos isolados e a identificação das espécies foram realizadas através da técnica de PCR. Também foi utilizada a PCR para pesquisar a presença dos genes *cdt*. Obteve-se 61% de amostras de fezes de frango positivas para *Campylobacter*, 20% de produtos de frango e 3% de fezes de humanos. A espécie *C.jejuni* foi predominante e 93,5% dos isolados desta espécie apresentaram os genes para a toxina CDT. Apesar da prevalência de *Campylobacter* observada em fezes de humanos ter sido baixa, a ocorrência em fezes de frangos de corte e produtos de frango comercializados na região Sul do Rio Grande do Sul foi elevada e a maioria dos isolados apresentou potencial para a produção da toxina CDT. Esses resultados são indicativos da necessidade de medidas preventivas no sistema de produção e de boas práticas de fabricação na indústria, de forma a minimizar a contaminação dos produtos e diminuir o risco para os consumidores.

Palavras-chave: *Campylobacter*, genes *cdt*, fezes de frango, fezes de humanos, produtos de frango.

Abstract

SILVA, Daiani Teixeira. **Occurrence of *Campylobacter* in poultry, chicken and human feces, and *cdt* genes research.** 2012. 25f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Campylobacter is a bacteria related to foodborne illnesses. It is one of the most common causes of diarrhea in humans in the world. It might cause Guillain-Barre syndrome, which attacks the cells of the peripheral nervous system causing muscle paralysis. Some strains of this bacterium can produce a cytolethal distending toxin (CDT), which can exacerbate diarrheal diseases. Birds are the main reservoir of this micro-organism, of which they are asymptomatic hosts. During the slaughter of broilers, contamination of meat and its products may occur. They are the main responsible for infections in humans. The objective of this study was to verify the presence of *C. jejuni* and *C. coli* in poultry meat, chicken and human feces and investigate the presence of *cdtA*, *cdtB* and *cdtC* genes in the isolates. A hundred chicken fecal samples, a hundred samples of retail poultry products and a hundred samples of human feces were collected. The poultry products were washed with Brucella broth and spread onto plates of Columbia agar. The feces samples were directly spread onto plates containing this medium. Confirmation of isolates and species identification were performed by PCR. PCR was also used to investigate the presence of *cdt* genes. *Campylobacter* was found in 61% of the chicken fecal samples, in 20% of the poultry products and in 3% of the human feces. *C. jejuni* was the predominant species and 93,5% of them exhibited the *cdt* genes. Despite the fact that the prevalence of *Campylobacter* found in human feces was low, the occurrence of *Campylobacter* in broilers and poultry products sold in southern Rio Grande do Sul was high. Besides, it has been observed that most of the isolates were highly likely to produce CDT. These results suggest there is a need for preventive measures in the production system and good manufacturing practices in the industry so as to minimize contamination of products and reduce the risk to consumers.

Key-words: *Campylobacter*, *cdt* genes, chicken fezes, human fezes, poultry meat.

Lista de Tabelas

Tabela 1	<i>Primers</i> usados na diferenciação de <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>	17
Tabela 2	<i>Primers</i> usados na pesquisa dos genes <i>cdtA</i> , <i>cdtB</i> e <i>cdtC</i>	17
Tabela 3	Amostras positivas para <i>Campylobacter</i> em carne de frango e presença dos genes <i>cdt</i> nas espécies isoladas.....	19

Lista de Abreviaturas

ATCC	American Type Culture Collection
°C	Graus Celsius
<i>C. coli</i>	<i>Campylobacter coli</i>
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CDT	Toxina Citoletal Distensiva
CO₂	Dióxido de Carbono
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DTA	Doença Transmitida por Alimento
FBP	Ferro, Bissulfito e Piruvato (Suplemento antioxidante)
FDA	Food and Drug Administration
G	Gramma
HeLa	Células tumorais Herietta Lacks
IU	Unidade Internacional
L	Litro
min	Minuto
mL	Mililitro
m/v	Massa/Volume
N₂	Nitrogênio
NaCl	Cloreto de Sódio
nm	Nanomol
NINDS	National Institute of Neurological Disorders and Stroke
O₂	Oxigênio
pb	Pares de base
PCR	Polimerase Chain Reaction
pH	Potencial Hidrogeniônico
µL	Microlitro
µm	Micrometro
pmol	Picomol

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
INTRODUÇÃO GERAL	10
OCORRÊNCIA DE <i>CAMPYLOBACTER</i> EM CARNE DE FRANGO, FEZES DE FRANGO E HUMANAS E PESQUISA DOS GENES <i>CDT</i>	12
RESUMO	12
ABSTRACT	13
INTRODUÇÃO.....	13
MATERIAL E MÉTODOS.....	15
RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
CONCLUSÕES	21
AGRADECIMENTOS	21
REFERÊNCIAS	22
CONCLUSÕES	25
REFERÊNCIAS.....	26

INTRODUÇÃO GERAL

Campylobacter é uma bactéria Gram negativa, delgada, móvel, de formato espiral, que requer baixos níveis de oxigênio para se desenvolver. É relativamente frágil, sensível a alterações ambientais e apresenta dificuldade de ser cultivada em laboratório (FDA, 2012).

Esta bactéria é conhecida por ser um importante patógeno entérico. A grande maioria dos casos de campylobacteriose ocorre como eventos isolados, esporádicos, não fazendo parte de surtos. *Campylobacter* é um dos principais agentes de doenças transmitidas por alimentos (DTA) em humanos (CDC, 2010). Um em cada mil casos de infecção entérica pode levar à síndrome Guillain-Barré, uma doença autoimune que ataca o sistema nervoso periférico causando paralisia flácida (NACHAMKIN et al., 1998; NINDS, 2011). Outra complicação rara, decorrente da campylobacteriose é a Síndrome Hemolítica Urêmica, que pode causar uma morte a cada mil casos da doença e atinge principalmente indivíduos com a saúde debilitada (FDA, 2012).

Campylobacter é a principal causa de enterite bacteriana nos Estados Unidos, onde é responsável por 5 % dos casos de pacientes com diarreia, provocando cerca de 99 mortes por ano (OBERHELMAN; TAYLOR, 2000). O número de pesquisas em países em desenvolvimento é muito menor do que em países desenvolvidos, por isso não existem muitos dados de incidência da doença em países não desenvolvidos. *Campylobacter* também é isolado conjuntamente com outras bactérias entéricas, reduzindo ainda mais o número dos casos reportados (COKER et al., 2002). Um estudo no Brasil demonstrou que crianças sem sintomatologia podem estar contaminadas por *Campylobacter* (QUERTZ et al., 2010). A exposição desde cedo à bactéria faz com que o organismo produza anticorpos específicos contra *Campylobacter* (TAYLOR et al., 1993), tornando rara a ocorrência de sinais clínicos em indivíduos adultos. Em países desenvolvidos, a infecção por *Campylobacter* afeta todas as faixas etárias, com maior ocorrência em crianças com menos de 4 anos (PADUNGTON; KANEENE, 2003).

A carne de frango é a principal fonte de infecção para os humanos. As aves são os reservatórios naturais desta bactéria, entretanto não apresentam sinais clínicos. Desta forma, não acarretam prejuízos econômicos para os sistemas de produção avícolas, que, por sua vez, não se preocupam em adotar medidas de controle da infecção (GERMANO; GERMANO, 2003). A contaminação do alimento geralmente ocorre durante o abate e o processamento industrial (ROSENQUIST et al., 2006).

Mais de 80% das campylobacterioses alimentares são causadas por *Campylobacter jejuni* (FDA, 2012). A maioria das cepas de *C. jejuni* são capazes de produzir a toxina letal distensiva (CDT) (MARTINEZ et al., 2006), a qual é um fator de virulência que está associado às infecções. As cepas produtoras desta toxina são mais invasivas e citotóxicas, sendo capazes de causar mais danos às células intestinais do que as cepas não produtoras, além de induzirem intensa resposta inflamatória (JAIN et al., 2008).

Estudos da ocorrência de *Campylobacter* em diferentes pontos da cadeia da enfermidade, como fezes de frango, produtos de frango e fezes de humanos, determinando sua relativa virulência, constitui importante avanço no entendimento da epidemiologia da campylobacteriose alimentar.

Este estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência de *Campylobacter* em frangos de corte e em produtos de frango oferecidos ao consumidor, avaliando assim o potencial risco de infecção por *Campylobacter* na região sul do Rio Grande do Sul. Além disso, foi pesquisada a presença, nos isolados, dos genes de virulência *cdt*, responsáveis pelo aumento da patogenicidade da doença. Outro foco do estudo foi avaliar a ocorrência de humanos de diversas faixas etárias contaminados com esta bactéria, assim como a presença dos genes de patogenicidade *cdt* nesses isolados.

Ocorrência de *Campylobacter* em carne de frango, fezes de frango e humanas e pesquisa dos genes *cdt* *

Occurrence of *Campylobacter* in poultry, chicken and human feces, and *cdt* genes research

D.T. Silva¹, T.S. Tejada¹, C.C. Cunha¹, N.A. Lopes¹, A. Agostinetto¹, T. Collares², P.M.M. Leon², C.D. Timm^{1*}

1 Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal – UFPel

2 Centro de Desenvolvimento Tecnológico – UFPel

* Autor para correspondência, E-mail: timm@ufpel.tche.br

RESUMO

Foram coletadas 100 amostras de conteúdo fecal de aves de corte, 100 de produtos de frango e 100 de fezes de humanos e analisadas para pesquisa de *Campylobacter*. Foi realizada a determinação da espécie e da presença dos genes *cdt*, responsáveis pela codificação da toxina citoletal distensiva (CDT), através da técnica da PCR. A bactéria foi isolada de 61% das amostras de fezes de frango, 20% de produtos de frango e 3% de fezes de humanos. A maioria dos isolados foi determinada como *C. jejuni*. Destes, 93,5% apresentaram os genes para a toxina CDT. Apesar da ocorrência de *Campylobacter* em fezes de humanos ter sido baixa, a prevalência em frangos de corte e produtos de frango foi elevada, fato que, aliado à presença dos genes *cdt* na maioria dos isolados, representa risco potencial para os consumidores. Esses resultados são indicativos da necessidade de medidas preventivas no sistema de produção e de boas práticas de fabricação na indústria, de forma a minimizar a contaminação dos produtos e diminuir o risco para os consumidores.

Palavras-chave: *Campylobacter*, genes *cdt*, fezes de frango, fezes de humanos, produtos de frango.

* Artigo a ser enviado para a o Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

ABSTRACT

A hundred chicken fecal samples, a hundred samples of retail poultry products and a hundred samples of human feces were collected and tested for the presence of *Campylobacter*. The species identification and the analysis for the presence of *cdt* genes, responsible for encoding the cytolethal distending toxin, were performed by PCR. *Campylobacter* was found in 61% of the chicken fecal samples, in 20% of the poultry products and in 3% of the human feces. Most isolates were identified as *C. jejuni*. In 93.5% of these isolates, the *cdt* genes have been detected. Despite the occurrence of *Campylobacter* in feces of humans has been low, the prevalence in broilers and poultry products was high, which, combined with the presence of *cdt* genes in most isolates, represents a potential risk to consumers. These results suggest there is a need for preventive measures in the production system and good manufacturing practices in the industry so as to minimize contamination of products and reduce the risk to consumers.

Key words: *Campylobacter*, *cdt* genes, chicken feces, human feces, poultry products.

INTRODUÇÃO

A campylobacteriose é uma doença transmitida por alimentos (DTA) para humanos, a qual afeta mais de 2 milhões de pessoas por ano. A maioria dos casos ocorre isoladamente, apresentando quadros que cursam com diarreia, cólicas abdominais e febre. A enfermidade pode ainda levar à Síndrome de Guillain-Barré, uma complicação rara que ocorre em um a cada mil casos da doença, na qual o sistema imune ataca parte do sistema nervoso periférico, causando paralisia muscular. A bactéria *Campylobacter*, agente etiológico da enfermidade, é encontrada nos alimentos geralmente em baixa concentração, o que, aliado à sensibilidade ao oxigênio, dessecação, calor, desinfetantes e pH ácido, dificulta o seu isolamento. A principal espécie envolvida nos casos de campylobacteriose é *C. jejuni* (FDA, 2012).

Os frangos podem ser portadores de *Campylobacter* em seus tratos intestinais, sendo os seus produtos o principal alimento veiculador desta bactéria para humanos. Este micro-organismo é essencialmente não patogênico para as aves, não representando um problema para os sistemas de produção avícola, o que faz com que seu controle seja negligenciado nos aviários (Germano e Germano, 2003). No Brasil, as porcentagens de contaminação em fezes de frango podem chegar a 96,6% (Chaves et al., 2010).

Normalmente, o isolamento de *Campylobacter* a partir de produtos de frango é menor que o isolamento em fezes. Higiene e medidas de controle dentro da indústria são práticas que reduzem a contaminação inicial da carcaça, mas são insuficientes para eliminar a bactéria do produto final (Kuana et al., 2008). *Campylobacter* pode ser encontrado em diversos pontos dentro da linha de abate de frangos, com isso, lotes livres de contaminação inicial podem se contaminar durante o processamento, mesmo que tenham sido abatidos em dias subsequentes (Perko-Mäkelä et al., 2011). Pesquisas mostram prevalências de 32,6 a 93,7% em produtos de frango vendidos no mercado (Carvalho e Cortez, 2003; Freitas e Noronha, 2007).

A ocorrência de *Campylobacter* em humanos, no Brasil, ainda está pobremente estabelecida. Dois estudos, desenvolvidos por Lima et al. (1993) e Scarcelli et al. (1998), encontraram 12% de portadores em Recife e 25,9% em São Paulo, respectivamente.

Um dos fatores de patogenicidade da bactéria, responsável pelos sinais clínicos em humanos, é a toxina citoletal distensiva (CDT). Essa toxina é composta pelas subunidades proteicas *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*, codificadas pelos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*, respectivamente. É necessária a expressão dos três genes para que a proteína esteja na sua forma ativa e possa penetrar nas células. A subunidade *cdtB* é o componente tóxico, que atua como uma DNase. CdtB chega até o núcleo da célula intestinal e leva à quebra da fita dupla de DNA, provocando a morte celular. As funções das porções *cdtA* e *cdtC* ainda não são claras, mas parece serem responsáveis pela ligação a receptores celulares e endocitose. Mutações nos genes *cdt* podem causar perda de função, impedindo, desta forma, que ocorram os danos celulares (Young et al., 2007).

Os trabalhos realizados no Brasil, com vistas ao isolamento de *Campylobacter* a partir de fezes de frangos, alimentos e de humanos, são poucos e apresentam resultados variáveis. Adicionalmente, não foram feitos estudos de virulência, não havendo garantias de que os isolados obtidos tenham potencial patogênico para humanos e possam causar DTA. A pesquisa de *Campylobacter* em diferentes pontos da cadeia epidemiológica, identificando características dos isolados importantes para a patogenicidade da doença, constituem significativo avanço no conhecimento da campylobacteriose alimentar.

Este trabalho teve como objetivo verificar a presença de *C. jejuni* e *C. coli* em carne de frango, fezes de frango e humanas e pesquisar a presença dos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* nos isolados.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas 100 amostras de fezes da porção final do intestino de frangos de corte, com idade entre 40 a 45 dias, oriundos de 20 aviários (cinco amostras de cada), 100 produtos de frango *in natura* (20 de coxa/sobrecoxa, 20 de asa, 20 de dorso, 20 de carne moída e 20 de fígado) coletados no comércio varejista do Sul do Brasil e 100 amostras de fezes de humanos. Todas as amostras foram coletadas na região sul do estado do Rio Grande do Sul.

As amostras de fezes de frango e humanas foram coletadas com o uso de zaragatoas estéreis e encaminhadas ao laboratório em meio de transporte Cary Blair (Himedia, Mumbai, Índia) em caixas isotérmicas com gelo. As fezes de frango foram obtidas da porção final do intestino das aves imediatamente após o abate. As fezes de humanos foram coletadas de material enviado a laboratórios de análises clínicas para análise parasitológica. Os produtos de frango foram encaminhados ao laboratório em caixas isotérmicas com gelo, acondicionados nas embalagens de venda.

Para o isolamento, cada produto de frango foi colocado em sacos plásticos estéreis contendo 50 mL de Caldo Brucella (Acumedia, Lansing, Michigan, USA) e massageado durante 2 min. Uma alíquota deste caldo foi semeada na superfície de Columbia Blood Agar Base (Acumedia) adicionado de 0,4% (m/v) de carvão ativado, 5% (m/v) de suplemento de solução redutora de oxigênio FBP (George et al., 1978) e 1% (m/v) de suplemento Campylobacter I (Blaser – Wang) (Himedia), que contém antibióticos para controlar o crescimento da microbiota acompanhante. As zaragatoas com as amostras de fezes foram diretamente semeados em superfície de ágar Columbia com as adições mencionadas.

As incubações foram realizadas em microaerofilia a 42°C por 48 horas. A atmosfera de microaerofilia foi gerada através de uma modificação sugerida por Filgueiras e Hofer (1989) da técnica de passivação do cobre descrita por Attebery e Finegold (1970). Adaptada proporcionalmente a uma jarra de 2,5 L, esta técnica consiste em triturar 2,8 g de Sonrisal (Sanofi-Winthrop Farmacêutica), colocar em uma base de placa de Petri e, sobre este, colocar 7,1 g de palha de aço (Bombril®) embebida em solução acidulada de sulfato de cobre. Com este preparo, obtêm-se uma concentração final de 85% N₂, 10% CO₂ e 5% O₂.

As colônias com brilho d'água e espriadas foram analisadas morfo-tintorialmente pela coloração de Gram. Naquelas em que foram observados bastonetes delgados, em forma de S ou de “asa de gaivota”, foram realizados testes das enzimas catalase e oxidase. As colônias com características de *Campylobacter* foram repicadas para nova cultura em ágar

Columbia. Quando não foram obtidas culturas puras, as colônias foram raspadas da superfície do ágar e, após suspensão em solução salina a 0,85%, foram filtradas em filtro de 0,45 µm (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Germany) para separação dos contaminantes e foram novamente cultivadas.

As culturas puras suspeitas de *Campylobacter* foram criopreservadas em meio estoque (glicerol 25 mL, neopeptona 1 g, NaCl 0,5 g, água destilada 75 mL). Os isolados foram recuperados em ágar Columbia a 42°C por 48 horas, em microaerofilia, quando necessário.

A confirmação dos isolados suspeitos foi realizada através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). O DNA foi extraído com *kit* comercial Ilustra Bacteria GenomicPREP Mini Spin Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), de acordo com as recomendações do fabricante, a partir de um *pellet* de colônias obtido diretamente das placas. O DNA foi analisado através da técnica de multiplex PCR para identificação das espécies *C. jejuni* e *C. coli*, de acordo com protocolo descrito por Harmon et al. (1997). Foram utilizados dois pares de *primers* (Tab. 1): par pg 3/pg 50, que amplificam uma região altamente conservada relacionada aos genes da flagelina, tanto em *C. jejuni* como em *C. coli*, e o par C-1/C-4, que amplificam uma região específica somente presente em *C. jejuni*. Cada reação teve um volume final de 25 µL. Foram utilizados 12 µL de Master Mix (Promega, Madison, Wisconsin, USA), 2 µL (20 pmol) de cada *primer*, 1 µL de DNA (na concentração de 5nmol/µL) e 4 µL de água para completar o volume da reação. A amplificação foi realizada em termociclador TC-3000 (Techne) com o seguinte programa: desnaturação inicial de 94°C por 4 min, seguido de 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento dos *primers* a 45°C por 1 min, extensão a 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 7 min. Como controle positivo, foi utilizada a cepa de *C. jejuni* ATCC 33291 e a cepa *C. coli* CCAMP1003, gentilmente cedida pelo setor de *Campylobacter* do Instituto Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro. Para análise das amplificações, foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Para visualização das bandas foi utilizado GelRed (Uniscience, São Paulo, São Paulo, Brasil), um corante de ácido nucleicos que emite fluorescência na presença de luz ultravioleta.

Tabela 1. *Primers* usados na diferenciação de *C. jejuni* e *C. coli*.

<i>Primer</i>	Seqüência (5' a 3')	Espécie	Tamanho da amplificação na PCR (pb)
Pg 3	GAACCTGAACCGATTTG	<i>C. coli</i>	460
Pg 50	ATGGGATTTTCGTATTAAC	<i>C. jejuni</i>	480
C-1	CAAATAAAGTTAGAGGTAGAATGT	<i>C. jejuni</i>	160
C-4	GGATAAGCACTAGCTAGCTGAT		

Após a identificação da espécie, foi feita a pesquisa de genes de virulência também através da técnica de multiplex PCR, de acordo com Martinez et al. (2006), utilizando *primers* específicos para os genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* (Tab. 2). Para um volume final de 25 µL, foram utilizados 12 µL de Master Mix, 2 µL (20 pmol) de cada *primer* e 1 µL (5 nmol/µL) de DNA. A amplificação foi realizada com uma desnaturação inicial de 94°C por 5 min, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 57°C por 1 min, extensão a 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 5 min. Para análise do produto amplificado, foi utilizada mesma técnica já descrita anteriormente.

Tabela 2. *Primers* usados na pesquisa dos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*.

<i>Primer</i>	Seqüência (5' a 3')	Tamanho da amplificação na PCR (pb)
<i>cdtA</i> -F	CTATTACTCCTATTACCCCACC	422
<i>cdtA</i> -R	AATTTGAACCGCTGTATTGCTC	
<i>cdtB</i> -F	AGGAACTTTACCAAGAACAGCC	531
<i>cdtB</i> -R	GGTGGAGTATAGGTTTGTGTC	
<i>cdtC</i> -F	ACTCCTACTGGAGATTTGAAAG	339
<i>cdtC</i> -R	CACAGCTGAAGTTGTTGTTGGC	

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 100 amostras de fezes de frango analisadas, foram isolados *Campylobacter spp.* de 61 (61%) amostras de 17 dos 20 aviários estudados. Seis aviários apresentaram todas as

amostras positivas para *Campylobacter*. Dos outros onze aviários em que a bactéria foi isolada, foram observados quatro com quatro amostras positivas, três com três, três com duas e dois com uma. Os resultados observados estão de acordo com as prevalências encontradas em outros trabalhos, como 75,8% no Reino Unido (Powell et al., 2012) e 76% no Irã (Ansari-Lari et al., 2011). Prevalências maiores têm sido citadas em estudos realizados no Brasil. Chaves et al. (2010), no Pará, isolaram *Campylobacter* de 96,6% de amostras de cloaca de frangos. No Rio Grande do Sul, Kuana et al. (2008) encontraram 81% de contaminação em frangos de uma granja. Estes valores elevados se devem ao fato da bactéria ter a capacidade de se disseminar rapidamente dentro dos aviários (Evans e Sayers, 2000).

Dos 41 isolados de fezes de frango estudados (20 isolados foram identificados, mas devido à dificuldade de cultivo da bactéria não foi possível obter material para análise molecular), 35 (85,4%) foram identificados como *C. jejuni* e seis (14,6%) como *C. coli*. Considerando os aviários positivos para *Campylobacter*, 12 apresentaram apenas *C. jejuni* (70,6%), um somente *C. coli* (5,9%) e outro apresentou as duas espécies (5,9%). Três aviários não puderam ter as espécies identificadas devido à dificuldade de cultivo do micro-organismo. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Heuer et al. (2001) que analisaram as espécies de *Campylobacter* distribuídas em lotes de frangos de corte portadores da bactéria. Estes autores encontraram 87,5% dos lotes com *C. jejuni*, 10% com *C. coli* e somente 2,5% com infecção mista. A observação das duas espécies concomitantemente em aves do mesmo aviário parece não ser uma ocorrência comum.

Campylobacter é frequentemente encontrado em produtos cárneos de frango, sendo a contaminação dos alimentos a principal causa da campylobacteriose em humanos. Frangos portadores de *Campylobacter* são responsáveis pela contaminação de carcaças durante o processamento, especialmente durante a etapa de evisceração e através da contaminação cruzada (Powell et al., 2012). Das 100 amostras de produtos de frango analisadas, *Campylobacter* foi isolado de 20 (20%) amostras, sendo 11 *C. jejuni* e quatro *C. coli* (Tab. 3). Cinco isolados não puderam ser identificados. Vários estudos reportam prevalências elevadas de *Campylobacter* em carnes de frango, como 81% na Itália (Pezzotti et al., 2003) e 83% no Reino Unido (Kramer et al., 2000). No Brasil, no estado do Pará, Freitas e Noronha (2007) isolaram *Campylobacter* spp. de 93,7% das amostras de carne e miúdos de frango analisadas. Os valores encontrados em nosso estudo são mais baixos do que estes percentuais, o que pode estar relacionado à adoção de boas práticas de fabricação na indústria, uma vez que a ocorrência observada em frangos foi relativamente alta. Os produtos de frango que apresentaram maior contaminação foram os fígados. Esta contaminação pode ser decorrente

de falhas no processo de evisceração das carcaças, etapa do processamento com alto risco de contaminação, considerando a proximidade do órgão com o trato gastrointestinal.

Tabela 3. Amostras positivas para *Campylobacter* em carne de frango e presença dos genes *cdt* nas espécies isoladas.

Produtos de frango	N° de amostras	Isolamento de		Espécie / gene		
		<i>Campylobacter</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>cdt</i>	<i>C. coli</i>	<i>cdt</i>
Fígado	20	11	6	5	2	0
Dorso	20	5	2	2	1	0
Asa	20	3	2	2	1	0
Coxa/Sobrecoxa	20	1	1	1	0	0
Carne moída	20	0	0	0	0	0
Total	100	20	11	10	6	0

C. jejuni foi a espécie mais encontrada em todos os tipos de amostras analisadas. Esta é a espécie predominante em fezes de frangos de corte (Hald et al., 2000). *C. jejuni* é também a espécie mais frequente em produtos de frango e o principal causador das enterites humanas (Kramer et al., 2000; Pezzotti et al., 2003).

Das 100 amostras de fezes humanas analisadas, 40 amostras eram de pessoas com idade até cinco anos, 36 de pessoas entre cinco e 20 anos, 11 entre 20 e 60, e 13 com mais de 60 anos. Foram encontrados 3% de amostras positivas para *Campylobacter*, mas somente um isolado pode ser estudado, o qual foi identificado como *C. jejuni*. As idades das pessoas portadoras de *Campylobacter* foram 1, 4 e 31 anos, sendo o isolado estudado de uma mulher de 31 anos. A maior incidência de campylobacteriose ocorre em crianças abaixo de 2 anos de idade (Jofre e Espinoza, 2008). Quertz et al. (2010) realizaram um estudo com crianças de 2 a 36 meses e isolaram *Campylobacter* de 10,6% das crianças que apresentaram diarreia e de 8,4% das crianças sem sintomatologia. Segundo Lima et al. (1993), a enfermidade acomete 12% das crianças menores de 5 anos, cursando com quadros diarreicos. Em nosso estudo, duas das três pessoas que albergavam *Campylobacter* tinham idade inferior a 5 anos, entretanto a ocorrência de *C. jejuni* em um adulto é indicativo da importância que indivíduos dessa faixa etária podem ter na epidemiologia da campylobacteriose. Devido à forma de obtenção das amostras no nosso estudo, não foi possível avaliar o quadro clínico das pessoas cujas amostras foram analisadas, mas é possível presumir que as pessoas que encaminharam

fezes para exame laboratorial parasitológico apresentassem algum tipo de desconforto ou patologia intestinal.

Uma pesquisa no estado de Santa Catarina mostrou que 6,2% da população de adultos pode ser portadora assintomática de *Campylobacter* (Tosin e Machado, 1995). A ocorrência encontrada em humanos no Brasil pode ser considerada baixa quando comparada a estudos desenvolvidos em outros países. O trabalho de Hänninen et al. (2000), desenvolvido na Finlândia durante três anos consecutivos, de 1996 a 1998, encontrou uma variação na incidência de casos de campylobacteriose em humanos de 89, 36 e 69% para cada ano, respectivamente. Nos Estados Unidos, no mesmo período, a incidência foi mais baixa, com valores de 23,6; 25,2 e 21,4%, respectivamente em cada ano (Samuel et al., 2004). Uma possível explicação para a baixa ocorrência no Brasil é que as cepas prevalentes em humanos sejam sensíveis aos antibióticos utilizados nos meios de cultivo seletivo. Outra explicação é que a exposição à bactéria desde criança pode fazer com que o organismo produza anticorpos específicos contra *Campylobacter*, diminuindo assim a infecção em indivíduos adultos.

Todos os isolados estudados que apresentaram genes *cdt*, possuíam os três genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*. Trinta e três (91,7%) dos 35 *C. jejuni* isolados de fezes de frangos continham os genes *cdt*. Dez dos 11 *C. jejuni* isolados de produtos de frango, assim como o *C. jejuni* isolado de humano, também apresentaram os genes para a produção da toxina CDT. Estudos com amostras clínicas de *C. jejuni* têm demonstrado que a maioria dos isolados são produtores de CDT (Martínez et al., 2006; Van Deun et al., 2007). A patogenia da campylobacteriose em humanos ainda não é bem conhecida, mas há uma correlação entre a produção de CDT e casos da doença em humanos, sendo esta toxina um dos fatores de virulência associado às infecções (Van Deun et al., 2007). Jain et al. (2008) demonstraram que as cepas de *Campylobacter* produtoras de CDT apresentam alto poder de aderência, capacidade invasiva e citotoxicidade frente a células HeLa. Estes autores também estudaram a atividade de cepas de *Campylobacter* CDT positivas e CDT negativas através da inoculação em camundongos. Os camundongos inoculados com cepas CDT positivas provocaram grande destruição celular e intensa resposta inflamatória nos tecidos intestinais. Os camundongos inoculados com cepas CDT negativo, por sua vez, apresentaram apenas uma leve inflamação, sem danos significativos aos tecidos gastrointestinais. Portanto, embora a capacidade da bactéria provocar doença independa da produção da toxina, o risco para o consumidor está aumentado quando da ocorrência de cepas portadoras dos genes *cdt*, pois a intensidade da patologia da enfermidade será exacerbada.

Nenhum isolado de *C. coli* apresentou os genes *cdt*. Rozynek et al. (2005) também observaram que cepas de *C. coli* isoladas de crianças com diarreia não apresentavam genes *cdt*.

Os resultados obtidos nesse estudo são indicativos da necessidade de medidas preventivas no sistema de produção, de forma a diminuir a contaminação dos frangos para que esta possa ser eliminada durante o processamento. Na indústria, procedimentos rigorosos devem ser implementados com vistas à segurança alimentar, sendo fundamental a adoção de boas práticas de fabricação, conforme demonstrado no estudo de Kuana et al., (2008), no qual a aplicação dessas medidas resultaram na redução de produtos de frango contaminados por *Campylobacter*.

A maioria dos países desenvolvidos da Europa e América do Norte têm programas de vigilância para *Campylobacter* e outras bactérias patogênicas transmitidas por alimentos. Estabelecer programas semelhantes em países em desenvolvimento poderia colaborar para o controle da disseminação da bactéria.

CONCLUSÕES

A prevalência de *Campylobacter* em frango de corte na região sul do Rio Grande do Sul é elevada e um percentual importante dos produtos de frango oferecidos ao consumo na região estão contaminados por esse patógeno. *C. jejuni* é a espécie predominante tanto nos aviários como nos produtos de frango, sendo que a maioria das cepas apresenta potencial para produção da toxina CDT. Com isso, os alimentos a base de frango destinados à alimentação humana oferecem riscos para a saúde dos consumidores. Entretanto, a prevalência de *Campylobacter* em fezes de humanos é baixa no sul do Brasil.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do trabalho.

REFERÊNCIAS

- ANSARI-LARI, M.; HOSSEINZADEH, S.; SHEKARFOROUSH, S.S.; et al. Prevalence and risk factors associated with *campylobacter* infections in broiler flocks in Shiraz, southern Iran. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 144, p. 475-479, 2011.
- ATTEBERY, H.R.; FINEGOLD, S.M. A miniature anaerobic jar for tissue transport or for cultivation of anaerobes. *Am. J. Clin. Pathol.*, n. 53, p. 383-388, 1970.
- CARVALHO, A.C.F.B.; CORTEZ, A.L.L. Contaminação de produtos avícolas industrializados e seus derivados por *Campylobacter jejuni* e *Salmonella* sp. *ARS Vet.*, v. 19, n. 1, p. 57-62, 2003.
- CHAVES, S.O.C.; SOUZA, C.O.; FREITAS, J.A.; et al. Ocorrência de *Campylobacter* em granjas e abatedouro avícola na mesorregião metropolitana de Belém, PA, BR. *Ci. Anim. Bras.*, v. 11, n. 3, p. 554-560, 2010.
- EVANS, S.J.; SAYERS, A.R. A longitudinal study of *campylobacter* infection of broiler flocks in Great Britain. *Prev. Vet. Med.*, v. 46, n. 3, p. 209-223, 2000.
- FILGUEIRAS, A.L.L.; HOFER, E. Ocorrência de *Campylobacter* termofílico em diferentes pontos de uma estação de tratamento de esgotos na cidade do Rio de Janeiro. *Rev. Microbiol.*, n. 20, p. 303-308, 1989.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION [FDA]. Department of Health and Human Services. *Campylobacter jejuni*. In: Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook, 2012. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm070024.htm>> Acesso em 4 jun. 2012.
- FREITAS, J.A.; NORONHA, G.N. Ocorrência de *Campylobacter* spp. em carne e miúdos de frango expostos ao consumo em Belém, Pará. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 59, n. 3, p. 813-815, 2007.
- GEORGE, H.A.; HOFFMANN, P.S.; KRIEG, N.R.; SMIMBERT, R.M. Improved media for growth and aerotolerance of *Campylobacter fetus*. *J. Clin. Microbiol.* n. 8, p. 36-41. 1978.
- GERMANO, P.M.L., GERMANO, M.I.S. Agentes bacterianos de toxinfecções. In: GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos. Ed. 2, Editora Varela, 2003, p. 215-275.
- HALD, B.; WEDDERKOPP, A.; MADSEN, M. Thermophilic *Campylobacter* spp. in Danish broiler production: a cross-sectional survey and a retrospective analysis of risk factors for occurrence in broiler flocks. *Avian Pathol.*, n. 29, p. 123-131, 2000.
- HÄNNINEN, M.; PERKO-MÄKELÄ, P.; PITKÄLÄ, A.; RAUTELIN, H. A three-year study of *Campylobacter jejuni* genotypes in humans with domestically acquired infections and in chicken samples from the Helsinki area. *J. Clin. Microbiol.*, v. 38, n. 5, p. 1998-200, 2000.

HARMON, K.M.; RANSOM, G.M.; WESLEY, I.V. Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Probes*, v.11, p. 195-200, 1997.

HEUER, O.E.; PEDERSEN, K.; ANDERSEN, J.S.; MADSEN, M. Prevalence and antimicrobial susceptibility of thermophilic *Campylobacter* in organic and conventional broiler flocks. *Lett. App. Microbiol.*, v. 33, p. 269-274, 2001.

KRAMER, J.M.; FROST, J.A.; BOLTON, F.J.; WAREING, D.R.A. *Campylobacter* contamination of raw meat and poultry at retail sale: identification of multiple types and comparison with isolates from human infection. *J. Food Protect.*, v. 63, n. 12, p. 1654-1659, 2000.

KUANA, S.L.; SANTOS, L.R.; BEATRIZ, L.; et al. Ocorrência de *Campylobacter* em lotes de frangos de corte e nas carcaças correspondentes. *Ciênc. Anim. Bras.*, v. 9, n. 2, p. 480-486, 2008.

JAIN, D.; PRASAD, K.N.; SINHA, S.; HUSAIN, N. Differences in virulence attributes between cytolethal distending toxin positive and negative *Campylobacter jejuni* strains. *J. Med. Microbiol.*, v. 57, p. 267-272, 2008.

JOFRE, K.J.M.; ESPINOZA, C.P. Prevalencia de especies de *Campylobacter spp.* Em niños menores de 10 años com diarrea aguda en la ciudad de Talca. , 2008. Disponível em: <<http://dspace.utalca.cl/handle/1950/5697>> Acesso em: 15 dez. 2011.

LIMA, N.V.; FIGUEIREDO, A.C.T. A.; PRADO, A.D.; et al. *Campylobacter* e outros enteropatógenos em processos diarreicos infantis no Recife, Pernambuco. *Rev. Bras. Anal. Cli.* v. 25, n. 3, p. 71-74, 1993.

MARTINEZ, I.; MATEO, E.; CHURRUCA, E.; et al. Detection of *cdtA*, *cdtB*, and *cdtC* genes in *Campylobacter jejuni* by multiplex PCR. *Int. J. Med. Microbiol.*, v. 296, p. 45-48, 2006.

PERKO-MÄKELÄ, P.; ALTER, T.; ISOHANNI, P.; et al. Distribution of *Campylobacter jejuni* isolates from Turkey farms and different stages at slaughter using pulsed-field gel electrophoresis and *flaA*-short variable region sequencing. *Zoonoses Public Health*, n. 58, p. 388-398, Jun. 2011.

PEZZOTTI, G.; SERAFIN, A.; LUZZI, I.; et al. Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in animals and meat in northeastern Italy. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 82, n. 3, p. 281-287, 2003.

POWELL, L.F.; LAWES, J.R.; CLIFTON-HADLEY, F.A.; et al. The prevalence of *Campylobacter spp.* in broiler flocks and on broiler carcasses, and the risks associated with highly contaminated carcasses. *Epidemiol. Infec.* v. 16, p1-14, 2012.

QUERTZ, J.S.; LIMA, I.F.N.; HAVT, A.; et al. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in children from communities in Northeastern Brazil: molecular detection and relation to nutritional status. *Diagn. Micr. Infec. Dis.*, v. 67, p. 220-227, 2010.

ROZYNEK, E.; DZIERZANOWSKA-FANGRAT, K.; JOZWIAK, P.; et al. Prevalence of potential virulence markers in Polish *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates obtained from hospitalized children and from chicken carcasses. *J. Med. Microbiol.*, v. 54, p. 615–619, 2005.

SAMUEL, M.C.; VUGIA, D.J.; SHALLOW, S.; et al. Epidemiology of sporadic *Campylobacter* infection in the United States and declining trend in incidence, FoodNet 1996–1999. *Clin. Infec. Dis.*, v. 38, p. S165-S174, 2004.

SCARCELLI, E.; GENOVEZ, M.E.; CARDOSO, M.V.; et al. Avaliação do potencial de disseminação de *Campylobacter* spp. por diferentes espécies animais. *Arq. Inst. Biol.*, v. 65, p. 55-61, 1998.

TOSIN, I.; MACHADO, R.A.; Ocorrência de *Campylobacter* spp entre manipuladores de alimentos em cozinhas hospitalares de localidade urbana da Região Sul do Brasil. *Rev. Saúde Públ.*, v. 29, n. 6, p. 472-477, 1995.

VAN DEUN, K.; HAESEBROUCK, F.; HEYNDRICKX, M.; et al. Virulence properties of *Campylobacter jejuni* isolates of poultry and human origin. *J. Med. Microbiol.*, v.56, p.1284-1289, 2007.

YOUNG, K.T.; DAVIS, L.M.; DIRITA, V.J. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nat. Rev.*, v. 5, p. 665-679, 2007.

CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que a prevalência de *Campylobacter* em frangos de corte na região sul do Rio Grande do Sul é bastante elevada. A maioria dos aviários analisados apresentou aves contaminadas, sendo *C. jejuni* a espécie. Como grande parte dos frangos abatidos são portadores, é comum ocorrer contaminação das carcaças durante o abate e processamento, como consequência, um percentual importante dos produtos de frango oferecidos ao consumo na região apresenta contaminação por esse patógeno.

Assim como a maioria dos isolados de fezes de frango, também os isolados de produtos de frango destinados a alimentação humana apresentaram potencial para produção da toxina CDT, aumentando o risco para os consumidores.

A ocorrência de *Campylobacter* em fezes de humanos foi baixa em relação ao número de produtos de frangos contaminados.

REFERÊNCIAS

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION [CDC]. National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases. *Campylobacter*, General information, 2010a. Disponível em:
<<http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/campylobacter/>> Acesso em 5 jun. 2012.

COKER, A.O.; ISOKPEHI, R.D.; THOMAS, B.N.; AMISU, K.O.; OBI, C.L. Human campylobacteriosis in developing countries. **Emerging Infectious Disease**, v. 8, n. 3, p. 237-243, 2002.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION [FDA]. Department of Health and Human Services. *Campylobacter jejuni*. In: *Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook*, 2012. Disponível em:
<<http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/Foodbornellness/FoodbornellnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm070024.htm>> Acesso em 20 jun . 2012.

GERMANO, P.M.L., GERMANO, M.I.S. Agentes bacterianos de toxinfecções. In: GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. Ed. 2, Editora Varela, 2003, p. 215-275.

JAIN, D.; PRASAD, K.N.; SINHA, S.; HUSAIN, N. Differences in virulence attributes between cytolethal distending toxin positive and negative *Campylobacter jejuni* strains. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, p. 267-272, 2008.

MARTINEZ, I.; MATEO, E.; CHURRUCA, E.; GIRBAU, C.; ALONSO, R.; FERNÁNDEZ-ASTORGA, A. Detection of *cdtA*, *cdtB*, and *cdtC* genes in *Campylobacter jejuni* by multiplex PCR. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 296, p. 45-48, 2006.

NACHAMKIN, I.; ALLOS, B.M.; HO, T. *Campylobacter* species and Guillain-Barré Syndrome. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 555-567, 1998.

National Institute of Neurological Disorders and Stroke [NINDS]. Guillain-Barré Syndrome Fact Sheet, 2011. Disponível em:
<http://www.ninds.nih.gov/disorders/gbs/detail_gbs.htm> Acesso em 4 dez. 2011.

OBERHELMAN, R.A.; TAYLOR, D.N. *Campylobacter* Infections in developing countries. In: NACHAMKIN, I.; BLASER, M.J. **Campylobacter**. 2ND Ed. Washington: ASM Press, 2000. p. 139- 150.

PADUNGTON, P.; KANEENE, J.B. *Campylobacter spp.* in human, chickens, pigs and their antimicrobial resistance. **Journal do Veterinary Medical Science**, v. 65, n. 2, p. 161-170, 2003.

QUERTZ, J.S.; LIMA, I.F.N.; HAVT, A.; CARVALHO, E.B.; LIMA, N.L.; SOARES A.M.; MOTA, R.M.S.; GUERRANT, R.L.; LIMA, A.A.M. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in children from communities in northeastern Brazil: molecular detection and relation to nutritional status. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 67, p. 220-227, 2010.

ROSENQUIST, H.; SOMMER, H.L.; NIELSEN, L.N.; CHRISTESEN, B.B. The effect of slaughter operations on the contamination of chicken. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 226-232, 2006.

TAYLOR, D.N.; PERLMAN, D.M.; ECHEVERRIA, P.D.; LEXOMBOOM, U.; BLASER, M.J. *Campylobacter* immunity and quantitative excretion rates in thai children. **Journal of Infectious Disease**, v. 168, p. 754-758, 1993.