

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**Pesquisa dos genes *cdtA*, *cdtB*, *cdtC* e *flaA* em amostras de
Campylobacter jejuni isoladas de cortes de frango de corte.**

Autor: Gabriel Luz da Silva

Porto Alegre

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE VETERINÁRIA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**Pesquisa dos genes *cdtA*, *cdtB*, *cdtC* e *flaA* em amostras de
Campylobacter jejuni isoladas de cortes de frango de corte.**

Autor: Gabriel Luz da Silva

Monografia apresentada à Faculdade de
Veterinária como requisito parcial para
obtenção do título de Médico Veterinário.

Orientador: Vladimir Pinheiro do
Nascimento

Co-orientador: Gustavo Perdoncini

Porto Alegre

2014

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo ensino gratuito e de qualidade que recebi durante estes anos.

Aos professores da Faculdade de Veterinária pela dedicação e paciência durante o curso.

À Capes e CNPQ pelo auxílio financeiro durante a faculdade e ter auxiliado no meu crescimento acadêmico.

Ao CDPA (Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária) e ao LEZO (Laboratório de Ensino Zootécnico) pela oportunidade de vivência nas áreas de sanidade avícola e zootecnia.

Aos Professores e Veterinários do CDPA pelos ensinamentos e amizade.

Aos professores do LEZO, Andréa e Alexandre, pelos ensinamentos e vivência na área de zootecnia.

Ao grupo de pesquisa Campylobacter – CDPA.

Ao meu professor orientador Vladimir Pinheiro do Nascimento.

Ao meu coorientador e amigo pessoal Gustavo Perdoncini.

À minha namorada Franciele pela paciência e companheirismo durante estes anos.

À minha família por ser a minha base durante a minha vida.

Ao meu tio Mario e meu primo Gustavo por me incentivar e ajudar a trilhar no caminho da avicultura.

Aos meus amigos da faculdade, Leonardo Tuca, José Skin, Saulo Mutema, Matheus Pipe, Ruivo, Vinícius Casca por terem tornado mais leve esse caminho.

Isaac Newton: *If I have seen further it is
by standing on the shoulders of Giants.*

RESUMO

A espécie *Campylobacter jejuni* tem sido associado com infecções alimentares, e os principais alimentos envolvidos são produtos avícolas, leite não pasteurizado, água contaminada e verduras cruas. Em humanos as manifestações mais comuns são as gastroenterites. As bactérias utilizam fatores de virulência para aderir e colonizar o epitélio intestinal e causar a infecção. Dentre estes fatores, podemos citar a toxina Citotoxina Letal Distensiva, CDT, que é codificada pelos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*. Esta toxina bloqueia o ciclo celular causando a distensão da célula e a sua morte. Outro fator é o flagelo bacteriano, codificado pelo gene *flaA*, este auxilia na quimiotaxia e adesão do microorganismo nas estruturas intestinais. As 36 amostras utilizadas neste estudo foram isoladas de cortes de frango (peito, sobrecoxa, coxa e coxa da asa). A presença dos genes foi pesquisada através da técnica de PCR. Foram encontradas as seguintes frequências 88%, 91%, 88% e 75% para os genes *cdtA*, *cdtB*, *cdtC* e *flaA*, respectivamente. Em 72% foi encontrada a presença dos quatro genes. A presença do gene *flaA* pode ser um indicativo de uma estirpe de *Campylobacter jejuni* mais patogênica, pois este gene está envolvido com a capacidade da bactéria colonizar o intestino e provocar o quadro infeccioso, e ainda poderia facilitar a ação dos genes CDT para a produção da toxina. Os resultados encontrados neste trabalho são semelhantes aos encontrados na literatura consultada, que relatam altas frequências destes genes. É importante a análise de mais amostras para averiguar a importância e o aparecimento destes genes nos isolados de *Campylobacter jejuni* e no futuro associar com outros fatores de virulência que permitam caracterizar melhor as amostras circulantes.

Palavras-chave: Campilobacteriose. Infecção alimentar. PCR. Fatores de virulência.

ABSTRACT

The species campylobacter jejuni has been associated with foodborne illness, and the main feed involved are poultry products, unpasteurized milk, contaminated water and raw vegetables. The most common manifestations of the symptoms in humans are gastroenteritis. Bacterial uses virulence factors to adhere and colonize the intestinal epithelium and to cause infection. Among these factors, we can mention a citolethal distending toxin, CDT, which is encoded by the genes cdtA, cdtB and cdtC. This toxin blocks the cell cycle causing distention of the cell and its death. another factor it is the bacterial flagellum, encoded by the gene flaA, which assists in chemotaxis and adherence of microorganisms in the intestinal structures. The 36 samples used in this study were isolated from chicken parts (breast, drumstick, thigh and wing thigh). The presence of those genes was screened by pcr. The following frequencies were found, 88%, 91%, 88% and 75% for cdtA genes, cdtB, cdtC and flaA, respectively. In 72% of the samples were found the presence of the four genes studied. The presence of flaA gene may be indicative of a more pathogenic campylobacter jejuni strain, because this gene is involved with the bacteria ability to colonize the intestine and cause infection, and, could also facilitate the action of cdt genes for the production of the toxin. The results obtained in this study are similar to those found in the literature, which reports frequencies close to 100%. the analysis of more samples is substantial to ascertain the importance of these genes and the frequency that they appear in campylobacter jejuni isolates, and in the future, be able of associate them with other virulence factors that allow better characterization of the circulating strains.

Key words: Campilobacteriosis. Foodborne Illness. PCR. Virulence Factors

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Sequência de <i>primers</i>	18
Tabela 2 -	Composição do mix.....	19
Tabela 3 -	Ciclos de PCR.....	19

LISTA DE ABREVIATURAS

ABPA - Associação Brasileira de Proteína Animal

C° - Graus Celsius

CDC - Center Disease Control and Prevention

CDPA - Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária

CDT - Citoletal Distensiva Toxina

DNA- Desoxirribonucleotídeo ácido

dNTP- Desoxirribonucleotídeos

DTA - Doenças Transmitidas por Alimentos

EFSA - European Food Safety Authority

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas

LPS - Lipopolissacarídeo

MgCl₂ - Cloreto de Magnésio

OMS - Organização Mundial da Saúde

PCR - Polimerase Chain Reaction

rRNA- Ribossomal Ácido Ribonucleico

RPM - Rotações por Minuto

µm - microlitro

VNC - Viável Não Cultivável

USFDA - United States Food and Drug Administration

UV - Ultra Violeta

WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1 Características do gênero Campylobacter.....	11
2.2 Epidemiologia e fontes de contaminação por Campylobacter spp.....	12
2.3 Fatores de virulência e patogenicidade.....	15
2.4 Síndrome de Guillain Barré.....	17
3 Materiais e métodos.....	17
4 Resultados e Discussão.....	19
5 Conclusão.....	21
REFERÊNCIAS.....	22

1 INTRODUÇÃO

O Brasil no setor avícola ocupa um papel importante na produção e exportação mundial, tendo produzido no ano de 2012 12,69 milhões de toneladas de carne de frango (ABPA, 2012). A grande produção brasileira de suínos e aves está alicerçada na grande disponibilidade de grãos produzidos no país, devido à forte agricultura que tem. A produção de cereais, leguminosas e oleaginosas foi estimada neste ano de 2014 em 193,5 milhões de toneladas (IBGE, 2014). A grande oferta e a disponibilidade dos grãos nas áreas produtoras fazem do Brasil um país competitivo no setor produtivo de carne de aves, pois o custo com ração é de 60 a 70% dos custos de produção (INNOCENTINI, 2009). O consumo interno de produtos avícolas vem crescendo com passar dos anos, chegou aos 45 kg/per capita de carne de frango consumidos em 2012 (ABPA, 2012).

Com o aumento da produção avícola e a necessidade de se produzir alimentos mais seguros e com qualidade, o controle da produção através da adoção de medidas sanitárias, que garantam a inocuidade dos alimentos, nas granjas e no processamento industrial é crucial para evitar surtos ou infecções alimentares de doenças transmitidas por alimentos, DTA. Segundo os autores BRYAN & DOYLE (1995), as zoonoses que ocorrem com maior frequência nos países industrializados são as infecções de origem alimentar causadas por espécies dos gêneros *Salmonella* e *Campylobacter*, sendo os principais patógenos associados ao consumo de produtos de origem avícola.

Após o abate e a obtenção do alimento, este precisa ser livre de resíduos de agrotóxicos, metais pesados, patógenos e outras substâncias que representam um perigo à saúde das pessoas. Outro aspecto importante, é que se mantenham as qualidades funcionais e nutricionais do alimento e também as propriedades sensoriais de gosto e de aparência (GRUNERT, 1997).

Há muitos anos se sabe que os representantes do grupo *Campylobacter* estão relacionados com enfermidades nos animais. No entanto, somente nos últimas décadas tem sido identificadas espécies de *Campylobacter* termófilos microaerófilos como causadores de enterites humanas. Em alguns países, o *Campylobacter* é isolado com maior frequência que salmonelas em quadros clínicos humanos doentes que apresentam quadros de gastroenterites (WALDROUP, 1996).

As bactérias utilizam mecanismos de virulência para aderir e colonizar o epitélio intestinal e causar a infecção. Os genes *cdtA*, *cdtB*, *cdtC* codificam a Citotoxina Letal Distensivo – CDT, e ao gene *flaA*, que codificam proteínas flagelares, são consideradas um dos

os principais fatores de virulência do *Campilobacter jejuni*, principal espécie envolvida. Os genes *cdtA* e *cdtC* estão envolvidos na aderência e na penetração da célula hospedeira e o *cdtB* está diretamente ligado a produção da toxina que causa dano ao DNA (ácido desoxirribonucléico) através de sua atividade enzimática. Também foi pesquisada a presença do gene *flaA*, que codificam proteínas flagelares, e auxiliam na quimiotaxia e adesão do microorganismo nas estruturas intestinais

A legislação brasileira atual regulariza o controle de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos (BRASIL, 2003), entretanto para *Campylobacter* spp., não existe legislação específica para sua detecção e controle nas aves. Isto mostra que há a necessidade de mais estudos sobre a ocorrência deste patógeno e os riscos à saúde humana (CORTEZ, 2006). Já nos Estados Unidos foi criado pelo Serviço de Inspeção e Segurança Alimentar (FSIS), em 2011, padrões microbiológicos para a indústria avícola para a carne resfriada e processada de frango e perus, com objetivo de diminuir a incidência de casos de gastroenterites em humanos (FSIS - USDA, 2011)

Devido a alta ocorrência desta bactéria em alimentos e a importância em saúde pública, principalmente em produtos avícolas, este trabalho pesquisou a presença dos três genes que codificam a Toxina Citoletal Distensiva (*cdtA*, *cdtB* e *cdtC*) e do gene *flaA* que codifica as proteínas flagelares.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características do gênero *Campylobacter*

O gênero *Campylobacter* pertence à ordem Campylobacterales e à família Campylobacteraceae. Todas as espécies denominadas *Campylobacter* e os grupos taxonômicos relacionados pertencem ao mesmo grupo filogenético, nomeado superfamília VI de rRNA. Essa superfamília ainda agrega mais 4 gêneros: *Arcobacter*, *Helicobacter*, *Wolinella* e *Flexispira*.

São reconhecidas atualmente 33 espécies de *Campylobacter* (EUZÉBY, 2014). Esta bactéria possui formato de bastonete delgado, curvo espiralados, conhecido também como “asa de gaivota”. São bactérias gram-negativas, medindo 0,2 a 0,9µm de largura e 0,5 a 5 µm de comprimento. Não esporulam e tem motilidade em forma de saca-rolha, produzida por um flagelo polar em uma ou em duas extremidades da célula. A visualização deste microorganismo pode ser feita através do microscópio de contraste de fase ou campo escuro (NACHAMKIN, 2001).

O *Campylobacter* não forma esporos e cresce em microaerófilia. Pode crescer até em anaerobiose e é necessário uma atmosfera especial com 5 a 7% de oxigênio, 10 % de gás carbônico e 85% de nitrogênio (SNELLING, 2005; JOES, 2010; HUMPHREY, 2007). *C. jejuni* hidrolisa o hipurato, indoxil acetato e reduz nitrato. A maioria das cepas são resistentes à cefalotina, e também há resistência às fluorquinolonas tem sido relatada, uma categoria de antibióticos usados normalmente para tratar de animais e doenças em humanos (KOENRAAD *et al.*, 1995).

São produtores de oxidase e não fermentam açúcares, sua energia é obtida pela utilização de aminoácidos e intermediários do ciclo Krebs. É variável a produção da enzima catalase nas espécies de *Campylobacter* (STERN *et al.*, 2001). Tanto espécies catalases positivas e negativas podem causar doença, entretanto as espécies catalase positivas são mais associadas à ocorrência de doenças em humanos. *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari* e *Campylobacter upsaliensis* representam o grupo de bactérias denominadas termofílicas, devido a sua faixa de temperatura de crescimento ótimo oscilar entre 42 e 43° C e apresentam também como característica o cultivo fastidioso. *C. jejuni* e *C. coli* são as espécies mais comumente isoladas de enterites humanas (REES *et al.* 1995, MOORE *et al.* 2001).

As células de *Campylobacter* quando submetidas ao estresse causado pela presença de oxigênio, temperatura baixa ou falta de nutrientes, mudam a sua morfologia para formas cocóides, entrando num estado de viável, mas não cultivável (VNC); sendo incapazes de crescer em meios seletivos, mas podem ainda causar infecção em humanos (LEE & NEWELL, 2006). Apesar de não ser cultivável e nem detectável através de técnicas de bacteriologia quando está no estado VNC, o *Campylobacter* pode ser detectado através de técnicas de biologia molecular, como reação em cadeia da polimerase (HALEZEGER, 1994).

2.2 Epidemiologia e fontes de contaminação por *Campylobacter* spp.

Campilobacteriose é uma doença causada por microorganismos do gênero *Campylobacter* spp. e são reconhecidos como umas das principais fontes de gastroenterites em humanos. O leite cru, as verduras e os legumes crus, a água contaminada e também produtos de origem avícola são reconhecidamente fontes importantes de contaminação.

Um fator que torna o *Campylobacter* spp. um agente perigoso e a necessidade de haver maior controle e mais estudos é a sua capacidade de poucas células causarem o quadro infeccioso. Black et al. (1988) e Robinson (1981) sugerem que apenas 500 células de *Campylobacter jejuni* são suficientes, dependendo da competência do sistema imunológico do hospedeiro, para desencadear a doença.

Campylobacter jejuni é uma bactéria intestinal isolada com alta frequência de aves e se destaca como um microrganismo emergente de origem alimentar, causador de gastroenterite no homem, sendo a carne de aves considerada seu principal veículo (AQUINO & FRANCO, 1995).

A forma mais comum de transmissão para os humanos mais comum ocorre através do consumo e do manuseio de alimentos de origem animal, onde as carcaças são contaminadas por *Campylobacter* durante o abate e o processamento e manipulação das carcaças no frigorífico (BERRANG et al. 2001, EFSA 2010). O frango tem sido descrito por inúmeros autores por ser a principal fonte de *Campylobacter*, e conseqüentemente os produtos avícolas, nos casos de campilobacteriose humana (MOORE et al., 2005). As espécies mais comumente isoladas de gastroenterites em humanos são *C. jejuni* e *C. coli*. Enquanto 94% dos casos de gastroenterites são causados por *C. jejuni*; *C. coli* e *C. fetus* são responsáveis por 4% e 1,3 % dos casos no Japão respectivamente (YOKOHAMA, 2006).

O CDC (2014) estimou a incidência de 14,3 casos por 100.000 pessoas nos Estados Unidos, e estima-se que anualmente são infectadas 2 milhões de pessoas neste país por *Campylobacter*, sendo a principal fonte o consumo de carne de aves contaminadas (ALTEKRUSE, et al., 1999; KEMP et al., 2001). Apesar do quadro mais comum na infecção por *Campylobacter* ser as gastroenterites, é estimado que ocorram 73 mortes anuais (CDC, 2014).

A Campilobacteriose nos últimos cinco anos foi a zoonose mais notificada na União Européia, seguido de Salmonelose e Yersiniose (EFSA, 2007; 2010). De 2010 até 2015, o governo do Reino Unido está implementando uma estratégia para controle de *Campylobacter*, pois é atualmente considerado a mais comum causa de infecção alimentar, responsável por 321.000 casos estimados na Inglaterra e no país de Gales em 2008, com 15.000 pessoas hospitalizadas e 76 mortes (EFSA, 2010).

De acordo com a EFSA (2010), e levando em conta os fatores que podem contribuir para a propagação desta bactéria nas aves e carcaças de frango, e também com o fato de que os níveis de contaminação encontrados podem apresentar alta variação, indicam que alguns abatedouros são mais eficientes em diminuir e controlar a disseminação deste organismo do que outros. Outros fatores que podem influenciar também o risco de contaminação com *Campylobacter* são a idade das aves abatidas, a época do ano e a hora do dia que as carcaças são processados.

Recentemente, a EFSA (2010) descreveu os fatores que influenciam nas infecções por *Campylobacter*: idade (taxa de maior ocorrência em crianças menores de 5 anos de idade), a época (um número mais elevado de casos de campilobacteriose é relatado durante os meses de verão), as cepas (algumas estirpes são menos patogênicas do que outras), a imunidade do hospedeiro, viagens e os fatores demográficos (o status sócio-econômico). Zoonoses alimentares são importantes causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, a Organização Mundial da Saúde (WHO) estima que mais de dois milhões de pessoas morrem a cada ano de doenças diarréicas causadas principalmente pela ingestão de alimentos contaminados (WHO, 2005; EFSA, 2007). A Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos tem enfatizado a importância e recomendou o estabelecimento de uma vigilância ativa de campilobacteriose em todos os estados membros da comunidade européia, incluindo os esforços para determinar os casos de campilobacteriose não diagnosticados (EFSA, 2010).

A entrada do *C. jejuni* nas granjas e a posterior contaminação dos lotes pode se dar através de moscas e roedores, além de equipamentos pessoais e da fazenda, assim como

caminhões, empilhadeiras, pallets e sapatos são identificados como fontes em potencial de *C. jejuni* (RAMABU *et al.* 2004). Alguns fatores contribuem para o aumento da contaminação da carne de frango: a alta densidade populacional no criatório e as elevadas taxas de abate no abatedouro, onde as carcaças permanecem muito próximas umas das outras. Essas condições favorecem uma rápida disseminação de qualquer patógeno que possa ter acesso ao criatório (MEAD, 2004). Segundo Genigeorgis (1987) a tecnologia de abate não garante produtos livres de *Campylobacter*. A contaminação das aves é quase que exclusivamente de origem intestinal, não sendo suficientemente eliminada durante o processamento tecnológico, resultando em produtos finais contaminados (OOSTEROM, 1983).

Existem muitos fatores de riscos envolvidos com a transmissão ambiental e horizontal do *Campylobacter* entre os lotes e entre as aves, e para diminuir a contaminação com este agente é importante a implementação de medidas higiênico-sanitárias nas granjas, como a: limpeza, desinfecção e vazio sanitário entre o alojamento de lotes novos de aves; controle da qualidade microbiológica de rações e água ofertada aos animais; controle de roedores, insetos, pássaros selvagens; monitoria da prevalência de *Campylobacter* dos lotes; limpeza e desinfecção dos caminhões e das caixas de transporte de aves; processamento adequado e higiênico das carcaças no frigorífico. A combinação de medidas empregadas no sistema avícola diminui a probabilidade da entrada de patógenos nos lotes e acaba diminuindo a transmissão ao longo da cadeia e, ao final do processo, resultando em um produto com maior qualidade sanitária para o consumidor. No Reino Unido, algumas medidas como procedimentos de limpeza intensivos nas granjas de equipamentos, de veículos e de higiene pessoal reduziram a prevalência de *Campylobacter*, entretanto falharam na redução da colonização dos lotes de aves (RIDLEY *et al.*, 2011).

Outro método de diminuir a contaminação é a lavagem de carcaças com auxílio do fosfato trisódico. Whyte *et al.* (2001), estudando o efeito do fosfato trisódico (TSP) observaram uma redução de 1,71 ciclos logarítmicos para *Campylobacter* termofílicos após tratamento com solução a 10 % de TSP, por 15 segundos. O fosfato trisódio (TSP) usado em concentrações entre 8 e 12% (pH > 11,5) tem demonstrado ser um efetivo descontaminante de carcaças de aves e é aprovado para uso nos Estados Unidos pelo Serviço de Inspeção e Segurança Alimentar do Departamento de Agricultura dos EUA. Outro produto também utilizado para diminuir a contaminação é o clorito de sódio acidificado (ASC). ASC é um antimicrobiano aprovado pela Administração de Alimentos e Medicamentos dos EUA (USFDA) para tratamento de aves processadas, carnes vermelhas (ovinos, suínos, e ovelhas), produtos marinhos, frutas e vegetais

que demonstrou eficiência na redução de positividade para *Campylobacter* e *Salmonella* quando aplicado em carcaças de frango (KEMP *et al.* 2001).

2.3 Fatores de Virulência

Os mecanismos de virulência do *Campylobacter* ainda não foram completamente entendidos, e há uma variação dos sintomas apresentados nos quadros da doença, de quadros leves a sérios de gastroenterites (Rivera Amill *et al.* 2001). Ainda não é claro quais são os fatores essenciais do *Campylobacter* para desenvolver a doença, entretanto é conhecido que mecanismos que favoreçam a quimiotaxia, adesão, transcitoses, penetração na célula hospedeira e produção de toxinas são fundamentais para a bactéria causar uma doença gastrointestinal.

A principal citotoxina do gênero *Campylobacter* é o complexo da toxina citoletal distensiva (CDT), esta toxina é composta por três subunidades, e cada subunidade é transcrita por um gene de mesmo nome, *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*, proteínas codificadas com pesos de 30, 29 e 21 kDa, respectivamente. São toxinas suscetíveis ao calor e tem a propriedade de bloquear o ciclo das células de mamíferos. A proteína produzida pelo gene *cdtB* potencializa o bloqueio do ciclo celular, e as proteínas dos genes *cdtA* e *cdtC* transportam a proteína do *cdtB* e a interiorizam na célula hospedeira. Uma vez dentro da célula, a proteína *cdtB* entra no núcleo e exibe uma atividade de corte no DNA dupla fita. As células eucarióticas respondem aos cortes no DNA, o dano se deve pela troca de um simples aminoácido por uma enzima, DNAase, bloqueando a fase G2/M da divisão celular, induzindo uma distensão citoplasmática que leva à morte da célula (JEON,2005; LARA-TEJERO e GALÁN, 2000; SMITH, 2006; DASTI, *et al.*, 2010). A toxina Citoletal Distensiva (CDT), é produzida também por outras bactérias gram-negativas incluindo, *Escherichia coli*, *Shigella spp.*, *Helicobacter spp.*, *Haemophilus ducreyi* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (YAMASAKI *et al.*, 2006).

É sugerido ainda que ação da toxina CDT seja responsável pela morte das células epiteliais nos vilos intestinais, prejudicando a função de barreira do intestino frente a patógenos e também a absorção de nutrientes (WHITEHOUSE *et al.* 1998).

A toxina distensiva citoletal é comum em amostras de *Campylobacter jejuni*. Bang *et al.* (2004) utilizou 117 cepas de *C. jejuni* isoladas de perus na Dinamarca e constatou que 97,4 % das cepas eram positivas para CDT. Além disso, Lee *et al.* (2003) verificaram que a combinação de *cdtB* e *cdtA* não teve nenhum efeito sobre a linhagem celular HeLa, mas a

combinação de *cdtB* e *cdtC* era tão eficaz quanto a combinação das três proteínas. Estudos de competição indicaram que *cdtA* e *cdtC* se ligam ao mesmo sítio na superfície da célula HeLa (LEE et al., 2003).

As células de mamíferos expostas a agentes que danificam o DNA, tais como radiação- γ , fazem com que complexos de reparação do DNA, corrijam os danos causados a dupla fita de DNA (TAKATA et al., 1998). Hassane et al.(2003) demonstraram que as células da linhagem IMR- 90, quando expostas a toxina citoletal distensiva (CDT) havia o acúmulo da proteína histona γ -H2AX. As quebras de cadeia dupla fita de DNA causados pela radiação ionizante induzem a fosforilação desta proteína. A fosfo-histona medeia o recrutamento de complexos de reparação do DNA, para o locais de quebras de cadeia dupla induzida pela radiação (ROGAKOU et al.1999). Assim, a detecção de respostas de reparação do DNA após exposição a toxina CDT, indica que esta toxina provoca danos ao DNA celular de um modo semelhante a radiação- γ .

Outro marcador de virulência bacteriana muito bem descrito é o *flaA*, que codifica a formação do flagelo. Este favorece a motilidade, a colonização e penetração do agente nas criptas intestinais do hospedeiro, possui duas proteínas, denominadas flagelina A (codificada pelo gene *flaA*) e flagelina B (codificada pelo gene *flaB*), que parecem estar envolvidas também na adesão e na invasão às células hospedeiras, conforme mostram os estudos com mutantes que, tendo seu movimento flagelar paralisado apresentaram reduzida capacidade de aderir e ausência de invasão. Também há de destacar que a motilidade e quimiotaxia são essenciais para a colonização por *C. jejuni*, que é atraído por mucina, L-serina, e L-fucose e é repellido por ácidos biliares. Após o *C. jejuni* atravessar a barreira do muco, é necessária sua aderência na superfície epitelial para que a efetiva colonização ocorra. A adesão tem sido estudada de maneira bastante intensa in vitro (KETLEY, 1997). Mutantes de *C. jejuni* imóveis, com flagelo incompleto ou com ausência de flagelo não conseguem colonizar o trato gastrointestinal ou requerem grandes quantidades de inoculo, em relação às cepas móveis com flagelo completo (GUERRY, 2007; LODGE, 2007). Segundo os autores Osek e Wiczorek (2008), estudos têm sido feitos para detecção dos genes *flaA* e *flaB*, e tem sido relatado uma maior presença do gene *flaA*, sugerindo que este gene seja essencial para a motilidade bacteriana, e conseqüente, adesão e colonização.

Alguns estudos pesquisando a presença do gene *flaA* encontraram a frequência de 100% nas amostras testadas, o que pode sugerir que o gene *flaA* é necessário para a colonização bacteriana do trato digestivo dos animais e permite às bactérias aderirem à

superfície das carcaças de aves contaminadas (BANG *et al.*, 2001; DATTA, NIWA & ITOH, 2003; WIECZOREK E OSEK, 2008)

2.4 Síndrome de Guillain Barré

A síndrome de Guillain-Barré é caracterizada por uma paralisia flácida aguda que acomete os músculos esqueléticos e também pode comprometer os músculos da respiração, levando o paciente ao óbito. Tecnicamente é uma polirradiculopatia desmielinizante inflamatória aguda auto-imune, na grande maioria das vezes reversível, se caracteriza por uma desmielinização dos nervos motores mas pode atingir também os nervos sensitivos (BOLAN *et al.*, 2007).

Algumas estimativas sugerem que mais de 30% dos casos da síndrome de Guillain Barré, ocorrem após a infecção por *Campylobacter jejuni*, mas também podem ocorrer após a infecção por citomegalovírus, vírus Epstein Barr e *Mycoplasma pneumoniae* (DRENTHEN, 2011). A patogênese da Síndrome de Guillain Barré ainda não é bem compreendida, entretanto há estudos que identificaram uma reação cruzada provocada pela produção de anticorpos contra o lipopolissacarídeo (LPS) presente na parede celular de *C. jejuni* que é semelhante estruturalmente a um componente (gangliosídeo) presente na bainha de mielina nos nervos periféricos. Há o ataque por parte dos anticorpos anti-LPS de *C. jejuni* contra o gangliosídeo, comprometendo a integridade da bainha de mielina e a condução nervosa, causando a paralisia (ANG, 2002).

Em 2007 houve um surto na região rural da China em que 36 pessoas foram acometidos pela Síndrome de Guillain Barré (Zhang *et al.*, 2010). Ao pesquisar o histórico desses pacientes, verificou-se um aumento no número de casos de diarreia prévia a manifestação da síndrome, sugerindo que esses casos estão relacionados à infecção prévia por *Campylobacter jejuni* (Ho *et al.*, 1995).

3 Materiais e Métodos

Foram utilizadas neste trabalho 36 isolados de corte de frango, provenientes da bacterioteca do CDPA (Centro de Diagnóstico de Pesquisa em Patologia Aviária - UFRGS).

O DNA das amostras foram extraídos pela técnica de termoextração adaptado por Borsoi *et al.* (2009). Um mL do caldo contendo o isolado a ser analisado foi centrifugado

(5415C Microcentrifuge, Eppendorf, Hamburg, Germany) a 12.000 rotações por minuto (RPM) por 2 minutos e descartado o sobrenadante. O *pellet* foi ressuspensionado com 800 µl em água ultrapura, homogeneizado e novamente centrifugado a 12.000 RPM por 2 minutos. Este procedimento foi realizado duas vezes, sendo que na última etapa o material foi ressuspensionado com 500 µl de água ultrapura. A termoextração foi feita em banho-maria a 95°C, por 10 minutos, após esse tempo o sobrenadante contendo o DNA foi coletado para ser utilizado no ensaio de PCR.

Os genes pesquisados foram identificados com a utilização de três protocolos de Reação da Cadeia da Polimerase – PCR. O primeiro utilizado foi composto por um duplex-PCR para identificar o *cdtA* e *cdtC* (370 pb/182 pb), um segundo protocolo para identificar o gene *cdtC* (620 pb) e o terceiro protocolo para identificar o gene *flaA* (1700 pb).

Para a pesquisa dos genes *cdtA* e *cdtC* foi utilizado como controle positivo das reações de PCR a amostra ATCC *Campylobacter jejuni* 33560 e para a pesquisa de *cdtB* foi utilizado amostra clínica de *Arcobacter*. A sequência de primers utilizadas estão descritas na tabela 1.

Tabela 1. *Primers* dos genes (*cdtA*, *cdtB*, *cdtC* e *flaA*) pesquisados nas amostras de *Campylobacter jejuni*.

<i>Primer</i>	Sequência de bases
<i>cdtA forward</i>	5' CCTTGTGATGCAAGCAATC 3'
<i>cdtA reverse</i>	5' ACACTCCATTTGCTTTCTG 3'
<i>cdtB forward</i>	5' CAGAAAGCAAATGGAGTGTT 3'
<i>cdtB reverse</i>	5' AGCTAAAAGCGGTGGAGTAT 3'
<i>cdtC forward</i>	5' CGATGAGTTAAAACAAAAAGATA 3'
<i>cdtC reverse</i>	5' TTGGCATTATAGAAAATACAGTT 3'
<i>flaA forward</i>	5' GGATTTTCGTATTAACACAAATGGTGC 3'
<i>flaA reverse</i>	5' CTGTAGTAATCTTAAACATTTTG 3'

Fonte: adaptado de BANG *et al.*, 2003; DATTA *et al.*, 2003

O DNA dos isolados foi adicionado a um mix de reagentes, dispostos na tabela 2, composto por um tampão 10X, MgCl₂, mix de dNTP's, *primers*, enzima Taq polimerase e completado o volume final com água ultrapura. Após as sequências de amplificação, descritos na tabela 3, o amplicon foi visualizado através da técnica de eletroforese em gel de agarose a

1,5% com acréscimo de brometo de etídio. Para visualização foi utilizado um transluminador Ultra-violeta (UV) para identificar a amplificação dos genes pesquisados.

Tabela 2. Volume dos reagentes utilizados nas reações da técnica de PCR para detecção dos genes *cdtA*, *cdtB*, *cdtC* e *flaA*.

Reagentes	<i>cdtA</i> e <i>cdtC</i>	<i>cdtB</i>	<i>flaA</i>
Água mili-Q (µL)	20,15	20,15	16,4
Tampão 10X (µL)	3	3	2,5
dNTP (2,5 mmol)	2,4	2,4	2,5
MgCl ₂ (µL)	1 (1mM)	1,25 (1,5mM)	1,2
Primer (20Pmol) (µL)	1	1	0,5
Taq polimerase (1U) (µL)	0,2	0,2	0,4
DNA (µL)	1	1	1
Total	30	30	25

Fonte: adaptado de DATTA *et al.*, 2003; WIECZOREK, 2008.

Tabela 3. Condições de tempo e temperatura para ocorrência das reações da técnica de PCR de cada gene.

Etapas	<i>cdtA</i> e <i>cdtC</i>	<i>cdtB</i>	<i>flaA</i>
Desnaturação inicial	94° C - 5 min	94° C - 5 min	94° C - 5 min
Desnaturação	94° C - 1 min	94° C - 1 min	94° C - 1 min
Anelamento	55° C - 1min	55° C - 1min	48° C - 1min
Extensão	72° C - 1 min	72° C - 1 min	72° C - 1 min
Extensão final	72° C - 5 min	72° C - 5 min	72° C - 5 min
Tamanho do amplicon (pb)	370 - 182	620	1700

Fonte: adaptado de DATTA *et al.*, 2003; WIECZOREK, 2008.

4 Resultados e Discussão

Entre as amostras pesquisadas de *Campylobacter jejuni* em cortes de frango comercial foi encontrada as seguintes frequência dos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*, respectivamente: 88%, 91% e 88%. Quando avaliado o conjunto dos três genes presentes na

mesma amostras, 86% tinham a presença dos três genes. Os genes *cdtA* e *cdtC* foram encontrados em 86% das amostras.

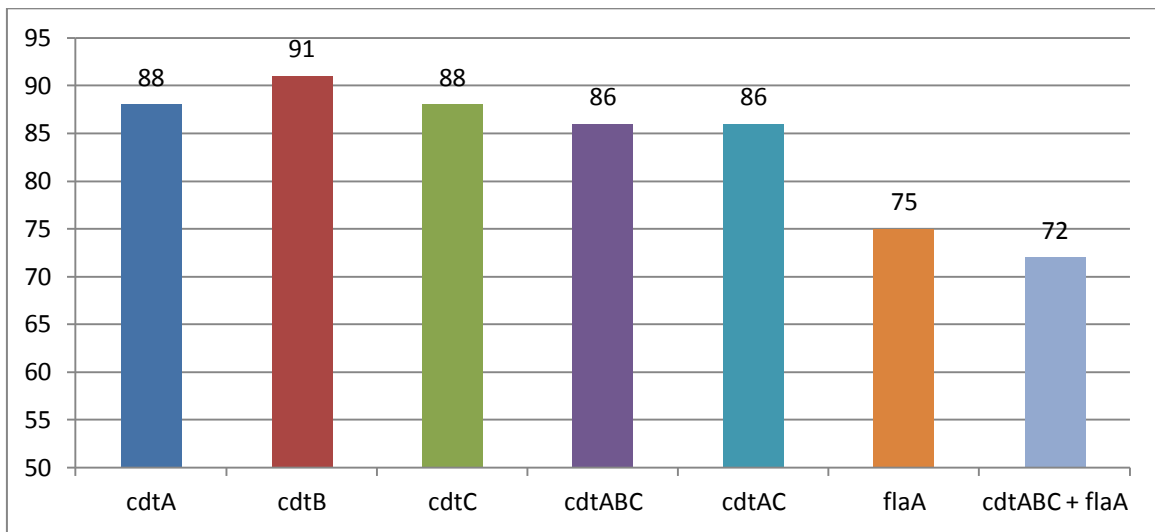


Gráfico 1. Resultados obtidos na pesquisa dos genes *cdtA*, *cdtB*, *cdtC* e *flaA* pela técnica de PCR nas 36 amostras de *Campylobacter jejuni*.

O resultado da pesquisa dos genes do complexo CDT neste trabalho diferiu pouco de alguns trabalhos pesquisados na literatura. Estes trabalhos relatam frequências próximas a 100% para os três genes: *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*. Wiczorek & Osek (2008) ao pesquisar em amostras de fezes de aves, achou resultados de 76,6%, 85,3% e 83,2% para os genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*, respectivamente. Datta et al (2003) ao pesquisar os genes *cdtABC* em amostras clínicas isoladas de humanos, fezes e carne de aves achou a frequência de 100% para os três genes. Rozynek et al.,(2005), ao pesquisar o complexo CDT em *C. jejuni*, verificou a presença em amostras de crianças com diarreia (*cdtA*, 98,4%; *cdtB* 97%; *cdtC*, 98%) e a frequência em *swabs* de carcaças de frango (*cdtA*, 100%; *cdtB* 100%; *cdtC*, 100%).

Van Deun et al. (2007) e Wardak (2006) acharam frequências de 100% dos genes CDT, e sugerem ainda em seus trabalhos que existe uma associação entre a presença do genes CDT e ocorrência de sinais clínicos típicos de Campylobacteriose. Talukder et al. (2008) observaram em seu trabalho que os pacientes que tiveram campilobacteriose, e o *C. jejuni* envolvido no quadro tinha os genes CDT, tiveram uma diarreia que apresentou uma secreção intestinal aumentada.

Bang et al. (2003) e Asakura et al. (2007) relataram, que quando há mutações nos genes que codificam a toxina CDT, a expressão do gene e também a detecção dos genes pelas técnicas de biologia molecular ficam prejudicadas.

O gene *flaA* neste trabalho foi encontrado em 75% das amostras pesquisadas. É relatado na literatura que a formação das proteínas flagelares, codificadas pelo gene *flaA*, é essencial para virulência, haja vista a dependência do flagelo para colonização das estruturas intestinais e ocorrência da doença gastrointestinal (GUERRY, 2007; NUIJTEN et al. 2000).

Datta *et al.* (2003) e Wieczorek e Osek (2008) relataram frequências de 100% dos genes *flaA* em amostras clínicas humanas, fezes de aves e carne de aves. Em pacientes humanos com diarreia em Bangladesh, o gene *flaA* foi isolado em 100% das amostras (TALUKDER *et al.*, 2008). A formação do flagelo é relacionada fortemente com a virulência bacteriana ao aumentar a capacidade de colonização e aderência ao epitélio intestinal. Além da formação do flagelo, o gene *flaA* está relacionado na produção de uma série de proteínas que facilitam a invasão e a apoptose celular do epitélio intestinal, também é citado a necessidade do flagelo bacteriano para formação de biofilme (GUERRY, 2007).

Nas amostras estudadas, 72% foi verificado a frequência dos genes *cdtA*, *cdtB*, *cdtC* e *flaA*. A presença do gene *flaA* que é responsável pela motilidade e a colonização das estruturas no epitélio intestinal facilitar a atuação dos genes CDT, pois a adesão promovida por estes genes facilitaria a ação da toxina, já que a bactéria se encontraria no seu sítio de ação

5 Conclusão

Este trabalho pesquisou a presença dos genes *cdtA*, *cdtB*, *cdtC* e *flaA*, que são considerados fatores de virulência, e achou em frequências acima de 75% nas amostras de cortes comerciais de frangos de corte pesquisadas.

Este trabalho teve resultados semelhantes com a da bibliografia consultada, e os próximos passos a serem dados são na tentativa de entender como se relacionam os genes de virulência.

É importante a análise de mais amostras para averiguar a importância e o aparecimento destes genes nos isolados de *Campylobacter jejuni* e no futuro associar com outros fatores de virulência que permitam caracterizar melhor as amostras circulantes.

REFERÊNCIAS:

- Associação Brasileira de Proteína Animal. Frango: produção brasileira de carne de frango. São Paulo, 2012. Disponível em: <http://www.ubabef.com.br/estatisticas/frango/producao_brasileira_de_carne_de_frango> Acesso em 24 de out de 2014.
- ALTEKRUSE, S. F. *et al.* *Campylobacter jejuni* - an emerging food borne pathogen. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 5, n. 1, Jan.1999
- ANG, C.W. *et al.* Structure of *Campylobacter jejuni* lipopolysaccharides determines antiganglioside specificity and clinical features of Guillain-Barré and Miller Fisher patients. **Infection And Immunity**. Washington, DC, v.70, n.3, p. 1202–1208. Mar. 2002.
- AQUINO, M. H. C., FRANCO, R. M., TIBANA, A. *Campylobacter jenuni* na avicultura: importância e métodos de controle. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 9, n. 36, p. 17 – 19, 1995
- BANG, D. D. *et al.* Prevalence of cytolethal distending toxin (cdt) genes and CDT production in *Campylobacter* spp. Isolated from Danish broilers. **Journal of Medical Microbiology**, London, v.50, p.1087-1094, 2001.
- BANG, D. D. *et al.* PCR detection of seven virulence and toxin genes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from Danish pigs and cattle and cytolethal distending toxin production of the isolates. **Journal Applied Microbiology**. Bedford. v.94, n.6, p. 482 - 487, 2001.
- BANG, D. D. *et al.* Detection of seven virulence and toxin genes of *Campylobacter jejuni* isolates from Danish turkeys by PCR and cytolethal distending toxin production of the isolates. **Journal Food Protection**, Des Moines, v. 67, n.10, p. 2171–2177. out. 2004.
- BERRANG, M. E. *et al.* Broiler carcass contamination with *Campylobacter* from feces during defeathering. **Journal Food Protection**, Des Moines, v. 64, n.12, p. 2063–2066. 2001.
- BLACK, R. E. *et al.* Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. **Journal of Infectious Disease**. Des Moines, V. 157, p. 472 – 479, 1988.
- BOLAN, R. S. *et al.* Síndrome de Guillain-Barré. **Revista da AMRIGS**, Porto Alegre, v.51, n.1, p. 58-61, jan.. 2007.
- BORSOI, A. *et al.*. An inoculation of newly hatched broiler chicks with two Brazilian isolates of *Salmonella* Heidelberg strains with different virulence gene profiles, antimicrobial resistance and pulsed field electrophoresis patterns to intestinal changes evaluation. **Poultry Science**, Champaign, v.88, n.4, p.750-758, apr, 2009.
- BRYAN, F. L., DOYLE, M. P. Health risks and consequences of *Salmonella* and

Campylobacter jejuni on raw poultry. **Journal Food Protection**. Des Moines, v.58, n.3, p. 326-344, mar.1995.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Atlanta, [2013]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/campylobacter/technical.html#incidence>>. Acesso em 12 out.2014.

CORTEZ, A. L. *et al.* Survey of chicken abattoir for the presence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **Revista Instituto Medicina Tropical**. São Paulo. v.48, n.6, p.307-310. nov. 2006.

DASTI, J. I. *et al.* *Campylobacter jejuni*: A brief overview on pathogenicity – associated factors and disease mediating mechanisms. **International Journal of Medical Microbiology**. Amsterdã, v.300, n.4, p.205-211. apr. 2010.

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

DRENTHEIN, J. Guillain Barré syndrome subtypes related to *Campylobacter* infection. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**. Wurzburg. v. 82, n. 3, p.300-305. 2011.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. The community summary report on trends and sources of zoonoses , zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European union in 2006. **EFSA Journal**. Parma. n.130, p. 130–155, 2007.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific opinion on quantification of the risk posed by broiler meat to human campylobacteriosis in the EU. **EFSA Journal**. Parma. n.8 p.1437. 2010.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food- borne outbreaks in the European union in 2008. **EFSA Journal**. Parma. n.8, p. 1496–1906, 2010.

EUZÉBY, J. P. List of prokaryotic names with standing in nomenclature - Genus *Campylobacter*. Paris. 2014. Disponível em: <[http:// www.bacterio.cict.fr](http://www.bacterio.cict.fr)>. Acesso em: 10 out. 2014.

FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE - USDA. New performance standards for salmonella and campylobacter in young chicken and turkey slaughter establishments: response to comments and announcement of implementation schedule. **Federal Register** Washington, DC. v.76, n. 54, Mar 2011

- GENIGEORGIS, C. A. Importância do *Campylobacter* na avicultura. **Avicultura Industrial**, Itú, p. 6-12, ago. 1987.
- GRUNERT, K. G. (1997). What's in a steak? A cross-cultural study on the quality perception of beef. **Food Quality and Preference**, Amsterdã, v. 8, n.3, p. 157–174, 1997.
- GUERRY, P. *Campylobacter* flagella: not just for motility. Review. **Trends in Microbiology**, Cambridge, vol. 15, n. 10, p. 456-461, oct. 2007.
- HASSANE, D. C., LEE, R. B., PICKETT, C. L. *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin promotes repair responses in normal human cells. **Infection and Immunity**, Washington, DC, v.71, n.1, p.541–545, jan. 2003.
- HAZELEGER, W. *et al.* Detection of the coccoid form of *Campylobacter jejuni* in chicken products with the use of the polymerase chain reaction. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdã, v. 24, p. 273-281, 1994.
- Ho T. W. *et al.* Guillain-Barre syndrome in northern China. Relationship to *Campylobacter jejuni* infection and anti-glycolipid antibodies. **Brain**, London, v.118, p. 597–605, jun.1995.
- HUMPHREY, T.; O'BRIEN, S; MADSEN, M. *Campylobacter* as a zoonotic pathogens: A food production perspective. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdã, v.117, p. 237-257, 2007.
- KEMP, G. K. *et al.* Continuous online processing of fecal and ingesta contaminated poultry carcasses using an acidified sodium chlorite antimicrobial intervention. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 64, n.6, p. 807 – 812, 2001.
- KETLEY, J. M. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. **Microbiology**. Reading, n. 143, p. 5-21. Jan. 1997.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Brasília, Disponível em: [ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_\[mensal\]/Comentarios/lspa_201409comentarios.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Comentarios/lspa_201409comentarios.pdf). Acesso em: 24 de out. 2014.
- INNOCENTINI, R. da C.P. Análise dos custos de produção de frangos de corte nos sistemas integrado e independente. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v.15. n.2, jul. 2009.
- JEON, B.; ITOH, K.; RYU, S. Promoter analysis of cytolethal distending toxin genes (cdtA, B and C) and effect of luxS mutation on CDT production in *Campylobacter jejuni*. **Microbiology and Immunology**. Tokyo. V. 49, n.7, p. 599-603. 2005.
- JOES, L. A.; HAESEBROUCK, F.; PASMANS, F. *Campylobacter* and helicobacter, In: GYLES, C. L. *et al.* Pathogenesis of bacterial infections in animals. Iowa: **Blackwell Publishing**, 4 ed, 2010, p. 484-501.

KOENRAAD, P. M. *et al.* Antibiotic susceptibility of *Campylobacter* isolates from sewage and poultry abattoir drain water. **Epidemiology and Infection**. Cambridge, n. 115, p. 475–483, Dec. 1995.

LARA-TEJERO, M.; GALÁN, J. E. A bacterial toxin that controls cell cycle progression as a deoxyribonuclease I-like protein. **Science**. New York v. 290, n. 5490, p.354–357. Oct. 2000

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

LEE, R. B., HASSANE, D. C., COTTLE, D. L., PICKETT, C. L. Interactions of *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin subunits CdtA and CdtC with HeLa cells. **Infection and Immunity**. Washington, DC, v. 71, n.9, p.4883–4890, Sep. 2003.

LODGE, K. A Molecular Investigation of *Campylobacter jejuni* Pathogenesis. [online], 2007. **School of Applied Sciences University**, Australia, 2007.

MARTINEZ, I. *et al.* Detection of *cdtA*, *cdtB* and *cdtC* genes in *Campylobacter jejuni* by multiplex PCR. **International Journal of Medical Microbiology**. Amsterdã. v.296, n.1, p. 45-48. 2006.

MEAD, G. C. Microbiological quality of poultry meat – a review. **Revista Brasileira Ciência Avícola**. Campinas, v. 6, n. 3, p. 135-142, jul. 2004.

MOORE, J. E. *et al.* Occurrence of *Campylobacter* spp. In water in Northern Ireland: implications for public health. **The Ulster Medical Journal**. Londonderry, v. 70, n. 2, p. 102-107, 2001.

MOORE, J. *et al.* *Campylobacter*. **Veterinary Research**, París, n. 36, p. 351-382, May, 2005.

NACHAMKIN, I. *Campylobacter jejuni*. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. **Food Microbiology Fundamentals and Frontiers**. Washington, p.179-192. 2001.

OOSTEROM, J., DE WILDE, G. J. A. Origen and prevalence of *Campylobacter jejuni* in poultry processing. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.46, n.4, p.339-344, 1983.

RAMABU, S. S. *et al.* Some potential sources for transmission of *Campylobacter jejuni* to broiler chickens. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford v. 39, n. 3, p. 252–256, 2004.

REES, J. H., *et al.* *Campylobacter jejuni* Infection and Guillain-Barré Syndrome. **New England Journal of Medicine**. Boston, v. 333, n. 21, p. 1374-1379, Nov. 1995.

RIDLEY, A. *et al.* Potential sources of *Campylobacter* infection on chicken farms: contamination and control of broiler-harvesting equipment, vehicles and personnel. **Journal Applied Microbiology**, Oxford, v. 111, p. 233–244, Jul. 2011.

ROBINSON, D. A. Infective dose of *Campylobacter jejuni* in milk. **British Medical Journal**, London, v. 282, n. 6276, p. 1584, May, 1981.

ROGAKOU, E.P. *et al.* Megabase chromatin domains involved in DNA double strand breaks in vivo. **Journal Cell Biology**, New York, v.146, n. 5, p.905–915. Sep.1999.

ROZYNEK, E. *et al.* Prevalence of potential virulence markers in Polish *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates obtained from hospitalized children and from chicken carcasses. **Journal of Medical Microbiology**. London. v. 54, p.615-619. Jul. 2005.

SMITH, J. L.; BAYLES, D. O. The contribution of cytolethal distending toxin to bacterial pathogenesis. **Critical reviews in microbiology**. Pennsylvania. [online]. V.32, n.4, p227-248. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17123907>>. Acesso em: 25 nov. 2014.

SNELLING, W. J. Under the microscope *Campylobacter jejuni*. **Applied Microbiology**, v.41, p.297-307, 2005.

STERN, N. J.; LINE, J. E.; CHEN, H. C. *Campylobacter* in: DOWNES, F.P.; ITO,K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, Washington, DC, p. 301-310, 2001.

TALUKDER, K. A. *et al.* Prevalence of virulence and cytolethal distending toxin, production in *Campylobacter jejuni* isolates from diarrheal patients in Bangladesh. **Journal of Clinical Microbiology**. Washington. v.46, n.4, p.1485-1488. Apr. 2008.

VAN DEUN, K.; *et al* Virulence properties of *Campylobacter jejuni* isolates of poultry and human origin. **Journal of Medical Microbiology**. London, v.56, p. 1284-1289. 2007.

YAMASAKI, S. *et al.* Cytolethal distending toxin (CDT): genetic diversity, structure and role in diarrheal disease. **Toxin Rev** n.25, p. 61–88. 2006.

YOKOHAMA, K. Occurrence of *Campylobacter* food poisoning. **Japan Journal Food Microbiology**. n. 23, p. 109–113. 2006.

WALDROUP, A. L. Contamination of raw poultry with pathogens. **World's Poultry Science Journal**. v. 52, p.7-25, 1996.

WARDAK, S; SZYCH, J. Prevalence of pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* isolated from humans in Poland between 2003- 2005. **Medycyna Doswiadczalna Mikrobiologia**. Warszawa, v.58, n. 3, p. 217-222, 2006.

WHYTE, P. *et al.* Quantitative investigation of effects of chemical decontamination procedures on the microbiological status of broiler carcasses during processing. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.64, n.2, p.179 – 183, Feb. 2001.

WHITEHOUSE, C.A. et al. *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin causes a G2-phase cell cycle block. **Infection and Immunity**. Washington, DC, v. 66, n.5, p. 1934–1940. May, 1998.

WIECZOREK, K.; OSEK, J. Identifications of virulence genes in *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolates by PCR. **Bull Vet Inst Pulawy** v. 52, p. 211-216, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Salm-Surv Strategic Plan 2006–2010. Disponível em: <http://www.who.int/gfn/general/documents/GSS_STRATEGICPLAN_2006_10.pdf>. Acesso em 14 nov. 2014.

ZHANG, M. *et al.* Association study between an outbreak of guillain-barre syndrome in jilin, china, and preceding campylobacter jejuni infection. **Foodborne Pathogens and Disease**. Larchmont. v.7, n. 8, p. 913-919. Aug. 2010.