

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL**

**OCORRÊNCIA DE OVINOS PORTADORES DA INFECÇÃO POR *Campylobacter***  
**spp. NA MICRORREGIÃO GARANHUNS, PERNAMBUCO**

**ÉERICA CHAVES LÚCIO**

**RECIFE**

**2016**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL**

**ÉERICA CHAVES LÚCIO**

**OCORRÊNCIA DE OVINOS PORTADORES DA INFECÇÃO POR *Campylobacter*  
spp. NA MICRORREGIÃO GARANHUNS, PERNAMBUCO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal Tropical.

Orientador: Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Junior

**RECIFE**

**2016**

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

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal Tropical, outorgado pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, à disposição na Biblioteca Central desta universidade. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas às normas de ética científica.

**OCORRÊNCIA DE OVINOS PORTADORES DA INFECÇÃO POR *Campylobacter* spp. NA MICRORREGIÃO GARANHUNS, PERNAMBUCO**

Dissertação elaborada por

---

**ÉERICA CHAVES LÚCIO**

Aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Junior  
Orientador – Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

---

Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa  
Departamento de Zootecnia - UNIVASF

---

Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota  
Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

Dedico

*A minha família, grande incentivadora na  
concretização de todos os meus sonhos.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, luz que ilumina os meus dias, força maior que me faz perseverar nessa bela e incessante caminhada. Acredito que a fé, de uma maneira geral, é uma ponte sobre as águas turbulentas que nos levam através das tempestades para os portos seguros da calma e amor. Grata por tanto amor e bênçãos ao meu redor.

A minha querida mãe, exemplo de ser humano, por me ensinar que quem acredita e luta com honestidade, consegue. Em cada passo dado na vida (desde o primeiro, literalmente) foi a sua mão que esteve entrelaçada à minha.

A meu pai (*in memoriam*), que sempre lembro com imenso carinho e saudade. Obrigada por ser memória viva, que me fez ouvir sua voz, mesmo quando ela só falava dentro de mim.

A Ely, minha irmã e melhor amiga, agradeço por cada momento compartilhado, cada sorriso oferecido, cada palavra de incentivo e afago. Agradeço pela segurança de poder pensar: ela está do meu lado.

A toda minha família: avós, tios e primos, tão especiais, que se fizeram presentes, mesmo quando distantes fisicamente. Obrigada pelo apoio, torcida e orações.

Ao meu orientador José Wilton Pinheiro Junior, pela confiança, amizade, generosidade que partilha seus conhecimentos e disponibilidade permanente em ajudar. Muito obrigada!

Aos amigos Camila Pininga, Edmacya, Frederico e Jennifer, por aliviarem o fardo dos dias pesados, por crescerem junto comigo e me proporcionarem grandes e bons momentos.

A Marcos Antônio (Quinhos), por sua ajuda nas coletas, pelos chocolates levados no laboratório e amizade incondicional.

A Camilla Victor e Nathália Paula (Natita) pelo companheirismo e por tornar Recife uma cidade mais linda.

A Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG), por sempre me acolher e proporcionar condições necessárias à realização de boa parte desse trabalho. Em especial ao funcionário Ivanildo, que me recebia todos os dias com um sorriso largo, demonstrando o que é a alegria de se trabalhar, de se viver.

Aos companheiros do laboratório LARADIC, por compartilharem comigo o espaço e o tempo, pelas conversas, risadas e conselhos. Especialmente a Jonas pelo auxílio nas coletas e isolamento bacteriano; a André pelo auxílio na escolha das propriedades e coletas; e a Fernando pela ajuda na elaboração dos mapas.

Aos colegas dos laboratórios de bacterioses e viroses da UFRPE, pela agradável companhia e auxílio quando necessário.

A professora Elizabeth Rodrigues da Silva por sua amizade e por permitir a utilização da estufa do laboratório de Microbiologia.

Ao professor Rinaldo Aparecido Mota pelas valiosas sugestões que muito contribuíram para enriquecimento deste trabalho.

Aos professores Gisele Veneroni Gouveia e Mateus Matiuzzi da Costa, pela ajuda quando eu mais precisei, por indicar o caminho a ser trilhado e confiança depositada no meu trabalho.

A Cláudia Balzan, da UFSM, por estar sempre à disposição e gentilmente ceder cepas (ATCC).

A Sheila Duque, do Instituto Oswaldo Cruz, pela troca de experiências, disponibilidade e envio de cepas (ATCC).

A Facepe pela bolsa de estudos concedida durante a execução deste trabalho.

Enfim, a todos que ajudaram de alguma maneira durante essa jornada, muito obrigada!

“Qualquer um, independente das habilitações que tenha, ao menos uma vez na vida fez ou disse coisas muito acima da sua natureza e condição, e se a essas pessoas pudéssemos retirar do quotidiano pardo em que vão perdendo os contornos, ou elas a si próprias se retirassem de malhas e prisões, quantas mais maravilhas seriam capazes de obrar, que pedaços de conhecimento profundo poderiam comunicar, porque cada um de nós sabe infinitamente mais do que julga e cada um dos outros infinitamente mais do que neles aceitamos reconhecer”.

José Saramago (A Jangada e a Pedra)

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Área do estudo de ocorrência da infecção por <i>Campylobacter</i> spp. em ovinos na microrregião Garanhuns do estado de Pernambuco.	..... 57
<b>Figura 2.</b> Distribuição da ocorrência da infecção por <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i> em ovinos, na microrregião Garanhuns, estado de Pernambuco, Brasil, 2015.	..... 58
<b>Figura 3.</b> Distribuição da ocorrência da infecção por <i>Campylobacter jejuni</i> em ovinos, na microrregião Garanhuns, estado de Pernambuco, Brasil, 2015.	..... 59



## LISTA DE TABELAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabela 1.</b> Análise univariada dos fatores de risco ..... associados à infecção por <i>Campylobacter</i> spp. em ovinos na microrregião Garanhuns do estado de Pernambuco, Brasil.	<b>45</b>

## RESUMO

Objetivou-se com este estudo determinar a ocorrência e os fatores de risco associados à infecção por *Campylobacter* spp. em criações de ovinos na microrregião Garanhuns, no estado de Pernambuco, Brasil. Foram coletadas 421 amostras fecais de ovinos procedentes de 20 rebanhos para o isolamento de *Campylobacter* spp. As espécies *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* e *Campylobacter jejuni* foram identificadas por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Para análise dos fatores de risco foi realizada uma análise univariada e posteriormente regressão logística a partir de questionário com perguntas objetivas sobre o manejo higiênico-sanitário e reprodutivo. A ocorrência para *Campylobacter* spp. foi de 4,5% (19/421; I.C. 2,8% - 7,1%). Das 19 amostras positivas no cultivo, oito (1,9%; I.C. 0,9% - 3,9%) foram classificadas como *C. fetus* subsp. *fetus* e sete (1,7%; I.C. 0,7% - 3,6%) como *C. jejuni*, com co-infecção em quatro amostras (0,95%). O número de focos identificados foi de 35,0% (7/20) das criações de ovinos que apresentavam pelo menos um animal positivo. Na análise de regressão logística não foi identificada nenhuma das variáveis como fator de risco. Este é o primeiro registro da infecção por *Campylobacter* spp. em rebanhos ovinos no Nordeste do Brasil, concluindo-se que a infecção ocorre nesses rebanhos. Dessa forma, se faz necessário à implementação de medidas de controle e prevenção, para impedir a propagação do agente entre as criações, evitando prejuízos para ovinocultura e risco para saúde pública, uma vez que a campilobacteriose é considerada uma zoonose emergente.

**Palavras-chave:** Campilobacteriose, *Campylobacter*, Ovinos, Pernambuco.

## ABSTRACT

The objective of this study was to determine the occurrence and risk factors associated with infection with *Campylobacter* spp. in sheep creations in the micro-region Garanhuns, State of Pernambuco, Brazil. Were collected 421 fecal samples from sheep flocks coming 20 for the isolation of *Campylobacter* spp. and *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter fetus* species were identified by Polymerase Chain Reaction (PCR). To analyze the risk factors logistic regression was performed from the questionnaire with objective questions about the hygienic-sanitary and reproductive management. The occurrence of *Campylobacter* spp. it was 4.5% (19/421; C.I. 2.8% - 7.1%). The 19 positive samples in cultivation, eight (1.9% CI 0.9% - 3.9%) were classified as *C. fetus* subsp. *fetus* and seven (1.7% CI 0.7% - 3.5%) as *C. jejuni*, coinfecting with four stool samples (0.95%). The number of identified focus was 35.0% (7/20) of the creations of sheep that had at least one positive animal. In logistic regression analysis did not identify any of the variables as a risk factor. This is the first report of infection with *Campylobacter* spp. in sheep herds in northeastern Brazil, and it is concluded that infection occurs in those herds. Thus, it is necessary to implement prevention and control measures to prevent the propagation of agent between the creations, avoiding damage to sheep production and risk to public health, since campylobacteriosis is considered an emerging zoonosis.

**Keywords:** Campylobacteriosis, *Campylobacter*, Sheep, Pernambuco.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
2.1. Objetivo Geral.....	14
2.2. Objetivos Específicos.....	14
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
3.1. <i>Campylobacter</i> spp.....	15
3.2. Campilobacteriose ovina.....	16
3.2.1. Etiologia e epidemiologia.....	16
3.2.2. Sinais clínicos e patogenia.....	18
3.2.3. Diagnóstico.....	20
3.2.4. Diagnóstico diferencial .....	21
3.2.5. Prevenção e controle.....	21
3.3. <i>Campylobacter</i> como agente zoonótico.....	23
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>24</b>
<b>4. ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>39</b>
Resumo.....	40
Introdução.....	41
Material e Métodos.....	42
Resultados.....	45
Discussão.....	47
Conclusão.....	50
Referências.....	50
Figuras.....	57
<b>5. CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>60</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>61</b>
A – Questionário Investigativo.....	61
<b>ANEXOS.....</b>	<b>65</b>
A – Autorização da comissão de ética para uso de animais em experimentação e/ou ensino.....	65

## 1. INTRODUÇÃO

A ovinocultura destaca-se no cenário brasileiro por apresentar grande potencial de crescimento, contando com um efetivo que chega a mais de 17 milhões de cabeças, distribuídas principalmente nas regiões Nordeste e Sudeste do país. Na região Nordeste, a atividade tem um relevante significado econômico e social, sendo os animais em sua maioria pertencentes a raças deslanadas, adaptadas ao clima tropical, apresentando alta rusticidade e produção de carne e pele (FACÓ et al., 2008; IBGE, 2013).

Conforme a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO, 2007), a demanda de carne de ovinos nos países em desenvolvimento foi impulsionada pelo aumento populacional, urbanização e mudanças nos hábitos alimentares dos consumidores. No período de 2005 à 2014 estimou-se um crescimento anual de 2,1% na produção de carne ovina. Essa expansão pode ser justificada por algumas vantagens da atividade, como a necessidade de menor área de criação, menor consumo alimentar, facilidade de manejo e diversidade de produção de carne e pele de boa qualidade, servindo como alternativa de renda (FERNANDES, 2009).

O estado de Pernambuco apresenta um rebanho ovino de 1.830.647 animais (IBGE, 2013). Essa criação está destinada tanto à subsistência de famílias da zona rural como à exploração econômica com bases empresariais, embora ainda apresente um baixo desempenho produtivo e reprodutivo, devido a inúmeros fatores que acarretam sérios problemas sanitários (VIEIRA; CAVALCANTE; XIMENES, 1998; ARAÚJO NETO et al., 2010).

Dentre as doenças infecciosas que causam problemas reprodutivos na espécie ovina destaca-se a campilobacteriose. Essa enfermidade caracteriza-se por causar infertilidade temporária, endometrite, morte embrionária, nascimento de crias fracas e aborto geralmente no último trimestre da gestação (SKIRROW, 1994; SAHIN et al., 2008; SANAD et al., 2014; WU et al., 2014). Trata-se de uma zoonose, de distribuição mundial, causada por bactérias do gênero *Campylobacter*, que são transmitidas aos ovinos por via oral-fecal (HARIHARAN; MURPHY; KEMPF, 2004). No Brasil, os relatos de campilobacteriose em ovinos são escassos, se concentrando apenas no Rio Grande do Sul, onde houve isolamento de *Campylobacter* spp. em fetos abortados (VARGAS et al., 2005; GRESSLER et al., 2012).

Tendo em vista a falta de dados no país e as possíveis perdas econômicas causadas por problemas reprodutivos associados à campilobacteriose, pretende-se com este estudo, analisar os aspectos epidemiológicos relacionados à infecção por *Campylobacter* spp. em criações de ovinos procedentes da microrregião Garanhuns do estado de Pernambuco.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Analisar os aspectos epidemiológicos relacionados à infecção por *Campylobacter* spp. em ovinos na microrregião Garanhuns do estado de Pernambuco.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Determinar a ocorrência da infecção por *Campylobacter* spp. em ovinos na microrregião Garanhuns do estado de Pernambuco;
- Identificar os possíveis fatores de risco associados à infecção por *Campylobacter* spp. em ovinos na microrregião Garanhuns do estado de Pernambuco;
- Elaborar mapas com a distribuição da infecção por *Campylobacter* spp. em ovinos na microrregião Garanhuns do estado de Pernambuco.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. *Campylobacter* spp.

*Campylobacter* spp. pertence ao Domínio Bacteria, Filo Proteobacteria, Classe Epsilonproteobacteria, Ordem Campylobacteriales, Família Campylobacteraceae e Gênero *Campylobacter* (GARRITY; BELL; LILBURN, 2004). Em relação às espécies, ainda existem controvérsias entre os estudos, mas atualmente são descritas 34 espécies e 14 subespécies (LPSN, 2015).

O gênero *Campylobacter* spp. é caracterizado por bacilos espiralados gram-negativos, curtos e finos (0,2-0,8 $\mu$ m X 0,5-5 $\mu$ m), não produtores de esporos, microaerófilos, não hemolíticos, que ao se agruparem apresentam formato em “S”, de asa de gaiivota, ou ainda de vírgula (CRUSHELL et al., 2004). As células bacterianas ao permanecerem por prolongado tempo em meio de cultivo podem adquirir o formato esférico, indicando fase de degeneração (DEBRUYNE; GEVERS; VANDAMME, 2008). Geralmente possuem elevada motilidade pela presença de flagelo com comprimento de duas a três vezes maior que a célula, localizado em uma ou nas duas extremidades, promovendo um movimento característico de saca-rolhas (SMIBERT, 1978; PENNER, 1988).

Essas bactérias não oxidam e não fermentam carboidratos, obtendo energia através de aminoácidos e produtos intermediários do Ciclo de Krebs; não produzem acetoina, indol, ou qualquer pigmento; comumente são oxidase positivo e catalase variável (STERN et al., 2001; DEBRUYNE; GEVERS; VANDAMME, 2008). A temperatura de crescimento varia entre 25°C e 43°C (STERN et al., 2001), sendo que espécies termofílicas como *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari*, tem o crescimento otimizado a uma temperatura de 42°C a 43°C e constituem-se nas espécies mais isoladas em quadros de enterite humana e animal (WOO et al., 2002). Ocorre morte bacteriana a 60°C por 10 minutos e inativação a 4°C. Apresentam sensibilidade ao congelamento em alimentos, porém se for realizado congelamento rápido, as células que sobrevivem podem permanecer viáveis durante algumas semanas (FRANCO; LANDGRAF, 2002).

As principais ferramentas de virulência de *Campylobacter* spp. são: motilidade, aderência, invasão e produção de toxinas (WASSENAAR, 1997). A principal toxina descrita é a toxina citoletal distensiva, que é composta por três subunidades, codificadas pelos genes adjacentes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*, sendo a presença dos três genes exigida para



plena atividade da toxina (MARTINEZ et al., 2006; ASAKURA et al., 2007). Essa toxina impede o ciclo celular, interrompendo a mitose no estágio G2 e causando assim progressiva distensão e morte da célula. A proteína produzida pelo gene *cdtB* apresenta atividade de DNase, induzindo dano por quebra das duplas ligações, e as proteínas dos genes *cdtA* e *cdtC* transportam a proteína do *cdtB* para o interior da célula hospedeira (ASAKURA et al., 2008; SILVA et al., 2011).

A espécie *C. fetus* possui uma camada de proteínas de superfície (SAP – Surface array protein), também conhecida como camada *S-layer*. Essas proteínas conferem a bactéria uma elevada virulência, com resistência a fagocitose e impedindo a ativação da via alternativa do sistema complemento (GARCIA et al., 1995; YANG et al., 1992; PENN, 2001). As variações antigênicas que essas proteínas podem sofrer impedem a ação do sistema imune, permitindo o estabelecimento de infecções por longos períodos (WANG et al., 1993; VARGAS et al., 2002). Já foi demonstrado que a presença das proteínas de superfície em *C. fetus* subsp. *fetus* são imprescindíveis na indução de aborto (GROGONO-THOMAS et al., 2003).

## **3.2. Campilobacteriose ovina**

### **3.2.1. Etiologia e epidemiologia**

As principais espécies de *Campylobacter* causadoras de problemas reprodutivos em ovinos são: *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*, *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*, sendo as duas primeiras mais predominantes (CAMPERO et al., 2005; SAHIN et al., 2008; HAMALI et al., 2014). São usualmente encontradas nas fezes de animais domésticos e silvestres, aparentemente hígidos, e esses animais podem fazer parte da cadeia de transmissão do agente aos ovinos (STANLEY; JONES, 2003; OPORTO et al., 2007).

A transmissão de *Campylobacter* spp. aos ovinos ocorre por via oral-fecal e em todas as faixas etárias (HARIHARAN; MURPHY; KEMPF, 2004). *Campylobacter* spp. pode ser encontrado no solo, pastagem, água e leite, em decorrência do contato com animais que eliminam o agente nas fezes ou com restos placentários e abortamentos (SAID et al., 2003; GILPIN et al., 2008; HEUVELINK et al., 2009).

A eliminação fecal de *Campylobacter* por ovinos pode contaminar potencialmente pastagens e águas de superfície e em épocas de chuva haverá propagação das bactérias para áreas mais planas, águas subterrâneas, córregos e rios (BOLTON et al., 1987; STANLEY; CUNNINGHAM; JONES, 1998).

As aves domésticas e silvestres constituem os principais reservatórios de *C. jejuni* e *C. coli* (ALTEKRUSE et al., 1999). Dessa forma, existe a possibilidade de disseminação do agente em rebanhos fechados e contaminação do ambiente pelas fezes das aves predadoras que se alimentam de restos placentários e fetos abortados (DENNIS, 1967; HORROCKS et al., 2009). Nos Estados Unidos foi encontrada prevalência de 4,79% para *Campylobacter* termofílico em aves silvestres, sendo o primeiro relato de cepas comprovadamente patogênicas para ruminantes em aves desse tipo (SIPPY et al., 2012).

Ainda quanto à transmissão do agente, Sproston et al. (2010) indicaram que as moscas podem atuar como vetor em propriedades onde os animais eliminem *Campylobacter* spp., embora a carga bacteriana carregada por estes vetores seja baixa. Uma análise de fatores de risco, visando explicar o aumento sazonal no mês de junho dos casos de campilobacteriose em humanos na Inglaterra e País de Gales sugeriu que as moscas estavam envolvidas diretamente e indiretamente com os casos de infecções, por transportar material contaminado ao ter contato com fezes (NICHOLS et al., 2005).

Em relação à ocorrência dessa infecção em ovinos, Stanley et al. (1998) isolaram *Campylobacter* spp. a partir de 420 amostras fecais de ovelhas, com positividade de 29,3%, e destas 87,0% eram *C. jejuni*. Chanyalew et al. (2013) detectaram 33 (10,6%) isolados de *Campylobacter* spp. em amostras fecais e 87,9% foram classificadas como *C. jejuni*, ainda nesse estudo se constatou uma maior prevalência da infecção (60,6%) em ovinos de raças mistas. Em 2014, Lazou e colaboradores realizaram estudo em pequenos ruminantes em um matadouro na Grécia e detectaram a presença de *C. jejuni* em 69,7% das amostras analisadas, principalmente na espécie ovina.

Estudo conduzido na Universidade de Tabriz, no período de 2010 a 2011, analisando 132 fetos ovinos abortados e placentas pela reação em cadeia da polimerase (PCR), foram detectadas 12 (9,09%) amostras positivas para *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* e 2 (1,51%) para *Campylobacter jejuni*, não havendo amostras positivas para *Campylobacter coli* (HAMALI et al., 2014).

No Brasil os relatos de campilobacteriose em ovinos são escassos. Vargas et al. (2005) isolaram, no estado do Rio Grande do Sul, *Campylobacter jejuni* a partir de um feto ovino abortado no terço final da gestação. Posteriormente, Gressler et al. (2012) relataram pela primeira vez no país a ocorrência de aborto em ovinos causado por *Campylobacter fetus* subesp. *fetus*, identificado em fetos e natimortos ovinos naturalmente infectados também procedentes do Rio Grande do Sul.

Em relação aos fatores de risco associados à infecção por *Campylobacter* spp. poucos estudos foram realizados no mundo (JONES; HOWARD; WALLACE, 1990; STANLEY; JONES 2003; KOVATS et al., 2005; YANG et al., 2014). Na Inglaterra foi realizado um estudo para determinar a prevalência de *C. fetus* a partir de amostras fecais de ovinos e bovinos em 19 propriedades, e nos ovinos observou-se maior prevalência do micro-organismo durante o verão, sem associação com nenhuma prática de manejo adotada nas propriedades (DUNCAN et al., 2014). A campilobacteriose em humanos também já foi associada a fatores temporais, com aumento da infecção durante o verão (NYLEN et al., 2002).

As razões para essa sazonalidade da enfermidade permanecem desconhecidas, mas tem sido proposta uma associação das condições climáticas com o manejo adotado nas propriedades rurais, tais como mudança na alimentação e nos padrões das pastagens (STANLEY; JONES 2003; KOVATS et al., 2005).

Jones, Howard e Wallace (1999), pesquisaram espécies termofílicas de *Campylobacter* em rebanho ovino durante 12 meses com maior eliminação bacteriana (100%) coincidindo com as épocas de parição, desmame e troca de pasto. Reforçando a ideia que a eliminação de *Campylobacter* spp. está relacionada aos fatores estressantes a que os animais são submetidos. A principal espécie isolada foi *C. jejuni*, sobrevivendo nas fezes por até quatro dias, e os cordeiros foram infectados dentro de um a cinco dias após o nascimento. Yang et al. (2014) também encontraram em rebanhos de ovinos da Austrália uma maior concentração bacteriana de *C. jejuni* nas fases de desmame e pós-desmame.

### **3.2.2. Sinais clínicos e patogenia**

A campilobacteriose é caracterizada por causar infertilidade temporária, morte embrionária, nascimento de crias fracas, aborto geralmente no último trimestre da gestação e morte da fêmea em virtude da evolução do quadro de metrite. Os

mecanismos pelo qual esse agente, que pode estar presente no intestino desses animais sem causar alterações clínicas, progride para bacteremia ainda não estão muito claros (HEDSTROM et al., 1987; SKIRROW, 1994; GRESSLER et al., 2012).

Sanad et al. (2014) infectaram ovelhas gestantes com *C. jejuni* e estas apresentaram prolapso uterino parcial ou total com retenção da placenta, natimortalidade ou aborto. Foi observado ainda lesões histopatológicas, incluindo placentite supurativa necrosante e endometrite, associadas ao aumento da morte apoptótica de trofoblastos, aumento na expressão de genes ligados à morte celular e às respostas pró-inflamatórias no útero (interleucina IL-6 e IL-5), além de diminuição dos genes que codificam proteínas importantes para o desenvolvimento embrionário. Pela imunohistoquímica observou-se a presença de antígenos bacterianos nos trofoblastos que revestem a membrana corioalantóide.

Em outra infecção experimental de *C. jejuni* em ovelhas no terço final de gestação, ocorreram abortamentos após 7-12 dias da inoculação bacteriana. Uma grande concentração do agente foi encontrada nas carúnculas, bile, fezes, tecidos fetais e placenta. Histologicamente observou-se endometrite purulenta grave com vasculite, e nos fetos, broncopneumonia e necrose multifocal hepática (HEDSTROM et al., 1987). Já foram induzidos abortos em cobaias infectadas com *C. jejuni*, e as bactérias foram recuperadas dos tecidos placentários e fetais (BURROUGH et al., 2009).

A lesão considerada característica de campilobacteriose em fetos ovinos abortados é necrose circular hepática em torno de dois centímetros de diâmetro, com bordas elevadas mais claras e centros deprimidos (QUINN et al., 2005). Isso foi observado em casos de aborto provocados por *C. fetus* subsp. *fetus*, associados ainda com congestão e hemorragia multifocal acentuada no timo, autólise difusa moderada no intestino delgado, hemorragia multifocal leve nos rins e congestão difusa encefálica (GRESSLER et al., 2012).

Ainda não se tem muitos estudos relacionados à infecção por *Campylobacter* em machos e sua influência na qualidade espermática. Bar et al. (2008) contaminaram o sêmen ovino com *C. fetus* subsp. *fetus*, no intuito de observar possíveis alterações, e os espermatozóides contaminados mostraram uma diminuição na motilidade, vigor, aumento na reação acrossômica precoce, danos na cromatina e elevada expressão de receptores FAS, demonstrando efeito negativo sobre a qualidade do sêmen de carneiros.

### 3.2.3. Diagnóstico

A avaliação dos dados zootécnicos da propriedade, a observação dos sinais clínicos e do histórico dos animais auxilia no diagnóstico, sendo o primeiro passo para suspeitar de casos de campilobacteriose (ALVES et al., 2011).

O teste padrão e confirmatório para infecção por *Campylobacter* spp. é o isolamento e identificação do micro-organismo. Porém, essas bactérias são exigentes e possuem o crescimento mais lento que outros enteropatógenos, requerendo condições diferenciadas para seu crescimento (OYOFO et al., 1992). Com o intuito de aumentar a tolerância ao oxigênio deve-se adicionar aos meios de cultivo: sulfato ferroso, metabissulfito de sódio e piruvato de sódio, reduzindo assim componentes tóxicos como o peróxido de hidrogênio, íons superóxido e oxigênio simples (CORY et al., 1995; KUANA et al., 2008; SILVA et al., 2010).

Para favorecer o crescimento de *Campylobacter* spp. e inibir o de outras bactérias, os meios devem conter antibióticos específicos, como a vancomicina que inibe as bactérias gram-positivas, anfotericina B e cicloheximida que inibe fungos, e a trimetoprima que inibe *Proteus* spp. (KUANA et al., 2008; SILVA et al., 2010).

Quanto maior o intervalo entre a coleta e o cultivo bacteriano, menores são as chances de isolamento do agente. É recomendado o envio do material para processamento no período máximo de seis horas (PELLEGRIN; LEITE, 2003). Diante disso, foram desenvolvidos meios de transporte que permitem o maior sucesso do isolamento de *Campylobacter* spp., pelo aumento da viabilidade celular e redução no crescimento de contaminantes (LANDER, 1990; MONKE et al., 2002).

Lander (1990) desenvolveu um meio de transporte e enriquecimento, composto por carvão, suplemento FBP (piruvato de Sódio, metabissulfito de sódio e sulfato ferroso), antibióticos seletivos e antifúngico, capaz de manter a viabilidade de *C. fetus* em amostras clínicas por mais de três dias e inibir o crescimento de *Pseudomonas* e *Proteus*, mostrando-se mais eficiente que outros meios anteriormente descritos.

Métodos fenotípicos são limitados pela falta de uma padronização, interpretação subjetiva dos resultados e da existência de cepas atípicas bioquimicamente, além disso, são trabalhosos e demorados, tornando-os desvantajosos quando se processa grande número de amostras e há necessidade de um diagnóstico rápido (LINTON et al., 1996; HUM et al., 1997; IRAOLA et al., 2012). Os métodos moleculares se tornaram uma boa

alternativa para obtenção de resultados rápidos e altamente específicos (KULKARNI et al., 2002; LAPPIN, 2009; GROFF et al., 2010).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica eficiente e de fácil execução, apresentando especificidade e bom limite de detecção para *Campylobacter* spp. A principal vantagem é que a bactéria não precisa estar viável, basta seu DNA alvo da amplificação permanecer íntegro para identificação, diminuindo dessa forma os cuidados com a coleta e transporte do material (BASTYNS et al., 1994; RODRIGUES et al., 2004; SILVA et al., 2012; HAMALI et al., 2014).

Outros métodos empregados para identificação e caracterização de *Campylobacter* spp. são: teste de coaglutinação, que mostrou ser uma alternativa simples e rápida em comparação com o cultivo (ERGANIS et al., 2002); Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição do DNA (RFLP), uma das técnicas mais empregadas (AÇIK; ÇETINKAYA, 2006; OPORTO et al., 2007); Eletroforese em campo pulsátil (PFGE) (FITZGERALD et al., 2001; DEVANE et al., 2005; SAHIN et al., 2008; ON, 2013); Sequência de digitação multilocus (MLST), usada internacionalmente e considerada padrão ouro para subtipagem bacteriana (VAN BERGEN et al., 2005; ON, 2013); Polimorfismo de tamanho de fragmentos amplificados (AFLP) (DUIM et al., 2000; DUIM et al., 2001; CAMPOS, 2006); e imunohistoquímica de tecidos fetais (CAMPERO et al., 2005; SANAD et al., 2014).

#### **3.2.4. Diagnóstico diferencial**

O diagnóstico diferencial da campilobacteriose se faz com outras enfermidades que comumente causam problemas reprodutivos nos ovinos, principalmente abortos causados por *Chlamydomphila abortus* (ROSSI et al., 2012; LIMA et al., 2014), *Brucella ovis* (RIZZO et al., 2014), *Leptospira* spp. (HIGINO e AZEVEDO, 2014; CARNEIRO et al., 2015), *Listeria monocytogenes* (DREYER et al., 2015), *Salmonella* ser. Abortusovis (BELLOY et al., 2009), *Coxiella burnetti* (BROM et al., 2015), *Neospora caninum* (PINTO et al., 2012) e *Toxoplasma gondii* (DANTAS et al., 2014; GUIMARÃES et al., 2015).

#### **3.2.5. Prevenção e Controle**

Para controlar a campilobacteriose e impedir a disseminação de *Campylobacter* spp. nas criações é necessária a adoção de medidas gerais de manejo adequadas, visando

minimizar o estresse dos animais e conseqüentemente a eliminação bacteriana. Além do fornecimento de alimentação com qualidade e água clorada, deve-se evitar o contato destes com as fezes dos animais, realizando uma frequente limpeza das instalações (NYLEN et al., 2002; STANLEY; JONES, 2003; KOVATS et al., 2005; YANG et al., 2014). Também é indicado o controle de aves e moscas nas propriedades, pois podem servir como disseminadores da bactéria (DENNIS, 1967; ALTEKRUSE et al., 1999; HORROCKS et al., 2009; SPROSTON et al., 2010).

Em rebanhos nos quais ocorreram abortos causados por *Campylobacter* spp., houve controle dos problemas reprodutivos após utilização de oxitetraciclina na dose de 75mg/ovelha dia, combinada ao suplemento alimentar durante 14 dias. E as crias das fêmeas tratadas apresentaram desenvolvimento adequado, sem apresentação de qualquer alteração clínica (VARGAS et al., 2005). Os surtos de aborto também podem ser controlados pela utilização de eritromicina (4mg/kg – intramuscular) seguida por aplicação de oxitetraciclina de longa duração ou ainda por administração oral de clortetraciclina por 14 dias (75mg/kg) (WALT, 1994).

Para impedir a disseminação do agente também é recomendada a retirada dos produtos de abortamento das áreas que os animais tenham acesso, pois podem apresentar alta carga bacteriana (DENIS, 1967; CAMPERO et al., 2005; HAMALI et al., 2014).

Apesar do uso de antimicrobianos ser recomendado em surtos de aborto causados por *Campylobacter* spp., é fundamental a cultura e teste de sensibilidade do isolado para determinar o antimicrobiano mais adequado a utilizar. O uso prolongado deve ser desencorajado, para diminuir o risco de desenvolvimento de resistência antimicrobiana nas cepas (MENZIES, 2011).

Outra medida de controle e prevenção nos surtos de abortamento por *Campylobacter* spp. é a vacinação, embora a vacina não esteja disponível no Brasil (BRASIL, 2015). A vacinação preventiva nos animais que não estão apresentando problemas reprodutivos deve ser realizada no término do segundo terço de gestação das ovelhas (GILMOUR, THOMPSON, FRESER, 1975; HANSEN et al., 1990; GUMBRELL, SAVILLET, GRAHAM, 1996). Se ocorrer falha vacinal, além da técnica de vacinação e manuseio da vacina deve ser investigada a cepa envolvida nos casos de aborto na região, devido a grande variabilidade genética de *Campylobacter* spp.

(FITZGERALD et al., 2001; GROVE-WHITE et al., 2011; MENZIES, 2011; ON, 2013).

### **3.3. *Campylobacter* como agente zoonótico**

A campilobacteriose é uma zoonose de distribuição mundial, que leva a quadros de gastroenterite em humanos, e problemas neurológicos como a Síndrome de Guillain-Barré (ZONIOS et al., 2005; BOURQUE; CHARDON; MASSIE, 2015). Essa síndrome trata-se de uma polineuropatia desmielinizante inflamatória aguda progressiva, com origem autoimune, que leva a debilidade muscular, podendo evoluir para paralisia flácida e comprometer os músculos da respiração e levar a óbito (BENETI; SILVA, 2006).

No Reino Unido já foi considerada a causa mais frequente de diarreia bacteriana aguda, porém em alguns países, como o Brasil, os relatos de campilobacteriose são pouco descritos, sendo a enfermidade subdiagnóstica e subnotificada (KETLEY, 1997). Indivíduos com imunidade baixa como idosos, diabéticos, doentes hepáticos, portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e com câncer podem desenvolver uma forma grave de campilobacteriose (SORVILLO; LIEB; WATERMAN, 1991).

Com um estudo genético realizado na Inglaterra, identificou-se que 35% dos casos de infecção por *Campylobacter jejuni* em humanos foi a partir de aquisição com fontes bovinas e 4,3% de fontes ovinas (WILSON et al., 2008). As rotas de infecção incluem o consumo de leite cru, água contaminada com as fezes dos animais, ou o contato direto com as fezes em áreas rurais (SAID et al. 2003; GILPIN et al. 2008; HEUVELINK et al. 2009).

Foi encontrado um aumento na frequência de resistência a drogas que são importantes no tratamento da gastroenterite causada por *Campylobacter*, especialmente fluoroquinolonas e macrolídeos. Alguns grupos têm sugerido que o aumento da resistência entre isolados humanos é atribuível à transmissão de cepas antimicrobianorresistentes originadas de animais (PIDDOCK, 1995; SMITH et al. 1999). No geral, a campilobacteriose é uma das doenças infecciosas mais importantes e que desafiarão a saúde global nos próximos anos (KAAKOUSH et al. 2015).



## REFERÊNCIAS

AÇIC, M. N.; ÇETINKAYA, B. (2006) Heterogeneity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains from healthy sheep. *Vet Microbiol*, 115(4):370-375.

ALTEKRUSE, S. F. et al. (1999) *Campylobacter jejuni* - An emerging foodborne pathogen. *Emerg Infect Dis*, 5(1):28-35.

ALVES, T. M. et al. (2011) Campilobacteriose genital bovina e tricomonose genital bovina: epidemiologia, diagnóstico e controle. *Pesq Vet Bras*, 31(4):336-344.

ARAÚJO NETO, J. O. et al. (2010) Soroprevalência da leptospirose em caprinos da microrregião do Seridó Oriental, Estado do Rio Grande do Norte, Brasil, e pesquisa de fatores de risco. *Braz J Vet Res Anim Sci*, 47(2):150-155.

ASAKURA, M. et al. (2008) Development of a cytolethal distending toxin (cdt) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the detection and identification of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter fetus*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 52(2):260-266.

ASAKURA, M. et al. (2007) Comparative analysis of cytolethal distending toxin (cdt) genes among *Campylobacter jejuni*, *C. coli* and *C. fetus* strains. *Microb Pathog*, 42(5):174-183.

BAR, T. et al. (2008) Influence of *Campylobacter fetus subsp. fetus* on ram sperm cell quality. *J Med Microbiol*, 57(11):1405-1410.

BASTYNS, K. et al. (1994) Species-specific detection of *Campylobacters* important in veterinary medicine by PCR amplification of 23rDNA areas. *System Appl Microbiol*, 17(4):563-568.

BELLOU, L. et al. (2009). Diagnosis by culture and PCR of *Salmonella Abortusovis* infection under clinical conditions in aborting sheep in Switzerland. *Vet Microbiol*, 138(3):373-377.

BENETI, G. M.; SILVA, D. L. D. (2006) Guillain – Barré Syndrome. *Semina Cienc Biol Saude*, v.27(1):57-69.

BOLTON, F. J. et al. (1987) A study of thermophilic campylobacters in a river system. *J Appl Bacteriol*, 62(2):167-176.

BOURQUE, P. R.; CHARDON, J. W.; MASSIE, R. (2015) Autoimmune peripheral neuropathies. *Clin Chim Acta*, 449(1):37–42.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/portal/page/portal/InternetMAPA/paginainicial/animal/sanidade-animal/programas/prog-nacional-sanidade-caprinos-ovinos-PNSCO>>. Acesso em: 19 nov. 2015.

BROM, R. V. D. et al. (2015) *Coxiella burnetii* infections in sheep or goats: an opinionated review. *Vet Microbiol*, 181(1):119-129.

BURROUGH, E. R. et al. (2009) Pathogenicity of an emergent, ovine abortifacient *Campylobacter jejuni* clone orally inoculated into pregnant guinea pigs. *Am J Vet Res*, 70(10):1269-1276.

CAMPERO, C. M. et al. (2005) Immunohistochemical identification of *Campylobacter fetus* in natural cases of bovine and ovine abortions. *J Vet Med B*, 52(3):138-141.

CAMPOS, F. R. Isolamento e Caracterização de *Campylobacter* spp. em amostras e fezes e carcaças de suínos provenientes de abatedouros do Estado de São Paulo. 2006. 49p. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) - Universidade de São Paulo, SP. 2006.

CARNEIRO, L. A. et al. (2015). Investigação sorológica, molecular e anatomopatológica para leptospirose em ovinos (*Ovis aries*) procedentes de um biotério de criação. Rev Pan-Amaz Saude, 6(4):55-61.

CHANYALEW, Y. et al. (2013) Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of Thermophilic *Campylobacter* Isolated from Sheep at Debre Birhan, North-Shoa, Ethiopia. Kasetsart J (Nat Sci), 47(4):551-560.

CORRY, J. E. L. et al. (1995) Culture media for the isolation of Campylobacters. Int J Food Microbiol, 26(1):43-76.

CRUSHELL, E. et al. (2004) Enteric Campylobacter purging its secrets? Pediatr Res, 55(1):3-12.

DANTAS, S. B. A. et al. (2014). Risk factors associated with the occurrence of antibodies against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in domiciled dogs in Northeastern Brazil. Semina: Cienc Agra, 35(2):875-881.

DEBRUYNE, L.; GEVERS, D.; VANDAMME, P. (2008) Taxonomy of the family Campylobacteraceae: *Campylobacter*, 3<sup>a</sup> ed. Washington: ASM. 25p.

DENNIS, S. M. (1967) The possible role of the raven in the transmission of ovine vibriosis. Aust Vet J, 43(2):45-48.

DEVANE, M. L. et al. (2005) The occurrence of *Campylobacter* subtypes in environmental reservoirs and potential transmission routes. *J Appl Microbiol*, 98(4):980-990.

DREYER, M. et al. (2015) Outbreak investigation identifies a single *Listeria monocytogenes* strain in sheep with different clinical manifestations, soil and water. *Vet Microbiol*, 179(1):69-75.

DUIM, B. et al. (2000) Amplified fragment length polymorphism analysis of *Campylobacter jejuni* strains isolated from chickens and patients with gastroenteritis or Guillain-Barré or Miller Fisher syndrome. *Appl Environ Microbiol*, 66(9):3917-3923.

DUIM, B. et al. (2001) Differentiation of *Campylobacter* species by AFLP fingerprinting. *Microbiol*, 147(10):2729-2737.

DUNCAN, J. S. et al. (2014) Temporal and farm-management-associated variation in faecal-pat prevalence of *Campylobacter fetus* in sheep and cattle. *Epidemiol Infect*, 142(6):1196-1204.

ERGANIS, O. et al. (2002) Rapid diagnosis of ovine *Brucella*, *Campylobacter* and *Salmonella* infections from fetal stomach contents by coagglutination test. *Small Ruminant Res*, 45(2):123-127.

FACÓ, O. et al. (2008) Raça Morada Nova: Origem, Características e Perspectivas. Embrapa CNPC, Sobral-CE, Documentos (75). Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/533728/1/doc75.pdf>>. Acesso em: 28 mai. 2015

FAO. Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação, 2007. Disponível em: <[www.fao.org](http://www.fao.org)>. Acesso em: 16 set. 2015.

FERNANDES, C. E. Papel do ovino na cadeia epidemiológica da leptospirose pela *Leptospira* spp. sorovar Hardjo: fatores de risco que envolvem a infecção e transmissão entre ovinos e bovinos. 2009. 101p. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal, Segurança Alimentar e o Ambiente) - Instituto Biológico, São Paulo, SP. 2009.

FITZGERALD, C. et al. (2001) Evaluation of methods for subtyping *Campylobacter jejuni* during an outbreak involving a food handler. J Clin Microbiol, 39(7):2386-2390.

FRANCO, B. D. G.; LANDGRAF, M. (2002) Microbiologia dos Alimentos. São Paulo: Atheneu, 182p.

FREITAS, J. A.; NORONHA, G. N. (2007) Ocorrência de *Campylobacter* spp. em carne e miúdos de frango expostos ao consumo em Belém, Pará. Arq Bras Med Vet Zootec, 59(3):813-815.

GARCIA, M. M. et al. (1995) Protein shift and antigenic variation in the s-layer of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* during bovine infection accompanied by genomic rearrangement of *sapA* homologs. J Bacteriol, 177(8):1976-1980.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. G. (2004) Taxonomic outline of the prokaryotes. Bergey's manual of systematic bacteriology. 2ª ed. New York: Springer, 401p.

GILMOUR, N. J.; THOMPSON, D. A.; FRASER, J. (1975) Vaccination against *Vibrio* (*Campylobacter*) *fetus* infection in sheep in late pregnancy. Vet Rec, 96(6):129-131.

GILPIN, B. J. et al. (2008) The transmission of thermotolerant *Campylobacter* spp. to people living or working on dairy farms in New Zealand. *Zoonoses Public Health*, 55(7):352–360.

GRESSLER, L. T. et al. (2012) *Campylobacter fetus* subespécie *fetus*: abortamento e natimortalidade em ovinos. *Cienc Rural*, 42(4):697-700.

GROFF, A. et al. (2010) Polymerase chain reaction for the diagnosis of bovine genital campylobacteriosis. *Pesq Vet Bras*, 30(12):1031-1035.

GROGONO-THOMAS, R. et al. (2003) Role of S-layer protein antigenic diversity in the immune responses of sheep experimentally challenged with *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*. *Infect Immun*, 71(1):147-154.

GROVE-WHITE, D. H. et al. (2010) Temporal and farm-management-associated variation in the faecal-pat prevalence of *Campylobacter jejuni* in ruminants. *Epidemiol Infect*, 138(4):549-558.

GUIMARÃES, A. et al. (2015). Occurrences of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in sheep from four districts of Tocantins state, Brazilian Legal Amazon Region. *Pesq Vet Bras*, 35(2), 110-114.

GUMBRELL, R. C.; SAVILLE, D. J.; GRAHAM, C. F. (1996) Tactial control of ovine *Campylobacter* abortion outbreaks with a bacterin. *New Zeal Vet J*, 44(2):61-63.

HAMALI, H. et al. (2014) Detection of *Campylobacter* spp. in sheep aborted fetuses by PCR. *TLS*, 3(2):49-56.

HANSEN, D. E. et al. (1990) Efficacy of a vaccine to prevent *Chlamydia*-or *Campylobacter*-induced abortions in ewes. J Am Vet Med Assoc, 196(5):731-734.

HARIHARAN, H.; MURPHY G. A.; KEMPF, I. (2004) *Campylobacter jejuni*: public health hazards and potential control methods in poultry: a review. Vet Med, 49(11):441-446.

HEDSTROM, O. R. et al. (1987) Pathology of *Campylobacter jejuni* abortion in sheep. Vet Pathol, 24(5):419-426.

HEUVELINK, A. E. et al. (2009) Two outbreaks of campylobacteriosis associated with the consumption of raw cows' milk. Int J Food Microbiol, 134(1):70-74.

HIGINO, S. S. S. e AZEVEDO, S. S. (2014). Leptospirose em pequenos ruminantes: situação epidemiológica atual no Brasil. Arq Inst Biol, 81(1):86-94.

HORROCKS, S. M. et al. (2009) Incidence and ecology of *Campylobacter jejuni* and *coli* in animals. Anaerobe, 15(1):18-25.

HUM, S. et al. (1997) Evaluation of a PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subsp. Aust Vet J, 75(11):827-831.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da Pecuária Municipal, 2012. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/>>. Acesso em: 15 ago. 2015.

IRAOLA, G. et al. (2012) Application of a multiplex PCR assay for *Campylobacter fetus* detection and subspecies differentiation in uncultured samples of aborted bovine fetuses. *J Vet Sci*, 13(4):371-376.

JONES, K.; HOWARD, S.; WALLACE, J. S. (1999) Intermittent shedding of thermophilic campylobacters by sheep at pasture. *J Appl Microbiol*, 86(3):531-536.

KAAKOUSH, N. O. et al. (2015) Global Epidemiology of *Campylobacter* Infection. *Clin Microbiol Rev*, 28(3):687-720.

KETLEY, J. M. (1997) Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. *Microbiol*, 143(1):5-21.

KOVATS, R. S. et al. (2005) Climate variability and *Campylobacter* infection: an international study. *Int J Biometeorol*, 49(4):207-214.

KUANA, S. L. et al. (2008) Ocorrência de *Campylobacter* em lotes de frangos de corte e nas carcaças correspondentes. *Cienc Anim Bras*, 9(2):480-486.

KULKARNI, S. P. et al. (2002) Detection of *Campylobacter* species: a comparison of culture and polymerase chain reaction based methods. *J Clin Pathol*, 55(10):749-753.

LANDER, K. P. (1990) The development of a transport and enrichment medium for *Campylobacter fetus*. *Brit J Vet*, 146(4):327-333.

LAPPIN, M. R. (2009) Infectious disease diagnostic assays. *Top Companion Anim Med*, 24(4):199-208.



LAZOU, T. et al. (2014) *Campylobacter* in small ruminants at slaughter: Prevalence, pulsotypes and antibiotic resistance. *Int J Food Microbiol*, 173(1):54-61.

LIMA B. A. C. et al. (2014) Prevalence of antibodies to *Chlamydia abortus* in ovines in the Londrina area of Paraná state, Brazil. *Semina Cienc Agr*, 35(5):2507-2512.

LINTON, D. et al. (1996) Rapid identification by PCR of the genus *Campylobacter* and of five *Campylobacter* species enteropathogenic for man and animals. *Res Microbiol*, 147(9):707-718.

LPSN, List of prokaryotic names with standing in nomenclature, 2015. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/campylobacter.html>>. Acesso em: 05 nov. 2015

MARTINEZ, I. et al. (2006) Detection of *cdtA*, *cdtB*, and *cdtC* genes in *Campylobacter jejuni* by multiplex PCR. *Int J Med Microbiol*, 296(1):45-48.

MENZIES, P. I. (2011) Control of important causes of infectious abortion in sheep and goats. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 27(1):81-93.

MONKE, H. J. et al. (2002) Effect of transport enrichment medium, transport time and growth medium on the detection of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. *J Vet Diagn Invest*, 14(1):35-39.

NICHOLS, G. L. (2005) Fly transmission of *Campylobacter*. *Emerg Infect Dis*, 11(3):361-364.

NYLEN, G. et al. (2002) The seasonal distribution of *Campylobacter* infection in nine European countries and New Zealand. *Epidemiol Infect*, 128(3):383-390.

ON, S. L. W. (2013) Isolation, identification and subtyping of *Campylobacter*: where to from here? *J Microbiol Methods*, 95(1):3-7.

OPORTO, B. et al. (2007) Prevalence and strain diversity of thermophilic campylobacters in cattle, sheep and swine farms. *J Appl Microbiol*, 103(4):977-984.

OYOFO, B. A. et al. (1992) Specific Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by Using Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol*, 30(10):2613-2619.

PELLEGRIN, A.O.; LEITE, R.C. (2003) Atualização sobre Tricomonose Genital Bovina. Embrapa Pantanal, Corumbá-MS, Documentos (54). Disponível em: <<http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/DOC54.pdf>>. Acesso em: 19 mai. 2015.

PENN, C. W. (2001) Surface components of *Campylobacter* and *Helicobacter*. *J. Appl Microbiol*, 90(6):25-35.

PENNER, J. L. (1988) The genus *Campylobacter*: a decade of progress. *Clin Microbiol Rev*, 1(2):157-72.

PIDDOCK, L. J. (1995) Quinolone resistance and *Campylobacter* spp. *J Antimicrob Chemother*, 36(6):891-898.

PINTO, A. P. et al. (2012). Sheep abortion associated with *Neospora caninum* in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Pesq Vet Bras*, 32(8):739-742.

QUINN, P. J. et al. (2005) *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*. 1ª ed. Porto Alegre: Artmed, 415p.

RIZZO, H. et al. (2014). Ocorrência de anticorpos anti-*Brucella ovis* em ovinos com histórico de distúrbios reprodutivos no estado de São Paulo, Brasil. *Arq Inst Biol*, 81(2), 99-106.

RODRIGUES, M. A. et al. (2004) Standardization of in-house polymerase chain reaction for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* at the reference Tropical Disease Hospital in the State of Goiás, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 99(4):415-419.

ROSSI, R. S. et al. (2012). Sinais clínicos e ocorrência de anticorpos anti-*Chlamydomphila abortus* em ovinos de São Paulo e Minas Gerais. *Cienc Rural*, 42(11), 2018-2024.

SAHIN, O. et al. (2008) Emergence of a tetracycline-resistant *Campylobacter jejuni* clone associated with outbreaks of ovine abortion in the United States. *J Clin Microbiol*, 46(5):1663-1671.

SAID, B. et al. (2003) Outbreaks of infectious disease associated with private drinking water supplies in England and Wales 1970–2000. *Epidemiol Infect*, 130(3):469–479.

SANAD, Y. M. et al. (2014) Insights into potential pathogenesis mechanisms associated with *Campylobacter jejuni*-induced abortion in ewes. *BMC Vet Res*, 10(1):274.

SILVA, G. O. et al. (2012) Detecção de fatores de virulência em estirpes de *Campylobacter* spp. isoladas de carcaças de suínos abatidos em frigoríficos. Arq Bras Med Vet Zootec, 64(5):1209-1215.

SILVA, J. et al. (2011) *Campylobacter* spp. as foodborne pathogen: a review. Front Microbiol, 2(1):1-12.

SILVA, N. et al. (2010) Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos. 4ª ed. São Paulo: Varela, 625p.

SIPPY, R. et al. (2012) Occurrence and molecular analysis of *Campylobacter* in wildlife on livestock farms. Vet Microbiol, 157(3):369-375.

SKIRROW, M. B. (1994) Diseases due to *Campylobacter*, *Helicobacter* and related bacteria. J Comp Pathol, 111(2):113-149.

SMIBERT, R. M. (1978) The genus *Campylobacter*. Annu Rev Microbiol, 32(1):673-709.

SMITH, K. E. et al. (1999) Quinolone-resistant *Campylobacter jejuni* infections in Minnesota, 1992–1998. New Engl J Med, 340(20):1525–1532.

SORVILLO, F. J; LIEB, L. E.; WATERMAN, S. H. (1991) Incidence of campylobacteriosis among patients with aids in in Los Angeles County. J Acquir Immune Defic Syndr, 4(6):598-602.

SPROSTON, E. L. et al. (2010) Multi-locus sequence types of *Campylobacter* carried by flies and slugs acquired from local ruminant faeces. *J Appl Microbiol*, 109(3):829-838.

STANLEY, K.; JONES, K. (2003) Cattle and sheep farms as reservoirs of *Campylobacter*. *J Appl Microbiol*, 94(1):104-113.

STANLEY, K. N. et al. (1998) Seasonal variation of thermophilic campylobacters in lambs at slaughter. *J Appl Microbiol*, 84(6):1111–1116.

STANLEY, K. N.; CUNNINGHAM, R.; JONES, K. (1998) Thermophilic campylobacters in ground water. *J Appl Microbiol*, 85(1)187-191.

STERN, N. J. et al. (2001) Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, *Campylobacter*. 1<sup>a</sup> ed. Washington: APHA, 301p.

VAN BERGEN, M. A. P. et al. (2005) Clonal nature of *Campylobacter fetus* as defined by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol*, 43(12)5888-5898.

VARGAS, A. C. et al. (2005) Isolamento de *Campylobacter jejuni* em feto ovino abortado: relato de caso. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 57(3): 317-320.

VARGAS, A. C. et al. (2002) *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis* surface array protein from bovine isolates in Brazil. *Curr Microbiol*, 45(2):111-114.

VIEIRA, L. S.; CAVALCANTE, A. C. R.; XIMENES, L. F. (1998) Epidemiologia e controle das principais parasitoses de caprinos nas regioes semi-áridas do Nordeste.

Embrapa-CNPC, Sobral-CE. Disponível em: <  
livimagens.sct.embrapa.br/amostras/00064500.pdf>. Acesso em: 14 mar. 2015.

WALT, M. L. (1994) Infectious Diseases of Livestock with special reference to Southern Africa. 2<sup>a</sup> ed. United Kingdom: Oxford, 1605p.

WANG, E. et al. (1993) Shift in S-layer protein expression responsible for antigenic variation in *Campylobacter fetus*. J Bacteriol, 175(16):4979-4984.

WASSENAAR, T. M. (1997) Toxin production by *Campylobacter* spp. Clin Microbiol Rev, 10(3):466-476.

WILSON, D. J. et al. (2008) Tracing the Source of Campylobacteriosis. Plos Genet, 4(5):1-9.

WOO, P. C. et al. (2002) Thermo-tolerant *Campylobacter fetus* bacteraemia identified by 16S ribosomal RNA gene sequencing: an emerging pathogen in immunocompromised patients. J Med Microbiol, 51(9):740-746.

WU, Z. et al. (2014) Genetic diversity and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* isolates associated with sheep abortion in the United States and Great Britain. J Clin Microbiol, 52(6):1853-1861.

YANG, L. et al. (1992) Reattachment of surface array proteins to *Campylobacter fetus* cells. J Bacteriol, 174(4):1258-1267.

YANG, R. et al. (2014) Longitudinal prevalence, faecal shedding and molecular characterisation of *Campylobacter* spp. and *Salmonella enterica* in sheep. Vet J, 202(2):250-254.

ZONIOS, D. I. et al. (2005). *Campylobacter fetus* bacteraemia in a healthy individual: clinical and therapeutical implications. J Infect, 51(4)329–332.

#### **4. ARTIGO CIENTÍFICO**

### **OCCURRENCE OF SHEEP CARRIER OF INFECTION *Campylobacter* SPP. IN THE STATE OF PERNAMBUCO, BRAZIL**

**(Artigo submetido ao periódico *Preventive Veterinary Medicine*)**



1 **Occurrence of sheep carrier of infection *Campylobacter* spp. in the state of**  
2 **Pernambuco, Brazil**

3

4 **ABSTRACT**

5 The objective of this study was to determine the occurrence and risk factors  
6 associated with infection with *Campylobacter* spp. in sheep creations in the micro-  
7 region Garanhuns, State of Pernambuco, Brazil. Were collected 421 fecal samples from  
8 sheep flocks coming 20 for the isolation of *Campylobacter* spp. and *Campylobacter*  
9 *jejuni* and *Campylobacter fetus* species were identified by Polymerase Chain Reaction  
10 (PCR). To analyze the risk factors logistic regression was performed from the  
11 questionnaire with objective questions about the hygienic-sanitary and reproductive  
12 management. The occurrence of *Campylobacter* spp. it was 4.5% (19/421; C.I. 2.8% -  
13 7.1%). The 19 positive samples in cultivation, eight (1.9% CI 0.9% - 3.9%) were  
14 classified as *C. fetus* subsp. *fetus* and seven (1.7% CI 0.7% - 3.5%) as *C. jejuni*,  
15 coinfecting with four stool samples (0.95%). The number of identified focus was 35.0%  
16 (7/20) of the creations of sheep that had at least one positive animal. In logistic  
17 regression analysis did not identify any of the variables as a risk factor. This is the first  
18 report of infection with *Campylobacter* spp. in sheep herds in northeastern Brazil, and it  
19 is concluded that infection occurs in those herds. Thus, it is necessary to implement  
20 prevention and control measures to prevent the propagation of agent between the  
21 creations, avoiding damage to sheep production and risk to public health, since  
22 campylobacteriosis is considered an emerging zoonosis.

23 **Keywords:** Campylobacteriosis, *Campylobacter*, Sheep, Pernambuco.

## 24 **Introducion**

25           Reproductive problems in the sheep can be caused by numerous factors,  
26 infectious or non (Cardinal et al., 2010; Santos et al., 2012; Antoniassi et al., 2013).  
27 *Campylobacter* spp. stands out among the main infectious agents in several countries,  
28 with abortion rates caused by infection with this agent ranging from 5% to 50%  
29 (Skirrow, 1994; Agerholm et al., 2006; Wu et al., 2014).

30           *C. fetus* subsp. *fetus* and *C. jejuni* are the main species of *Campylobacter* spp.  
31 involved in abortion of sheep, which usually occurs in the last trimester of pregnancy.  
32 Other reproductive problems are reported are: placentitis, uterine infection,  
33 natimortality, birth of premature lambs and death of sheep due to metritis and  
34 septicemia (DeLong et al., 1996; Sahin et al., 2008; Hamali et al., 2014). The  
35 mechanisms by which the agent, which may be present in the intestines of sheep  
36 without causing clinical disease causes bacteremia frames are not yet fully elucidated  
37 (Hedstrom et al., 1987;. Skirrow, 1994; Sanad et al., 2014).

38           Campylobacteriosis is a zoonosis of worldwide distribution, which leads to  
39 gastroenteritis in humans (Zonios et al., 2005; Boer et al., 2013). In the UK it was  
40 already considered the most common cause of acute bacterial diarrhea, but in some  
41 countries, such as Brazil, campylobacteriosis reports remain just described, being  
42 underreported (Ketley, 1997).

43           Little has been studied in relation to the dynamics of infection with  
44 *Campylobacter* spp. in sheep and the associated risk factors, with only two case reports  
45 of infection in sheep in Rio Grande do Sul (Vargas et al., 2005; Gressler et al., 2012)  
46 and a study in the state of São Paulo (Rizzo et al., 2015). Given this lack of information,

47 the economic impact that the disease can cause to the flocks, and concern for public  
48 health, the aim of this study was to determine the occurrence and risk factors associated  
49 with infection by *Campylobacter* spp. in sheep creations.

50

## 51 **Material and methods**

### 52 **Sampling**

53 A cross-sectional study from November 2014 to June 2015 in 20 creations of  
54 sheep, from 19 municipalities in the state of Pernambuco, Brazil (Figure 1). The  
55 properties were selected from non-probabilistic for convenience. For the sample was  
56 considered a total of 92,074 sheep in the area (IBGE, 2012) and an expected prevalence  
57 of 50% for *Campylobacter* spp. infection. With this ratio is maximized the size of the  
58 sample, with a confidence interval of 95% and statistical error of 5%. This parameter  
59 provided a minimum size to be examined in 385 sheep (Thrusfield, 2007), being  
60 collected in this study stool samples from 421 animals in a systematic random. For the  
61 calculation of samples per property used the computer program WinEpiScope 2.0. There  
62 were no exclusion criteria in relation to race, gender, age and rearing systems.

63

### 64 **Collection of biological material and bacterial isolation**

65 Fecal samples were collected by rectal palpation with use of procedure glove  
66 and packaged in sterile vials containing 20 mL of means of transport and enrichment  
67 (TEM) (Lander, 1990) and sent at room temperature to Garanhuns Laboratories Center  
68 (CENLAG) Federal Rural University of Pernambuco for its proper processing.

69 In the laboratory, the samples were incubated at 37 °C for 72 hours under  
 70 microaerophilic conditions (10% CO<sub>2</sub>, 6% O<sub>2</sub>, 84% N<sub>2</sub>) and subsequently plated on  
 71 Columbia agar (Difco®), added with 7% defibrinated horse blood and selective  
 72 supplement Skirrow for *Campylobacter* spp. (Merck®) and again incubated in  
 73 microaerophilic conditions for 72 hours. After incubation was performed phenotypic  
 74 analysis of colonies by morphology and Gram staining (Quinn et al., 2005). The  
 75 colonies with characteristics consistent with *Campylobacter* spp. had their DNA  
 76 extracted from "QIAGEN DNA Easy Blood and Tissues Kit" (Qiagen®), according to  
 77 manufacturer's protocol. After extraction the DNA was quantified with  
 78 spectrophotometer PicoDrop and the quality of the samples was analyzed by the ratio of  
 79 absorption at 260/280 nm.

80

### 81 **Polymerase Chain Reaction (PCR)**

82 It was used as a template the DNA extracted from bacterial colonies as described  
 83 above, and 2,5µL his suspension were added to 10µl of Gotaq Green Master Mix  
 84 (Promega®). The primers used in the reactions for amplification of genomic material *C.*  
 85 *fetus* subsp. *fetus* were: MG3F (5'GGTAGCCGCAGCTGCTAAGAT3') and MG4R  
 86 (5'TAGCTA CAATAACGACAAC3'); VenSF  
 87 (5'CTTAGCAGTTTGCGATATTGCCATT3') and VenSR  
 88 (5'GCTTTTGAGATAACAATAAGAGCTT3') (Hum et al., 1997). For *C. jejuni* were  
 89 used CL2 (5'TGACGCTAGTGTTGTAGGAG3') and CR3  
 90 (5'CCATCATCGCTAAGTGCAAC3') described by Wang et al. (1999). Positive  
 91 controls reactions to *C. fetus* subsp. *fetus* and *C. fetus* subsp. *venerealis* were provided  
 92 by the Federal University of Santa Maria and *C. jejuni* by the Oswaldo Cruz Foundation  
 93 (CCAMP0008 e CCAMP00159). As a negative control was ultrapure water used. The

94 amplified products were identified by agarose gel electrophoresis (1.5%), stained with  
95 Blue Green (LGCbio®), visualized under UV light and documented in image capture  
96 system.

97

### 98 **Analysis of risk factors**

99 For analysis of the factors was applied a standardized investigative questionnaire,  
100 comprised of objective questions to the creator, for the hygiene and health and  
101 reproductive management. Descriptive analysis was performed to calculate the  
102 frequencies relative and absolute the results in the agent search. To identify risk factors  
103 associated with infection by *Campylobacter* spp. was performed a univariate analysis of  
104 the variables of interest using Pearson's chi-square test or Fisher exact test, as needed.  
105 Subsequently, a logistic regression analysis dependent variable considering PCR  
106 (positive or negative) was made. The independent or explanatory variables considered  
107 in the model were those that showed statistical significance  $<0.20$ . This probability was  
108 set for possible risk factors of the event were not excluded from the analysis (Hosmer;  
109 Lemeshow, 1989). The Epi Info 3.5.2 program was used to perform statistical  
110 calculations.

111

### 112 **Spatial analysis**

113 It was built thematic map with the distribution of the occurrences of *Campylobacter*  
114 spp infection. in Garanhuns micro-region, in the state of Pernambuco, Brazil. The  
115 location of the properties was obtained with the aid of a satellite positioning system  
116 (GPS-Global Positioning System). For mapping and identification of spatial clusters,  
117 the georeferenced data were released in the Terra View 3.13 software.

118

119 **License Ethics Committee**

120 The project was approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of  
121 the Federal Rural University of Pernambuco, with license No. 042/2014.

122

123 **Results**

124 Of the 421 samples tested, 19 (4.5%; C.I. 2.8% - 7.1%) were positive for  
125 *Campylobacter* spp. And eight (1.9%; I.C. 0.9% - 3.9%) samples classified as *C. fetus*  
126 subsp. *fetus* seven (1.7%; C.I. 0.7% - 3.6%) as *C. jejuni* PCR from the cultivation, the  
127 co-infected into four samples (0.95%). Regarding the number of outbreaks, 35.0%  
128 (7/20) of the studied sheep creations they had at least one positive animal (Figures 2 and  
129 3).

130 In the univariate analysis there was a significant association for the variables  
131 creation system, purchase of animals, not conducting quarantine and presence of  
132 reproductive problems (Table 1). In logistic regression analysis was not confirmed any  
133 of the variables as a risk factor.

134

135 **Table 1.** Univariate analysis of risk factors associated with infection by *Campylobacter*  
136 spp. in sheep in Garanhuns micro-region of the state of Pernambuco, Brazil.

Variable	N <sup>a</sup>	PCR Positive	OR <sup>b</sup> (C.I.95%) <sup>c</sup>	p-value
<b>Property area</b>				
Urban	15	1 (6.7%)	-	0.569
Rural	386	18 (4.7%)		
Periurban	20	0 (0.0%)		
<b>Tamanho do criatório</b>				
≤ 25 animals	115	2 (1.7%)	-	0.244
26 - 50 animals	201	11 (5.5%)		
51 - 100 animals	15	0 (0.0%)		
≥ 100 animals	90	6 (6.7%)		

<b>Breed</b>				
Defined	266	12 (4.5%)	0.99 (0.35 – 3.06)	0.587
Undefined	155	7 (4.5%)		
<b>Sex</b>				
Female	311	11 (3.5%)	0.46 (0.16 – 1.38)	0.091
Male	110	8 (7.3%)		
<b>Age (months)</b>				
≤ 9	71	1 (1.4%)	-	0.699
10 – 18	71	3 (4.2%)		
19 – 24	84	4 (4.8%)		
25 – 36	73	4 (5.5%)		
≥ 37	122	7 (5.7%)		
<b>Creation System</b>				
Intensive	78	1 (1.3%)		0.007*
Semi-Intensive	285	11 (3.9%)	3.09 (0.39 – 24.32)	
Extensive	58	7 (12.1%)	3.42 (1.27 – 9.23)	
<b>Flock</b>				
Closed	114	1 (0.9%)	0.14 (0.00 – 0.92)	0.018*
Open	307	18 (5.9%)		
<b>Feeding</b>				
Pasture	145	7 (4.8%)	-	0.233
Pasture with supplementation	179	5 (2.8%)	0.57 (0.18 – 1.82)	
Silo and concentrated	97	7 (7.2%)	2.71 (0.84 – 8.77)	
<b>Provided water source</b>				
Standing water	401	19 (4.7%)		0.388
Running water	20	0 (0.0%)	-	
<b>Power Change</b>				
Yes	57	0 (0.0%)	-	0.059
No	364	19 (5.2%)		
<b>Reproductive problems</b>				
Yes	264	17 (6.4%)	5.33 (1.23 – 48.09)	0.008*
No	157	2 (1.3%)		
<b>Quarantine realization</b>				
Yes	105	1 (1.0%)	0.15 (0.00 – 1.03)	0.028*
No	316	18 (5.7%)		
<b>Access to wetlands</b>				
Yes	314	13 (4.1%)	0.72 (0.25 – 2.39)	0.346
No	107	6 (5.6%)		

---

<b>Use of esterqueira</b>				
Yes	43	1 (2.3%)	0.47 (0.01 – 3.17)	0.402
No	378	18 (4.8%)		
<b>Growing of poultry</b>				
Yes	370	19 (5.1%)	-	0.081
No	51	0 (0.0%)		

---

137 <sup>a</sup> Total number of samples.

138 <sup>b</sup> OR = odds ratio

139 <sup>c</sup> C.I. = confidence interval

140 \* p <0.05, significant association

141

## 142 **Discussion**

143 This is the first report of infection with *Campylobacter* spp. in sheep in the  
 144 Northeast of Brazil. In the country, only two reports of infection have been previously  
 145 published, both in the state of Rio Grande do Sul, where there was isolation of  
 146 *Campylobacter* spp. in aborted fetuses. Vargas et al. (2005), identified as *C. jejuni*  
 147 causes four abortions in a herd of 22 sheep, with the hypothesis that infection has  
 148 occurred due to the presence of chickens in the property, who fed and drank water with  
 149 the sheep. While Gressler et al. (2012) method detected by molecular *C. fetus* subsp.  
 150 *fetus* in two stillborn fetuses and four sheep naturally infected in late pregnancy third.

151 It was observed that although in this study of *C. fetus* subsp. *fetus* has been  
 152 detected with a higher incidence, there was no big difference between the number of  
 153 isolates of this and *C. jejuni*. In several regions of the world *C. fetus* subsp. *fetus* has  
 154 been isolated species most frequently in reproductive problems in sheep flocks  
 155 (Fenwick et al. 2000; Grogono-Thomas et al. 2003; Mannering et al. 2003; Mannering  
 156 et al. 2004; Campero et al. 2005; Duncan et al., 2014; Hamali et al. 2014). However, in  
 157 the United States it was noted an increased frequency of *C. jejuni* (DeLong et al., 1996).  
 158 Regardless of the different frequency isolation of the species *Campylobacter* spp. found



159 in the studies, it is emphasized that *C. fetus* subsp. *fetus* and *C. jejuni* can cause  
160 reproductive problems in sheep and have zoonotic potential.

161 The research developed with *Campylobacter* spp. in sheep are usually held in  
162 herds with a history of reproductive problems. Thus, it is believed that epidemiological  
163 studies should also be carried out without reproductive problems in cattle, in order to  
164 identify the sheep as a reservoir to reduce environmental contamination and prevent  
165 cases of miscarriages. Studies already indicate that healthy sheep can participate in a  
166 more significant way than cattle in the contamination of the environment and food by  
167 removal of *Campylobacter* spp. (Stanley et al., 1998; Açık e Çetinkaya, 2006).

168 Factors that interfere with fecal elimination of zoonotic microorganisms such as  
169 *Campylobacter*, are still not well elucidated, with little data available on naturally  
170 infected animals. Studies have shown that there is seasonality in this elimination in  
171 temperate countries (Stanley et al., 1998; Grove-White et al., 2010; Jorgensen et al.,  
172 2011; Duncan et al., 2014), but in climates tropical, like Brazil, you do not have records  
173 of the influence of the seasons in the elimination of this bacteria.

174 Concerning the number of animals with positive properties, there has been an  
175 agent distribution among herds studied region (7/20). This is a concern because it has  
176 been shown that a small proportion of animals may be responsible for a great  
177 elimination of bacteria (Stanley and Jones 2003). Through this spatial distribution of  
178 infection, it can establish a planning and development of measures that can control the  
179 spread of the agent.

180 There was a significant association in the univariate analysis between open herd  
181 ( $p = 0.018$ ) and not conducting quarantine ( $p = 0.028$ ) with the infection. It is likely that  
182 the purchase of infected animals and the lack of knowledge of the producers are

183 responsible for the introduction and maintenance of *Campylobacter* spp. the creations.

184 All owners reported that they make no prior examination to the purchase of animals.

185         The highest risk of infection in properties with extensive farming is probably  
186 associated with greater contact with contaminated food and contact with birds, which  
187 are reservoirs of *Campylobacter* spp. (Smibert, 1978; Humphrey et al., 2007; Horrocks  
188 et al., 2009; Sears et al., 2011). All properties where the samples were positive had  
189 poultry flocks. In a survey conducted in England, it was also identified an association  
190 between infection with *C. fetus* and extensive cattle (Duncan et al., 2014).

191         There was an association between infection and the presence of reproductive  
192 disorders in cattle ( $p = 0.008$ ). Of the seven positive creations of *Campylobacter* spp.,  
193 five (71.4%) had a history of reproductive problems, and in all these cases of  
194 miscarriages occurred in the last third of pregnancy, campylobacteriosis characteristic  
195 of sheep (Hedstrom et al., 1987; Skirrow, 1994; Sanad et al., 2014). Studies should be  
196 conducted to identify bacteria in the placenta of sheep and aborted fetuses to confirm  
197 the agent's involvement in cases of abortions in sheep.

198         Still on the reproductive problems, some authors have *Campylobacter* spp. say  
199 the elimination rates can become elevated due to stress or multiple infections that  
200 reduce animal immunity (Stanley and Jones, 2003; Yang et al., 2014). Jones et al.  
201 (1999) observed that higher amounts of elimination of bacteria coincide with farrowing,  
202 weaning and changing pasture, as well as sheep that did not eliminate *Campylobacter*  
203 spp. before delivery started agent elimination after parturition. In this study, all positive  
204 feces samples were coming from animals with recent changes in feeding.

205         In all creations of the study was not done any sort of fly control and the presence  
206 of these is common in the studied creations. It has been proven that in properties where  
207 animals eliminate *Campylobacter* spp. in feces, flies can serve as vectors, contaminating

208 water and food, despite the low bacterial load carried from by them (Sproston et al.,  
209 2010). It was also observed good hygiene practices, such as cleaning the employee  
210 boots, which can be important in the introduction and maintenance of the exposure of  
211 animals to the agent, as well as the employees themselves (Kazwala et al., 1990;  
212 Humphrey et al., 1993).

213 The relationship between sheep and infection by *Campylobacter* spp. in humans  
214 has been reported (Raji et al., 2000). The results obtained in this study have impact on  
215 public health, since *Campylobacter* spp. is a frequent pathogen in human infections  
216 caused from gastroenteritis to bacteremia and a variety of systemic complications (Adak  
217 et al., 2005; Zonios et al., 2005; Boer et al., 2013).

218

## 219 **Conclusion**

220 From the results obtained it is noted that sheep are infected *Campylobacter* spp.  
221 Thus, it is necessary to implement measures for control and prevention, to avoid  
222 spreading of the agent of the creations, avoiding damage to sheep production and risk to  
223 public health, since campylobacteriosis is considered an emerging zoonosis.

224

## 225 **Acknowledgements**

226 The FACEPE for the scholarship granted and CNPq for financial support  
227 (process n°447664/2014-0).

228

## 229 **References**

230 Açık, M. N., & Cetinkaya, B. (2006). Heterogeneity of *Campylobacter jejuni* and  
231 *Campylobacter coli* strains from healthy sheep. *Vet Microbiol*, 115(4), 370-375.

232

- 233 Adak, G. K., Meakins, S. M., Yip, H., Lopman, B. A., & O'Brien, S. J. (2005). Disease  
234 risks from foods, England and Wales, 1996–2000. *Emerg Infect Dis*, 11(3), 365-72.  
235
- 236 Agerholm, J. S., Aalbaek, B., Fog-Larsen, A.M., Boye, M., Holm, E., Jensen, T. K.,  
237 Lindhardt, T., Larsen, L. E. & Buxton, D. (2006). Veterinary and medical aspects of  
238 abortion in Danish sheep. *Apmis*, 114(2), 146-152.  
239
- 240 Antoniassi, N. A., Juffo, G. D., Santos, A. S., Pescador, C. A., Corbellini, L. G., &  
241 Driemeier, D. (2013). Causas de aborto bovino diagnosticadas no Setor de Patologia  
242 Veterinária da UFRGS de 2003 a 2011. *Pesq. Vet. Bras*, 33(2), 155-160.  
243
- 244 Boer, R. F., Ott, A., Güren, P., Zanten, E. V., Belkum, A. V., & Kooistra-Smid, A. M.  
245 (2013). Detection of *Campylobacter* species and *Arcobacter butzleri* in stool samples by  
246 use of real-time multiplex PCR. *J Clin Microbiol*, 51(1), 253-259.  
247
- 248 Campero, C. M., Anderson, M. L., Walker, R. L., Blanchard, P. C., Barbano, L., Chiu,  
249 P., Martínez, A., Combessies, G., Bardon, J. C., & Cordeviola, J. (2005).  
250 Immunohistochemical identification of *Campylobacter fetus* in natural cases of bovine  
251 and ovine abortions. *J Vet Med*, 52(3), 138-141.  
252
- 253 Cardinal, S. G., Aniz, A. C., Santos, B. S., Carvalho, N. M., & Lemos, R. A. (2010).  
254 Lesões perinatais em cordeiros induzidas pela administração de *Tetrapterys*  
255 *multiglandulosa* (Malpighiaceae) a ovelhas em diferentes estágios de gestação. *Pesq.*  
256 *Vet. Bras*, 30(1), 73-78.  
257
- 258 DeLong, W. J., M. D. Jaworski, and A. C. Ward. 1996. Antigenic and restriction enzyme  
259 analysis of *Campylobacter* spp. associated with abortion in sheep. *Am. J. Vet. Res.*  
260 57:163–167.  
261
- 262 Duncan, J. S., Leatherbarrow, A. J. H., French, N. P., & Grove-White, D. H. (2014).  
263 Temporal and farm-management-associated variation in faecal-pat prevalence of  
264 *Campylobacter fetus* in sheep and cattle. *Epidemiol Infect*, 142(6), 1196-1204.  
265

- 266 Fenwick, S. G., D. M. West, J. E. Hunter, N. D. Sargison, F. Ahmed, J. S. Lumsden, &  
267 M. G. Collett. (2000). *Campylobacter fetus fetus* abortions in vaccinated ewes. N. Z.  
268 Vet. J. 48(5),155–157.
- 269
- 270 Gressler, L. T., Kirinus, J. K., Machado, G., Libardoni, F., & de Vargas, A. C. (2012).  
271 *Campylobacter fetus* subespécie *fetus*: abortamento e natimortalidade em ovinos. Cienc  
272 Rural, 42(4), 697-700.
- 273
- 274 Grogono-Thomas, R., M. J. Blaser, M. Ahmadi, & D. G. Newell. (2003). Role of S-  
275 layer protein antigenic diversity in the immune responses of sheep experimentally  
276 challenged with *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*. Infect. Immun. 71(1), 147–154.
- 277
- 278 Grove-White, D. H., Leatherbarrow, A. J. H., Cripps, P. J., Diggle, P. J., & French, N.  
279 P. (2010). Temporal and farm-management-associated variation in the faecal-pat  
280 prevalence of *Campylobacter jejuni* in ruminants. Epidemiol Infect, 138(04), 549-558.
- 281
- 282 Hamali, H., Fallah, S., Joozani, R. J., Zare, P., & Noorsaadat, G. (2014). Detection of  
283 *Campylobacter* spp. in sheep aborted fetuses by PCR. TLS, 3(2), 49-56.
- 284
- 285 Hedstrom, O. R., Sonn, R. J., Lassen, E. D., Hultgren, B. D., Crisman, R. O., Smith, B.  
286 B., & Snyder, S. P. (1987). Pathology of *Campylobacter jejuni* abortion in sheep. Vet  
287 Pathol, 24(5), 419-426.
- 288
- 289 Horrocks, S. M., Anderson, R. C., Nisbet, D. J., & Ricke, S. C. (2009). Incidence and  
290 ecology of *Campylobacter jejuni* and *coli* in animals. Anaerobe, 15(1), 18-25.
- 291
- 292 Hosmer, D.W. and Lemeshow, S., 1989. Applied logistic regression. (New York: John  
293 Wiley & Sons).
- 294
- 295 Hum, S., Quinn, K., Brunner, J., & On, S. L. (1997). Evaluation of a PCR assay for  
296 identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. Aust Vet J, 75(11),  
297 827-831.
- 298

- 299 Humphrey, T., O'Brien, S., & Madsen, M. (2007). *Campylobacters* as zoonotic  
300 pathogens: a food production perspective. *Int J Food Microbiol*, 117(3), 237-257.  
301
- 302 Humphrey, T.J., Henley, A. and Lanning, D.G. (1993). The colonization of broiler  
303 chickens with *Campylobacter jejuni*: some epidemiological investigations. *Epidemiol*  
304 *Infect*, 110(3), 601–607.  
305
- 306 IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sistema IBGE de Recuperação  
307 Automática. Disponível em <[http://www.sidra. ibge.gov.br/bda/](http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/)>. Acessado em 26 jul.  
308 2013.  
309
- 310 Jones, K., Howard, S., & Wallace, J. S. (1999). Intermittent shedding of thermophilic  
311 campylobacters by sheep at pasture. *J Appl Microbiol*, 86(3), 531-536.  
312
- 313 Jorgensen, F., Ellis-Iversen, J., Rushton, S., Bull, S. A., Harris, S. A., Bryan, S. J.,  
314 Gonzalez, A. & Humphrey, T. J. (2011). Influence of season and geography on  
315 *Campylobacter jejuni* and *C. coli* subtypes in housed broiler flocks reared in Great  
316 Britain. *Appl Environ Microbiol*, 77(11), 3741-3748.  
317
- 318 Kazwala, R. R., Collins, J. D., Hannan, J., Crinion, R. A., & O'mahony, H. (1990).  
319 Factors responsible for the introduction and spread of *Campylobacter jejuni* infection in  
320 commercial poultry production. *Vet Rec*, 126(13), 305-306.  
321
- 322 Ketley, J. M. (1997). Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*.  
323 *Microbiology*, 17(1), 5-21.  
324
- 325 Lander, K. P. (1990). The development of a transport and enrichment medium for  
326 *Campylobacter fetus*. *Brit Vet J*, 146(4), 327-333.  
327
- 328 Mannering, S. A., D. M. West, S. G. Fenwick, R. M. Marchant, N. R. Perkins, & K.  
329 O'Connell. (2004). Pulsed-field gel electrophoresis typing of *Campylobacter fetus*  
330 subsp. *fetus* isolated from sheep abortions in New Zealand. *N. Z. Vet. J.* 52 (6), 358–  
331 363.

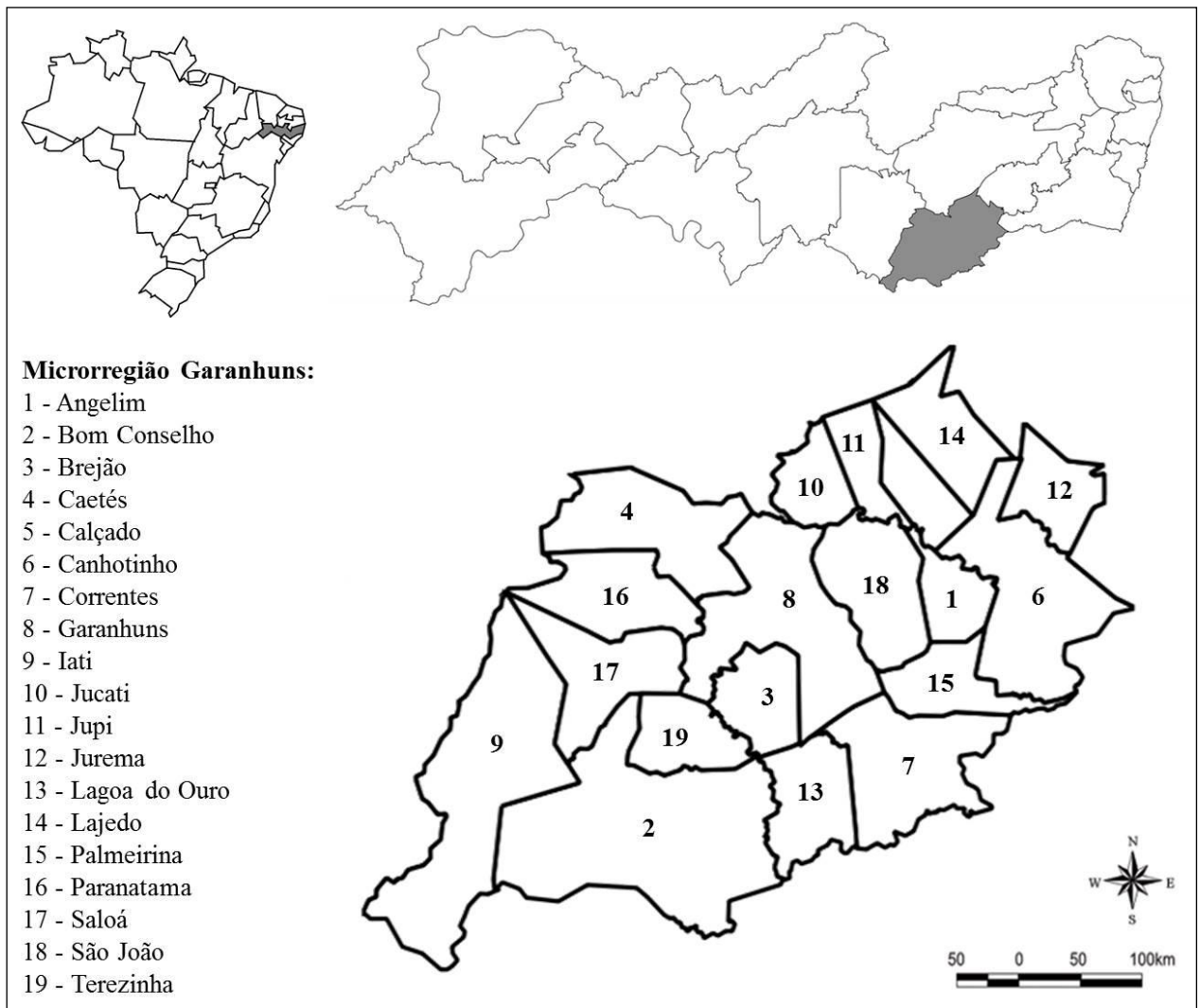
- 332 Mannering, S. A., R. M. Marchant, A. Middelberg, N. R. Perkins, D. M. West, & S. G.  
333 Fenwick. (2003). Pulsed-field gel electrophoresis typing of *Campylobacter fetus* subsp.  
334 *fetus* from sheep abortions in the Hawke's Bay region of New Zealand. N. Z. Vet. J.  
335 51(1), 33–37.
- 336
- 337 Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B., Carter, G.R., 1994. Clin Vet Microbiol. Wolfe,  
338 London, 648pp.
- 339
- 340 Raji, M. A., Adekeye, J. O., Kwaga, J. K. P., & Bale, J. O. O. (2000). Bioserogroups of  
341 *Campylobacter* species isolated from sheep in Kaduna State, Nigeria. Small Rumin Res,  
342 37(3), 215-221.
- 343
- 344 Rizzo, H., Gregory, L., Beraldi, F., Carvalho, A. F., Pinheiro, E. S. (2015).  
345 *Campylobacter* isolation from the feces of sheep with a history of reproductive  
346 disorders bred in the state of São Paulo, Brazil. Semina Cienc Agr, 36(6), 4207-4214.
- 347
- 348 Sahin, O., Plummer, P. J., Jordan, D. M., Sulaj, K., Pereira, S., Robbe-Austerman,  
349 S., Wang, L., Yaeger, M. J., Hoffman, L. J. & Zhang, Q. (2008). Emergence of a  
350 tetracycline-resistant *Campylobacter jejuni* clone associated with outbreaks of ovine  
351 abortion in the United States. J Clin Microbiol, 46(5), 1663-1671.
- 352
- 353 Sanad, Y. M., Jung, K., Kashoma, I., Zhang, X., Kassem, I. I., Saif, Y. M., &  
354 Rajashekara, G. (2014). Insights into potential pathogenesis mechanisms associated  
355 with *Campylobacter jejuni*-induced abortion in ewes. BMC Vet Res, 10(1), 274.
- 356
- 357 Santos, J. R. S., Dantas, A. F., & Riet-Correa, F. (2012). Malformações, abortos e  
358 mortalidade embrionária em ovinos causada pela ingestão de *Mimosa tenui lora*  
359 (Leguminosae). Pesq. Vet. Bras, 32(11), 1103-1106.
- 360
- 361 Sears, A., Baker, M. G., Wilson, N., Marshall, J., Muellner, P., Campbell, D. M., Lake,  
362 D. M. & French, N. P. (2011). Marked campylobacteriosis decline after interventions  
363 aimed at poultry, New Zealand. Emerg Infect Dis, 17(6), 1007-1015.
- 364

- 365 Skirrow, M. B. (1994). Diseases due to *Campylobacter*, *Helicobacter* and related  
366 bacteria. *J Comp Pathol*, 111(2), 113-149.
- 367
- 368 Smibert, R. M. (1978). The genus campylobacter. *Annual Reviews in Microbiology*,  
369 32(1), 673-709.
- 370
- 371 Sproston, E. L., Ogden, I. D., MacRae, M., Forbes, K. J., Dallas, J. F., Sheppard, S.  
372 K., Cody, A., Colles, F., Wilson, M. J., & Strachan, N. J. C. (2010). Multi-locus  
373 sequence types of *Campylobacter* carried by flies and slugs acquired from local  
374 ruminant faeces. *J Appl Microbiol*, 109(3), 829-838.
- 375
- 376 Stanley, K., & Jones, K. (2003). Cattle and sheep farms as reservoirs of *Campylobacter*.  
377 *Appl Environ Microbiol*, 94(1), 104-113.
- 378
- 379 Stanley, K.N., Wallace, J.S., Currie, J.E., Diggle, P.J., Jones, K. (1998). Seasonal  
380 variation of thermophilic campylobacters in lambs at slaughter. *J Appl Microbiol* 84(6),  
381 1111–1116.
- 382
- 383 Thrusfield, M., 2002. *Veterinary Epidemiology*. 3rd Edition. Blackwell Science,  
384 Cambridge. 624p.
- 385
- 386 Vargas, A. C., Cecim, M., Viana, L. R., Spricigo, D. A., & Costa, M. M. (2005).  
387 Isolation of *Campylobacter jejuni* from ovine aborted fetus: case report. *Arq Bras Med*  
388 *Vet Zootec*, 57(3), 317-320.
- 389
- 390 Wang, H., Farber, J. M., Malik, N., & Sanders, G. (1999). Improved PCR detection of  
391 *Campylobacter jejuni* from chicken rinses by a simple sample preparation procedure.  
392 *Int J Food Microbiol*, 52(1), 39-45.
- 393
- 394 Wu, Z., Sippy, R., Sahin, O., Plummer, P., Vidal, A., Newell, D., & Zhang, Q. (2014).  
395 Genetic diversity and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* isolates  
396 associated with sheep abortion in the United States and Great Britain. *J Clin Microbiol*,  
397 52(6), 1853-1861.

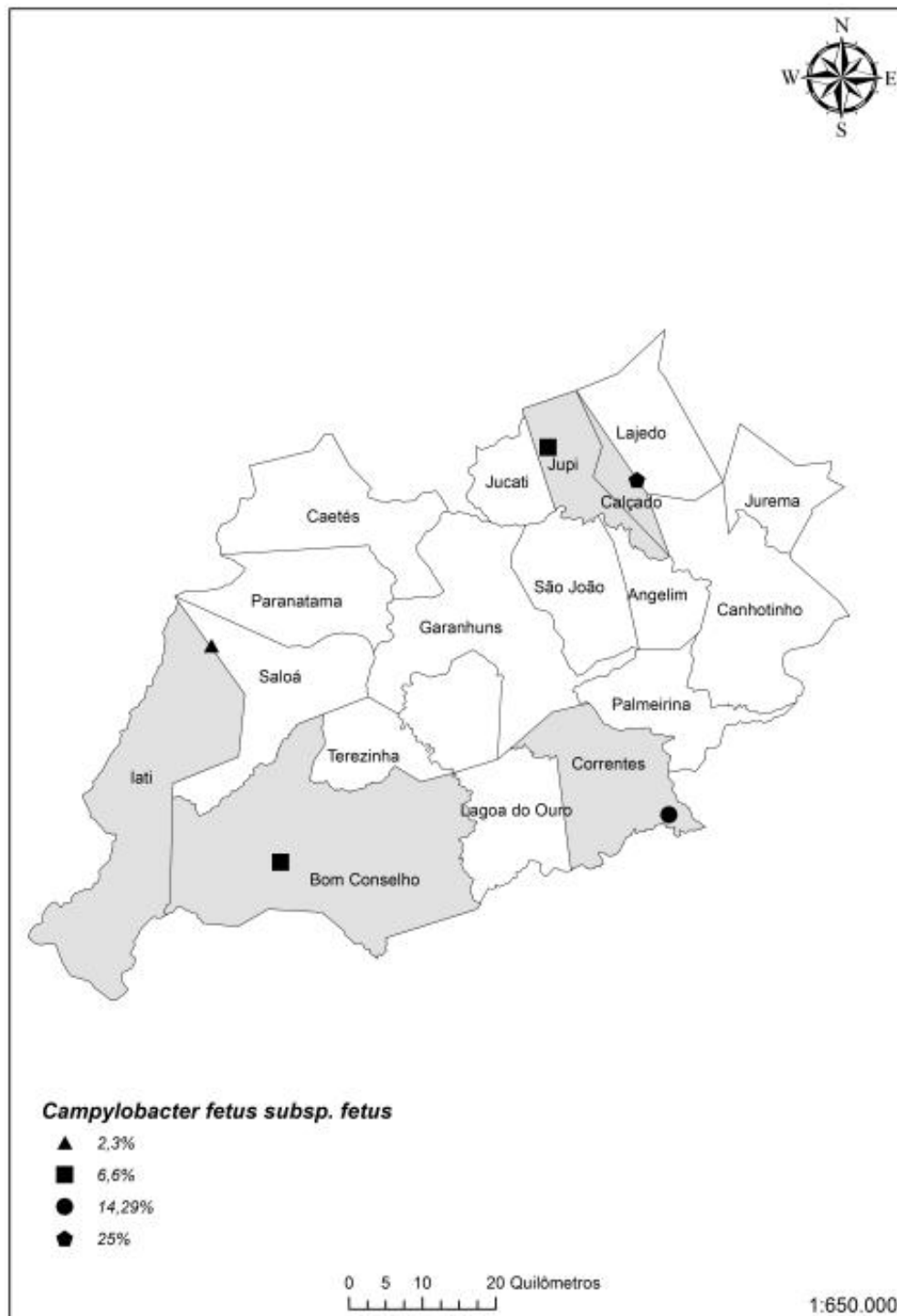


- 398 Yang, R., Jacobson, C., Gardner, G., Carmichael, I., Campbell, A. J., & Ryan, U.  
399 (2014). Longitudinal prevalence, faecal shedding and molecular characterisation of  
400 *Campylobacter* spp. and *Salmonella enterica* in sheep. *Vet J*, 202(2), 250-254.  
401
- 402 Zonios, D. I., Panayiotakopoulos, G. D., Kabletsas, E. O., Tzima, E. L., Stefanou, I., &  
403 Archimandritis, A. J. (2005). *Campylobacter fetus* bacteraemia in a healthy individual:  
404 clinical and therapeutical implications. *J Infect*, 51(4), 329-332.

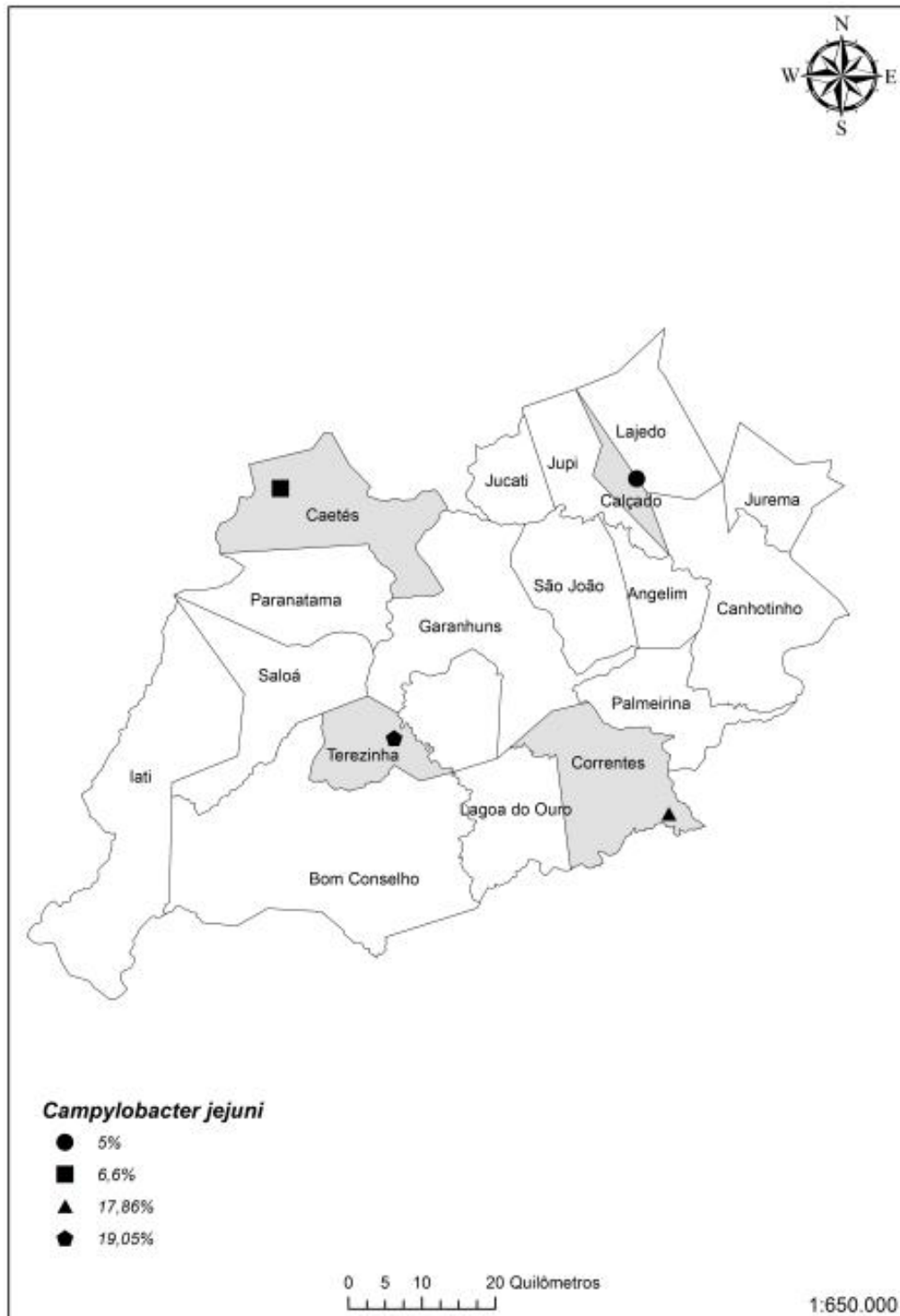
## FIGURES



**Figure 1.** Study area occurrence of infection with *Campylobacter* spp. in sheep in the micro-region Garanhuns, Pernambuco state.



**Figure 2.** Infection event of distribution for *Campylobacter fetus subsp. fetus* in sheep, in micro-region Garanhuns, state of Pernambuco, Brazil, 2015.



**Figure 3.** Infection event of distribution of *Campylobacter jejuni* in sheep, in micro-region Garanhuns, state of Pernambuco, Brazil, 2015.

## 5. CONCLUSÕES GERAIS

A partir dos resultados obtidos observa-se que as ovelhas são infectadas por *Campylobacter* spp, com elevado número de focos. Identificou-se associação significativa da infecção com a compra de animais, não realização de quarentena, sistema de criação extensivo e presença de problemas reprodutivos nas propriedades. Assim, é necessária a implementação de medidas de controle e prevenção, para evitar a propagação do agente nas criações, evitando prejuízos à ovinocultura e os riscos para a saúde pública, uma vez que a campilobacteriose é considerada uma zoonose emergente.

**APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO INVESTIGATIVO**

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS  
LABORATÓRIO DE DOENÇAS INFECTO-CONTAGIOSAS  
Avenida Bom Pastor, s/n. – Boa Vista, Garanhuns/PE  
55.296-901 - Telefone: (87) 3761.0969 ou 3761.0882

**QUESTIONÁRIO INVESTIGATIVO PARA CAMPILOBACTERIOSE OVINA**

FICHA Nº:

PROPRIEDADE Nº

DATA: / /

INVESTIGADOR:

**IDENTIFICAÇÃO****Fazenda:****Proprietário:****Endereço:****Município:****Telefone:****E-mail:****Coordenada geográfica:****Precipitação anual:****Área:** ( ) Urbana ( ) Rural ( ) Peri-Urbana

## **DADOS GERAIS**

### **1) Tamanho do criatório:**

- a) Abaixo de 25 animais
- b) Entre 26 e 50 animais
- c) Entre 51 e 100 animais
- d) Acima de 100 animais

### **2) Raça dos animais:**

- a) Santa Inês
- b) Morada Nova
- c) Dorper
- d) SRD
- e) Outra \_\_\_\_\_

### **3) Os animais tem acesso a alagadiços:**

- a) Sim
- b) Não

### **4) Presença de estábulo:**

- a) Sim
- b) Não

### **5) Alimentação:**

- a) Pastagem
- b) Silo
- c) Concentrado

### **6) Origem da água fornecida:**

- a) Poço
- b) Açudes
- c) Córregos e riachos
- d) Água tratada

### **7) Sistema de criação:**

- a) Intensivo
- b) Semi-intensivo
- c) Extensivo

### **8) Criação de outras espécies:**

a) Não

b) Sim

Bovinos ( ) **Aves** ( ) Caninos ( ) Outras ( ) \_\_\_\_\_

**9) Existe assistência veterinária na propriedade:**

a) Sim

b) Não

c) Temporária/Esporádica

**10) Quando importa animais realiza quarentena:**

a) Sim

b) Não

**11) Quando importa animais realiza algum exame para posterior introdução no rebanho:**

a) Sim

b) Não

**12) Presença de moscas nas instalações:**

a) Sim

b) Não

**13) Utilização de esterqueira:**

a) Sim

b) Não

**14) Houve mudança de alimentação nos últimos tempos?**

a) Sim

b) Não

**15) Os animais para reposição são provenientes da propriedade:**

a) Sim

b) Não

**16) Tipo de manejo reprodutivo:**

a) Monta Natural

b) Inseminação artificial

c) Transferência de embriões

**17) Problemas reprodutivos que foram observados:**

a) Aborto



- b) Natimortos
- c) Nascimento de cordeiros prematuros
- d) Repetição de cio
- e) Corrimento vaginal

**18) Se houve caso de aborto, em qual terço da gestação ocorreu:**

- a) 1/3
- b) 2/3
- c) 3/3

**19) Os problemas reprodutivos foram observados depois de algum momento de estresse (mudança de pasto, dieta de baixa qualidade, transporte, épocas do ano mais quentes...):**

- a) Sim
- b) Não

## ANEXO A - AUTORIZAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA PARA USO DE ANIMAIS EM EXPERIMENTAÇÃO E/OU ENSINO



**Universidade Federal Rural de Pernambuco**  
 Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n,  
 Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE

### Comissão de ética no uso de animais - CEUA

#### Licença para o uso de animais em experimentação e/ou ensino

O Comitê de ética no uso de animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no uso de suas atribuições, autoriza a execução do projeto discriminado abaixo. O presente projeto também se encontra de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11794/2008.

Número da licença	042/2014
Número do processo	23082.003577/2014
Data de emissão da licença	07 de abril de 2014
Título do Projeto	Análise epidemiológica da infecção por <i>Campylobacter spp.</i> em ovinos do Agreste Meridional do estado de Pernambuco.
Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão)	Pesquisa
Responsável pela execução do projeto	José Wilton Pinheiro Júnior.
Colaboradores	Érica Chaves Lúcio; Júnior Mário Baltazar de Oliveira; Antonio Fernando Barbosa Batista Filho; Daniel Friguglietti Brandespim; Mateus Matiuzzi da Costa; Jonas de Melo Borges; Rinaldo Aparecido Mota.
Tipo de animal e quantidade total autorizada	Ovino; total de 385 animais.

*Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim*

Prof. Dr. Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim  
 (Presidente em Exercício da CEUA-UFRPE)

