

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

RENATA RESENDE PRADO

INFLUÊNCIA DA VIDA SÉSSIL E PLANCTÔNICA NO PERFIL DE
RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE *Campylobacter jejuni*
ISOLADAS DE CARCAÇAS DE FRANGOS COMERCIALIZADAS NO
BRASIL

UBERLÂNDIA
2017

RENATA RESENDE PRADO

INFLUÊNCIA DA VIDA SÉSSIL E PLANCTÔNICA NO PERFIL DE RESISTÊNCIA
ANTIMICROBIANA DE *Campylobacter jejuni* ISOLADAS DE CARCAÇAS DE
FRANGOS COMERCIALIZADAS NO BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Uberlândia, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Saúde Animal

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daise Aparecida Rossi

UBERLÂNDIA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- P896i
2017
- Prado, Renata Resende, 1986
Influência da vida séssil e planctônica no perfil de resistência antimicrobiana de *Campylobacter jejuni* isoladas de carcaças de frangos comercializadas no Brasil / Renata Resende Prado. - 2017.
78 f. : il.
- Orientadora: Daise Aparecida Rossi.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2017.60>
Inclui bibliografia.
1. Veterinária - Teses. 2. Antibióticos - Teses. 3. Biofilme - Teses. 4. Drogas - Resistência em micro-organismos - Teses. I. Rossi, Daise Aparecida. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

INFLUÊNCIA DA VIDA SÉSSIL E PLANCTÔNICA NO PERFIL DE RESISTÊNCIA
ANTIMICROBIANA DE *Campylobacter jejuni* ISOLADAS DE CARCAÇAS DE
FRANGOS COMERCIALIZADAS NO BRASIL

Dissertação aprovada para a obtenção
do título de Mestre no Programa de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias, da
Universidade Federal de Uberlândia,
pela banca examinadora formada por:

Uberlândia, 03 de agosto de 2017.

Prof^a. Dr^a. Daise Aparecida Rossi (Orientadora) – FAMEV/UFU

Dr^a. Eliane Pereira Mendonça – LABIO/FUNDAP/UFU

Prof^a. Dr^a. Aline Teodoro de Paula – UNITRI

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

RENATA RESENDE PRADO– Nascida em Araguari, Estado de Minas Gerais, em 02 de setembro de 1986, filha de Divino Resende Do Prado e Maria de Fátima De Jesus Prado. Médica Veterinária, graduada em 29 de março de 2012 pela Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Goiás. Durante a graduação foi estagiária na Brasil Foods (BRF), na unidade de Jataí, GO, no período de agosto 2011 a fevereiro de 2012. Estagiária no Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada (LABIO) desde julho de 2013 até julho de 2017. Em 2015 iniciou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias na Universidade Federal de Uberlândia, área de concentração em Saúde Animal, no qual foi bolsista pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), de março de 2016 a março de 2017.

"Dê-me, Senhor,
agudeza para entender,
capacidade para reter,
método e faculdade para aprender,
sutileza para interpretar,
graça e abundância para falar.
Dê-me, Senhor,
acerto ao começar,
direção ao prosseguir,
e perfeição ao concluir"

São Tomás de Aquino

"Os animais foram criados pela mesma
mão caridosa de Deus que nos criou. É
nosso dever protegê-los e promover o
seu bem-estar."

Madre Teresa de Calcutá

Aos meus pais, Divino Resende do Prado e Maria de Fátima de Jesus Prado que sempre me incentivaram e apoiaram meus estudos. Pelos seus exemplos de fé e persistência, não medindo esforços para que esta etapa fosse concluída.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que sempre esteve ao meu lado me abençoando e permitindo que a cada dia eu possa crer em sua onipresença e onipotência para que toda essa etapa pudesse ser cumprida.

Aos meus pais, Divino Resende e Maria de Fátima por confiar e acreditar no meu crescimento pessoal e profissional, pelo apoio que tive na minha caminhada, pela compreensão e incentivo que sempre me deram nos momentos de decisões enfim, em especial por todo carinho.

Aos meus irmãos, Carlos Eduardo e Tânia Mara, pelo carinho, por todo apoio em pensamentos e atitudes positivas e pelo exemplo que são como pessoas persistentes e batalhadoras.

Aos meus cunhados, Débora Nasciutti e Carlos Eduardo Senju, pela força, palavras de incentivo e por todo apoio.

As minhas sobrinhas e afilhadas que tanto amo, Eduarda, Sophia e a Isabela, por terem me proporcionado momentos descontraídos e divertidos, que através da inocência e da pureza pude aprender o lado doce da vida.

Ao meu noivo Gustavo Sestari que sempre esteve ao meu lado, sendo o meu suporte e equilíbrio através de seus conselhos, afetos e carinhos. Agradeço meu amor, por você ter sido tão paciente e compreensivo pelos dias que abdiquei a sua presença para os estudos.

A minha segunda família, Sílvia e Roberto Sestari que esteve tão presente nestes últimos anos, agradeço pelos conselhos, ensinamentos e por me apoiar.

A minha orientadora prof.^a dr.^a Daise Rossi, que sempre foi uma mãe para os seus “filhos”. Sempre esteve a disposição com seus conhecimentos enriquecedores nos abrindo e nos ensinando. Muito obrigada por ter me acolhido!!

A todos os professores mestres e doutores que proporcionaram de alguma forma a contribuição necessária para a conclusão deste trabalho, em especial a prof.^a Dr.^a Kênia Carrijo, prof. Dr. Ednaldo Guimarães e o prof. Dr. Ubirajara Coutinho.

Ao Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada da Universidade Federal de Uberlândia (LABIO-UFU) por disponibilizar o espaço físico e condições para que o projeto pudesse ser executado.

A todos os meus amigos de laboratório, Roberta, Eliane, Guilherme e Priscila, pois foram sempre o alicerce do meu conhecimento. Todos com muita dedicação, empenho, amor e paciência me ensinaram tudo o que foi necessário para a execução deste trabalho. Sempre serão meus amigos do coração. E em especial agradeço a minha amiga Silvia Cassimiro Brasão por todos os dias de muito empenho e aprendizado, juntas descobrimos que o conhecimento não é importante por si só, mas aliado a ele, a fé, persistência, dedicação é a certeza de que tudo já deu certo!!

A todos os estagiários em especial o Phelipe Peres, Sara, Dani que além de me proporcionarem dias alegres e divertidos, sempre estiveram de prontidão para me ajudar, desde a lavagem de algum material ou a produção de meio de cultura até a contribuição na pesquisa.

Aos técnicos do laboratório, Franscesca e Marcelo não só pela ajuda no que foi preciso como também os conselhos, os puxões de orelha, e as boas conversas nas horas vagas. Meu muito obrigada!!

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudo concedida e pelo apoio financeiro para o desenvolvimento de toda a pesquisa.

Aos professores que aceitaram compor esta banca de defesa, Eliane Mendonça e a Aline Teodoro. Obrigada por se disponibilizarem a realizar a leitura, correções e avaliação deste trabalho.

A todas as pessoas que me ajudaram ou permitiram de alguma forma para que essa etapa fosse cumprida, muito obrigada de coração.

RESUMO

Campylobacter spp. está entre os agentes etiológicos bacterianos mais frequentes em doenças gastrintestinais de origem alimentar em todo o mundo. A espécie *C. jejuni* é a mais implicada na doença humana quando comparada a *C. coli* e demais espécies. A principal fonte de infecção humana para a campilobacteriose é o consumo de alimentos de origem animal contaminados, com destaque para a carne de frango. A dissertação foi dividida em dois capítulos, sendo o primeiro referente às considerações gerais que embasam os assuntos abordados no segundo capítulo. Foram revisadas as características de virulência de *Campylobacter*, formação de biofilmes, resistência aos antibióticos e filogenia. No segundo capítulo foram analisadas 30 cepas de *C. jejuni* previamente isoladas de carcaças de frango, no período de 2015 a 2016, produzidas por uma empresa brasileira com ciclo completo de produção, sob inspeção federal e habilitada à exportação. Avaliou-se a susceptibilidade das cepas aos antimicrobianos antes e após a formação de biofilmes em meio de cultivo tradicional e meio de cultivo adicionado de *chicken juice*, que simula as condições nutricionais do ambiente industrial. A técnica utilizada foi a de difusão em discos, sendo os resultados utilizados para criar perfis de resistência aos antimicrobianos. A concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada para a tetraciclina utilizando a técnica da microdiluição em caldo. A similaridade genética entre as cepas foi determinada por meio da técnica de RAPD-PCR. Para comparar a resistência das cepas antes e após formação de biofilmes (com e sem *chicken juice*) no teste de difusão foi utilizado o teste binomial para duas proporções, e para a CIM, o teste de Friedman, ambos com 95% de probabilidade.

Palavras-chave: Antibióticos. Biofilme. *Chicken juice*. CIM. RAPD.

ABSTRACT

Campylobacter spp. is one of the most common bacterial etiological agents of food-borne gastrointestinal diseases worldwide. Among the species, *C. jejuni* is the most implicated in human disease when compared to *C. coli* and other ones. The main source of human infection for Campylobacteriosis is the consumption of contaminated food of animal origin, especially chicken meat. The dissertation was divided in two chapters, the first one referring to the general considerations that support the subjects discussed in the second chapter. *Campylobacter* virulence characteristics, biofilm formation, resistance to antibiotics and phylogeny were reviewed. In the second chapter, 30 strains of *C. jejuni* previously isolated from chicken carcasses produced by a Brazilian company with a complete production cycle, under federal inspection and qualified for export, were analyzed between 2015 and 2016. The susceptibility to antimicrobials of the isolates before and after the formation of biofilms in traditional culture medium and culture medium added with *chicken juice*, which simulates the nutritional conditions of the industrial environment. The technique used was the disc diffusion, and the results were used to create antimicrobial resistance profiles. Minimum inhibitory concentration (MIC) was performed for tetracycline using the broth microdilution technique. The genetic similarity between the strains was determined using the RAPD-PCR technique. To compare the resistance of the strains before and after biofilm formation (with and without *chicken juice*) in the diffusion test, the binomial test was used for two proportions, and for the MIC, the Friedman test, both with 95% probability.

Keywords: Antibiotics. Biofilm. *Chicken juice*. MIC. RAPD.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

- Tabela 1.** Resistência aos antimicrobianos de 30 cepas de *C. jejuni* isoladas de carcaças de frango de corte no Brasil, nos anos de 2015 a 2016 (planctônica e após formação de biofilme em MH e biofilme em MH com CJ). 58
- Tabela 2.** Percentual de resistência de *C. jejuni* isolados de carcaças de frango de corte no Brasil entre os anos de 2015 e 2016. 58
- Tabela 3.** Perfis de resistência aos antimicrobianos em 30 cepas de *C. jejuni* planctônica isoladas de carcaças de frango de corte no Brasil entre os anos de 2015 e 2016. 59
- Tabela 4.** Perfis de resistência aos antimicrobianos em 30 cepas de *C. jejuni* sésseis sem *chicken juice* isoladas de carcaças de frango de corte no Brasil entre os anos de 2015 e 2016. 59
- Tabela 5.** Perfis de resistência aos antimicrobianos em 30 cepas de *C. jejuni* em biofilme com *chicken juice* isoladas de carcaças de frango de corte no Brasil entre os anos de 2015 e 2016. 60

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figura 1. Dendrograma de resultados de RAPD-PCR com os primers 1290 e 61 HLWL, utilizando a média de experimentos (average from experiments) com tolerância de 1,5% e método UPGMA com otimização de 80%, pelo programa GelCompar de 30 isolados de *C. jejuni*, oriundos de frangos resfriados e congelados. Perfil A – 100% de homologia (clone). Perfil B – *cluster* com 85,7% de homologia. Perfil C – *cluster* com 83,3% de homologia. Perfil D – *cluster* com 85,7% de homologia. Perfil E – 100% de homologia (clone). Perfil F – *cluster* com 90,9% de homologia. Perfil G – *cluster* com 85,7% de homologia. ID – identificação das cepas. Date: data de isolamento das cepas.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPA: Associação Brasileira de Proteína Animal
AMC: amoxicilina/ácido clavulânico 30µg
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AZM: azitromicina 15µg
CaCl₂: Cloreto de Cálcio
CCDA: *Ágar Campylobacter Blood-Free Selective Medium*
CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*
CDT: toxina citotética distensiva
CIM: Concentração Inibitória Mínima
CIP: ciprofloxacina 5 µg
CJ: caldo *chicken juice*
CLSI: *Clinical Laboratory Standards Institute*
CPS: polissacarídeo capsular (CPS)
DANMAP: *The Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme*
DNA: Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs: Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DO: densidade óptica
DTA: Doenças Transmitidas por Alimentos
EFSA: *European Food Safety Authority*
ERI: eritromicina 15 µg
EUA: Estados Unidos da América
EUCAST: *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
FDA: *Food and Drug Administration*
IAL: Instituto Adolfo Lutz
LOS: lipo-oligosacarídeos
LPS: lipopolissacarídeos
MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MBL: metalo-β-lactamases
MEC: Matriz Extracelular
MgCl₂: Cloreto de Magnésio
MH: caldo/ágar Mueller Hinton

mm: Milímetro

mM: Milimolar

MOMP: permeabilização da membrana externa mitocondrial

NARMS: *The National Antimicrobial Resistance Monitoring System*

NCTC: *National Collection of Types Cultures*

ng: Nanograma

OMS: Organização Mundial da Saúde

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

pH: Potencial Hidrogeniônico

PLP: Proteínas Ligadoras de Penicilinas

pmol: Picomol

QRDR: *Quinolone Resistance-Determining Regions*

QS: *quorum-sensing*

RAPD: *Random Amplified Polymorphic DNA*

RNA: Ácido Ribonucléico

RNAr: RNA ribossomal

rpm: rotações por minuto

SGB: Síndrome de Guillain-Barré

TET: tetraciclina 30µg

U: Unidade

UFC: Unidades Formadoras de Colônia

UPGMA: *Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean*

WHO: *World Health Organization*

µg: Micrograma

µl: Microlitro

µm: Micrômetro

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	16
1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo Geral	19
2.2 Objetivos Específicos	19
3 REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1 Caracterização do Gênero <i>Campylobacter</i> spp.	20
3.2 Epidemiologia e Saúde Pública	21
3.3 Virulência de <i>Campylobacter</i> spp.	24
3.4 Biofilmes	26
3.5 Resistência aos antimicrobianos	29
3.5.1 Resistência às quinolonas e fluoroquinolonas	31
3.5.2 Resistência aos macrolídeos	32
3.5.3 Resistência às tetraciclinas	34
3.5.4 Resistência aos β -lactâmicos	34
4 Random Amplification of Polimorphic DNA (RAPD)	36
CAPÍTULO 2 - Biofilmes e susceptibilidade aos antimicrobianos de <i>C. jejuni</i> isoladas de carcaças de frangos no Brasil.	38
REFERÊNCIAS	62

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

Campylobacter spp. é um dos mais prevalentes agentes etiológicos das gastroenterites bacterianas humanas, e dentre as espécies, *C. jejuni* é responsável por mais de 85% dos episódios de campilobacteriose, uma zoonose complexa e de distribuição mundial (EFSA, 2010a; SCALLAN et al., 2011; PERIO et al., 2013; EFSA, 2017).

Uma variedade de animais podem abrigar *Campylobacter* no trato intestinal, mas o frango de corte é considerado o principal reservatório natural deste micro-organismo (GARIN et al., 2012; CFSPH, 2013; WAGENAAR et al., 2013; TORRALBO et al., 2014; EFSA, 2015a; 2017). Consequentemente, o consumo da carne de frango e seus derivados contaminados é a mais importante fonte da infecção humana. *C. jejuni* está presente nos galpões de criação, nas caixas de transporte e nas plantas industriais destinadas ao abate e processamento da carne de frangos (MELERO et al., 2012). Esta diversidade de ambientes evidencia o alto potencial de adaptação e disseminação destes micro-organismos (EFSA, 2010; KVALSVIG et al., 2014).

Em 2005, pela primeira vez, a campilobacteriose excedeu a salmonelose como a zoonose mais comumente notificada na União Europeia, e desde então, o número de casos de campilobacteriose continua aumentando (EFSA, 2010; EUROSURVEILL 2012). Porém, a alta prevalência da campilobacteriose não é a única preocupação para a saúde pública.

O aumento significativo da resistência aos antibióticos em bactérias zoonóticas (BEBELL et al., 2014; LEE et al., 2015) levou a Organização Mundial da Saúde (OMS) a realizar um alerta em 2017 (OMS e PAHO, 2017; ONU, 2017). Em *C. jejuni* a situação foi considerada como alarmante por ser observada resistência às mesmas drogas em cepas isoladas de animais, alimentos e humanos infectados (EFSA, 2016; OMS e PAHO, 2017; ONU, 2017).

O aumento no número de casos de campilobacteriose e resistência aos antimicrobianos das cepas podem ser associados a vários fatores que tornam esses micro-organismos mais adaptados e resistentes às adversidades.

C. jejuni é sensível ao estresse osmótico, à dessecação, ao oxigênio ambiental e a outros fatores desfavoráveis (MIHALJEVIC et al., 2007; WESCHE et al., 2009). Para se manterem viáveis nestas situações adversas, utilizam

mecanismos adaptativos, entre eles, a associação em biofilmes (ICA et al., 2012; NGUYEN et al., 2012).

Em biofilmes, a produção da matriz extracelular permite que as bactérias permaneçam hidratadas e metabolicamente ativas (SUTHERLAND, 2001; BILLINGS et al., 2013), e adicionalmente, reduz o acesso de moléculas maiores, como os antimicrobianos (MULCAHY et al., 2008; BILLINGS et al., 2013). Nestas associações há proteção física aos antibacterianos, que impedem a entrada destas moléculas, o que contribui para a natureza crônica das infecções (MOREAU-MARQUIS et al., 2008; VUOTTO et al., 2014). Além disso, a proximidade das células também facilitam as trocas gênicas (HANNAN et al., 2010), entre elas, a de genes de resistência aos antimicrobianos. Particularmente, algumas cepas de *Campylobacter jejuni* são naturalmente competentes a realizar recombinação gênica por transformação (SVENSSON et al., 2014).

A posição de destaque do Brasil como segundo maior produtor e maior exportador mundial de carnes de frangos (ABPA, 2016) justifica estudos em bactérias zoonóticas como *C. jejuni* que impactam a saúde pública.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Objetivou-se avaliar a resistência antimicrobiana de *C. jejuni* isoladas de carcaças de frango antes e após a formação do biofilme (com e sem *chicken juice*), a concentração inibitória mínima para a tetraciclina, e ainda, verificar a disseminação das cepas por análise molecular.

2.2 Objetivos específicos

Determinar em cepas de *C. jejuni* isoladas de carcaças de frango em empresas exportadoras e com ciclo completo de produção:

- a resistência antimicrobiana, pelo método de difusão em discos, para os antibióticos amoxicilina/ácido clavulânico, azitromicina, eritromicina, ciprofloxacina e tetraciclina antes e após a formação de biofilmes em Mueller-Hinton (MH) e em MH com *chicken juice* (MH + CJ), que simula as condições nutricionais nas plantas de abate;
- construir perfis de resistência para as células antes e após a formação de biofilme em MH e MH + CJ;
- se há diferença na resistência antimicrobiana entre as cepas antes da formação do biofilme e nas formas sésseis quando os biofilmes são produzidos em MH e MH + CJ;
- a concentração inibitória mínima (CIM) para a tetraciclina, antes da formação do biofilme;
- a similaridade genética utilizando a técnica de RAPD.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Caracterização do Gênero *Campylobacter*

Em 1886, Theodor Escherich, um médico bacteriologista, observou e descreveu bactérias em espiral (originalmente chamada de *Vibrio*), encontrada em fezes de crianças com diarreia (VINZENT et al., 1947; BUTZLER et al., 1973). Após várias alterações na estrutura taxonômica do gênero (GALATE, BANGDE, 2013), em 1963, Sebald e Véron, nomearam o gênero como *Campylobacter* (BUTZLER et al., 1973; GALATE e BANGDE, 2013). A nomenclatura foi baseada no formato espiral do micro-organismo: *Campylobacter* origina-se da palavra grega *campylos* (curvos) e *bacter* (bactéria) (GARCÍA e CRAVIOTO, 2007; FERNÁNDEZ, 2008; QUETZ, 2009).

Campylobacter são bactérias Gram-negativas, não esporogênicas, oxidase e catalase positiva. A fonte de energia é obtida pela degradação de aminoácidos ou de componentes intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico e não por intermédio de carboidratos (FAGUNDEZ, 2005). Pertencem ao gênero *Campylobacter*, família *Campylobacteraceae* (VANDAMME, 2000; ALLOS et al., 2015).

Campylobacter spp. utiliza o ácido tricarboxílico para diversos e diferentes receptores finais das etapas de respiração celular, tanto em ambientes aeróbios como em anaeróbios. Adicionalmente, algumas estirpes de *C. jejuni* possuem genes que codificam diferentes oxirredutases, permitindo a utilização de vários substratos. Esta versatilidade na utilização dos substratos pode estar associada à capacidade deste micro-organismo sobreviver em diferentes ambientes como o intestino de aves ou de mamíferos, mas também em ambientes externos como, por exemplo, leite e água (KELLY et al., 2001).

Possuem formato de bastonetes curtos, em espiral (forma de S), com comprimento de 0,5 a 5 μm e largura de 0,2 a 0,5 μm . Porém, Rollins e Colwell (1986), Moran e Upton (1987) e EMBRAPA (2012) descreveram que em condições desfavoráveis ou adversas, estes micro-organismos, tradicionalmente na forma espiralada, adquirem a forma esférica ou cocóide, contudo, sem perder o poder infectante.

Campylobacter possuem um flagelo monopolar ou bipolar, que aliados ao formato em espiral conferem ao micro-organismo movimento rápido e característico

em forma de saca-rolha (MORAN e UPTON, 1987; BRASIL, 2011; GALATE e BANGDE, 2013).

São tipicamente microaerófilos e requerem uma concentração de 5% O₂ e altas concentrações de CO₂ (10%), como condições ideais para sua multiplicação (BRASIL, 2011; WHO, 2016). A temperatura ideal varia de 30°C a 47°C, com ótima em 42°C, sendo consideradas termofílicas. O pH varia entre 5,5 e 8, com ideal próximo de 7,0 (WHO, 2016; CFSPH, 2013).

C. jejuni são sensíveis à dessecação, acidez, irradiação, desinfetantes e temperaturas elevadas, sendo geralmente destruídas por aquecimento de 55°C a 60°C por 15 a 20 minutos, mas podem sobreviver por semanas na água a 4°C e alguns dias em temperatura abaixo de 15°C (CFSPH, 2013). Entretanto, o processo de congelamento leva apenas a uma redução significativa do número de células viáveis, não sendo capaz de provocar a destruição completa (CFSPH, 2013).

Os representantes deste gênero, mesmo não apresentando multiplicação fora do hospedeiro, possuem estruturas genéticas que permitem criar mecanismos de adaptação em diferentes ambientes e em animais (NEWELL et al., 2002; CFSPH, 2013), o que provavelmente, contribui para sua persistência ambiental e alta prevalência em alimentos.

3.2 Epidemiologia e Saúde Pública

Vários animais domésticos e silvestres são reservatórios da *Campylobacter*, albergando o micro-organismo no intestino, mas as aves, especialmente os frangos de corte, são consideradas os principais hospedeiros (CRAVIOTO e GARCÍA, 2007). As aves raramente apresentam algum tipo de sintoma, sendo possível que haja uma relação de comensalismo entre a *Campylobacter* e a ave (CDSC, 2000). No entanto, há evidência experimental, que algumas estirpes de *Campylobacter* em certas condições, se comportam como um patógeno, desencadeando efeitos negativos na saúde e no bem-estar das aves (FONSECA, FERNANDEZ, ROSSI, 2016).

No ambiente, os micro-organismos podem ser encontrados na água, solo, leite e derivados lácteos, nas fezes dos animais e em equipamentos industriais (BRASIL, 2011; CFSPH, 2013). O leite e seus subprodutos mesmo que pasteurizados podem ser contaminados após o beneficiamento e ser a causa de

campilobacteriose em humanos (GORMAN et al., 2002; CDC, 2012). Porém, o consumo da carne de frango contaminada mal cozida é a principal fonte da infecção de humanos (GUYARD-NICODEME et al., 2013).

No Brasil, a taxa de isolamento da bactéria a partir de fezes de frangos de corte tem variado em função da região geográfica, podendo chegar a 75% (CARVALHO et al., 2001; CORTEZ et al., 2006; FRANCHIN et al., 2006). Em 2013, um estudo nos frigoríficos do sul do Brasil determinou que 37% das carcaças de frango no pós *chiller* eram positivas para *Campylobacter* spp. destes, 97% foram identificados como *C. jejuni* (PERDONCINI et al., 2015).

Múltiplas fontes relacionadas à presença e aos níveis de *Campylobacter* na carne de frango já foram detectadas e envolve toda a cadeia de produção do alimento (MELERO et al., 2012). O aumento da incidência do micro-organismo varia de acordo com as regiões da carcaça, sendo que o peito, a pele do pescoço e a região da cloaca as que apresentam maior positividade (EFSA, 2010b). Na cadeia de produção, a *C. jejuni* pode ser isolada desde os alojamentos dos frangos, nas caixas de transporte até o local de processamento da carcaça nas indústrias avícolas, incluindo os produtos finais e as lojas de varejo (MELERO et al., 2012).

Durante o abate, a presença de fezes e penas contaminadas auxilia a disseminação da *Campylobacter*. A contaminação pode ocorrer em qualquer momento, mas o tanque de escaldagem é considerado crítico (ALLEN et al., 2007; FIGUEROA et al., 2009), devido a grande concentração de micro-organismos, bem como a evisceração (HERMAN et al., 2003; ROSENQUIST et al., 2006; FIGUEROA et al., 2009). Alavagem e refrigeração das carcaças são alternativas para tentar reduzir a incidência de *C. jejuni* (REICH et al., 2008; FIGUEROA et al., 2009; PERDONCINI et al., 2015).

Nos humanos, os sinais e sintomas da campilobacteriose ocorrem geralmente 2 a 5 dias após a infecção, mas podem variar de 1 a 10 dias (CDSC, 2000). O período de incubação da doença pode variar dependendo do número de bactérias ingeridas, pois quanto maior o número de células, menor será o tempo de incubação e mais severa a manifestação clínica da doença (ALLOS et al., 2015).

A campilobacteriose é caracterizada por enterite aguda com presença de sangue e leucócitos nas fezes, dor abdominal e febre (CAMERON et al., 2012; LU et al., 2012), dor de cabeça, náuseas e/ou vômitos. Geralmente, os sintomas duram em torno de 3 a 6 dias (WHO, 2016) e são relativamente leves, com grande parte

dos acometidos se recuperando sem a necessidade de tratamento específico (CDC, 2015). Entretanto, em alguns casos, a duração da doença pode se prolongar dependendo do hospedeiro, da dose ingerida e da cepa de *Campylobacter* (WHO, 2016).

Todos são susceptíveis à campilobacteriose, mas crianças com menos de cinco anos, idosos e imunocomprometidos podem apresentar complicações (WHO, 2016).

Apesar de pouco frequentes, podem ocorrer complicações extra intestinal como bacteremia e migração para outros órgãos. Outras complicações estão associadas a manifestações pós-infecção, geralmente decorrentes de reações autoimunes como a artrite reativa (inflamação dolorosa das articulações) e a síndrome de Guillain-Barré (SGB). A SGB é caracterizada com uma paralisia muscular, que pode resultar em disfunção respiratória grave ou morte neurológica (HARVALA et al., 2016; WHO, 2016). Nos Estados Unidos, um número estimado de 1/1000 casos clínicos de campilobacteriose resulta na síndrome de Guillain-Barré (NACHAMKIN et al., 1998).

As manifestações clínicas desencadeadas por *C. jejuni* demonstram o paradoxo entre suas condições rigorosas de crescimento e sua ubiquidade como um patógeno eficaz.

Episódios de campilobacteriose estão distribuídos geograficamente por todo o mundo (CFSPH, 2013; EFSA, 2010b).

Nos Estados Unidos (EUA), *Campylobacter* foi responsável por 35% dos casos de doenças transmitidas pelos alimentos (DTAs) registrados no ano de 2012, sendo superada somente por *Salmonella* com 40% (CDC, 2014c). O mesmo órgão mostrou que naquele país, o prejuízo econômico anual da campilobacteriose foi estimado em R\$1,2 bilhões, incluindo as despesas com a síndrome de Guillain-Barré (GBS), uma sequela grave da doença (FIGHT BAC, 2016).

Apesar dos poucos estudos sobre a campilobacteriose humana no país, estudos realizados em viajantes estrangeiros que passaram pelo Brasil em 2014, identificaram *Campylobacter* spp. e *Giardia* spp. como os patógenos mais frequentes associados à doenças gastrointestinais (ECDC, 2014; WILSON et al., 2014).

Cabe aos pesquisadores, às indústrias de alimentos e às políticas públicas estabelecer estratégias para o controle e prevenção desses patógenos e garantir a qualidade do produto e a saúde do consumidor (CDC, 2016).

3.3 Virulência de *Campylobacter* spp.

Para a multiplicação de *Campylobacter* é necessário um ambiente adequado no hospedeiro. As exigências estão relacionadas à localização em um habitat oportuno, geralmente o muco que sobrepõe às células epiteliais intestinais (HU; KOPECKO, 2000), onde ocorre a aderência ao hospedeiro e o patógeno pode adquirir os nutrientes necessários para a sua viabilidade.

Alguns nutrientes, como o ferro, que são essenciais para o crescimento de *Campylobacter* podem estar mal distribuídos ou indisponíveis para as bactérias no lúmen intestinal, mas podem ser obtidos a partir de tecidos dos hospedeiros. Dessa forma, as bactérias precisam desenvolver estratégias, tais como a invasão e produção de toxinas, para acessar tais nutrientes, o que danifica a integridade da mucosa intestinal do hospedeiro. Na campilobacteriose há expressão das toxinas bacterianas e / ou a invasão de células epiteliais (NEWELL et al., 2002).

Alguns mecanismos relacionados à capacidade de produzir doença, como a aderência, colonização, invasão e toxicidade às células hospedeiras são intensificadas para que os micro-organismos se mantenham viáveis no trato gastrointestinal do hospedeiro (BABAKHANI e JOENS, 1993; HU; KOPECKO, 2000; YOUNG et al., 2007).

A aderência da *C. jejuni* às células epiteliais favorece a colonização intestinal (FAUCHERE et al., 1986). Após a ligação, várias outras proteínas bacterianas de superfície auxiliam na colonização ao hospedeiro, facilitando assim, a sua entrada nas células epiteliais intestinais (GAYNOR et al., 2001; KONKEL et al., 1997). Todos esses eventos são mediados por fatores de virulência bacterianos e podem induzir em consequências patológicas para o hospedeiro (NEWELL et al., 2002).

Entre os fatores de virulência bacterianos considerados importantes para a colonização estão a motilidade, proteção contra o estresse oxidativo e regulação da temperatura (PANIGRAHI et al., 1992; YOUNG et al., 2007).

Os mecanismos pelos quais a *Campylobacter* é capaz de invadir o epitélio intestinal são complexos e não completamente esclarecidos, contudo, o processo de invasão é facilitado pela presença dos flagelos, plasmídeos de alto peso molecular, adesinas superficiais e fatores quimiostáticos (WASSENAAR et al., 1999).

O aparelho flagelar está envolvido na secreção de proteínas que auxiliam a invasão (KONKEL et al., 2004). A presença do flagelo permite que *Campylobacter*

tenha a motilidade característica e também favorece a quimiotaxia, que são importantes para a colonização do trato intestinal (HU; KOPECKO, 2000; PARKHILL et al., 2000). Diferente de *Salmonella* e outras bactérias entéricas patogênicas, as flagelinas de *Campylobacter* não provocam a produção de citocinas pró-inflamatórias, sugerindo que podem ser importantes para evitar as respostas imunes inatas do hospedeiro (DE ZOETE et al., 2010).

Há evidências que sugerem que um reduzido número de *Campylobacter* colonizando o intestino pode ser capaz de induzir o epitélio intestinal a produzir respostas inflamatórias crônicas em indivíduos suscetíveis, edesencadear a Síndrome de Guillain-Barré após a campilobacteriose (HU; KOPECKO, 2000; WHO, 2013).

Mais raramente, *Campylobacter* pode provocar septicemia e infecções extra intestinais como consequência da translocação ou como resultado da invasão das células epiteliais intestinais (HU; KOPECKO, 2000; WHO, 2013). Porém, as estirpes de *C. jejuni* são sensíveis ao soro sanguíneo (BLASER et al., 1985), o que torna estes eventos não muito frequentes.

O nível de invasividade da *Campylobacter* é independente e não mostra relação com a apresentação da doença. No entanto, é possível que micro-organismos invasivos possam localizar-se em nichos protegidos de respostas imunes dentro dos hospedeiros, permitindo assim a persistência da infecção. No entanto, a presença de micro-organismos no ambiente extra intestinal induz a uma resposta imune rápida e substancial, o que pode contribuir para a autolimitação da doença (NEWELL et al., 2002).

As evidências clínicas sugerem que as cepas de *Campylobacter* expressem toxinas durante a colonização ao hospedeiro, que pode ser associado aos sintomas da doença (WASSENAAR, 1997). Embora várias toxinas já tenham sido descritas, a toxina citolética distensiva (CDT), produzida pelo gene *cdt* é a mais conhecida (PARKHILL et al., 2000). CDT altera a morfologia das células epiteliais causando distensão e morte celular.

A expressão do gene *cdt* varia entre as estirpes e podem estar ausentes em alguns isolados. Provavelmente, a não expressão é consequência de deleções e polimorfismos no gene *cdtB*. Porém, estirpes com ausência dos genes *cdt* já foram isoladas de fezes diarreicas e com sangue, sugerindo que o CDT não é essencial para a sintomatologia da enterite ou bacteremia. O papel da CDT na doença é

discutível, mas dados preliminares indicam que a CDT é expressa em seres humanos durante a colonização e que é altamente imunogênica (HICKEY et al., 2005).

Além dos mecanismos que auxiliam na produção das doenças, muitos são os fatores que podem contribuir para o desenvolvimento e intensificação da campilobacteriose. Entre eles, o número de organismos ingeridos e a imunidade do hospedeiro.

Para o desenvolvimento da campilobacteriose, a dose infectante pode ser muito baixa, em torno de 500 células, mas, uma dose mais elevada (9000 células) é capaz de causar infecção em 50% dos indivíduos, pois alguns fatores como a quantidade de organismos ingeridos, a virulência da estirpe infectante associada à baixa imunidade do hospedeiro podem ser considerados agravantes, para intensificar a severidade da doença (WHO, 2013, EFSA, 2015). Outra característica que pode intensificar a infecção é o uso de medicamentos que reduzam ou tamponam a acidez estomacal (DOORDUYN et al., 2008).

Há mecanismos moleculares responsáveis pela patogênese, persistência e sobrevivência que parecem ser exclusivos de *Campylobacter* em comparação com outros patógenos bacterianos invasivos como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* e *Staphylococcus aureus*. Estas características podem ser resultantes do alto nível de polimorfismo genômico, da capacidade catabólica restrita, da autorregulação, da desregulação de genes e de outras vias de sobrevivência indefinida (TURONOVA et al., 2015).

3.4 Biofilmes

C. jejuni é sensível ao estresse osmótico, à dessecação, ao estresse oxidativo e a outros fatores desfavoráveis do ambiente (MIHALJEVIC et al., 2007; WESCHE et al., 2009).

Para se manterem viáveis em ambientes adversos, as estirpes de *C. jejuni* utilizam mecanismos adaptativos. Entre eles, a degeneração do formato espiral para a forma cocóide e a associação em biofilmes (ROLLINS e COLWELL, 1986; MORAN e UPTON, 1987; BUSEWILL et al., 1998; EMPRABA, 2012; ICA et al., 2012; NGUYEN et al., 2012). Uma forma de *C. jejuni* superar sua fragilidade diante da

adversidade ambiental é a sua capacidade de se aderir a superfícies e formar biofilme (ICA et al., 2012; NGUYEN et al., 2012).

Biofilmes são agrupamentos estruturados de bactérias aderidas umas às outras por meio de uma matriz extracelular (MEC). A MEC é um componente essencial dos biofilmes bacterianos e geralmente representa mais de 90% da sua matéria seca (FLEMMING e WINGENDER, 2010). É composta principalmente por polissacarídeos (COSTERTON et al., 1999) considerada a estrutura fundamental do biofilme (COSTERTON et al., 1999; SUTHERLAND, 2001; BRANDA et al., 2005). A *C. jejuni* participa na composição da MEC por meio da produção de carboidratos, incluindo o lipo-oligossacarídeo (LOS), polissacarídeo capsular (CPS) e glicoproteínas (GUERRY et al., 2008).

A MEC permite que as bactérias permaneçam hidratadas e metabolicamente ativas, pois prende os nutrientes e líquidos próximos das células bacterianas, mantendo a forma do biofilme e garantindo a sua coesão (SUTHERLAND, 2001; BILLINGS et al., 2013). Adicionalmente, reduz o acesso de moléculas maiores, como os antimicrobianos (MULCAHY et al., 2008; BILLINGS et al., 2013).

O processo de formação do biofilme é mediado por flagelos, tendo como o primeiro passo, a adesão celular, embora a função do flagelo não seja crucial para seu início. Já o DNA extracelular (DNAe) e a proteína de ligação ao DNA são considerados imprescindíveis para o desenvolvimento da estrutura, pois são necessários para a formação adequada das micro colônias (SVENSSON et al., 2014), além de contribuir para o estabelecimento e a manutenção do biofilme (BAE et al., 2014, SVENSSON et al., 2014).

No biofilme, o DNAe assume um papel importante na transferência de material genômico entre as estirpes, podendo ser efetuado de forma direta entre as cepas bacterianas ou pela absorção de DNA exógeno (HANNAN et al., 2010). *Campylobacter* possui a capacidade de absorver o DNAe, e consequentemente, realizar trocas gênicas (HANNAN et al., 2010).

Ainda que o DNAe esteja presente nos biofilmes de muitas bactérias como, *Pseudomonas aeruginosa* (CHIANG et al., 2013), *Listeria monocytogenes* (HARMSEN et al., 2010) e *Escherichia coli* (ZHAO et al., 2013) o mecanismo de sua liberação para o meio extracelular ainda não está completamente elucidado. Existem dois mecanismos principais de liberação do DNA como: a secreção e lise celular (HE

et al., 2008; ADLER et al., 2014), embora seja possível, que um sistema de detecção de *quorum sense* ainda desconhecido controle a liberação de DNAe em *C. Jejuni*.

A formação do biofilme envolve a interação de fatores genéticos e ambientais. Os determinantes genéticos da formação de biofilmes diferem entre as espécies, e pouco se sabe como as estirpes de uma mesma espécie conseguem características genéticas próprias na presença de diferentes origens genéticas (FRIRDICH et al., 2012; SULAEMAN et al., 2012).

Vários genes influenciam no processo de formação do biofilme, entre eles, o *flaA*, relacionado à motilidade (KALMOKOFF et al., 2006), o gene *luxS*, que possui relação com o mecanismo de *quorum sense* (REESER et al., 2007) e outros genes reguladores envolvidos na resposta ao estresse. As estirpes que não possuem genes que respondem ao estresse apresentam dificuldade na formação do biofilme (FIELDS e THOMPSON, 2008; GUNDOGDU et al., 2011). As estirpes de *Campylobacter* que possuem estes genes geralmente são mais eficientes na formação do biofilme, o que sugere que o processo representa uma via alternativa de defesa contra o estresse (CANDON et al., 2007; MCLENNAN et al., 2008; SVENSSON et al., 2009).

Em relação ao ambiente, algumas condições estressantes como os níveis de oxigênio atmosférico (REUTER et al., 2010), temperaturas reduzidas (BUSWELL et al., 1998; TURONOVA et al., 2015) e presença de nutrientes em superfícies (BROWN et al., 2014), aumentam a formação de biofilme por *C. jejuni*, podendo também, influenciar na sua composição.

No ambiente do processamento industrial a presença de resíduos de produtos alimentares em contato com a superfície dos equipamentos pode levar ao condicionamento superficial, e consequentemente, ao aumento da ligação bacteriana (BROWN et al., 2014). Como exemplo de resíduo, o suco do frango "*chicken juice*", um exsudato complexo, com alto teor proteico e lipídico obtido de frangos inteiros descongelados (BIRK et al., 2004, 2006), promove a ligação bacteriana de forma indireta as superfícies, devido à sua capacidade de condicionar a superfícies abióticas resultando em maior formação de biofilme (BROWN et al., 2014).

Já no hospedeiro, as bactérias utilizam substâncias presentes no local infectado, como sais biliares, muco, oxigênio, bicarbonato e hormônios neuroendócrinos do estresse para regular a expressão de componentes necessários

para a sua interação com o hospedeiro (HAMNER et al., 2013; ROTHENBACHER e ZHU, 2014). *C. jejuni* mostra maior interação com as células epiteliais intestinais quando na presença de baixos níveis de oxigênio, sais biliares e noradrenalina (COGAN et al., 2007; MILLS et al., 2012). Além disso, foram recentemente comprovados que os sais biliares auxiliam para melhorar a formação de biofilme de *C. jejuni* auxiliando a liberação do DNA extracelular (SVENSSON et al., 2014).

C. jejuni pode formar três tipos diferentes de biofilmes: a) estrutura anexada a uma superfície abiótica; b) agregados flutuando na cultura líquida; c) uma película formada na interface gás / líquido (JOSHUA et al., 2006). Geralmente, a formação do biofilme ocorre dentro de 48h de cultivo, mas quando o período é prolongado, sua formação pode ser facilitada e ocorrer o desprendimento celular, caracterizando sua maturação (SANDERS et al., 2007; ICA et al., 2012).

C. jejuni pode ser encontrada em biofilmes de espécies mistas (SANDERS et al., 2007; ICA et al., 2012). Os biofilmes multicelulares são estruturalmente complexos e oferecem um ambiente protetor para a sobrevivência em *habitats* hostis. Podem também desempenhar papel importante na dispersão de agentes patogênicos (SANDERS et al., 2007; ICA et al., 2012; OTTO, 2014; SOLANO et al., 2014).

A composição do substrato e as propriedades físico-químicas do biofilme de *C. jejuni* podem ser influenciadas na presença de outras bactérias produtoras de biofilme (NGUYEN et al., 2011).

As diferentes formas de biofilmes de *C. jejuni* podem ser importantes nos estágios iniciais da sua formação, quando as células aderem à superfície.

A capacidade de adesão de *Campylobacter* spp. pode estar relacionada à aptidão biológica da cepa em se unir irreversivelmente a uma superfície e iniciar a formação do biofilme (JOSHUA et al., 2006, SULAEMAN et al., 2010; TEH et al., 2010).

Na indústria avícola, a presença da *Campylobacter* está fortemente ligada à capacidade da formação de biofilmes em equipamentos, instrumentos de abate, sendo fontes contínuas de contaminação de produtos de origem animal como as carcaças de frangos (BROWN et al., 2014).

3.5 Resistência aos antimicrobianos

Nos últimos anos têm se observado um aumento significativo da resistência aos antibióticos, particularmente entre as bactérias zoonóticas, que é provavelmente, consequente do uso indiscriminado das drogas (BEBELL et al., 2014; LEE et al., 2015). Também há correlação entre a resistência aos antimicrobianos e a utilização das drogas na produção animal, já que de acordo com estudos na União Europeia, 70% dos antibióticos produzidos no mundo são utilizados em fazendas (BEEF WORLD, 2015; ABC, 2016).

A OMS fez um alerta em relação à crescente resistência global aos medicamentos antimicrobianos e em março de 2017 divulgou uma lista das bactérias e antibióticos a que são mais resistentes. *Campylobacter* spp destacou-se entre as bactérias mais resistentes aos antibióticos da classe das fluorquinolonas (OMS e PAHO, 2017; ONU, 2017).

A crescente prevalência de *C. jejuni* resistente aos antibióticos é um grave problema de saúde pública em todo o mundo, gerando preocupações (ENGBERG et al., 2001; EFSA, 2016; OMS e PAHO, 2017; ONU, 2017). Esta característica compromete significativamente a eficácia da antibioticoterapia para o tratamento da campilobacteriose humana e resulta em desfechos adversos para o paciente, contribuindo assim, para o surgimento de infecções multirresistentes (HELMS et al., 2005; BAE et al., 2014). Há preocupação de que o tratamento da campilobacteriose humana fique comprometido em virtude da indisponibilidade de medicamentos eficazes para a terapêutica de infecções graves (EFSA, 2015b).

Biofilmes podem influenciar na resistência bacteriana, já que nestas formações, há proteção das bactérias à ação dos antibacterianos, pois impedem fisicamente a entrada das moléculas, e ainda, favorecem as trocas gênicas. Assim, podem contribuir também para a natureza crônica das infecções (DAVIES, 2003; MOREAU-MARQUIS et al., 2008; VUOTTO et al., 2014).

Os biofilmes possuem em sua estrutura proteínas, polissacarídeos e DNAe (NADELL et al., 2009; SVENSSON et al., 2009). O DNAe é considerado um componente estrutural importante na aquisição de resistência devido à capacidade de transformação de *C. jejuni*, que ao contrário de outros patógenos entéricos, tais como *Salmonella* e *Escherichia coli*, é naturalmente competente para absorver os genes presentes no DNAe, entre eles, os que conferem resistência aos antibióticos. Assim, biofilmes podem ser uma importante fonte de *C. jejuni* resistentes, pois

podem favorecer a emergência de estirpes mais especializadas mesmo sem o estímulo da pressão seletiva (BAE et al., 2014).

3.5.1 Resistência às quinolonas e fluoroquinolonas

Dependendo da concentração utilizada, as fluoroquinolonas apresentam atividade bactericida contra uma grande variedade de organismos Gram-negativos e Gram-positivos. Esta classe inclui antibióticos amplamente utilizados, como ciprofloxacina, enrofloxacin e norfloxacina (DANMAP, 2012).

Como a campilobacteriose é clinicamente indistinguível de outras enterites bacterianas, geralmente o tratamento é realizado com quinolonas ou fluoroquinolonas de maneira empírica, sem a confirmação do agente etiológico. Isso traz preocupação com a emergência da resistência à fluoroquinolona, já que esta característica era incomum no final dos anos 80 ao início dos anos 90 (GUPTA et al., 2004; LUANGTONGKUM et al., 2009; DANMAP, 2012).

Em adição ao uso indiscriminado de fluoroquinolonas em humanos, houve o aumento do seu uso na avicultura, levando a pressão de seleção. Isso contribuiu para o aumento da resistência a este antimicrobiano, tanto em cepas isoladas de animais quanto de humanos (SMITH et al., 1999; GUPTA et al., 2004; WHO, 2013).

A vigilância da susceptibilidade à fluoroquinolona em *Campylobacter* em animais é importante não somente para a produção de alimentos, mas também porque o surgimento de cepas resistentes em animais presume em um aumento de infecções humanas resistentes (SMITH et al., 1999; VAN LOOVEREN et al., 2001; EFSA, 2015b).

São descritos dois mecanismos de resistência às fluoroquinolonas em *Campylobacter*: a alteração na enzima DNA girase, que pode ocorrer por mutação cromossômica nos genes que são responsáveis pelas enzimas alvo (DNA girase e topoisomerase), que promovem a ineficiência do antimicrobiano; e a bomba de efluxo. Estes dois mecanismos funcionam em sinergia (GE et al., 2005; YAN et al., 2006).

Em geral, os dois alvos enzimáticos intracelulares da fluoroquinolona são a DNA-girase, codificada por *gyrA* e *gyrB* e a topoisomerase II, estruturalmente relacionada, codificada pelos genes *parC* e *parE* (DRLICA et al., 1997). As fluoroquinolonas formam um complexo estável com as enzimas, inibindo sua

atividade, levando a síntese descontrolada de RNA mensageiro e de proteínase, finalmente, à morte celular (SHEA e HIASA, 1999; BRASIL, 2007).

Diferentes estudos demonstraram que *C. jejuni* e *C. coli* carecem dos genes *parC* e *parE* (PARKHILL e al., 2000; PAYOT et al., 2002), sendo a resistência à fluoroquinolona nestas espécies consequente de uma mutação pontual específica na região determinante da resistência à quinolona (QRDR) do gene *gyrA*.

Outro mecanismo de resistência a fluoroquinolona que parece funcionar em conjunto com as mutações de *gyrA* é a bomba de efluxo multidroga *CmeABC*, codificada cromossomicamente, que é capaz de reduzir a concentração intracelular da fluoroquinolona e vários outros antibióticos (LIN et al., 2002). Esta bomba de efluxo atua sinergicamente com mutações da DNA girase para produzir uma resistência de alto nível a fluoroquinolona (GE et al., 2005; YAN et al., 2006). Quando *CmeABC* também é expresso, estirpes que possuem mutações da DNA girase que levam a resistência a fluoroquinolona de nível intermédio passam a manifestar resistência de alto nível (LUO et al., 2003; YAN et al., 2005).

Além disso, o gene *cmeABC* favorece o surgimento de mutantes de *gyrA* que, de outro modo, não poderiam sobreviver mesmo em dose baixas de fluoroquinolona (YAN et al., 2005).

De acordo com a *European Food Safety Authority* (EFSA, 2010a) cerca de 20 a 64% dos isolados de *Campylobacter* provenientes de carnes de aves são resistentes a fluoroquinolona. No Brasil, resultados similares foram encontrados por Frasão et al. (2015), que demonstrou que 100% e 56,25% das cepas foram resistentes à ciprofloxacina e à enrofloxacin, respectivamente, no teste de difusão em discos.

3.5.2 Resistência aos macrolídeos

Os macrolídeos são um grupo de antimicrobianos quimicamente constituídos por um anel macrocíclico de lactona, ao qual se ligam um ou mais açúcares (BRASIL, 2007). Membros desta classe de antibióticos incluem claritromicina, azitromicina, eritromicina, tilosina e tilmicosina, sendo os dois últimos, aprovados apenas para uso veterinário. A eritromicina pode ser usada em humanos e animais (FDA, 2012) e é o medicamento de escolha para tratamento da campilobacteriose humana (GUERRANT et al., 2001; EFSA, 2015b; EFSA, 2017).

O mecanismo de ação ocorre pela inibição da síntese de proteínas, por intermédio da ligação reversível aos receptores localizados na porção 50S de ribossomos bacterianos, em especial na molécula 23S do RNA, impedindo as reações de transpeptidação e translocação (BRASIL, 2007; LOGUE et al., 2010).

Os principais mecanismos de resistência aos macrolídeos em *Campylobacter* são: modificação do alvo, com a alteração no sítio receptor da porção 50S do ribossomo; efluxo e diminuição da permeabilidade da célula ao antimicrobiano. Os dois primeiros mecanismos atuam sinergicamente para conferir resistência de alto nível aos macrolídeos (CAGLIERO et al., 2006; BRASIL, 2007; LIN et al., 2007; LOGUE et al., 2010).

A bomba de efluxo multidrogas *CmeABC* também contribui para a resistência aos macrolídeos (LIN et al., 2007; ZEITOUNI et al., 2012) e funciona de forma sinérgica com as mutações do *rRNA* 23S para promover resistência de alto nível (CAGLIERO et al., 2006; CALDWELL et al., 2008). A resistência de alto nível a eritromicina pode estar relacionada à presença do gene *erm*, o qual pode estar associado com ilhas de resistência multidrogas cromossômicas ou de plasmídeos transferíveis (WANG et al., 2015; EFSA, 2017).

O mecanismo de resistência aos macrolídeos envolve a alteração da permeabilidade da membrana que é mediada pela expressão da porina no processo de permeabilização da membrana externa mitocondrial (MOMP), cromossomicamente codificada por *porA* (PUMBWE et al., 2004). Nas bactérias Gram-negativas, as porinas são proteínas da membrana externa que formam poros transmembranares e permitem a difusão passiva de moléculas hidrofílicas, incluindo muitos antibióticos.

O mecanismo de ação dos derivados quinolônicos é que atuam interferindo na síntese de DNA do micro-organismo, inibindo a ação da DNA girase. Esta enzima é responsável por promover o enrolamento e desenrolamento da molécula de DNA, para que ocupe o menor espaço dentro da célula, essenciais à sobrevivência bacteriana (ALTERTHUM, 2008a). A DNA girase torna a molécula de DNA compacta e biologicamente ativa. Ao inibir essa enzima, a molécula de DNA passa a ocupar grande espaço no interior da bactéria e suas extremidades livres iniciam a síntese descontrolada de RNA mensageiro e de proteínas, determinando a morte das bactérias (BRASIL, 2007).

3.5.3 Resistência às tetraciclinas

As tetraciclinas foram descobertas na década de 1940 e têm atividade contra organismos Gram-negativos e Gram-positivos (BRASIL, 2007). Devido ao seu intenso uso na medicina humana e veterinária, a resistência generalizada limitou um pouco o seu uso. Os membros mais utilizados desta classe são tetraciclina e doxiciclina (CHOPRA e ROBERTS, 2001).

Ação das tetraciclinas sobre as células é conferida por difusão em um processo dependente de gasto de energia. Ligam-se, de maneira reversível, à porção 30S do ribossomo, bloqueando a ligação do RNA transportador, impedindo a síntese proteica. Porém, não está completamente clara a forma exata como cada via contribui para a entrada da tetraciclina em *Campylobacter* (CHOPRA e ROBERTS, 2001; BRASIL, 2007; ZILBAUER et al., 2008; EURO SURVEILL, 2012).

Os mecanismos atribuídos à resistência à tetraciclina estão relacionados ao efluxo, por meio da diminuição da acumulação da droga no interior da célula; proteção ribossômica e modificação química pelo oxigênio (BRASIL, 2007; IOVINE, 2013; GROSSMAN, 2016). Portanto, sob ambiente de oxigênio esgotado, pode haver uma regulação negativa dessas vias, levando a uma maior suscetibilidade. Além disso, a limitação de oxigênio pode favorecer a perda de genes de resistência aos antibióticos devido à carga metabólica elevada (RYSZ et al., 2013).

Outro mecanismo de resistência à tetraciclina em *Campylobacter*, assim como outros Gram-negativos, é a proteção de um sítio A desocupado pela ligação da proteína bacteriana *tetO* a esse sítio (MANAVATHU et al., 1988; SALYERS et al., 1990). O gene *tetO* pode ser codificado no cromossomo (DASTI et al., 2007), mas em *C. jejuni* é mais comum sua codificação por plasmídeos (TAYLOR, 1986).

3.5.4 Resistência aos β -lactâmicos

A classe dos β -lactâmicos é formada por diversos compostos, incluindo penicilinas e seus derivados, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos, todos os quais contêm o anel β -lactâmico, composto por três átomos de carbono e um de nitrogênio, necessários para a atividade antimicrobiana (GIESBRECHT et al., 1998; BRASIL, 2007).

Quatro mecanismos mediam a resistência aos β -lactâmicos em *Campylobacter*: a inativação enzimática por β -lactamases; absorção reduzida devido a alterações ou mutações nas porinas da membrana externa; bomba de efluxo e modificações estruturais das proteínas ligadoras de penicilina (PLP) (LACHANCE et al., 1991; BRASIL, 2007).

Os mecanismos que envolvem a resistência aos β -lactâmicos se iniciam no momento em que há a ligação do antibiótico com as bactérias. Desta forma, interferem na síntese do peptidoglicano no momento em que as células estão sintetizando a parede celular, e com isso, resulta em parede celular com integridade estrutural prejudicada, predispondo a bactéria à lise osmótica (GIESBRECHT et al., 1998; BRASIL, 2007).

Em *Campylobacter*, a expressão das enzimas β -lactamases conferem resistência à amoxicilina, ampicilina e ticarcilina (LACHANCE et al., 1991), não afetando a susceptibilidade aos carbapenêmicos ou cefalosporinas. Uma classe D β -lactamase do tipo oxacilinase (OXA-61) com atividade contra penicilina, ampicilina e carbenicilina foi identificada em *C. jejuni* (ALFREDSON e KOROLIK, 2005; POLY et al., 2007). *Campylobacter* isolados de amostras avícolas resistentes à ampicilina mostraram uma alta prevalência do gene *bla*OXA-61 que codifica a enzima OXA-61, identificados em 91% (347/380) das cepas (GRIGGS et al., 2009).

Não há dados nacionais agrupados disponíveis sobre a resistência aos β -lactâmicos por bactérias do gênero *Campylobacter*, já que o NARMS (*National Antimicrobial Resistance Monitoring System*) não recomenda a inclusão destes antimicrobianos nos testes de susceptibilidade (NARMS, 2012).

A resistência de estirpes de *Campylobacter* spp. a amoxicilina está relacionada com a produção de β -lactamases, no entanto, outros mecanismos de resistência podem ocorrer de forma simultânea, como a modificação das proteínas de ligação de penicilinas e cefalosporinas e, consequentemente, a impermeabilidade da bactéria a este antibiótico (FALLON et al., 2003; YAN et al., 2005).

Outros dois genes que codificam um tipo de enzima metalo- β -lactamase foram relatados, embora ainda não esteja claro se sua expressão realmente levem *Campylobacter* a ser resistente aos β -lactâmicos (LACHANCE et al., 1993; ALFREDSON et al., 2007; GRIGGS et al., 2009).

A bomba de efluxo *CmeABC* também pode contribuir para a resistência aos β -lactâmicos. Quando ocorre mutação em *CmeB*, algumas cepas de *C. jejuni* podem alterar o seu comportamento, resultando em um aumento na susceptibilidade à ampicilina (LIN et al., 2002; PUMBWE et al., 2004; IOVINE, 2013).

Níveis elevados de resistência aos β -lactâmicos foram evidenciados em estudo conduzido por Melo (2012), que encontrou resistência à amoxicilina em 61,8% e 100% das cepas de *C. jejuni* e *Campylobacter* spp., respectivamente. O estudo foi realizado em isoladas de carcaças de frango resfriadas e congeladas. Alta resistência aos β -lactâmicos em *Campylobacter* também foram observados em isolados de outros países (ANDERSEN et al., 2006; ENGBERG et al., 2001; FALLON et al., 2003; RÖNER et al., 2004).

Geralmente, a ampicilina, amoxicilina e outros β -lactâmicos não são recomendados para o tratamento de infecções por *Campylobacter* spp. devido à elevada frequência de isolados resistentes (FALLON et al., 2003; BORGES, 2010). No entanto, a associação do ácido clavulânico potencializa a ação do antibiótico, reduzindo a resistência da *C. jejuni* (BORGES, 2010).

4 Random Amplification of Polimorphic DNA (RAPD)

RAPD-PCR (*Random Amplified Polymorphic DNA*) é uma das técnicas de tipagem molecular utilizadas para apoiar os estudos sobre a epidemiologia de infecções causadas por *Campylobacter* spp. (AQUINO et al., 2010).

A técnica de RAPD é um método simples, que envolve a amplificação aleatória do DNA genômico utilizando curtas sequencias de iniciadores arbitrários. Além de ser um método simples, outras vantagens podem ser agregadas ao RAPD como o baixo custo para caracterização e o alto poder discriminatório para identificar a variabilidade genética de cepas de *Campylobacter*, quando se tem a presença de mais de um *primer* (HERNANDEZ et al., 1995; ONO et al., 2003; ACIK e CETINKAYA, 2006). Como vantagem principal, a técnica RAPD não necessita do conhecimento prévio sobre genética ou dados extras sobre as cepas (BOWDITCH et al., 1993).

A amplificação aleatória do perfil de DNA por meio do RAPD-PCR é amplamente utilizada para descrever a filogenia de diversas espécies bacterianas,

determinando assim, a diversidade ou similaridade entre as estirpes (SIDDIQUI et al., 2015).

As técnicas de tipagem molecular têm sido consideradas fundamentais para melhorar as investigações epidemiológicas e rastrear possíveis fontes de infecção por *Campylobacter* spp. Estas técnicas permitem correlacionar os dados filogenéticos com outras características como fatores de virulência, locais de isolamento e resistência antimicrobiana, contribuindo para o entendimento da disseminação de genótipos, possível virulência e determinação de fontes comuns de contaminação e/ou infecção. Também possibilitam a associação entre bactérias presentes nos alimentos com as isoladas de infecções humanas (MÜLLNER et al., 2010; BATZ et al., 2012).

CAPÍTULO 2

Biofilmes e susceptibilidade aos antimicrobianos de *C. jejuni* isoladas de carcaças de frangos no Brasil

Artigo a ser publicado no periódico
Food Microbiology

BIOFILMES E SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE *C. jejuni* ISOLADAS DE CARCAÇAS DE FRANGOS NO BRASIL

Renata R. Prado^{1a}; Roberta T. Melo^a; Eliane P. Mendonça^a; Guilherme P. Monteiro^a;
Silvia C. Brasão^a; Daise A. Rossi^a

^a Laboratório de Epidemiologia Molecular, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de
Uberlândia, Rua Ceará, s/n, Bloco 2D, Sala 42, Bairro Umuarama, Uberlândia, MG 38402-018, Brasil

RESUMO

Objetivou-se avaliar a susceptibilidade aos antimicrobianos antes e após a formação de biofilmes em meio de cultivo Mueller Hinton (MH) e meio MH adicionado de *chicken juice* (CJ), determinar a concentração inibitória mínima (CIM) para tetraciclina e a similaridade genética de 30 cepas de *C. jejuni*. As cepas foram previamente isoladas de carcaças de frango produzidas por uma empresa brasileira com ciclo completo de produção, sob inspeção federal e habilitada à exportação, entre os anos de 2015 e 2016. A susceptibilidade antimicrobiana para os antibióticos amoxicilina/ácido clavulânico, azitromicina, eritromicina, ciprofloxacina e tetraciclina foi realizada pelo teste de disco difusão, a CIM para tetraciclina pela técnica de microdiluição em caldo e a filogenia por RAPD-PCR. Os maiores percentuais de resistência foram observados para tetraciclina, amoxacilina/ácido clavulânico e ciprofloxacina, sendo observado aumento ($p < 0,05$) na resistência para tetraciclina, de 73,3% para 93,3%, quando comparou-se *C. jejuni* antes e após a formação do biofilme em MH com CJ, respectivamente. Nessas mesmas condições, observou-se diminuição ($p < 0,05$) para a resistência a amoxacilina/ácido clavulânico, de 60% para 33,3%. A resistência a ciprofloxacina manteve-se constante em torno de 60%. A mesma comparação foi realizada após classificar as cepas em relação à quantidade de classes de antibióticos, como resistentes a nenhuma, uma a duas ou três a quatro classes de antimicrobianos, e não se observou diferença entre as formas de vida antes e após a formação de biofilme. Foram identificados 15 perfis de resistência aos antimicrobianos para as cepas antes da formação de biofilme e 12

¹ Autor correspondente - E-mail: renatarprado@yahoo.com.br (R. R. Prado)

para as bactérias em biofilme em MH e MH com CJ, com 12 (40,0%), 7 (23%) e 8 (26,7%) cepas consideradas multirresistentes, respectivamente. A CIM foi mais eficiente ($p < 0,05$) na detecção de uma maior quantidade de cepas em suspensão resistentes à tetraciclina. A avaliação filogenética demonstrou a presença de sete *clusters* com similaridade superior a 80%, sendo que os perfis A e E apresentaram similaridade de 100% e, portanto, foram consideradas clones. Conclui-se que na forma séssil em presteça de *chicken juice*, um maior número de cepas foram resistentes à tetraciclina e mais sensíveis à amoxicilina/ácido clavulânico. A presença de cepas multirresistentes e resistentes às drogas de escolha para o tratamento da campilobacteriose humana é preocupante em ambas as formas de vida de *C. jejuni*. A análise filogenética identificou *clusters* que indicam possível ocorrência de contaminação cruzada e de genótipos persistentes no ambiente de abate.

Palavra-chave: Campilobacteriose. CIM. RAPD. Resistência antimicrobiana.

1. Introdução

Bactérias do gênero *Campylobacter* impactam a saúde humana, pois está entre os agentes etiológicos mais frequentes em doenças gastrointestinais de origem alimentar na Europa e Estados Unidos (EFSA, 2010a, Scallan et al., 2011; Perio et al., 2013; EFSA, 2015). Dentre as espécies, *C. jejuni* é mais implicada na doença humana quando comparada a *C. coli* e demais espécies (CFSPH, 2013; EFSA, 2016; WHO, 2016).

O consumo de alimentos de origem animal contaminados e mal cozidos como o leite e derivados lácteos não pasteurizados e a carne bovina, suína e aves são os fatores de maior risco para a campilobacteriose humana (WHO, 2013; CFSPH, 2013; Tam et al., 2014; EFSA, 2015a), além da água não tratada (CFSPH, 2013). Dentre estes, a carne de frango e seus derivados são os alimentos mais incriminados em casos da doença (CFSPH, 2013; EFSA, 2015a).

Vários fatores estão relacionados à presença e aos níveis de *Campylobacter* na carne de frango (EFSA, 2010b), dentre eles, a capacidade de se estabelecer em biofilmes. Estes são definidos como um agrupamento de bactérias estruturadas e aderidas umas às outras por uma matriz extracelular (MEC) (Brown, 2014).

Várias vantagens aos micro-organismos em biofilmes são atribuídas à MEC, como permitir que permaneçam hidratadas e metabolicamente ativas, pois retêm os nutrientes e líquidos (Sutherland, 2001; Billings et al., 2013). Adicionalmente, a MEC reduz o acesso a algumas moléculas maiores, como as de alguns sanitizantes e antimicrobianos (Mulcahy et al., 2008; Billings et al., 2013), conferindo proteção às células em biofilme.

Hannan et al. (2010) argumentam que as trocas gênicas são favorecidas entre os micro-organismos associados em biofilmes. Provavelmente, a capacidade de algumas cepas de *Campylobacter* em realizar transformação (Svensson et al., 2014) seja facilitada com a maior proximidade entre os micro-organismos e permita que estas bactérias abtenham DNA exógeno, incluindo genes relacionados à resistência.

Em biofilmes, as bactérias estão mais protegidas das condições adversas do ambiente como temperatura, estresse oxidativo, privação de nutrientes, ação de antimicrobianos, dentre outros, auxiliando na sua perpetuação. Isso faz com que a formação destas comunidades em equipamentos, instrumentos e ambiente de abate se tornem fontes contínuas de contaminação das carcaças de frangos (Brown et al., 2014).

A Organização Mundial de Saúde alerta sobre o aumento da resistência aos antimicrobianos em bactérias zoonóticas, classificando-a como alarmante. Esta característica tem sido observada em bactérias do gênero *Campylobacter* isoladas de animais, alimentos e humanos, com o agravante de apresentarem resistência aos mesmos antimicrobianos (OMS, 2017).

Diante do impacto da campilobacteriose na saúde pública, da posição de destaque do Brasil de maior exportador mundial de carnes de frangos (ABPA, 2016) e da emergência da resistência antimicrobiana em bactérias zoonóticas (Perio et al., 2013; EFSA, 2015; OMS, 2017), torna-se necessário o monitoramento constate desse agente e a investigação sobre as características dessas cepas, como a susceptibilidade antimicrobiana e a capacidade de formar biofilmes.

Objetivou-se avaliar a resistência antimicrobiana de *C. jejuni* isoladas de carcaças de frango antes da formação de biofilme e nas formas sésseis (com e sem a presença de *chicken juice*), a concentração inibitória mínima para a tetraciclina, e ainda, verificar a disseminação das cepas por análise molecular.

2. Material e métodos

2.1. Desenho do estudo

O estudo foi conduzido com cepas de *C. jejuni* isoladas de carcaças de frangos. Os isolados foram avaliados quanto à susceptibilidade antimicrobiana na forma planctônica e séssil pelo método de difusão em disco para a determinação dos perfis de resistência. Na forma séssil a mesma análise foi realizada para biofilmes formados em caldo Mueller Hinton (MH) e em caldo MH suplementado com *chicken juice*, para simular as condições da indústria.

O teste da CIM (concentração inibitória mínima) foi realizado para o antimicrobiano tetraciclina em todas as cepas na forma planctônica.

A análise filogenética por RAPD-PCR foi utilizada para determinar a disseminação de genótipos e verificar se pode ser relacionada com os perfis de resistência aos antimicrobianos.

2.2. Obtenção das cepas

Foram utilizadas 30 cepas de *C. jejuni* provenientes da análise de 442 carcaças de frangos resfriadas ou congeladas, prontas para a comercialização, isoladas no período de setembro de 2015 a março de 2016, oriundos de uma indústria avícola brasileira. Os frangos foram abatidos em três estados distintos, em frigoríficos habilitados para a exportação e sob fiscalização do Serviço de Inspeção Federal.

As cepas utilizadas foram previamente isoladas e caracterizadas por Melo (2017), seguindo os protocolos para isolamento da ISO (2006). A identificação da espécie foi realizada por PCR-multiplex, conforme protocolo definido por Harmon et al. (1997). As estirpes foram armazenadas a -80°C.

Para o estudo, as cepas foram reativadas em caldo Bolton (Oxoid) suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado (Laborclin), e incubadas a temperatura de 37°C em microaerofilia (Probac) por 48 horas. Após, foram estriadas na superfície de ágar CCDA (*Campylobacter Blood-Free Selective Agar Base*) (Oxoid) e incubadas nas mesmas condições (ISO, 2006).

2.3. Ajuste do inóculo de *C. jejuni* na forma planctônica

Após a reativação das cepas em ágar CCDA (*Campylobacter Blood-Free Selective Agar Base*) (Oxoid), colônias isoladas foram introduzidas em 2 mL de NaCl 85% (Synth®) e a concentração padronizada em 0,5 na escala de McFarland.

2.4. Formação de biofilme

Para a formação do biofilme, inicialmente as culturas presentes nas placas de CCDA foram paralelamente transferidas para 20 mL de caldo MH (Difco) e para 20 mL de caldo MH (Difco) suplementado com 5% de *chicken juice* (CJ) e incubadas a 37°C por 48 horas sob microaerofilia. Após o crescimento, a suspensão bacteriana em MH e aquelas suplementadas com CJ foram padronizadas para uma $DO_{600} = 0,22$ a $0,28$ que corresponde a 10^8 UFC/mL e centrifugadas a 5.000 rpm por 10 min a 4°C. Após descarte do sobrenadante, as células foram lavadas e centrifugadas duas vezes em 20 mL solução estéril de NaCl 0,9% (Synth®). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em 20 mL de solução de NaCl 0,9% e 100 µL da suspensão de cada amostra foi diluída em 10 mL com caldo MH, de maneira a obter um inóculo final de 10^4 UFC/mL.

A formação de biofilmes foi realizada de acordo com Sulaeman et al. (2009), com modificações. Resumidamente, 200 µL da suspensão bacteriana em MH e em MH com 5% de CJ contendo 10^4 células foram adicionadas em placas de 96 poços e incubadas por 48h a 37°C em condições de microaerofilia. Após, as bactérias aderentes foram lavadas duas vezes com solução de NaCl 0,9% estéril e recolhidas por raspagem dos poços durante 90 segundos em solução de NaCl 0,9%. Os produtos das raspagens corresponderam à forma séssil de *C. jejuni* em MH e em MH com CJ, os quais foram submetidos ao teste de susceptibilidade antimicrobiana pelo método de difusão em disco.

2.5. Teste da difusão em discos

O ensaio foi realizado em *C. jejuni* nas suas formas planctônica e séssil, nos substratos MH e MH+CJ. O protocolo foi o recomendado para bactérias fastidiosas pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2014).

A preparação e padronização dos inóculos para células planctônicas foram realizadas seguindo o método de suspensão direta das colônias. Foram selecionadas 10 a 15 colônias puras do ágar CCDA (Oxoid) e transferidas para tubos contendo 2 mL de solução de NaCl 0,85% (Synth®). A turbidez foi ajustada e comparada à da solução padrão de MacFarland a 0,5, correspondente a aproximadamente 10^8 UFC/mL. Já as células em biofilme em MH e MH+CJ, apresentaram como inóculo o produto das raspagens dos poços. Em seguida, os inóculos foram semeados em ágar Mueller Hinton (MH) (Difco®) acrescido de 5% de sangue desfibrinado de carneiro (Laborclin®). Após absorção do inóculo seguiu-se a aplicação dos discos.

Os antimicrobianos, as concentrações e as classes testadas foram: amoxicilina com ácido clavulânico (AMC 30 µg) (β-lactâmico – penicilina), azitromicina (AZI 15 µg) (macrolídeo), eritromicina (ERI 15 µg) (macrolídeo), ciprofloxacina (CIP 5 µg) (fluoroquinolona) e tetraciclina (TET 30 µg) (tetraciclina) (LABORCLIN®).

As zonas de inibição foram medidas e as bactérias classificadas como sensíveis (S), intermediárias (I) ou resistentes (R) ao antimicrobiano testado (EUCAST, 2014).

As cepas IAL 2383 e *C. jejuni* NCTC 11351 foram utilizadas como controle.

2.6. Concentração inibitória mínima (CIM)

Em paralelo ao teste de disco difusão, foi determinada a CIM para a tetraciclina nas cepas de *C. jejuni* em sua forma planctônica, utilizando o método da microdiluição em caldo (CLSI, 2003, 2010). O critério de escolha deste antimicrobiano baseou-se na utilização dessa droga na medicina veterinária e humana e ocorrência de resistência em ambas. As concentrações de tetraciclina testadas foram: 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 e 256 µg. mL⁻¹.

Para a determinação da CIM foi utilizado o meio de cultivo MH (Oxoid) previamente ajustado com 20-25mg de Ca²⁺/L, 10-12,5mg de Mg²⁺/L e 5% de sangue desfibrinado de carneiro (CLSI, 2003, 2010).

Em placas de microdiluição de 96 poços foram adicionados 180 µL de caldo MH (Oxoid) contendo as oito concentrações de tetraciclina previamente estabelecidas. A suspensão bacteriana foi preparada em NaCl 0,9% estéril

correspondente a escala 0,5 de McFarland e 20 µL desta suspensão foi transferida para os poços contendo as concentrações de tetraciclina em MH (CLSI, 2003, 2010).

As microplacas foram incubadas a 42°C durante 48 horas, sob condição de microaerofilia (Probac) e, após, realizada a leitura visual. Foi definida como a CIM a menor concentração do antibiótico na qual não foi observado crescimento visível da bactéria, pela ausência de turvação do meio.

Em todas as determinações foram utilizados controle negativo composto do meio sem adição de bactérias e as cepas de *C. jejuni* IAL 2383 e NCTC 11351 como controles positivos.

2.7. Análise Filogenética

A similaridade genética entre os isolados foi determinada pela técnica de RAPD-PCR (*Random Amplification of Polymorphic DNA*). As reações foram realizadas com os iniciadores HLWL85 (5'ACGTATCTGC3') e 1290 (5'GTGGATGCGA3') (Mazurier et al., 1992; Akopyanz et al., 1992).

A técnica do RAPD-PCR foi realizada de acordo com Akopyanz et al. (1992). A reação foi preparada em um volume total de 20 µL, composto por 10 ng do DNA bacteriano, 10 mM de Tris-HCL, 50 mM de KCl, 2,0 mM de MgCl₂, 1U Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen®), 200 µM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (dNTP) (Invitrogen®) e 30 picomoles do *primer* (Invitrogen®).

A amplificação ocorreu nas seguintes condições: 1 ciclo de desnaturação inicial a 92°C por 2 minutos; 35 ciclos das três etapas: desnaturação a 92°C por 15 segundos, anelamento a 36°C por 1 minutos, extensão a 72°C por 1 minuto; e um ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Affymetrix®), utilizando o tampão de corrida TBE 0,5x (Invitrogen®) e como padrão de peso molecular o marcador de 100pb (Invitrogen®). O gel foi corado com Syber Safe (Invitrogen®), visualizados e capturados em transiluminador (Loccus Biotecnologia).

O dendrograma foi construído utilizando o software GelCompar II, (*Comparative Analysis of Electrophoresis Patterns*), versão 1.50. A comparação dos padrões de bandas foi realizada pelo método UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic mean*), utilizando o coeficiente de similaridade de Dice.

2.8. Análise dos resultados

A análise dos resultados foi realizada conforme Ayres et al. (2007). Para comparar os resultados do teste de disco difusão entre as células planctônicas e sésseis (em MH e MH+CJ), foi utilizado o teste binomial para duas proporções. O teste de Friedman foi utilizado para comparar os resultados do método de disco difusão e CIM para a tetraciclina. Em todos os testes adotou-se um nível de significância de 5%, utilizando o Programa Action 2.8 para os cálculos.

3. Resultados e Discussão

Na tabela 1 estão apresentados os percentuais de resistência de *C. jejuni* frente aos cinco antimicrobianos testados. Os resultados referem-se ao somatório dos isolados classificados como resistente e intermediário pelo teste de disco difusão. Para *C. jejuni* planctônica observou-se maior resistência à tetraciclina, com 22/30 cepas (73,3%), seguido da amoxicilina/ácido clavulânico e a ciprofloxacina, cada um com 18 cepas resistentes (60,0%).

Altos percentuais de resistência à tetraciclina e ciprofloxacina também foram observados por Simaluiza et al. (2015) em cepas de *Campylobacter* spp. isoladas de carcaças de frangos no Chile, onde 32/51 (62,7%) eram resistentes a estes antimicrobianos. Ainda neste estudo, os autores encontraram 78,1% das cepas resistentes à tetraciclina e 98,8% resistentes a ciprofloxacina.

No Brasil, Moura et al. (2013) encontraram 93,75% de resistência à tetraciclina em 18 cepas de *C. jejuni* isoladas de carcaças de frangos congeladas.

A resistência à ciprofloxacina pode ser explicada pelo fato desta droga ser considerada similar a enrofloxacin que, é de uso exclusivo veterinário (Endtz et al., 1991; Idowu et al., 2010). Com o uso frequente da enrofloxacin na avicultura é possível que tenha havido seleção de cepas resistentes à ciprofloxacina, explicando a resistência encontrada em 60% das cepas.

O surgimento de bactérias resistentes às fluoroquinolonas é preocupante, pelo fato de serem utilizadas para tratar infecções humanas graves, podendo a resistência a estas drogas causar complicações no tratamento (WHO, 2012; Kilonzo-Nthenge et al., 2013; EFSA, 2017).

Nos EUA, desde 2005, a *Food and Drug Administration* (FDA) proibiu o uso das fluoroquinolonas na avicultura alegando que cepas de *Campylobacter* resistentes a este antimicrobiano poderiam ser transmitidas pela carne desses animais e causar infecção humana, sendo uma ameaça à saúde coletiva (FDA, 2014). Além dos EUA, na Noruega e na Austrália também não é permitido o uso de quinolonas na avicultura, e estudos realizados nesses países demonstram que ainda não há relatos de cepas de *Campylobacter* resistentes às fluorquinolonas (Cui et al., 2005; Norström et al., 2007; Obeng et al., 2012). Já no Brasil, o uso da enrofloxacin não é proibido, mas é de uso exclusivo na medicina veterinária, podendo ser usado para terapêutica na avicultura (Obeng et al., 2012).

Atualmente, com a emergência da resistência antimicrobiana surgem preocupações a respeito da eficácia dos tratamentos de doenças em humanos. Por consequência, a Organização Mundial da Saúde (OMS), em março de 2017, listou pela primeira vez as bactérias mais resistentes a determinadas classes de antibióticos e *Campylobacter* foi classificada em nível de alta prioridade em relação a resistência às fluoroquinolonas (OMS, 2017).

A alta resistência encontrada para a tetraciclina (22/30 – 73,3%) e para amoxicilina/ácido clavulânico (18/30 – 60,0%) pode ser explicada pelo fato destas drogas ainda serem utilizadas de forma terapêutica nos animais e, dessa forma, exercer uma pressão seletiva sobre os micro-organismos (WHO, 2012; Iovine, 2013). Diante disto, é de extrema importância monitorar constantemente os níveis de susceptibilidade de bactérias zoonóticas a esses antimicrobianos e privilegiar o uso racional destas drogas (Kilonzo-Nthenge et al., 2013).

Para os macrolídeos foram encontrados os menores percentuais de resistência, com 4/30 (13,3%) para azitromicina e 6/30 (20,0%) para eritromicina. Trabalho realizado por Ferro et al. (2015) no Paraná também encontrou elevada susceptibilidade à eritromicina, equivalente a 95,8% (23/24) cepas de *Campylobacter* spp. isoladas de carcaças de frangos. Estes dados reforçam o fato dos macrolídeos serem drogas de primeira escolha para o tratamento da campilobacteriose humana (EFSA, 2016; EFSA, 2017).

Ainda na Tabela 1, ao analisar as cepas em biofilme formado em MH, observou-se que o maior percentual de resistência foi mantido para tetraciclina (22/30 – 73,3%). A diferença cabe aos biofilmes suplementados com CJ que

303 permitiram o desenvolvimento de resistência a um maior número de cepas (28/30 –
304 93,3%).

305 Uma situação que pode explicar essa mudança de comportamento seria o
306 fato de que o biofilme fornece um ambiente mais favorável para a sobrevivência das
307 estirpes, protegendo da ação de grandes moléculas como os antimicrobianos e,
308 principalmente, pelo fato de favorecer as mutações e transferências de material
309 gênico entre as cepas, inclusive genes de resistência aos antimicrobianos (Hannan
310 et al., 2010).

311 Além disso, biofilmes de *C. jejuni* formados na presença de *chicken juice*
312 permitem a formação de uma estrutura séssil mais madura e de forte intensidade,
313 que permitem às cepas uma maior proteção contra condições adversas, incluindo a
314 presença de antimicrobianos (Melo et al., 2017).

315 Nos estudos de Bae e Joe (2013), as células de *C. jejuni* em biofilme
316 apresentaram frequências significativamente mais altas de resistência a
317 ciprofloxacina ($p= 0,006$) quando comparadas com as células planctônicas. Porém,
318 em nosso estudo, a resistência a ciprofloxacina se manteve constante, independente
319 se em forma de vida séssil ou planctônica.

320 De maneira contraditória, a resistência à amoxicilina e ácido clavulânico foi
321 reduzida para *C. jejuni* séssil na presença de *chicken juice* (Tabela 1). É possível
322 que algum fator possa ter contribuído para que as cepas em *chicken juice* ficassem
323 mais expostas à presença do antibiótico. O fato de o *chicken juice* permitir a
324 formação de um biofilme mais maduro em menor tempo favorece a formação de
325 poros que permitem o acesso das bactérias à água e demais nutrientes e
326 possivelmente ao antibiótico.

327 Em Portugal, das 29 cepas de *C. jejuni* isoladas de carcaças de frangos,
328 100% apresentam sensibilidade quando testadas com amoxicilina/ácido clavulânico
329 (Borges, 2010). Resultados semelhantes foram encontrados na região do Sul do
330 Brasil, em que, 100% das 27 cepas de *C. jejuni* isoladas de suabes de cloaca de
331 frangos, foram sensíveis à associação destes antibióticos (Pozza et al., 2011).

332 Para os demais antimicrobianos, apesar da variação nos percentuais, não foi
333 identificada diferença significativa entre os testes.

334 Uma provável explicação para a manutenção da resistência em todos os
335 testes se deve à metodologia utilizada para avaliação das formas sésseis. Em nosso
336 estudo, as células foram raspadas do biofilme e só depois expostas aos

antimicrobianos, o que pode ter causado a destruição da matriz protetora, deixando a bactéria vulnerável à ação dos antimicrobianos. É possível que a aplicação do antibiótico diretamente nos biofilmes pudesse gerar resultados diferentes.

Na tabela 2 foi demonstrada a resistência a uma ou mais classes de antimicrobianos nos diferentes tratamentos. Observa-se que a multirresistência foi identificada em 40% (12/30) de *C. jejuni* antes da formação de biofilme, 23,3% (7/30) para as cepas sésseis em MH, e 26,7% (8/30) para *C. jejuni* sésseis em MH com *chicken juice*. Não houve diferença significativa no perfil de multirresistência entre os tratamentos ($p>0,05$).

Na tabela 3 estão demonstrados 15 perfis de resistência aos antimicrobianos (A1 a A15) em *C. jejuni* antes da formação de biofilme, sendo que os perfis de A9 a A14 agruparam cepas de caráter multirresistente, correspondente a 40,0% (12/30) das cepas. A resistência comum aos macrolídeos e fluoroquinolonas, antimicrobianos de escolha no tratamento humano da campilobacteriose, foi identificada em 20,0% (6/30) das cepas multirresistentes, pertencentes aos perfis A10, A12, A13 e A14.

Para as cepas em biofilme sem *ckicken juice*, 12 perfis de resistência foram descritos (B1 a B12), sendo que os perfis de B8 a B11 agruparam 7/30 (23,3%) isolados multirresistentes. Os perfis B5 (AMC TET) e B6 (CIP TET) foram os mais freqüentes. A resistência comum aos macrolídeos e fluoroquinolonas foi identificada nos perfis B10 e B11, em 3/30 (10,0%) cepas multirresistentes (Tabela 4).

Na tabela 5 estão demonstrados 12 perfis de resistência (C1 a C12) obtidos para *C. jejuni* em biofilme com *ckicken juice*. Oito isolados (26,7%) foram classificados como multirresistentes, correspondentes aos perfis C7 a C11. O perfil C5 foi o mais frequente, com 36,7% (11/30). Seis cepas multirresistentes apresentaram resistência conjunta às drogas de escolha, macrolídeos e fluoroquinolonas, presentes nos perfis C8, C9, C10 e C11.

C. jejuni está comumente envolvida em casos humanos de doenças alimentares (EFSA, 2015), desta forma, os elevados percentuais de resistência encontrados neste estudo geram preocupações quanto às perspectivas no tratamento de infecções humanas. Isto se deve à possibilidade de cepas resistentes isoladas do frango de corte serem transferidas ao homem via alimento contaminado, as quais podem não responder adequadamente a terapia antimicrobiana (CFSPH, 2013).

No teste de microdiluição para tetraciclina, considerando as concentrações limites para classificação (CLSI, 2010), a maioria dos isolados de *C. jejuni* (90,0% - 27/30) foram resistentes e apresentaram a CIM variando de ≥ 8 a 256 $\mu\text{g/mL}$, e 10,0% (3/30) das cepas foram sensíveis com valores de CIM de 2 a 4 $\mu\text{g/mL}$.

Ao comparar a CIM com o teste de disco difusão, observou-se que foi identificado pelo teste de Friedman um maior número ($p < 0,05$) de cepas resistentes 90,0% (27/30) no teste de microdiluição em relação ao teste disco difusão (22/30- 73,3%).

Os testes de microdiluição garantem maior confiabilidade e devem ser preferencialmente utilizados na identificação da resistência bacteriana. Além disso, são capazes de indicar a dosagem exata a ser utilizada para o controle do micro-organismo, uma vez que determinam a menor concentração da droga que impede o crescimento da bactéria (BRASIL, 2012).

A análise de similaridade genética demonstrou considerável diversidade entre as cepas (Fig. 1), indicando que, provavelmente, são provenientes de distintas fontes de contaminação.

Na análise filogenética, 14 cepas foram agrupadas em sete *clusters*, identificados de A a G, cada um contendo duas cepas, as quais apresentaram similaridade superior a 80%. As cepas agrupadas nos perfis A e E, apresentaram similaridade de 100% e, portanto, foram consideradas clones. Como estas cepas foram isoladas de carcaças abatidas no mesmo dia, provavelmente, é consequência de contaminação cruzada durante o abate ou provenientes de animais de um mesmo lote.

As demais cepas apresentaram proximidade genética inferior a 80% e, assim, foram classificadas como genótipos distintos.

As cepas do *cluster* C apresentaram 83,3% de similaridade genética, as dos *clusters* B, D e G, 85,7%, e as do *cluster* F, 90,9%. Para os grupos A, B, D e E, as cepas foram isoladas de carcaças com mesma data ou datas de abate muito próximas, reforçando que se tratavam de cepas circulantes no abatedouro. Já os *clusters* C, F e G, são compostos por cepas isoladas de carcaças abatidas com mais de uma semana de diferença, indicando a provável persistência desses genótipos no ambiente da indústria, provavelmente, devido à formação de biofilmes.

Dentro do abatedouro, a contaminação pode ocorrer em qualquer momento durante o processo de abate, nas águas do tanque de escaldagem do chiller (Allen

et al., 2007; Figueroa et al., 2009), bem como na evisceração (Herman et al., 2003; Rosenquist et al., 2006; Figueroa et al., 2009). Estes são considerados pontos críticos de contaminação, pois um grande número de carcaças são manuseadas e passam pelos mesmos tanques de água, o que aumenta as chances de contaminação cruzada.

4. Conclusão

A forma séssil permitiu que um maior número de cepas apresentasse resistência à tetraciclina e uma maior susceptibilidade à amoxicilina/ácido clavulânico. Para os demais antimicrobianos não houve alteração significativa nos perfis identificados. A presença de cepas multirresistentes e resistentes às drogas de escolha para o tratamento da campilobacteriose humana é preocupante em ambas as formas de vida de *C. jejuni*. A CIM demonstrou que um maior número de cepas são efetivamente resistentes à tetraciclina, quando comparado ao teste de disco difusão. A análise filogenética identificou *clusters* que indicam possível ocorrência de contaminação cruzada e de genótipos persistentes no ambiente de abate.

Agradecimentos

Ao CNPq pelo auxílio financeiro para a execução do estudo.

Referências

- ABPA - Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório anual ABPA 2016. São Paulo, 2016. 136 p.
http://abpabr.com.br/storage/files/versao_final_para_envio_digital_1925a_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web1.pdf. (accessed 05.17.16).
- Akopyanz, N., Bukanov, N. O., Westblom, T. U., Kresovich, S., Berg, D. E., 1992. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 20 (19), 5137-5142.

- Allen, M. V., Bull, S. A., Corry, J. E. L., Domingue, G., Jørgensen, F., Frost, J. A., Whyte, R., Gonzalez, A., Elviss, N., Humphrey, T. J. 2007. *Campylobacter* spp. contamination of chicken carcasses during processing in relation to flock colonisation. *Int. J. Food Microbiol.* 113 (1), 54-61.
- Ayres, M., Ayres Jr, M., Ayers, D.L., Santos, A. S. S., 2005. BioEstat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá; Brasília; DF; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), p. 324.
- Bae, J., Jeon, B., 2013. Increased Emergence of Fluoroquinolone-Resistant *Campylobacter jejuni* in Biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57(10), 5195-5196. doi: 10.1128/AAC.00995-13.
- Billings, N., Millan, M. R., Caldara, M., Rusconi, R., Tarasova, Y., Stocker, R., Ribbeck, K., 2013. The extracellular matrix Component Psl provides fast-acting antibiotic defense in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathogens*, 9(8). doi: 10.1371/journal.ppat.1003526.
- Borges, A.C.F. Antibiorresistência em estirpes de *Campylobacter* spp. isoladas em frangos num matadouro em Portugal.2010.(Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária)- Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2010.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA., 2012. Relatório de Pesquisa em Vigilância Sanitária de Alimentos. Brasília. 2012. 171 p. <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/73f1990042e128fdb2e4bf348b3626d1/Relat%C3%B3rioPrebafvers%C3%A3ofinalmar2012.pdf?MOD=AJPERES>. (accessed 06.20.17).
- Brown, H. L., Reutera, M., Salta, L. J., Crossa, K. L., Bettsb, R. P., Van Vliet. A. H. M., 2014. *Chicken juice* enhances surface attachment and biofilm formation of *Campylobacter jejuni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 80(22), 7053–7060. doi: 10.1128/AEM.02614-14.
- CFSPH - The Center of Food Security & Public Health, 2013. Zoonotic *Campylobacteriosis*: *Campylobacter* Enteritis, *Vibronic* Enteritis, *Vibriosis*. <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/campylobacteriosis.pdf>. (accessed 04.19.17).
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute, 2003. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition. NCCLS document M2-A8, 23(1).

- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved Guideline- Second Edition. CLSI M45-A2, 30(18).
- Cui, S., Ge, B., Zheng, J., Meng, J., 2005. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* serovars in organic chickens from Maryland retail stores. Appl. Environ. Microbiol. 71, 4108-4111. doi: 10.1128/AEM.71.7.4108-4111.2005.
- de Moura, H. M., Silva, P. R., da Silva, P. H., Souza, N. R., Racanicci, A. M., Santana, A. P., 2013. Antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* isolated from chicken carcasses in the Federal District, Brazil. J Food Prot. 76(4), 691-3. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-12-485.
- EFSA - Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses in the EU, 2008, Part A: *Campylobacter* and *Salmonella* prevalence estimates. 2010a. EFSA Journal, 8(3), 100. doi: 10.2903/j.efsa.2010.1503.
- EFSA - Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses, in the EU, 2008; Part B: Analysis of factors associated with *Campylobacter* colonisation of broiler batches and with *Campylobacter* contamination of broiler carcasses; and investigation of the culture method diagnostic characteristics used to analyse broiler carcass samples. 2010b. EFSA Journal, 8(8), 132. doi: 10.2903/j.efsa.2010.1522.
- EFSA - European Food Safety Authority, 2015. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. EFSA Journal, 2015. 14(2), 4036, 178. doi: doi:10.2903/j.efsa.2015.4036.
- EFSA - The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. 2015a. EFSA Journal, 13(12), 191. doi: 10.2903/j.efsa.2015.4329.
- EFSA - The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014. 2016. EFSA Journal, 14(2), 4380, 207pp. doi: 10.2903/j.efsa.2016.4380.
- EFSA - European Food Safety Authority, 2017. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans,

animals and food in 2015. EFSA Journal, 2017. 15(2), 4694, 212pp
doi:10.2903/j.efsa.2017.4694.

Endtz, H. P., Ruijs, G. J., van Klingeren, B., Jansen, W. H., van der Reyden, T.,
Mouton, R. P., 1991. Quinolone resistance in *Campylobacter* isolated from man
and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine.
J Antimicrob Chemother, 27(2), 199-208.

EUCAST - The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2014.
Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4.0,
valid from 2014-01-01.

FDA - Food and Drug Administration. 2014. Enrofloxacin for Poultry.
<http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/SafetyHealth/RecallsWithdrawals/ucm042004.htm>. (accessed 06.21.2017).

Ferro, I. D., Benetti, T. M., Oliveira, T. C., Abrahão, W. M., Farah, S. M., Luciano, F.
B., Macedo, R. E., 2015. Evaluation of antimicrobial resistance of *Campylobacter*
spp. isolated from broiler carcasses. Br. Poult. Sci. 56(1) 66-71. doi:
10.1080/00071668.2014.981796.

Figuerola, G., Troncoso, M., López, C., Rivas, P., Toro M., 2009. Occurrence and
enumeration of *Campylobacter* spp. during the processing of Chilean broilers.
BMC Microbiol. 9, 1-6. doi: 10.1186/1471-2180-9-94.

Hannan, S., Ready, D., Jasni, A. S., Rogers, M., Pratten, J., Roberts, A. P., 2010.
Transfer of antibiotic resistance by transformation with eDNA within oral biofilms.
FEMS Immunol. Med. Microbiol. 59(3), 345–349. doi: 10.1111/j.1574-
695X.2010.00661.x.

Harmon, K. M., Ramson, G. M., Wesley, I. V., 1997. Differentiation of *Campylobacter*
jejuni and *Campylobacter coli* by polymerase chain reaction. Mol. Cell. Probes.
11(3), 195-200. doi: 10.1006/mcpr.1997.0104.

Herman, L., Heyndrickx, M., Grijspeerdt, K., Vandekerckhove, D., Rollier I., De Zutter,
L., 2003. Routes for *Campylobacter* contamination of poultry meat:
epidemiological study from hatchery to slaughterhouse. Epidemiol. Infect. 131(3):
1169-1180. doi: 10.1017/S0950268803001183.

Idowu, O. R., Peggins, J. O., Cullison, R., Von Bredow, J. 2010. Comparative
pharmacokinetics of enrofloxacin and ciprofloxacin in lactating dairy cows and
beef steers following intravenous administration of enrofloxacin. Res. Vet. Sci.
89, 230-235. doi: 10.1016/j.rvsc.2009.12.019.

- lovine, N. M., 2013. Resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni*. *Virulence*, 4: 230- 240. doi: 10.4161/viru.23753.
- ISO- International Standards Organization., 2006. Microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. – Part 1: detection method. ISO 10272-1:2006, 2006.
- Kilonzo-Nthenge, A., Rotich, E., Nahashon, S. N. 2013. Evaluation of drug-resistant Enterobacteriaceae in retail poultry and beef. *Poult. Sci.* 92(4), 1098–1107. doi: 10.3382/ps.2012-02581.
- Mazurler, S.; Van Der Giessen, A.; Heuvelman, K.; Wernars, K., 1992. RAPD analysis of *Campylobacter* isolates: DNA fingerprinting without the need to purify DNA. *Lett. Appl. Microbiol.* 14(6), 260-262. doi: 10.1111/j.1472-765X.1992.tb00700.x.
- Melo, R. T. Emergência de *Campylobacter jejuni* no setor avícola e na saúde pública do Brasil. 2017. 186 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.
- Mulcahy, H., Charron-mazenod, L., Lewenza, S., 2008. Extracellular DNA Chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathog.* 4(11). doi: 10.1371/journal.ppat.1000213.
- Norström, M., Hofshagen, M., Stavnes, T., Schau, J., Lassen, J., Kruse H., 2007. Antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* from broilers and broiler house environments in Norway. *J. Food Prot.* 70(3), 736-738.
- Obeng, A. S., Rickard, H., Sexton, M., Pang, Y., Peng, H., Barton, M., 2012. Antimicrobial susceptibilities and resistance genes in strains isolated from poultry and pigs in Australia. *J. Appl. Microbiol.* 113(2), 294-307. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05354.x.
- OMS - Organização Mundial da Saúde, 2017. OMS publica lista inédita de bactérias resistentes a antibióticos. <https://nacoesunidas.org/oms-publica-lista-inedita-de-bacterias-resistentes-a-antibioticos/>. (Accessed 06.21.17).
- Perio, M. A. de., Niemeier, R. T., Levine, S. J., Gruszynski, K., Gibbins. J. D., 2013. *Campylobacter* infection in poultry-processing workers, Virginia, USA, 2008-2011. *Emerg. Infect. Dis.* 19(2), 286-288. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23347390>. (accessed 05.15.2016).
- Pozza, J. S.; Würfel, S. F. R.; Vaz, C. S. L.; Rech, D. V.; Mattos, G. L. M.; Santos, F. B.O., 2011. Perfis de resistência a antimicrobianos identificados em

- 574 *campylobacter jejuni* isolados de frangos de corte. Embrapa Suínos e Aves.
575 Brasília, DF, 2011.
- 576 Rosenquist, H., Sommer, H. M., Nielsen, N. L., Christensen, B. B., 2006. The
577 effect of slaughter operations on the contamination of chicken carcasses
578 with thermotolerant *Campylobacter*. Int. J. Food. Microbiol. 108(2), 226-232. doi:
579 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.12.007.
- 580 Scallan E, Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V. et al., 2011. Foodborne illness
581 acquired in the United States—Major pathogens. Emerg. Infect. Dis. 17(1), 7–15.
582 doi: 10.3201/eid1701.P11101.
- 583 Simaluiza, R. J., Toledo, Z., Ochoa, S., Fernandez, H., 2015. The Prevalence and
584 Antimicrobial Resistance of *Campylobacter* *Jejuni* and *Campylobacter* *coli* in
585 Chicken Livers Used for Human Consumption in Ecuador. Journal of Animal and
586 Veterinary Advances. 14(1), 6-9. doi: 10.3923/javaa.2015.6.9.
- 587 Sulaeman, S., Le Bihan, G., Rossero, A., Federighi M, De E., et al., 2009.
588 Comparison between the biofilm initiation of *Campylobacter jejuni* and
589 *Campylobacter coli* strains to an inert surface using BioFilm Ring Test. J. Appl.
590 Microbiol. 108(4), 1303–1312. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04534.x.
- 591 Sutherland, I. W., 2001. The biofilm matrix—an immobilized but dynamic Microbial
592 environment. Trends Microbiol. 9(5), 222–227. doi:
593 [http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02012-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02012-1).
- 594 Svensson, S. L.; Pryima, M.; Gaynor, E. C., 2014. Flagella-mediated adhesion and
595 extracellular DNA release contribute to biofilm formation and stress tolerance of
596 *Campylobacter jejuni*. PLoS ONE. 9(8). doi:
597 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106063>.
- 598 Tam, C., Larose, T., O'Brien, S., 2014. Costed extension to the second study of
599 infectious intestinal disease in the community: identifying the proportion of
600 foodborne disease in the United Kingdom and attributing foodborne disease by
601 food commodity. IID2 extension report.: Project B18021 (FS231043). London:
602 Food Standards Agency, p. 171.
- 603 WHO, 2013. The Global View of Campylobacteriosis. Report of expert consultation.
604 UTRECHT, NETHERLANDS, 9-11 JULY 2012.
605 http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/80751/1/9789241564601_eng.pdf.
606 (Accessed 05.20.16).

WHO, 2016. Media Centre. *Campylobacter*. Fact sheets. 2016.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/en/>. (Accessed 10.16.16).

Legenda da Figura

Figura 1: Dendrograma de resultados de RAPD-PCR com os primers 1290 e HLWL, utilizando a média de experimentos (average from experiments) com tolerância de 1,5% e método UPGMA com otimização de 80%, pelo programa GelCompar de 30 isolados de *C. jejuni*, oriundos de frangos resfriados e congelados. Perfil A – 100% de homologia (clone). Perfil B – *cluster* com 85,7% de homologia. Perfil C – *cluster* com 83,3% de homologia. Perfil D – *cluster* com 85,7% de homologia. Perfil E – 100% de homologia (clone). Perfil F – *cluster* com 90,9% de homologia. Perfil G – *cluster* com 85,7% de homologia. ID – identificação das cepas. Date: data de isolamento das cepas.

As Tabelas

Tabela 1. Resistência aos antimicrobianos de 30 cepas de *C. jejuni* isoladas de carcaças de frango de corte no Brasil, nos anos de 2015 a 2016 (planctônicas e após formação de biofilme em MH e biofilme em MH com CJ).

Antimicrobianos	<i>C. jejuni</i> planctônicas	<i>C. jejuni</i> sésseis em MH	<i>C. jejuni</i> sésseis em MH + CJ
	n (%)	n (%)	n (%)
Amoxicilina/Ác. Clavulânico	18 (60,0) ^A	13 (43,3) ^A	10 (33,3) ^B
Azitromicina	4 (13,3) ^A	3 (10,0) ^A	6 (20,0) ^A
Ciprofloxacina	18 (60,0) ^A	18 (60,0) ^A	19 (63,3) ^A
Eritromicina	6 (20,0) ^A	4 (13,3) ^A	4 (13,3) ^A
Tetraciclina	22 (73,3) ^A	22 (73,3) ^A	28 (93,3) ^B

MH: caldo Mueller Hinton; MH+CJ: caldo Mueller Hinton suplementado com 5% de *chicken juice*; n (%): frequência de cepas classificadas como resistentes e intermediárias pelo teste disco difusão. Letras diferentes na mesma linha indicam que há diferença significativa ($p \leq 0,05$) pelo teste binomial para duas proporções.

Tabela 2. Percentual de resistência de *C. jejuni* isolados de carcaças de frango de corte no Brasil entre os anos de 2015 e 2016.

Tratamentos	Número de cepas (%) resistentes conforme o número de classes de antimicrobianos*			Total
	0	1-2	3-4	
<i>C. jejuni</i> planctônicas	3 (10,0) ^A	15 (50,0) ^A	12 (40,0) ^A	30 (100,0)
<i>C. jejuni</i> sésseis em MH	2 (6,7) ^A	21 (70,0) ^A	7 (23,3) ^A	30 (100,0)
<i>C. jejuni</i> sésseis em MH + CJ	1 (3,3) ^A	21 (70,0) ^A	8 (26,7) ^A	30 (100,0)

MH: caldo Mueller Hinton; MH+CJ: caldo Mueller Hinton suplementado com 5% de *chicken juice*; * Os percentuais referem-se à soma das cepas classificadas como resistente e intermediária pelo teste de disco difusão. Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste do Qui-Quadrado.

Tabela 3. Perfis de resistência aos antimicrobianos em 30 cepas de *C. jejuni* planctônicas isoladas de carcaças de frango de corte no Brasil entre os anos de 2015 e 2016.

Perfis	Resistência a antimicrobianos	Classes	N (%)
A1	AMC	1	1 (3,3)
A2	(AMC)	1	1 (3,3)
A3	CIP	1	1 (3,3)
A4	TET	1	2 (6,7)
A5	(AMC) ERI	2	1 (3,3)
A6	AMC CIP	2	1 (3,3)
A7	AMC TET	2	4 (13,4)
A8	CIP TET	2	4 (13,4)
A9	(AMC) CIP TET	3	1 (3,3)
A10	CIP ERI TET	3	2 (6,7)
A11	AMC CIP TET	3	5 (16,7)
A12	AMC AZM CIP TET	4	1 (3,3)
A13	(AMC) AZM CIP ERI TET	4	1 (3,3)
A14	AMC AZM CIP ERI TET	4	2 (6,7)
A15	MULTI SENSÍVEIS	4	3 (10,0)
TOTAL			30(100)

(AMC): cepas com resistência intermediária ao antimicrobiano amoxicilina/ácido clavulânico. AMC: amoxicilina/ácido clavulânico (30 µg); CIP: ciprofloxacina (5 µg); AZM: azitromicina (15 µg); ERI: eritromicina (15 µg); TET: tetraciclina (30 µg); N (%): Número e percentual de cepas com o perfil de resistência; Perfis em negrito agruparam cepas de caráter multirresistente (A9 a A14).

Tabela 4. Perfis de resistência aos antimicrobianos em 30 cepas de *C. jejuni* sésseis sem *chicken juice* isoladas de carcaças de frango de corte no Brasil entre os anos de 2015 e 2016.

Perfis	Resistência a antimicrobianos ¹	Classes ²	N (%)
B1	AZM	1	1 (3,3)
B2	CIP	1	2 (6,7)
B3	TET	1	4 (13,3)
B4	AMC CIP	2	3 (10,0)
B5	AMC TET	2	4 (13,3)
B6	CIP TET	2	6 (20,0)
B7	AZM ERI TET	2	1 (3,3)
B8	(AMC) CIP TET	3	2 (6,7)
B9	AMC CIP TET	3	2 (6,7)
B10	AMC CIP ERI TET	4	2 (6,7)
B11	AZM CIP ERI TET	3	1 (3,3)
B12	MULTI SENSÍVEIS	4	2 (6,7)
TOTAL			30(100)

(AMC): cepas com resistência intermediária ao antimicrobiano amoxicilina/ácido clavulânico. AMC: amoxicilina/ácido clavulânico (30 µg); CIP: ciprofloxacina (5 µg); AZM: azitromicina (15 µg); ERI: eritromicina (15 µg); TET: tetraciclina (30 µg); N (%): Número e percentual de cepas com o perfil de resistência. Perfis em negrito agruparam cepas de caráter multirresistente (B8 a B11).

Tabela 5. Perfis de resistência aos antimicrobianos em 30 cepas de *Campylobacter jejuni* em biofilme com *chicken juice* isoladas de carcaças de frango de corte no Brasil entre os anos de 2015 e 2016.

Perfis	Resistência a antimicrobianos ¹	Classes ²	N (%)
C1	(AMC)	1	1 (3,3)
C2	TET	1	3 (10,0)
C3	(AMC) TET	2	4 (13,4)
C4	AMC TET	2	1 (3,3)
C5	CIP TET	2	11 (36,7)
C6	AZM ERI TET	2	1 (3,3)
C7	(AMC) CIP TET	3	2 (6,7)
C8	CIP ERI TET	3	1 (3,3)
C9	AZM CIP TET	3	3 (10,0)
C10	(AMC) AZM CIP ERI TET	4	1 (3,3)
C11	AMC AZM CIP ERI TET	4	1 (3,3)
C12	MULTI SENSÍVEL	4	1 (3,3)
TOTAL			30(100)

(AMC): cepas com resistência intermediária ao antimicrobiano amoxicilina/ácido clavulânico. AMC: amoxicilina/ácido clavulânico (30 µg); CIP: ciprofloxacina (5 µg); AZM: azitromicina (15 µg); ERI: eritromicina (15 µg); TET: tetraciclina (30 µg) ; N (%): Número e percentual de cepas com o perfil de resistência; Perfis em negrito agruparam cepas de caráter multirresistente (C7 a C11).

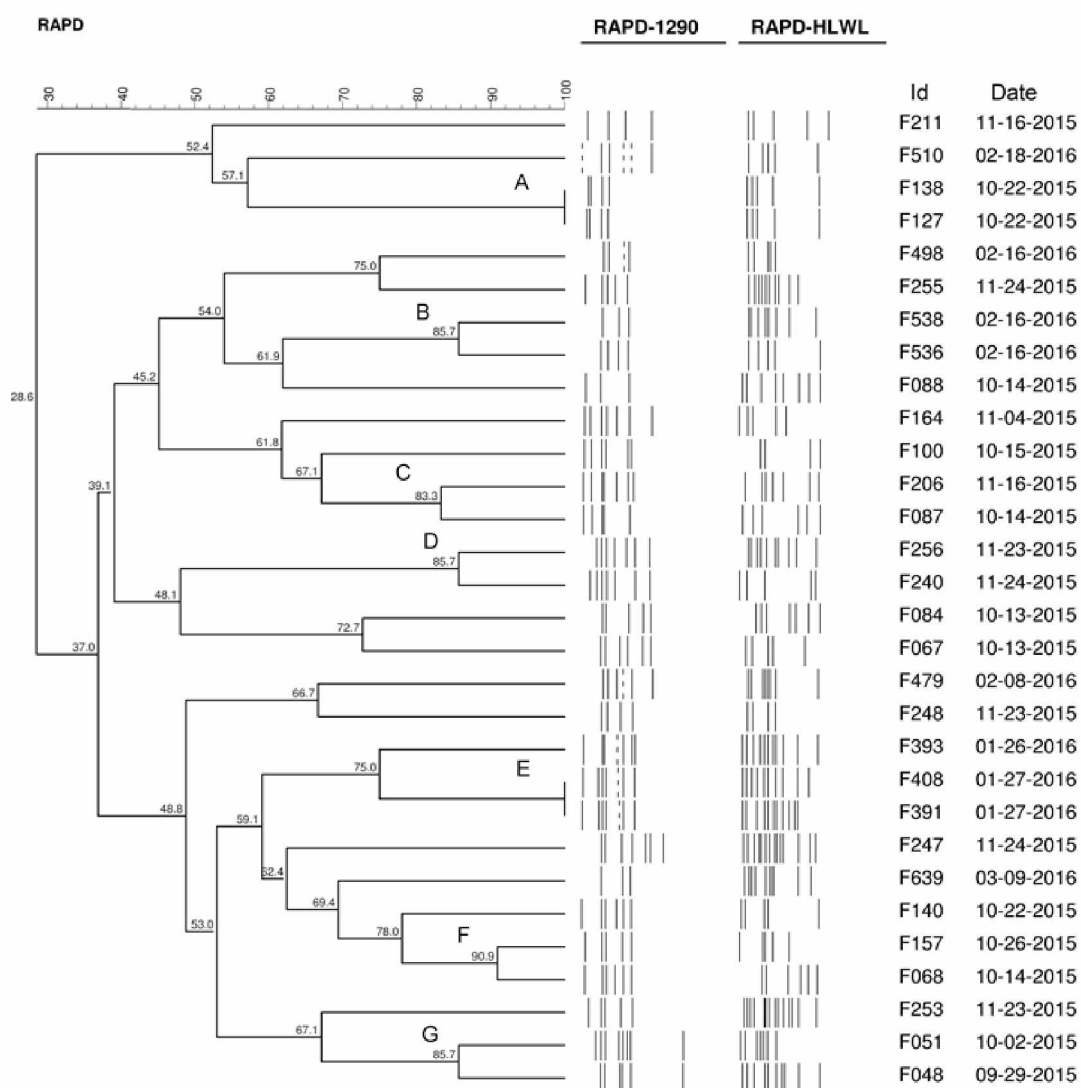


Figura 1

REFERÊNCIAS

- ABC – ABC SOCIEDAD. Bacterias resistentes a los antibióticos: um problema mundial, 2015. Disponível em: <http://www.abc.es/sociedad/abci-bacterias-resistentes-antibioticos-problema-mundial-201605312110_noticia.html>. Acesso em: 29 jun. 2017.
- ABPA - Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório anual ABPA 2016. São Paulo, 2016. 136 p. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/storage/files/versao_final_para_envio_digital_1925a_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web1.pdf>. Acesso em: 17 de maio 2016.
- Acik, M. N.; Cetinkaya, B. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Isolated from healthy cattle and sheep. *Journal of Medical Microbiology*, v. 55, n. 3, p. 331- 334, 2006.
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.46373-0>
- Adler, L. et al. Phenotypes of *Campylobacter jejuni* luxS mutants are depending on strain background, kind of mutation and experimental conditions. *PLoS ONE*, v. 9, n. 8, 2014.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104399>
- Alfredson, D. A.; Korolik V. Isolation and expression of a novel molecular class D beta-lactamase, OXA-61, from *Campylobacter jejuni*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Washington, v. 49, n. 6, p. 2515-8, 2005.
<https://doi.org/10.1128/AAC.49.6.2515-2518.2005>
- Alfredson, D. A.; Korolik, V. Identification of putative zinc hydrolase genes of the metallo-beta lactamase super-family from *Campylobacter jejuni*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 49, n. 1, p. 159-64, 2007.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2006.00197.x>
- Allen, M. V. et al. *Campylobacter* spp. contamination of chicken carcasses during processing in relation to flock colonisation. *International Journal of Food Microbiology*, v. 113, n. 1, p. 54-61, 2007.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.011>
- ALLOS, B. M. Microbiology, pathogenesis, and epidemiology of *Campylobacter* infection. 2015. Uptodate. Disponível em: <<http://www.uptodate.com/contents/microbiology-pathogenesis-and-epidemiology-of-campylobacter-infection>>. Acesso em: 22 out. 2016.
- ALTERTHUM, F. Mecanismo de ação dos antibacterianos e mecanismos de resistência. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). *Microbiologia*. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2008a. p. 79-85.
- Andersen, S. et al. Antimicrobial resistance among *Campylobacter jejuni* isolated from raw poultry meat at retail level in Denmark. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 107, n. 3, p. 250-255, 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.04.029>
- Aquino, M. H. C. et al. Diversity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Genotypes from Human and Animal Sources from Rio de Janeiro, Brazil. *Research in Veterinary Science*, London, v. 88, n. 2, p. 214–217, 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2009.08.005>

Babakhani, F. K.; Joens, L. A. Primary swine intestinal cells as a model for studying *Campylobacter jejuni* invasiveness. *Infection and Immunity*, Washington, v. 61, n. 6, p. 2723-2726, 1993.

Bae, J.; Oh, E.; Jeon, B. Enhanced transmission of antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* biofilms by natural transformation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Washington, v. 58, n. 12, p. 7573–7575, 2014.
<https://doi.org/10.1128/AAC.04066-14>

Batz, M. B.; Hoffmann, S.; Morris, J. G. Jr. Ranking the disease burden of 14 pathogens in food sources in the United States using attribution data from outbreak investigations and expert elicitation. *Journal of Food Protection*, v. 75, n. 7, p. 1278-1291, 2012.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-418>

Bebell, L. M.; Muir, A. N. Antibiotic use and emerging resistance: how can resource-limited countries turn the tide? *Global Heart*, v. 9, n. 3, p. 347-358, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.gheart.2014.08.009>

BEEF WORLD – PECUÁRIA DE CORTE BEEF WORLD. Estudo propõe carne livre de antibióticos, 2015. Disponível em: <<http://www.beefworld.com.br/noticia/estudo-propoe-carne-livre-de-antibioticos>>. Acesso em: 29 jun. 2017.

Billings, N. et al. The extracellular matrix Component Psl provides fast-acting antibiotic defense in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathogens*, v. 9, n. 8, 2013.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003526>

Birk, T. et al. *Chicken juice*, a food-based model system suitable to study survival of *Campylobacter jejuni*. *Letters in Applied Microbiology*, v. 38, n. 1, p. 66–71, 2004.
<https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01446.x>

Birk, T. et al. A comparative study of two food model systems to test the survival of *Campylobacter jejuni* at -18°C. *Journal of Food Protection*, v. 69, p. 2635–2639, 2006.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.11.2635>

BLASER, M. J.; SMITH, P. F.; KOHLER, P. F. Susceptibility of *Campylobacter* isolates to the bactericidal activity of human serum. *The Journal of Infectious Diseases*, n. 151, n. 2, p. 227-235, 1985.

BORGES, A. C. F. Antibiorresistência em estirpes de *Campylobacter* spp. isoladas em frangos num matadouro em Portugal. 2010. (Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária)- Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2010.

Bowditch, B. M. et al. Use of randomly amplified polymorphic DNA markers in comparative genome studies. *Methods in Enzymology*, v. 224, p. 294-309, 1993.
[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(93\)24022-M](https://doi.org/10.1016/0076-6879(93)24022-M)

Branda, S. S.; Vik, S.; Friedman, L.; Kolter, R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*, v. 13, n. 1, p. 20–26, 2005.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.006>

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Antimicrobianos: bases teóricas e uso clínico. Brasília, 2007. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/mo_dulo1/conceitos.htm>. Acesso em: 2 jan. 2016.

BRASIL – Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Campylobacter*: gênero *Campylobacter*: diagnóstico laboratorial clássico e molecular / Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolfo Lutz. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 40 p.: il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

Brown, H. L. et al. *Chicken juice* enhances surface attachment and biofilm formation of *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 80, n. 22, p. 7053–7060, 2014.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02614-14>

Buswell, C. M. et al. Extended survival and persistence of *Campylobacter* spp. in water and aquatic biofilms and their detection by immunofluorescent- antibody and -rRNA staining. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, n. 2, p. 733–741, 1998.

Butzler, J. P. et al. Related vibrios in stools. *The Journal of Pediatrics*, v. 82, n. 3, 493–495, 1973.
[https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(73\)80131-3](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(73)80131-3)

Cagliero, C. et al. Synergy between efflux pump CmeABC and modifications in ribosomal proteins L4 and L22 in conferring macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Washington, v. 50, n. 11, p. 3893–3896, 2006.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00616-06>

Caldwell, D. B.; Wang, Y.; Lin, J. Development, stability, and molecular mechanisms of macrolide resistance in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Washington, v. 52, n. 11, p. 3947–3954, 2008.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00450-08>

Cameron, A. et al. Hyperosmotic stress response of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Bacteriology*, Washington, v. 194, n. 22, p. 6116–6130, 2012.
<https://doi.org/10.1128/JB.01409-12>

Candon, H. L. et al. Polyphosphate Kinase 1 is a pathogenesis determinant in *Campylobacter jejuni*. *Journal of Bacteriology*, Washington, v. 189, n. 22, p. 8099–8108, 2007.
<https://doi.org/10.1128/JB.01037-07>

Carvalho, A. C. F. B. et al. *Campylobacter* em granja avícola. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v. 96, n. 540, p. 191–195, 2001.

CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. PulseNet Pathogens - *Campylobacter jejuni*, 2012. Disponível em:
<http://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens_pages/campylobacter_jejuni.htm> Acesso em: 07 dez. 2016.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet): FoodNet Surveillance Report for 2012 (Final Report). Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, CDC. 2014a.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Food Safety Homepage. *Campylobacter*. What is campylobacteriosis?, 2014b. Disponível em:

<<https://www.cdc.gov/foodsafety/diseases/campylobacter/index.html>>. Acesso em: 6 jun. 2017.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. National Notifiable Diseases Surveillance System (NNDSS). Campylobacteriosis (*Campylobacter* spp.) 2015 Case Definition. Atlanta, USA. 2015. Disponível em: <<https://wwwn.cdc.gov/nndss/conditions/campylobacteriosis/case-definition/2015/>>. Acesso em: 16 out. 2016.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Estimates of Foodborne Illness in the United States. Burden of Foodborne Illnesses. Atlanta, USA. 2016. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/foodborneburden/estimates-overview.html>> Acesso em: 15 jul. 2016.

CDSC - Sentinel surveillance of *Campylobacter* in England and Wales. Communicable Disease Report. CDR Weekly, v. 10, n. 169, 2000.

CFSPH - THE CENTER OF FOOD SECURITY & PUBLIC HEALTH. Zoonotic Campylobacteriosis: *Campylobacter* Enteritis, Vibronic Enteritis, Vibriosis, 2013. Disponível em: <<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/campylobacteriosis.pdf>>. Acessado 30.04.2016. Acesso em: 19 abril de 2017.

Chiang, W. C. et al. Extracellular DNA shields against aminoglycosides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, v. 57, n. 5, p. 2352–2361, 2013.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00001-13>

Chopra, I.; Roberts, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 65, n. 2, p. 232-260, 2001.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001>

Cogan, T. A. et al. Norepinephrine increases the pathogenic potential of *Campylobacter jejuni*. Gut, v. 56, n. 8, p. 1060–1065, 2007.
<https://doi.org/10.1136/gut.2006.114926>

Cortez, A. L. L. et al. Survey of chicken abattoir for the presence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 48, n. 6, p. 307-310, 2006.
<https://doi.org/10.1590/S0036-46652006000600001>

Costerton, J. W.; Stewart, P. S.; Greenberg, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science v. 284, n. 5418, p.1318–1322, 1999.
<https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>

DANMAP – THE DANISH INTEGRATED ANTIMICROBIAL RESISTENCE MONITORING AND RESEARCH PROGRAMME. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark. In: The Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme; 2012. ISSN 1600-2032.

Dasti, J. I. et al. Role of the plasmid-encoded *tet(O)* gene in tetracycline-resistant clinical isolates of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Journal of Medical Microbiology, v. 56, n. 6, p. 833-837, 2007.
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.47103-0>

Davies, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 2, n. 2, p. 114–122, 2003.

<https://doi.org/10.1038/nrd1008>

De Zoete, M. R. et al. Reconstitution of a functional Toll-like receptor 5 binding site in *Campylobacter jejuni* flagellin. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 16, p. 12149–12158, 2010.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.070227>

Doorduyn, Y. et al. Novel insight in the association between salmonellosis or campylobacteriosis and chronic illness, and the role of host genetics in susceptibility to these diseases. *Epidemiology and Infection*, v. 136, n. 9, p. 1225–1234, 2008.

<https://doi.org/10.1017/S095026880700996X>

Drlaca, K.; Zhao, X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Washington, v. 61, n. 3, p. 377–392, 1997.

ECDC – EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. Brazil 2014 FIFA World Cup, 12 June–13 July 2014 — 28 May 2014. Stockholm: ECDC; 2014.

EFSA - European Food Safety Authority. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses in the EU, 2008, Part A: *Campylobacter* and *Salmonella* prevalence estimates. *EFSA Journal*, v. 8, n. 3, 100 pp, 2010a.

EFSA - European Food Safety Authority. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses, in the EU, 2008; Part B: Analysis of factors associated with *Campylobacter* colonisation of broiler batches and with *Campylobacter* contamination of broiler carcasses; and investigation of the culture method diagnostic characteristics used to analyse broiler carcass samples. *EFSA Journal*, v. 8, n. 8, 132 pp, 2010b.

EFSA - European Food Safety Authority and ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control, 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal*, v. 13, n. 12, 191 pp, 2015a.

EFSA - European Food Safety Authority and ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control, 2015. EU Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. *EFSA Journal*, v. 13, n. 2, 178 pp, 2015b.

EFSA - European Food Safety Authority. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014. *EFSA Journal*, v. 14, n. 2, 207 pp, 2016.

EFSA – European Food Safety Authority. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2015. *EFSA Journal*, v. 15, n. 2, 212 pp, 2017.

EMBRAPA – Empresa Brasileira De Pesquisa Agropecuária. Anais / I Workshop de Diagnóstico Microbiológico de *Campylobacter* Aplicado à Avicultura; Clarissa Silveira Luiz Vaz, Editora - Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2012. 42 p.: il.; 29 cm. - (Documentos/Embrapa Suínos e Aves, ISSN 0101-6245; 155), 2012.

Engberg, J. et al. Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates. *Emerging Infectious Diseases*, Atlanta, v. 7, n. 1, p. 24-32, 2001.

<https://doi.org/10.3201/eid0701.010104>

EUROSURVEILLANCE editorial team. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *Euro Surveillance*, v. 17, n. 10, 2012. Disponível em: <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20113>>. Acesso em: 21 jun. 2016.

FAGUNDEZ, R.Q. Detecção de *Campylobacter*. 2005. Dissertação (mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Botucatu.

Fallon, R. et al. Antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from broiler chickens isolated at an Irish poultry processing plant. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, v. 36, n. 5, p. 277-281, 2003.

<https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01308.x>

Fauchere, J. L. et al. Association with HeLa cells of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from human feces. *Infection and Immunity*, v. 54, n. 2, p. 283-287, 1986.

FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Center for Veterinary Medicine. 2012. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/animaldrugsatfda/index.cfm>>. Acesso em: 14 out. 2016.

Fernández, H. et al. Occurrence of *Campylobacter* species in healthy well-nourished and malnourished children. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 39, n. 1, p. 56-58, 2008.

<https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000100013>

Fields, J. A.; Thompson, S. A. *Campylobacter jejuni* Csr A mediates oxidative stress responses, biofilm formation, and host cell invasion. *Journal of Bacteriology*, Washington, v. 190, n. 9, p. 3411–3416, 2008.

<https://doi.org/10.1128/JB.01928-07>

FIGHT BAC, - Partnership for Food Safety Education. Supporting consumers to prevent food poisoning. About foodborne illness, 2016. Disponível em: <<http://www.fightbac.org/food-poisoning/about-foodborne-illness/>>. Acesso em: 04 out. 2016.

FIGUEROA, G. et al. Occurrence and enumeration of *Campylobacter* spp. during the processing of Chilean broilers. *BioMed Central Microbiology*, v. 9, n. 1, p. 94, 2009.

<https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-94>

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, v. 8, n. 9, p. 623–633, 2010.

<https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>

FONSECA, FERNANDEZ, ROSSI, 2016. Belcholina Beatriz Fonseca, Heriberto Fernandez, Daise Aparecida Rossi. *Campylobacter* spp. and Related Organisms in Poultry. *Pathogen-Host Interactions, Diagnosis and Epidemiology*. Editora: Springer; Edição: 1st ed. 2016 (30 de junho de 2016).

Franchin, P. R.; Aidoo, K. E.; Batista, C. R. V. Sources of poultry meat contamination with thermophilic *Campylobacter* before slaughter. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 36, p.

157-162, 2005.

<https://doi.org/10.1590/S1517-83822005000200011>

FRASÃO, B. S. et al. Detection of fluoroquinolone resistance in *Campylobacter* strains from organic poultry. Detecção de resistência às fluoroquinolonas em *Campylobacter* isolados de frangos de criação orgânica. Pesquisa Veterinária Brasileira. v, 35, n.7, p. 613-619, 2015.

FRIRDICH, E. et al. Peptidoglycan-modifying enzyme Pgp1 is required for helical cell shape and pathogenicity traits in *Campylobacter jejuni*. PLoS Pathogens, California, v. 8, n. 3, 2012.

Galate, L.; Bangde, S. *Campylobacter* – A Foodborne Pathogen. International Journal of Science and Research, v. 4, n. 4, p. 1250-1259, 2013.

García, C. E.; Cravioto, Q. A. *Campylobacter* enfermedades asociadas. Revista de Facultad de Medicina UNAM, v. 50, n. 1, p. 31-35, 2007.

Garin, B. et al. Prevalence, quantification and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. on chicken neck-skins at points of slaughter in 5 major cities located on 4 continents. International Journal of Food Microbiology, v. 157, n. 1, p. 102–107, 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.020>

Gaynor E. C.; Ghor, N.; Falkow, S. Bile-induced 'pili' in *Campylobacter jejuni* are bacteria-independent artifacts of the culture medium. Molecular Microbiology, v. 39, n. 6, p. 1546-9, 2001.

<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02341.x>

Ge, B. et al. Role of efflux pumps and topoisomerase mutations in fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, v. 49, n. 8, p. 3347-3354, 2005.

<https://doi.org/10.1128/AAC.49.8.3347-3354.2005>

Giesbrecht, P. et al. *Staphylococcal* cell wall: morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 62, n. 4, p. 1371-1414, 1998

Gorman, R.; Bloomfield, S.; Adley, C. C. A study of cross-contamination of food-borne pathogens in the domestic kitchen in the Republic of Ireland. International Journal of Food Microbiology, v.76, p.143–150, 2002.

[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00028-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00028-4)

Griggs, D. J. et al. J. Beta-lactamase-mediated beta-lactam resistance in *Campylobacter* species: prevalence of Cj0299 (*bla* OXA-61) and evidence for a novel beta-Lactamase in *C. jejuni*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, v. 53, n. 8, p. 3357-64, 2009.

<https://doi.org/10.1128/AAC.01655-08>

Grossman, T. H. Tetracycline antibiotics and resistance. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, v. 6, n. 4, 2016.

<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025387>

Guerrant, R. L. et al. Infectious Diseases Society of America. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. Clinical Infectious Diseases, v. 32, n. 3, p. 331-351, 2001.

<https://doi.org/10.1086/318514>

Guerry, P.; Szymanski, C. M. *Campylobacter* sugars sticking out. Trends in Microbiology, v. 16, n. 9, p. 428–435, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.07.002>

Gundogdu, O. et al. The *Campylobacter jejuni* transcriptional regulator Cj1556 plays a role in the oxidative and aerobic stress response and is important for bacterial survival in vivo. Journal of Bacteriology, Washington, v. 193, n. 16, p. 4238–4249, 2011.

<https://doi.org/10.1128/JB.05189-11>

GUPTA, A. et al. Antimicrobial resistance among *Campylobacter* strains, United States, 1997-2001. Emerging Infectious Diseases journal, Atlanta, USA, v. 10, n. 6, p. 1102-1109, 2004.

Guyard-Nicodeme, M. et al. Characterization of *Campylobacter* spp. transferred from naturally contaminated chicken legs to cooked chicken slices via a cutting board. International Journal of Food Microbiology, v. 164, n. 1, p. 7–14, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.03.009>

Hamner, S. et al. Bile salts affect expression of *Escherichia coli* O157:H7 genes for virulence and iron acquisition, and promote growth under iron limiting conditions. PLoS One, v. 8, n. 9, 2013.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074647>

Hannan, S. et al. Transfer of antibiotic resistance by transformation with eDNA within oral biofilms. FEMS Immunology and Medical Microbiology, v. 59, n. 3, p. 345–349, 2010.

<https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00661.x>

Harmsen, M. et al. Role of extracellular DNA during biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. Applied Environmental and Microbiology, Washington, v. 76, n. 7, p. 2271–2279, 2010.

<https://doi.org/10.1128/AEM.02361-09>

Harvala, H. et al. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in Sweden, November 2011–October 2012: is the severity of infection associated with *C. jejuni* sequence type? Infection Ecology and Epidemiology, v. 6, n. 1, 2016.

<https://doi.org/10.3402/iee.v6.31079>

He, Y. et al. Analysis of AI-2/LuxS-dependent transcription in *Campylobacter jejuni* strain 81-176. Foodborne Pathogens and Disease, v. 5, n. 4, p. 399–415, 2008.

<https://doi.org/10.1089/fpd.2008.0106>

Helms, M. et al. Adverse health events Associated with antimicrobial drug resistance in *Campylobacter* species: a registry-based cohort study. The Journal of Infectious Diseases, v. 191, n. 7, p. 1050–1055, 2005.

<https://doi.org/10.1086/428453>

Herman, L. et al. Routes for *Campylobacter* contamination of poultry meat: epidemiological study from hatchery to slaughterhouse. Epidemiology and Infection, v. 131, n. 3, p. 1169–1180, 2003.

<https://doi.org/10.1017/S0950268803001183>

Hernandez, J. et al. Random amplified polymorphic DNA fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolated from human faeces, seawater and poultry products. Research in Microbiology, v. 146, n. 8, p. 685-689, 1995.

[https://doi.org/10.1016/0923-2508\(96\)81065-5](https://doi.org/10.1016/0923-2508(96)81065-5)

Hickey, T. E.; Majam, G.; Guerry, P. Intracellular survival of *Campylobacter jejuni* in human monocytic cells and induction of apoptotic death by cytolethal distending toxin. *Infection and Immunity*, v. 73, n. 8, p. 5194-5197, 2005.

<https://doi.org/10.1128/IAI.73.8.5194-5197.2005>

HU, L.; KOPECKO, D. J. Interactions of *Campylobacter* with eucaryotic cells: Gut luminal colonization and mucosal invasion mechanisms. 2000. p. 191-213. In: NACHAMKIN, I.; BLASER, M. J. *Campylobacter*, 2ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Ica, T. et al. Characterization of Mono- and Mixed-Culture *Campylobacter jejuni* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 78, n. 4, p. 1033-1038, 2012.

<https://doi.org/10.1128/AEM.07364-11>

IOVINE, N. M. Resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni*. *Virulence*, v. 4, n. 3, p. 230-240, 2013.

Joshua, G. W. P. et al. Biofilm formation in *Campylobacter jejuni*. *Microbiology*, v. 152, n. 2, p. 152-387, 2006.

<https://doi.org/10.1099/mic.0.28358-0>

Kalmokoff, M. et al. Proteomic analysis of *Campylobacter jejuni* 11168 biofilms reveals a role for the motility complex in biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, Washington, v. 188, n. 12, p. 4312-4320, 2006.

<https://doi.org/10.1128/JB.01975-05>

Kelly, A.F. et al. Survival of *Campylobacter jejuni* during stationary phase: evidence for the absence of a phenotypic stationary-phase response. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 5, p. 2248-2254, 2001.

<https://doi.org/10.1128/AEM.67.5.2248-2254.2001>

Konkel, M. E. et al. Identification and molecular cloning of a gene encoding a fibronectin-binding protein (*CadF*) from *Campylobacter jejuni*. *Molecular Microbiology*, Salem, v. 24, n. 5, p. 953-63, 1997.

<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.4031771.x>

Konkel, M. E. et al. Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is dependent on a functional flagellar export apparatus. *Journal of Bacteriology*, Washington, v. 186, n. 11, p. 3296-3303, 2004.

<https://doi.org/10.1128/JB.186.11.3296-3303.2004>

KVALSVIG, A. et al. Bacteria: *Campylobacter*. *Encyclopedia of Food Safety*, 1, p. 369-380, 2014.

Lachance, N. et al. Role of the beta-lactamase of *Campylobacter jejuni* in resistance to beta-lactam agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Washington, v. 35, n. 5, p. 813-8, 1991.

<https://doi.org/10.1128/AAC.35.5.813>

Lachance, N. et al. Susceptibilities of beta-lactamase-positive and -negative strains of *Campylobacter coli* to beta-lactam agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Washington, v. 37, p. 1174-6, 1993.

<https://doi.org/10.1128/AAC.37.5.1174>

LEE, C. R. et al. Educational effectiveness, target, and content for prudent antibiotic use. *BioMed Research International*, v. 2015, 13 pp., 2015.

Lin, J.; Michel, L. O.; Zhang, Q. *CmeABC* functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Washington, v. 46, n. 7, p. 2124-2131, 2002.

<https://doi.org/10.1128/AAC.46.7.2124-2131.2002>

Lin, J. et al. Effect of macrolide usage on emergence of erythromycin-resistant *Campylobacter* isolates in chickens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Washington, v. 51, n. 1, p. 1678-1686, 2007.

<https://doi.org/10.1128/AAC.01411-06>

LOGUE, C. M. et al. Repeated therapeutic dosing selects macrolide-resistant *Campylobacter* spp. in a turkey facility. *Journal of Applied Microbiology*, v.; 109, n. 4, p. 1379-1388, 2010.

Luangtongkum, T. et al. Antibiotic resistance in *Campylobacter*: emergence, transmission and persistence. *Future Microbiology*, v. 4, n. 2, p. 189-200, 2009.

<https://doi.org/10.2217/17460913.4.2.189>

Luo, N. et al. In vivo selection of *Campylobacter* isolates with high levels of fluoroquinolone resistance associated with *gyrA* mutations and the function of the *CmeABC* efflux pump. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Washington, v. 47, n. 1, p. 390-394, 2003.

<https://doi.org/10.1128/AAC.47.1.390-394.2003>

Lu, X. et al. Examination of nanoparticle inactivation of *Campylobacter jejuni* biofilms using infrared and Raman spectroscopies. *Journal of Applied Microbiology*, v. 113, n. 4, p. 952–963, 2012.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05373.x>

Manavathu, E. K.; Hiratsuka, K.; Taylor, D. E. Nucleotide sequence analysis and expression of a tetracycline-resistance gene from *Campylobacter jejuni*. *Gene*, v. 62, n. 1, p. 17-26, 1988.

[https://doi.org/10.1016/0378-1119\(88\)90576-8](https://doi.org/10.1016/0378-1119(88)90576-8)

Mclennan, M. K. et al. *Campylobacter jejuni* biofilms up-regulated in the absence of the stringent response utilize a calcofluor white-reactive polysaccharide. *Journal of Bacteriology*, v. 190, n. 3, p. 1097–1107, 2008.

<https://doi.org/10.1128/JB.00516-07>

Melero, B. et al. Tracing *Campylobacter jejuni* strains along the poultry meat production chain from farm to retail by pulsed-field gel electrophoresis, and the antimicrobial resistance of isolates. *Food Microbiology*, v. 32, n. 1, p. 124–128, 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.04.020>

MELO, R. T. Fatores de patogenicidade e potencial risco à saúde em *Campylobacter* spp. isolados de carcaças de frangos. 2012. 133 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

MELO, R. T. Emergência de *Campylobacter jejuni* no setor avícola e na saúde pública do Brasil. 2017. 186 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

Mihaljevic, R. R. et al. Environmental stress factors affecting survival and virulence of *Campylobacter jejuni*. Microbial Pathogenesis, v. 43, n. 2-3, p. 120- 125, 2007.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2007.03.004>

Mills, D. C. et al. Increase in *Campylobacter jejuni* invasion of intestinal epithelial cells under low-oxygen coculture conditions that reflect the in vivo environment. Infection and Immunity, v. 80, n. 5, p. 1690–1698, 2012.
<https://doi.org/10.1128/IAI.06176-11>

Moran, A. P.; Upton, M. E. Factors affecting production of coccoid forms by *Campylobacter jejuni* on solid media during incubation. Journal of Applied Bacteriology, v. 62, n. 6, p. 527-537, 1987.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1987.tb02685.x>

MOREAU-MARQUIS. S.; STANTON, B. A.; O'TOOLE, G. A. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in the cystic fibrosis airway. Pulmonary Pharmacology and Therapeutics, v. 21, n. 4, p. 595–599, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.pupt.2007.12.001>

MULCAHY, H.; CHARRON-MAZENOD, L.; LEWENZA, S. Extracellular DNA Chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. PLoS Pathogens, California, v. 4, n. 11, 2008.

Müllner, P. et al. Molecular and spatial epidemiology of human campylobacteriosis: source association and genotype-related risk factors. Epidemiology and Infection, v. 138, n. 10, p. 1372-1383, 2010.
<https://doi.org/10.1017/S0950268809991579>

Nachamkin, I.; Aloos, B. M.; Ho, T. *Campylobacter* species and Guillian-Barre syndrome. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 11, n. 3, p. 555-567, 1998.

NADELL, C. D.; XAVIER, J. B.; FOSTER, K. R. The sociobiology of biofilms. FEMS Microbiology Reviews, v. 33, n.1, p. 206–224, 2009.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00150.x>

NARMS - National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria (NARMS). Human Isolates Final Report, 2010. U.S. Department of Health and Human Services, CDC, 2012. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/narms/reports.htm>>. Acesso em: 20 jun. 2017.

NEWELL, D. G. The ecology of *Campylobacter jejuni* in avian and human hosts and in the environment. International Journal of Infectious Diseases, v. 6, n. 3, p. 3516-3520, 2002.
[https://doi.org/10.1016/S1201-9712\(02\)90179-7](https://doi.org/10.1016/S1201-9712(02)90179-7)

Nguyen, V. T.; Turner, M. S.; Dykes, G. A. Influence of cell surface hydrophobicity on attachment of *Campylobacter* to abiotic surfaces. FoodMicrobiology, v. 28, n. 5, p. 942–950, 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.01.004>

Ngeyen, V. T. et al. Role of attachment to surfaces on the prevalence and survival of *Campylobacter* through food systems. Journal of Food Protection, Des Moines, v. 75, n. 1, p. 195–206, 2012.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-012>

Ono, K. et al. Comparison of three methods for epidemiological typing of *Campylobacter jejuni* and *C.coli*. Current Microbiology, v. 47, n. 5, p. 364- 371, 2003.
<https://doi.org/10.1007/s00284-002-4037-6>

ONU - Organização das Nações Unidas no Brasil. OMS publica lista inédita de bactérias resistentes a antibióticos. 2017. Acesso em: 06.20.2017. Disponível
 <<https://nacoesunidas.org/oms-publica-lista-inedita-de-bacterias-resistentes-a-antibioticos/>>. Acesso em: 21 de junho de 2017.

Otto, M. Physical stress and bacterial colonization. FEMS Microbiology Reviews, v. 38, n. 6, p. 1250–1270, 2014.
<https://doi.org/10.1111/1574-6976.12088>

PAHO – Organização Pan- Americana da Saúde e OMS – Organização Mundial da Saúde. 2017. OMS publica lista de bactérias para as quais se necessitam novos antibióticos urgentemente. Disponível em:
 <http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5357:oms-publica-lista-de-bacterias-para-as-quais-se-necessitam-novos-antibioticos-urgentemente&Itemid=812>. Acesso em: 17 jun 2017.

Panigrahi, P. et al. Human immune response to *Campylobacter jejuni* proteins expressed in vivo. Infection and Immunity, v. 60, n. 11, p. 4938-4944, 1992.

Parkhill, J. et al. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. Nature, London, v. 403, n. 6770, p. 665-668, 2000.
<https://doi.org/10.1038/35001088>

Payot, S.; Cloeckaert, A.; Chaslus-Dancla, E. Selection and characterization of fluoroquinolone-resistant mutants of *Campylobacter jejuni* using enrofloxacin. Microbial Drug Resistance, v. 8, n. 4, p. 335-343, 2002.
<https://doi.org/10.1089/10766290260469606>

Perdoncini, G. et al. Occurrence of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* on broiler carcasses after chilling in southern Brazil. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 35, n. 4, p. 349-352, 2015.
<https://doi.org/10.1590/S0100-736X2015000400006>

Perio, M. A. de. et al. Campylobacter infection in poultry-processing workers, Virginia, USA, 2008-2011. Emerging Infectious Diseases, v. 19, n. 2, p. 286-288, 2013.
<https://doi.org/10.3201/eid1902.121147>

Poly, F. T. et al. Genome sequence of a clinical isolate of *Campylobacter jejuni* from Thailand. Infection and Immunity, Washington, v. 75, n. 7, p. 3425-3433, 2007.
<https://doi.org/10.1128/IAI.00050-07>

Pumbwe, L. et al. Expression of the efflux pump genes *cmeB*, *cmeF* and the porin gene *porA* in multiple-antibiotic- resistant *Campylobacter jejuni*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 54, n. 2, p. 341-7, 2004.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkh331>

QUETZ, J. Da S. Estudos sobre *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* em crianças da área urbana de Fortaleza, Ceará/ Brasil: Identificação genética, inflamação intestinal e impacto no estado nutricional. 2009. 141 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia, Faculdade de medicina) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

Reeser, R. J. et al. Characterization of *Campylobacter jejuni* biofilms under defined growth conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, n. 6, p. 1908–1913, 2007.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00740-06>

Reich, F.; Atanassova, V.; Klein, G. The effects of *Campylobacter* numbers in caeca on the contamination of broiler carcasses with *Campylobacter*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 127, n. 1-2, p. 116-120, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.06.018>

Reuter, M. et al. Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* is increased under aerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, n. 7, p. 2122–2128, 2010.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01878-09>

Rollins D. M.; Colwell R. R. Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 52, n. 3, p. 531-538, 1986.

Röner, A. et al. Species identification by genotyping and determination of antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from humans and chickens in Sweden. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 96, n. 2, p. 173-179, 2004.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.017>

Rosenquist, H. et al. The effect of slaughter operations on the contamination of chicken carcasses with thermotolerant *Campylobacter*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 108, n. 2, p. 226-232, 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.12.007>

Rothenbacher, F. P.; Zhu, J. Efficient responses to host and bacterial signals during *Vibrio cholerae* colonization. *Gut Microbes* v. 5, n. 1, p. 120–128, 2014.
<https://doi.org/10.4161/gmic.26944>

Rysz, M. et al. Tetracycline resistance gene maintenance under varying bacterial growth rate, substrate and oxygen availability, and tetracycline concentration. *Environmental Science and Technology*, Washington, v. 47, n. 13, p. 6995–7001, 2013.
<https://doi.org/10.1021/es3035329>

Salyers, A. A.; Speer, B. S.; Shoemaker, N. B. New perspectives in tetracycline resistance. *Molecular Microbiology*, v. 4, n. 1, p. 151-156, 1990.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1990.tb02025.x>

Sanders, S. Q. et al. Culture and detection of *Campylobacter jejuni* within mixed microbial populations of biofilms on stainless steel. *Journal of Food Protection*, v. 70, n. 6, p. 1379–1385, 2007.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.6.1379>

Scallan, E. et al. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerging Infectious Diseases journal*, v. 17, n. 1, p. 7–15, 2011.

Shea, M. E.; Hiasa, H. Interactions between DNA helicases and frozen topoisomerase IV-quinolone-DNA ternary complexes. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 274, n. 32, p. 22747-22754, 1999.
<https://doi.org/10.1074/jbc.274.32.22747>

Siddiqui, F. M. et al. Antibiotic susceptibility profiling and virulence potential of *Campylobacter jejuni* isolates from different sources in Pakistan. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 8, n. 3, p. 197-202, 2015.

[https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60314-X](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60314-X)

Smith, S. I.; Sansa, T. I.; Coker, A. O. Antibiotic susceptibility patterns and beta-lactamase production of animal and human isolates of *Campylobacter* in Lagos, Nigeria. *Zeitschrift für Naturforschung C*, v. 54, n. 7-8, p. 583-586, 1999.

<https://doi.org/10.1515/znc-1999-7-820>

Solano, C.; Echeverez, M.; Lasa, I. Biofilm dispersion and quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology*, v. 18, p. 96–104, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.02.008>

Sulaeman, S. et al. Comparison between the biofilm initiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains to an inert surface using BioFilm Ring Test (R). *Journal of Applied Microbiology*, v. 108, n. 4, p. 1303–1312, 2010.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04534.x>

Sulaeman, S. et al. Enhanced adhesion of *Campylobacter jejuni* to abiotic surfaces is mediated by membrane proteins in oxygen-enriched conditions. *PLoS ONE*, v. 7, n. 9, 2012.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046402>

Sutherland, I. W. The biofilm matrix—an immobilized but dynamic Microbial environment. *Trends in Microbiology*, v. 9, n. 5, p. 222–227, 2001.

[https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02012-1](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02012-1)

Svensson, S. L. et al. The *CprS* sensor kinase of the zoonotic pathogen *Campylobacter jejuni* influences biofilm formation and is required for optimal chick colonization. *Molecular Microbiology*, v. 71, n. 1, p. 253–272, 2009.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06534.x>

SVENSSON, S. L.; PRYIMA, M.; GAYNOR, E. C. Flagella-mediated adhesion and extracellular DNA release contribute to biofilm formation and stress tolerance of *Campylobacter jejuni*. *PLoS ONE*, California, v. 9, n. 8, 2014.

TAM, C.; LAROSE, T.; O'BRIEN, S. Costed extension to the second study of infectious intestinal disease in the community: identifying the proportion of foodborne disease in the United Kingdom and attributing foodborne disease by food commodity. IID2 extension report.: Project B18021 (FS231043). London: Food Standards Agency, p. 171, 2014.

Taylor, D. E. Plasmid-mediated tetracycline resistance in *Campylobacter jejuni*: expression in *Escherichia coli* and identification of homology with streptococcal class M determinant. *Journal of Bacteriology*, Washington, v.165, n. 3, p. 1037-1039, 1986.

<https://doi.org/10.1128/jb.165.3.1037-1039.1986>

Teh, K. H.; Flint, S.; French, N. Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* in controlled mixed-microbial populations. *International Journal of Food Microbiology*, v. 143, n. 3, p. 118–124, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.037>

Torralbo, A. et al. Prevalence and risk factors of *Campylobacter* infection in broiler flocks from southern Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 114, n. 2, p. 106-113, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.01.019>

TURONOVA, H. et al. Biofilm spatial organization by the emerging pathogen *Campylobacter jejuni*: comparison between NCTC 11168 and 81-176 strains under microaerobic and oxygen-enriched conditions. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, n. 6, p. 709, 2015.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00709>

Vandamme, P. Taxonomy of the family Campylobacteraceae. 2000. p. 3-26. In: NACHAMKIN, I.; BLASER, M. J. *Campylobacter*, 2ed. AMS Press, Washington, D.C.

Van Looveren, M. et al. Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter* strains isolated from food animals in Belgium. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 48, n. 2, p. 235-240, 2001.

<https://doi.org/10.1093/jac/48.2.235>

VINZENT, R.; DUMAS, J.; PICARD, N. Septicémie grave au cours de la grossesse due à un vibron: avortement consécutif. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, v. 131, n. 90, 1947.

Vuotto, C. et al. Antibiotic resistance related to biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*. *Pathogens*, Switzerland, v. 3, n. 3, p. 743–758, 2014.

<https://doi.org/10.3390/pathogens3030743>

Wagenaar, J. A.; French, N. P.; Havelaar, A. H. Preventing *Campylobacter* at the source: Why is it so difficult? *Clinical Infectious Disease*, v. 57, n. 11, p. 1600-1606, 2013.

<https://doi.org/10.1093/cid/cit555>

Wang, Y. et al. Emergence of Multidrug-Resistant *Campylobacter* Species Isolates with a horizontally acquired Rna methylase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Washington, v. 58, n. 9, p. 5405–5412, 2015.

<https://doi.org/10.1128/AAC.03039-14>

Wassenaar, T. M.; Blaser, M. J. Pathophysiology of *Campylobacter jejuni* infections of humans. *Microbes and Infection*, Paris, v. 1, n. 12, p. 1023– 1033, 1999.

[https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(99\)80520-6](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(99)80520-6)

Wassenaar, T. M. Toxin production by *Campylobacter* spp. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v. 10, n. 3, p. 466–476, 1997.

Wesche, A. M. et al. Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 72, n. 5, p. 1121- 1138, 2009.

<https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.5.1121>

WHO - World Health Organization., 2013. The Global View Of Campylobacteriosis. Report Of Expert Consultation. Utrecht, Netherlands, 9-11 July 2012.

<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/80751/1/9789241564601_eng.pdf>. Acesso em: 20 maio 2016.

WHO- World Health Organization., 2016. Media Centre. *Campylobacter*. Fact sheets. 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/en/>>. Acesso em: 16 de out. de 2016.

WILSON, D. J. et al. Tracing the source of campylobacteriosis. *Plos Genetics*, England, v. 4, n. 9, 2008.

Wilson, M. E. et al. Illness in travelers returned from Brazil: the GeoSentinel experience and implications for the 2014 FIFA World Cup and the 2016 Summer Olympics. *Clinical Infectious Diseases*, v. 58, n. 10, p.1347-56, 2014.

<https://doi.org/10.1093/cid/ciu122>

Yan, S. et al. *Campylobacter* infection and Guillain-Barré syndrome: public health concerns from a microbial food safety perspective. *Clinical and Applied Immunology Reviews*, v. 5, n. 5, p. 285-305, 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.cair.2005.08.001>

Yan, M. et al. Role of the *CmeABC* efflux pump in the emergence of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* under selection pressure. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 58, n. 6, p. 1154- 1159, 2006.

<https://doi.org/10.1093/jac/dkl412>

Young, K. T.; Davis, L. M.; Dirita, V. J. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, London, v. 5, p. 665-679, 2007.

<https://doi.org/10.1038/nrmicro1718>

Zeitouni, S. et al. Fitness of macrolide resistant *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*. *Microbial Drug Resistance, USA*, v. 18, n. 2, p. 101-108, 2012.

<https://doi.org/10.1089/mdr.2011.0188>

Zhao, J. et al. *Escherichia coli* toxin gene *hipA* affects biofilm formation and DNA release. *Microbiology*, v. 159, n. 3, p. 633–640, 2013.

<https://doi.org/10.1099/mic.0.063784-0>

Zilbauer, M. et al. *Campylobacter jejuni*-mediated disease pathogenesis: an update.

Transaction oh the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene,v. 102, n. 2, p. 123-129, 2008.