

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

**ROBERTA TORRES DE MELO**

**EMERGÊNCIA DE *Campylobacter jejuni* NO SETOR AVÍCOLA E NA  
SAÚDE PÚBLICA DO BRASIL**

**UBERLÂNDIA  
2017**

ROBERTA TORRES DE MELO

EMERGÊNCIA DE *Campylobacter jejuni* NO SETOR AVÍCOLA E NA SAÚDE  
PÚBLICA DO BRASIL

Tese 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 Doutora em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Saúde Animal

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daise Aparecida Rossi

UBERLÂNDIA  
2017

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

---

M528e Melo, Roberta Torres de, 1987  
2017 Emergência de *Campylobacter jejuni* no setor avícola e na saúde  
pública do Brasil / Roberta Torres de Melo. - 2017.  
186 p. : il.

Orientadora: Daise Aparecida Rossi.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa  
de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.  
Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. Síndrome de Guillain-Barré Teses. 3.  
Biofilme - Teses. 4. *Campylobacter* - Teses. I. Rossi, Daise Aparecida.  
II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Veterinárias. III. Título.

---

CDU: 619

EMERGÊNCIA DE *Campylobacter jejuni* NO SETOR AVÍCOLA E NA SAÚDE  
PÚBLICA DO BRASIL

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

Uberlândia, 14 de junho de 2017.

---

Profª. Drª. Daise Aparecida Rossi (Orientadora) – FAMEV/UFU

---

Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti – ICBIM/UFU

---

Prof. Dr. Marcus Vinícius Coutinho Cossi – FAMEV/UFU

---

Prof. Dr. Heriberto Fernández Jamillo – IMC/UACH

---

Profª. Drª. Hirasilva Borba – FCAV/UNESP

## DADOS CURRICULARES DA AUTORA

**ROBERTA TORRES DE MELO** - Nascida em Araguari, Estado de Minas Gerais, em 17 de dezembro de 1987, filha de Roberto Nunes de Melo e Vera Márcia Torres de Melo. Bióloga, graduada em dezembro de 2009 pelo Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia, e Técnica em Patologia Clínica, em 2008 pela Escola Técnica de Saúde da Universidade Federal de Uberlândia. Durante a graduação foi bolsista do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) por um período de dois anos 2008-2010. Em 2010, iniciou o mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias na Universidade Federal de Uberlândia, área de concentração em Saúde Animal, na qual foi bolsista pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), de março de 2011 a fevereiro de 2012. Em 2011, iniciou a graduação em Medicina Veterinária concluída em fevereiro de 2017, pela Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia. Em 2013, iniciou o doutorado na mesma instituição de pós-graduação, na qual foi bolsista DTI-B durante o período de janeiro de 2014 a março de 2015 pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e bolsista de doutorado de abril de 2015 a março de 2017 pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Tem experiência nas seguintes áreas: microbiologia, biologia molecular e patógenos de origem alimentar.

*"Determinação, coragem e auto-confiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho."*

Dalai Lama

Aos meus pais e minha irmã, pelo apoio que sempre  
me foi dado ao longo da minha vida acadêmica.

Dedico.

## AGRADECIMENTOS

O presente estudo resultou de um esforço mútuo, composto de várias etapas nas quais encontrei muitas dificultadas, mas também muitas superações. Foi com o auxílio da família, dos amigos e colegas, que contribuíram de forma direta e indireta na execução do trabalho, que tornou possível a finalização. Expresso, por isso, a todos minha mais profunda gratidão.

Gostaria primeiramente de agradecer a Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar o caminho nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades, enfim pela Sua presença constante na minha vida.

Meu maior agradecimento é dirigido aos meus pais, pelo contínuo apoio em todos estes anos, ensinando-me, principalmente, a importância da construção e coerência de meus próprios valores. Agradeço em especial a meu pai, pelas horas que passou comigo, por sua infinita paciência, por ter me proporcionado a fundamentação básica, por ter guiado meu caminho. Agradeço, de forma muito carinhosa, a atuação de minha mãe que sempre se orgulhou do meu esforço e pela sua crença absoluta na capacidade de realização que a mim atribuída foram, indubitavelmente, os elementos propulsores desta tese. À minha irmã, que apesar de sempre trabalhar muito, esteve ao meu lado, e sempre sentiu orgulho da minha luta nos estudos e por me presentear com uma afilhada que mal posso esperar pela sua chegada.

À minha orientadora, Profa. Dra. Daise Aparecida Rossi, pelos importantes ensinamentos tanto científicos quanto pessoais, pela amizade e apoio. Além disso, por ser meu exemplo de pessoa e profissional a qual sempre fará parte da minha vida. Sou muito grata a esta pessoa que reconhece meu esforço e me dá ainda mais força e segurança para alcançar meus objetivos.

Aos meus amigos em geral do laboratório tanto aos velhos e queridos quanto aos que se revelaram ao longo desse tempo, que me auxiliaram durante todos esses anos, compartilhando as dificuldades e experiências e por serem tão companheiros.

Devo fazer um agradecimento especial aos meus amigos Eliane (Neguinha) e Guilherme pelo sincero companheirismo, cumplicidade, união que sempre tivemos em tudo que fazemos. Obrigada por essa parceria valiosa que vou levar por toda minha vida. Vocês são muito especiais para mim.

À minha amiga Profa. Dra. Belchiolina, pelo incentivo que sempre me deu, pela atenção zelosa comigo, pelo apoio nos momentos de fraqueza e pelos conselhos pessoais e profissionais.

Aos alunos de iniciação científica, Mariana Cristina, Clara Boaventura, Phelipe Augusto e Edson Valadares que me ajudaram nos momentos mais complexos do estudo, naqueles em que precisei da ajuda conjunta de todos para conseguirmos finalizar tudo antes da meia-noite. Obrigada por serem tão prestativos e pró-ativos, além da dedicação que tiveram em todos os momentos, inclusive durante as noites e fins de semana em que tivemos que processar as amostras, biofilmes, correr géis, etc.

Aos meus amigos queridos de trabalho Francesca e Marcelo, que me ajudaram nas atividades de rotina do laboratório, nas longas coletas das amostras, nas minhas ausências em função das intermináveis aulas de graduação. Obrigada a vocês por sempre demonstrarem satisfação em estar me ajudando, tenho extremo carinho por vocês.

Aos demais companheiros Renata e Silvia que me auxiliaram principalmente nas etapas iniciais de processamento das amostras.

Ao Prof. Dr. Marcelo Belleti e aos técnicos Rosiane e Rafael que me auxiliaram de forma tão prestativa nos ensaios com microscopia de varredura. Por ceder seu espaço para execução dos experimentos e pela confiança em que depositaram em mim no manuseio dos equipamentos.

Ao Prof. Dr. Deivid, que com seu carisma e inteligência extremos me auxiliou na análise estatística dos meus resultados referentes à formação de biofilmes. Obrigada pela solidariedade e entusiasmo em me ajudar.

Às minhas amigas da graduação, Ana, Nathália, Isabela, Lígia, Camila, Mariana pelos momentos alegres e descontraídos que me proporcionaram, pelas dificuldades compartilhadas durante o curso e por sentirem orgulho de mim. Muito obrigada pelo carinho, também me orgulho de todas vocês.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária pela oportunidade de realização do curso de doutorado. Ao CNPq, FAPEMIG e CAPES pelas bolsas de estudo concedidas e pelo apoio financeiro para o desenvolvimento de toda a pesquisa.

Aos professores que aceitaram compor esta banca de defesa, Beletti, Marcus, Heriberto e HiraSilva. Obrigada por se disponibilizarem a realizar a leitura, correções e avaliação deste trabalho.

Muito obrigada a todos.

## RESUMO

*Campylobacter jejuni* é frequentemente associado a gastroenterites humanas no mundo todo, sendo transmitida pelo consumo de alimentos contaminados, principalmente os de origem animal, com destaque para a carne de frango. A tese foi fracionada em quatro capítulos, sendo o primeiro referente às considerações gerais dos tópicos abordados nos demais capítulos. O segundo capítulo objetivou avaliar as alterações na prevalência, nas características de virulência, na resistência antimicrobiana e na similaridade genética de 99 cepas de *C. jejuni* isoladas de carcaças de frangos, provenientes de três unidades distintas de uma empresa avícola brasileira exportadora, durante os períodos de 2011-2012 e 2015-2016. O terceiro capítulo teve por objetivo investigar em 30 cepas de *C. jejuni* isoladas de carcaças de frangos (2015) o potencial para produzir biofilmes isoladamente e em associação a outros agentes nos meios Mueller Hinton e *Chicken juice*, identificar fatores genéticos ligados à formação de biofilmes, verificar a eficácia de agentes químicos na remoção de estruturas sésseis, analisar a estrutura e composição das matrizes de biofilmes simples e mistos e comparar a similaridade genética entre as cepas. O quarto capítulo objetivou realizar uma análise comparativa relacionada aos genes de virulência e de resistência adaptativa, além da avaliação da homologia genética em 64 cepas de *C. jejuni*, sendo 44 de origem avícola (2015-2016) e 20 oriundas de pacientes humanos com sintomatologia clínica (2000-2006). A determinação da prevalência restrita ao segundo capítulo foi realizada a partir da análise tradicional de 1070 amostras de carcaças de frangos. A confirmação de *C. jejuni* foi feita por PCR-multiplex. Para a avaliação da sensibilidade antimicrobiana nas 99 cepas de origem avícola foi realizado o teste de disco difusão. Foi investigada a presença dos genes *flaA* (motilidade), *ciaB* (invasão intracelular), *cadF* (colonização intracelular), *pldA* (colonização/invasão), *cdtABC* (citotoxina), *luxS* (mecanismo *quorum-sensing*), *dnaJ* (termotolerância), *htrA* (auxilia no crescimento sob estresse), *cbrA* (resistência ao choque osmótico), *sodB* (tolerância ao estresse oxidativo), *cstII* e *neuA* (Síndrome de Guillain-Barré) pela técnica de PCR. A relação filogenética entre os isolados foi determinada pelo método de RAPD-PCR no segundo capítulo e por PFGE no terceiro e quarto capítulos. As análises de formação de biofilmes foram feitas por meio de técnicas de microbiologia tradicional utilizando os meios Mueller Hinton e *chicken juice* para quantificar, classificar e

determinar a constituição da biomassa de biofilmes simples e mistos de 30 cepas de *C. jejuni* (2015). A morfologia dos biofilmes foi verificada por meio de microscopia eletrônica de varredura. Os testes de inibição das formas sésseis de *C. jejuni* foram feitos com agentes desinfetantes usualmente utilizados na indústria e com nanopartículas de óxido de zinco. O estudo permitiu concluir que *C. jejuni* sofre modificações genotípicas e fenotípicas ao longo do tempo de maneira a tornarem-se mais especializadas e com maior virulência. Independente da origem, humana ou avícola, as cepas apresentaram elevado potencial de causar SGB. No ambiente industrial o problema se agrava na persistência de *C. jejuni* por meio da formação de biofilmes altamente estáveis e resistentes. Os testes de susceptibilidade aos antibióticos e aos desinfetantes na indústria mostram que a exposição constante a esses agentes seleciona cepas mais adaptadas. Logo, há necessidade de implementação de medidas criteriosas de monitoramento dentro da indústria e na saúde pública para o controle de *C. jejuni*.

**Palavras-chave:** Biofilmes. Campilobacteriose. Resistência antimicrobiana. Similaridade genética. Síndrome de Guillain-Barré. Virulência.

## ABSTRACT

*Campylobacter jejuni* is often associated with human gastroenteritis worldwide, being transmitted by the consumption of contaminated foods, mainly those of animal origin, especially chicken. The thesis was divided in four chapters, the first referring to the general considerations of the topics covered in the other chapters. The second chapter aimed to evaluate the changes in the prevalence, virulence characteristics, antimicrobial resistance and genetic similarity of 99 strains of *C. jejuni* isolated from chicken carcasses from three different units of a Brazilian export poultry company during the periods between 2011-2012 and 2015-2016. The aim of the third chapter was to investigate the potential to produce biofilms separately and in association with other agents in the Mueller Hinton and *Chicken juice* media, in 30 strains of *C. jejuni* isolated from chicken carcasses (2015), identify genetic factors related to the formation of biofilms, verify the effectiveness of chemical agents in the removal of sessile structures, analyze the structure and composition of simple and mixed biofilm matrices, and compare the genetic similarity between the strains. The fourth chapter aimed to perform a comparative analysis related to the genes of virulence and adaptive resistance, in addition to the evaluation of the genetic homology in 64 strains of *C. jejuni*, 44 of poultry origin (2015-2016) and 20 from human patients with symptomatology (2000-2006). The determination of the prevalence restricted to the second chapter was carried out from the traditional analysis of 1070 samples of chicken carcasses. The confirmation of *C. jejuni* was done by PCR-multiplex. For the evaluation of antimicrobial susceptibility in the 99 strains of poultry origin, the disc diffusion test was performed. The presence of the genes *flaA* (motility), *ciaB* (intracellular invasion), *cadF* (intracellular colonization), *pldA* (colonization/invasion), *cdtABC* (cytotoxin), *luxS* (quorum-sensing mechanism), *dnaJ* (thermotolerance), *htrA* (assistance in growth under stress), *cbrA* (resistance to osmotic shock), *sodB* (tolerance to oxidative stress), *cstII* and *neuA* (Guillain-Barré Sindrom) by the PCR technique. The phylogenetic relationship between the isolates was determined by the RAPD-PCR method in the second chapter and by PFGE in the third and fourth chapters. Biofilm formation analyzes were performed using traditional microbiology techniques using the Mueller Hinton and *Chicken Juice* media to quantify, classify and determine the biomass composition of single and mixed biofilms of 30 strains of *C. jejuni* (2015). The morphology of the biofilms was verified by means of scanning

electron microscopy. The inhibition tests of the sessile forms of *C. jejuni* were made with disinfectants commonly used in industry and with zinc oxide nanoparticles. The study allowed concluding that *C. jejuni* undergoes genotypic and phenotypic modifications over time in order to become more specialized and with greater virulence. Regardless of human or poultry origin, the strains present a high potential to cause GBS. In the industrial environment the problem is aggravated by the persistence of *C. jejuni* through the formation of highly stable and resistant biofilms. Antibiotic and disinfectant susceptibility tests in the industry had shown that constant exposure to these agents selects more adapted strains. Therefore, there is a necessity for the implementation of careful monitoring measures within the industry and in public health for the control of *C. jejuni*.

**Keywords:** Biofilms. Campylobacteriosis. Antimicrobial resistance. Genetic similarity. Guillain-Barré Sindrom. Virulence.

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

<b>Tabela 1.</b> Principais alvos para combate de biofilmes microbianos e exemplos de agentes.	78
--	----

### CAPÍTULO 2

<b>Tabela 1.</b> Primers utilizados na identificação de <i>Campylobacter jejuni</i> .	84
<b>Tabela 2.</b> Primers para identificação dos genes de virulência <i>flaA</i> , <i>pldA</i> , <i>cadF</i> , <i>ciaB</i> e <i>cdtABC</i> em <i>C. jejuni</i> .	85
<b>Tabela 3.</b> Porcentagem de genes de virulência em <i>C. jejuni</i> isolados de carcaças de frangos em dois períodos distintos.	88
<b>Tabela 4.</b> Perfis de virulência das cepas de <i>C. jejuni</i> isoladas de carcaças de frangos em períodos distintos.	89

### CAPÍTULO 3

<b>Tabela 1.</b> Classification of biofilm formation index.	133
<b>Tabela 2.</b> PCR conditions, nucleotide sequences and amplicon sizes for the specific <i>Campylobacter jejuni</i> primers used in this study.	134
<b>Tabela 3.</b> Classification of strains, according to the BFI (Biofilm Formation Index), under the different enrichment conditions.	135
<b>Tabela 4.</b> Counts obtained in the assays for adhesion analysis and biofilm formation in the 30 strains of <i>C. jejuni</i> .	136
<b>Tabela 5.</b> Resistance profiles to chemical agents tested on 13 biofilms of <i>C. jejuni</i> .	136

## CAPÍTULO 4

<b>Tabela 1.</b> Características das 64 linhagens de <i>C. jejuni</i> .	157
<b>Tabela 2.</b> Primers para identificação dos genes de virulência e de resistência adaptativa em <i>C. jejuni</i> .	159
<b>Tabela 3.</b> Porcentagem de genes de virulência em <i>C. jejuni</i> de origem humana e avícola.	160
<b>Tabela 4.</b> Perfis genéticos das linhagens humanas e avícolas de <i>C. jejuni</i> .	161

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Incidência e prevalência de campilobacteriose (*C. jejuni* e *C. coli*) no mundo. Adaptado de Kaakoush et al. (2015). 34
- Figura 2.** Esquema dos reservatórios ambientais, vias de transmissão e manifestações clínicas associadas às espécies de *Campylobacter*. Adaptado de Kaakoush et al. (2015) e Mendonça et al. (2015). 39
- Figura 3.** Mecanismos de invasão de *Campylobacter*. Adaptado de Backert; Hofreuter (2013). 59
- Figura 4.** Estágios do ciclo de formação de biofilme em *Campylobacter*. (a) Fase livre, (b) Fixação à superfície, (c) Micro-colônia, (d) Macro-colônia e (e) Dispersão. As setas indicam o caminho percorrido pelos nutrientes (azul) e excretas (vermelho) dentro dos canalículos formados no biofilme maduro. Adaptado de Rossi et al. (2016). 69
- Figura 5.** Imagem de microscopia eletrônica de varredura de biofilme maduro de *Campylobacter jejuni*. Coloração computadorizada em *C. jejuni*. 71
- Figura 6.** Análise *in vitro* da formação de biofilmes de *Campylobacter*. O protocolo laboratorial é baseado na cultura da suspensão bacteriana  $DO_{600}=0,22$  em meios específicos (caldo Mueller Hinton, caldo Bolton, caldo Brucella ou caldo *chicken juice*) incubados por 48 horas em placas de 96 poços à temperatura de 37°C, em condições de microaerofilia. Posteriormente, observa-se a formação de uma massa bacteriana no fundo dos poços, que caracterizam a estrutura de um biofilme. Após cerca de 96 horas de incubação, a formação de canais de transporte de substâncias já está estabelecida e torna-se visível em microscopia eletrônica confocal e de varredura. Adaptado de Rossi et al., (2016). 72

## CAPÍTULO 2

**Figura 1.** Variação temporal no percentual de isolamento de *C. jejuni* em 98 carcaças de frango provenientes de uma empresa exportadora.

**Figura 2.** Frequência de cepas de *C. jejuni* resistentes a cada antibiótico nos 98 períodos: (1) 2011-2012 (55 cepas) e (2) 2015-2016 (44 cepas); AMO – amoxacilina com clavulanato; GEN – gentamicina; ERI – eritromicina; TET – tetraciclina; \*p<0,05 usando teste exato de Fisher.

**Figura 3.** Dendrograma comparativo de *C. jejuni* utilizando coeficiente de 99 similaridade de Dice com tolerância de 1% e método UPGMA com otimização de 0,80%. Perfis A ao S – diferentes *clusters*, com homologia superior a 80%.

## CAPÍTULO 3

**Figure 1.** Difference between adhesion and the mean of initial inoculum 138 obtained in the counts (log of CFU/mL) of *C. jejuni* in the Mueller Hinton and Chicken juice. Error bars indicate the standard deviation for the means of the counts obtained for each strain at three repetitions.

**Figure 2.** Biofilm counts of *C. jejuni* (log CFU/mL) in the control test (30 138 strains) and maintained for 24 hours in peracetic acid solution 0.8% (7 strains), sodium hypochlorite 1% , ZnO NP 6mM (13 strains), and chlorhexidine 1% (4 strains). \*p <0.01; \*\*p<0.001 using one way Anova for the counts in the samples of the same treatment.

**Figure 3.** SEM images for three *C. jejuni* strains with different BFI (biofilm 139 formation index) in MH (**A** = nonexistent, **C** = weak and **E** = medium), and strong producers in chicken juice (**B**, **D** and **F**) (Computerized staining in *C. jejuni* in **F**).

**Figure 4.** Effect of treatment with sodium metaperiodate and proteinase K on 140 the biofilm of three *C. jejuni* strains. Results represent means with

standard deviation (error bars) of three independent experiments. 1 (F 80 in Mueller Hinton), 2 (F 80 in chicken juice), 3 (F 255 in Mueller Hinton), 4 (F 255 in chicken juice), 5 (F 256 in Mueller Hinton) and 6 (F 256 in Chicken juice). \* p<0.05; \*\* p<0.001 using one way Anova.

**Figure 5.** SEM images for mixed biofilms. *C. jejuni* with *Salmonella Enteritidis* 141 in MH **(A)** and in Chicken Juice (CJ) **(B)**, with *Staplylococcus aureus* in MH **(C)** and in CJ **(D)**, with *Pseudomonas aeruginosa* in MH **(E)** and in CJ **(F)** and with *Escherichia coli* in MH **(G)** and in CJ **(H)**. Computerized staining in *C. jejuni* in **(C)** and **(G)**.

**Figure 6.** Changes in biomass of mixed biofilms of *C. jejuni*. Results represent 142 means with standard deviation (error bars) of three independent experiments. \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001 using Student's T test for comparisons with the control (*C. jejuni*).

**Figure 7.** Dendrogram generated by computerized analysis (Gel Compare II) 142 of DNA profiles of *C. jejuni* strains, based on pulsed field electrophoresis (PFGE). The analysis was performed by the Dice/UPGMA method (tolerance parameter of 0.5%, optimization of 0.5%, homology  $\geq$  80%).

## CAPÍTULO 4

**Figura 1.** Dendrograma gerado por análise computadorizada (Gel Compare II) 162 de perfis de DNA de linhagens humanas e avícolas de *C. jejuni*, baseado na eletroforese em campo pulsado (PFGE). A análise foi realizada pelo método de Dice/UPGMA (parâmetro de tolerância de 0,5%, otimização de 0,5%, homologia  $\geq$  80%).

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABPA: Associação Brasileira de Proteína Animal
- Als: auto-indutores
- AMO: amoxacilina com clavulanato 10µg
- AMPs: peptídeos antimicrobianos
- ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- APPCC: Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
- ATCC: *American Type Culture Collection*
- CCDA: ágar *Campylobacter Blood-Free Selective Medium*
- CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*
- CDT: toxina citoletal distensiva
- CJ: caldo *chicken juice*
- CLSI: *Clinical Laboratory Standards Institute*
- CPD: Ponto Crítico de Secagem
- CU: colite ulcerativa
- DC: doença de *Crohn*
- DF: dispepsia funcional
- DGFP: distúrbios gastrointestinais funcionais pós-infecciosos
- DII: doenças inflamatórias no intestino
- DNA: Ácido Desoxirribonucleico
- dNTPs: Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
- DO: densidade óptica
- EFSA: *European Food Safety Authority*
- EPS: exopolissacarídeos
- ERI: eritromicina 15µg
- EUA: Estados Unidos da América
- FAO: *Food and Agriculture Organization*
- FDA: *Food and Drug Administration*
- FIOCRUZ: Fundação Instituto Oswaldo Cruz
- FSA: *Food Standards Agency*
- FSIS: *Food Safety and Inspection Service*
- G+C: somatório de guanina e citocina
- GEN: gentamicina 10µg

IAL: Instituto Adolfo Lutz

ICMSF: *International Commission on Microbiological Specifications for Foods*

IFB: Índice de Formação de Biofilme

ISO: *International Organization for Standardization*

LOS: lipo-oligossacarídeos

LPS: Lipopolissacarídeos

Kb: Kilobase

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

MgCl<sub>2</sub>: Cloreto de Magnésio

MH: caldo/ágar Mueller Hinton

MLST: *Multilocus sequence typing*

Mpb: milhões (mega) de pares de bases

mm: Milímetro

mM: Milimolar

NAMA: neuropatia axonal motora aguda

NCTC: *National Collection of Types Cultures*

ng: Nanograma

nm: Nanômetro

NPs: nanopartículas

OIE: *World Organisation for Animal Health*

OMS: Organização Mundial da Saúde

pb: pares de bases

PBS: Tampão fosfato-salino

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PDIA: polineuropatia desmielinizante inflamatória aguda

PFGE: *Pulsed Field Gel Electrophoresis*

pH: Potencial Hidrogeniônico

pmol: Picomol

QS: *quorum-sensing*

RAPD: *Random Amplified Polymorphic DNA*

RNA: Ácido ribonucléico

rpm: rotações por minuto

SGB: Síndrome de Guillain-Barré

SII: Síndrome do intestino irritado

SOD: superóxido desmutase

SPF: *specific pathogens free*

TBE: Tris/Borato/EDTA

TET: tetraciclina 30 $\mu$ g

TGI: trato gratointestinal

U: Unidade

UE: União Européia

UFC: Unidades Formadoras de Colônias

UPGMA: *Unweighted Pair Group Method With Arighmetic Mean*

UV: ultra violeta

VNC: viáveis não cultiváveis

WHO: *World Health Organization*

ZnO: Óxido de zinco

$\mu$ g: Micrograma

$\mu$ l: Microlitro

$\mu$ m: Micrômetro

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	24
1 INTRODUÇÃO	25
2 OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo Geral	28
2.2 Objetivos Específicos	28
3 REVISÃO DE LITERATURA	30
3.1 Histórico e caracterização de <i>Campylobacter</i>	30
3.2 Epidemiologia	33
3.3 Manifestações clínicas	37
3.4 Importância na produção avícola	42
3.5 Resistência antimicrobiana em <i>Campylobacter</i> spp.	46
3.6 Tipagem molecular	51
3.7 Determinantes de patogenicidade	54
3.7.1 Motilidade	55
3.7.2 Quimiotaxia	56
3.7.3 Adesão	58
3.7.4 Invasão	58
3.7.5 Toxinas	61
3.8 Mecanismos de adaptação	62
3.8.1 Aquisição de Ferro	62
3.8.2 Tolerância a baixas temperaturas	64
3.8.3 Tolerância a temperaturas elevadas	65
3.8.4 Mecanismo de <i>quorum-sensing</i>	66
3.9 Forma de vida séssil	68
3.9.1 Características dos biofilmes de <i>Campylobacter</i>	69
3.9.2 Biofilmes de <i>C. jejuni</i> na produção avícola	73
3.9.3 Mecanismos intrínsecos da forma séssil	74
3.9.4 Fatores extrínsecos ligados aos biofilmes	75
3.9.5 Controle dos biofilmes	76

CAPÍTULO 2 – Evolução de <i>Campylobacter jejuni</i> de origem avícola no Brasil	80
CAPÍTULO 3 – Intrinsic and extrinsic aspects on <i>Campylobacter jejuni</i> biofilms	101
CAPÍTULO 4 – Relação genotípica entre linhagens humanas e avícolas de <i>Campylobacter jejuni</i>	143
CONSIDERAÇÕES FINAIS	163
REFERÊNCIAS	165

## **CAPÍTULO 1**

### **CONSIDERAÇÕES GERAIS**

## 1 INTRODUÇÃO

A cadeia produtiva de frango de corte ocupa posição de destaque na economia brasileira e mundial. A avicultura no Brasil ocupa a segunda posição na produção mundial, com um total de 13,1 milhões de toneladas de carne de frango produzidas em 2015, ficando atrás apenas dos EUA, que produziu 17,9 milhões de toneladas. E, desde 2010, ocupa a liderança mundial na exportação (ABPA, 2016). Aliado a este sucesso, se fez necessário adotar inúmeros cuidados para obtenção de um produto de alta qualidade e livre de patógenos para assegurar a saúde dos consumidores e atender aos requisitos dos países importadores.

A indústria destinada à produção avícola tem hoje um grande desafio para manter a inocuidade do alimento que será comercializado. Dentre estes desafios, destacam-se as falhas que podem ocorrer durante os processos de higienização, que podem favorecer a permanência de micro-organismos e a contaminação do produto final. Dentre os vários micro-organismos transmitidos por alimentos que estão presentes na produção avícola destacam-se os representantes do gênero *Campylobacter*, agentes etiológicos mais prevalentes nas infecções de origem alimentar em humanos (ROSSI et al., 2016).

*Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* são responsáveis por cerca de 90% de todas as campilobacterioses diagnosticadas em seres humanos na UE e nos EUA e são comumente encontradas no trato gastrointestinal de várias espécies animais (EFSA, 2014; BOLTON, 2015). Estudos epidemiológicos relatam que a carne de frango é a principal fonte de transmissão da doença em humanos (OH et al., 2015; PRACHANTASENA et al., 2016).

A campilobacteriose é caracterizada por uma gastroenterite autolimitada, com presença de diarréia, febre e cólicas abdominais entre 12 e 72 horas após a infecção. A doença geralmente dura de 4 a 7 dias, e na maioria das pessoas, a recuperação acontece de forma espontânea, sem tratamento. Em alguns casos, a diarréia pode ser mais grave, com a necessidade de hospitalização. Nesses pacientes, *C. jejuni* pode se espalhar do intestino para a corrente sanguínea, e depois para outros locais do corpo, com risco de morte. Complicações graves pós-infecção, tais como artrite reativa e síndrome de Guillan-Barré (SGB) podem ocorrer, sendo a última caracterizada por paralisia flácida e morte por insuficiência respiratória (CDC, 2013; SKARP et al., 2016).

Para *Campylobacter* desenvolver uma infecção suficiente para causar a doença, é necessário sobreviver aos estresses fisiológicos associados aos diversos ambientes externos e internos, tais como, as variações de temperatura e de pH nos diferentes hospedeiros, além do estresse oxidativo e da limitação de nutrientes. Os fatores de virulência mais importantes que designam esse agente como patógeno humano incluem a motilidade, quimiotaxia, aquisição de ferro, adesão, invasão, *quorum sensing*, defesa e resposta ao estresse térmico, capacidade em formar biofilmes, de produzir toxina citoletal distensiva (CDT), de driblar o sistema imunológico do hospedeiro e de provocar a SGB (BOLTON, 2015; GARCÍA-SÁNCHEZ et al., 2017).

*C. jejuni* são micro-organismos fastidiosos sendo incapazes de crescer a temperaturas abaixo de 30°C, não tolerando dessecção nem níveis atmosféricos de oxigênio. São susceptíveis a vários estressores ambientais e alimentares induzidos pelo processamento, tais como estresse osmótico, variações bruscas de temperaturas e diferentes desinfetantes (GUTIÉRREZ-MARTÍN et al., 2011; BRONOWSKI et al., 2014). No entanto, esta espécie está amplamente disseminada no ambiente e podem ser facilmente isoladas de alimentos contaminados, água e outras fontes (TEH et al., 2014; TORRALBO et al., 2014).

Uma vez que *Campylobacter* é introduzido na linha de abate, esse agente pode disseminar por toda cadeia produtiva até o produto final (MELERO et al., 2012). Estudos de tipagem molecular já demonstraram a presença de genótipos persistentes desde a granja até a carcaça de frango destinada ao comércio (DAMJANOVA et al., 2011; MELERO et al., 2012; GRUNTAR et al., 2015). A persistência de populações de *Campylobacter* no ambiente e seu papel como uma fonte contínua de contaminação podem ser explicados pela capacidade de formar biofilmes.

Os biofilmes são definidos como sendo um processo de adesão entre células bacterianas a uma superfície viva ou inerte. Estas células se unem formando comunidades bacterianas, as quais são envolvidas por uma matriz polimérica composta principalmente por polissacarídeos, além de proteínas e ácidos nucléicos (AZEVEDO; CERCA, 2012). Esta matriz extracelular promove a proteção do biofilme, de modo a dificultar o acesso de agentes biocidas, além de concentrar nutrientes e prevenir a sua desidratação (CARPENTIER; CERF, 1993).

Diante dos problemas envolvidos na presença de patógenos em biofilmes, a prevenção do seu desenvolvimento e sua eliminação representam maior segurança ao alimento produzido e ao consumidor. A adoção de várias estratégias podem apresentar eficácia na eliminação, como a utilização de superfícies mais resistentes à formação de biofilme (SREY et al., 2013). Na prevenção e nos casos de biofilmes já formados, podem ser utilizados métodos físicos, químicos e biológicos, sendo a combinação dos três métodos considerada mais eficaz (MALAEB et al., 2013). A nanotecnologia surgiu como outra alternativa, uma vez que os nanometais afetam as atividades essenciais de *Campylobacter* (MATYAR et al., 2014).

Dessa forma, observa-se a necessidade de um melhor conhecimento das características de resistência e de fatores de virulência em *C. jejuni* provenientes de aves e humanos a nível comparativo e temporal. O agrupamento das diferentes linhagens em perfis genéticos obtidos por RAPD-PCR ou PFGE, fornece dados importantes quanto à similaridade e à evolução dessas estirpes. Aliado a isso, o estudo detalhado das características dos biofilmes dessa espécie permite compreender aspectos comportamentais que garantem sua sobrevivência sob as diversas condições. O somatório dessas informações são importantes para o entendimento da epidemiologia do patógeno e para o estabelecimento de parâmetros para avaliar os riscos que representam para a saúde pública. Além disso, podem subsidiar os órgãos institucionais competentes sobre as políticas de qualidade necessárias para o controle do patógeno no país.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Investigar a prevalência de *Campylobacter jejuni* em carcaças de frangos destinados ao comércio nacional e internacional, o potencial para produzir biofilmes isoladamente ou em associação a outros agentes e ainda, verificar a eficácia de agentes químicos na sua remoção. Objetivou-se também realizar um estudo comparativo com cepas isoladas de pacientes clínicos humanos e com cepas de origem avícola isoladas em períodos anteriores.

### 2.2 Objetivos específicos

- Conhecer a ocorrência de *Campylobacter jejuni*, identificadas por PCR multiplex, em carcaças de frangos distribuídas em todas as regiões do país e para o exterior;
- Comparar dados de prevalência, presença de genes de virulência, resistência antimicrobiana e similaridade genética;
- Analisar e quantificar a capacidade de produzir biofilmes pelas cepas isoladas por meio do método de microplacas;
- Verificar a interação de *C. jejuni* com *S. aureus*, *Salmonella*, *Pseudomonas* e *E. coli* na formação de biofilme, utilizando a microscopia eletrônica de varredura e o índice de formação de biofilme;
- Determinar nas cepas isoladas fatores de virulência: motilidade, invasão, adesão, produção de toxinas, resistência a condições adversas e mecanismo de *quorum-sensing* para verificar se há correlação com a capacidade de formar biofilme;
- Testar os produtos químicos: clorexidina, ácido peracético, hipoclorito de sódio e nanopartículas de óxido de zinco para remoção de células sésseis de *C. jejuni*;
- Determinar a estrutura e a composição da matriz de biofilmes mistos e simples;
- Identificar o perfil de similaridade genética entre as cepas isoladas por PFGE e correlacionar com as outras características identificadas;
- Sugerir métodos para controle de biofilmes formados por *C. jejuni*;
- Compreender a evolução de *C. jejuni* relacionada a dados de prevalência, presença de genes de virulência, resistência antimicrobiana e similaridade genética por RAPD-PCR em relação às cepas de origem avícola isoladas em 2011-2012;

- Comparar as características de virulência, de resistência a condições adversas, a presença de genes ligados à SGB assim como o material genético total por meio de análise filogenética com PFGE, com cepas isoladas de humanos hospitalizados.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Histórico e caracterização de *Campylobacter*

A primeira identificação de *Campylobacter* foi em 1886, quando Theodor Escherich notou a presença de uma bactéria espiral nas fezes de crianças falecidas e atribuiu o nome de "*cholera infantum*" (ESCHERICH, 1886). Em 1938, Levy (1946) solucionou um surto de gastroenterite em uma prisão estadual, o qual foi considerado o segundo caso de campilobacteriose humana registrado. Foi em 1963 e 1973 que esses micro-organismos foram renomeados como *Campylobacter* por Sebald e Véron devido às diferenças na composição do DNA, nas necessidades de crescimento e no metabolismo, quando comparados aos vibriões.

O desenvolvimento da técnica de filtração e do meio seletivo Skirrow específico para isolamento de *Campylobacter* nas fezes, foi um passo crucial na reavaliação da epidemiologia e identificação de *Campylobacter*. Somente na década de 1980, quase 100 anos após o primeiro relato, *C. jejuni* foi reconhecido como um dos agentes etiológicos mais frequentes de gastroenterite humana em todo o mundo (DEKEYSER et al., 1972; SKIRROW, 1977; BUTZLER et al., 1983).

O gênero *Campylobacter* constitui em conjunto com os gêneros *Arcobacter* e *Sulfurospirillum* a Família *Campylobacteraceae*, que é composta de organismos gram-negativos, geralmente microaerófilos, com baixo percentual de G+C em seu DNA. Atualmente, já foram descritas 34 espécies e 14 subespécies no gênero *Campylobacter* (VANDAMME; LEY, 1991; LPSN, 2015).

A maioria das espécies de *Campylobacter* são comensais humanos e animais em órgãos reprodutivos, trato intestinal e cavidade oral, mas algumas espécies são patógenos zoonóticos oportunistas ou primários. Das espécies e subespécies identificadas, as mais importantes são as que pertencem ao grupo das termófilas, nomeadamente *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* e *Campylobacter lari*, sendo que as duas primeiras constituem as espécies que são, com maior frequência, isoladas em casos de gastroenterites em humanos e animais (MAN et al., 2011).

São bastonetes gram-negativos, curvos, delgados que medem 0,2 $\mu$ m a 0,8 $\mu$ m por 0,5 $\mu$ m a 5  $\mu$ m. Caracterizam-se por possuírem morfologia curva típica, em forma de "S", de vírgula ou em espiral. Por vezes, estes micro-organismos podem ainda

apresentar uma forma que se designa por “asa de gaivota”. Outras características frequentemente observadas são as longas formas espirais, que ocorrem quando duas “células filhas” permanecem juntas, após a divisão (BLACKWELL, 2010).

Essas bactérias são termófilas com crescimento ideal entre 37 a 42°C e microaerófilas (SILVA et al., 2011). No entanto, *C. jejuni* é capaz de sobreviver em ambientes com temperaturas de 27°C e com 60% a 62% de umidade relativa (DAVIS; CONNER, 2007). A atividade metabólica destes micro-organismos não cessa a baixas temperaturas, pois desenvolvem mecanismos de adaptação ao ambiente, o que permite sua permanência em alimentos processados à temperatura de 4°C ou sob congelamento (LIGOWSKA et al., 2011; MELO, 2012).

Estes micro-organismos são móveis, devido à presença de um único flagelo polar em uma ou em ambas as extremidades, que pode medir até três vezes o comprimento da célula, e que lhe confere o movimento característico tipo “sacarolha” ou “vaivém” (LEVIN, 2007).

Apesar de não serem capazes de formar esporos, em condições de desenvolvimento lhe são desfavoráveis, quer por envelhecimento das culturas (mais de 48 horas) ou por estresse oxidativo ou térmico, pode ocorrer uma retração citoplasmática, na qual as células adquirem uma forma cocóide. Esta característica confere à bactéria a capacidade de entrar num estado que se pode descrever como “viável não cultivável” (VNC), que lhe permite sobreviver às alterações de estresse ambiental de forma a manter sua virulência. Quando as condições do meio se tornam novamente favoráveis, é possível a reversão para a forma espiral, bem como a multiplicação (KEUM-IL et al., 2007).

Apresentam um crescimento lento e são extremamente fastidiosos, requerendo condições de cultura específicas. São microaerófilas, com metabolismo respiratório complexo, necessitando de uma atmosfera com baixas concentrações de oxigênio para o seu desenvolvimento. O pH ótimo situa-se entre 5,8 e 8,0, ficando inativo em pH inferior a 4,9 (GUNTHER; CHEN, 2009).

*Campylobacter* são não hemolíticos, possuem propriedades de oxidase e catalase positivas, que lhe conferem a capacidade de decomposição do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água e a capacidade de catalisarem reações de oxidação/redução, envolvendo o oxigênio molecular como receptor de elétrons, respectivamente (LEVIN, 2007). Não fermenta nem oxida os carboidratos, obtendo a sua energia a partir de aminoácidos ou de compostos intermediários do ciclo do

ácido tricarboxílico. As reações bioquímicas típicas incluem a redução do fumarato a succinato, bem como as reações para produção de acetoína e indol. A maioria das espécies reduz o nitrato a nitrito. A diferenciação das espécies mais importantes em saúde pública (*C. jejuni* e *C. coli*) pode ser feita com base na hidrólise do hipurato (GUNTHER; CHEN, 2009).

Em 2000, Parkhill et al. sequenciaram o DNA da cepa de referência de *C. jejuni* NCTC 11168 e identificaram o valor de 1,64 Mpb (PARKHILL et al., 2000). E logo em seguida, as sequências de genoma de três outras estirpes de referência (81-176, 81116, RM1221) foram determinadas de maneira a permitir a detecção de regiões conservadas e distintas em vários pontos. Hoje, 142 genomas de *C. jejuni*, dos quais 32 completos, foram sequenciados e depositados no Genbank e mais de 5000 genomas estão disponíveis a partir da base de dados PubMLST (NCBI, 2015; PUBMLST 2015).

O tamanho médio do genoma de *C. jejuni* é bastante reduzido, entre 1,6 e 1,8 Mbp, e tem um valor relativamente baixo de conteúdo G+C ( $\approx$ 32%). Como a maioria das bactérias, a espécie *C. jejuni* pode ser descrita por um pan-genoma consistindo de um genoma central compartilhado por todos os isolados, além de um genoma acessório composto de genes específicos (TETTELIN et al., 2005).

Os genes presentes na região conservada estão envolvidos em funções como o metabolismo energético, a divisão celular, a síntese de proteínas e peptídeos e de macromoléculas, incluindo DNA e RNA. No entanto, muitos genes ainda não estão caracterizados na região não conservada, os quais provavelmente estão diretamente envolvidos na variabilidade do organismo, na virulência, na patogenicidade e na especificidade do hospedeiro (BIGGS et al., 2011).

A maioria das cepas de *C. jejuni* são naturalmente competentes para a captação de DNA externo, de forma que a recombinação por meio da transformação torna-se um evento constante, sendo o principal motor da diversidade genética nessa espécie. Essa habilidade resultou em uma estrutura de população clonal variável, de maneira que as fronteiras entre os diferentes grupos de genótipos relacionados são de difícil determinação (BIGGS et al., 2011; MERIC et al., 2014).

Para ter sucesso *C. jejuni* precisa se replicar em diversos hospedeiros, como aves e humanos, principalmente, e manter-se viável em diferentes ambientes, como alimentos e água. Portanto, esse micro-organismo apresenta-se metabolicamente flexível. Para aquisição de energia, *C. jejuni* é dependente do ciclo do ácido cítrico e

alimenta o ciclo através de diferentes intermediários, principalmente pela degradação de aminoácidos como L-aspartato, L-serina, L-asparagina, L-glutamato e L-prolina. A metabolização de ácidos graxos (acetato e lactato) ocorre somente quando todos os outros nutrientes estão esgotados. A ausência de transportadores de carboidratos e enzimas da via glicolítica torna *C. jejuni* uma bactéria assacarolítica (incapaz de utilizar carboidratos comuns para produzir energia) (THOMAS et al., 2011; STAHL et al., 2012).

O ferro é fundamental para o crescimento de *C. jejuni* e age em conjunto com outros elementos como oxigênio, nitrogênio e enxofre na síntese de DNA e na transferência de elétrons. O ferro-enxofre, por exemplo, é um co-fator em várias enzimas, que catabolizam as principais vias metabólicas e a sensibilidade ao oxigênio, principal razão pela característica de microaerófilo (PALYADA et al., 2004).

### **3.2 Epidemiologia**

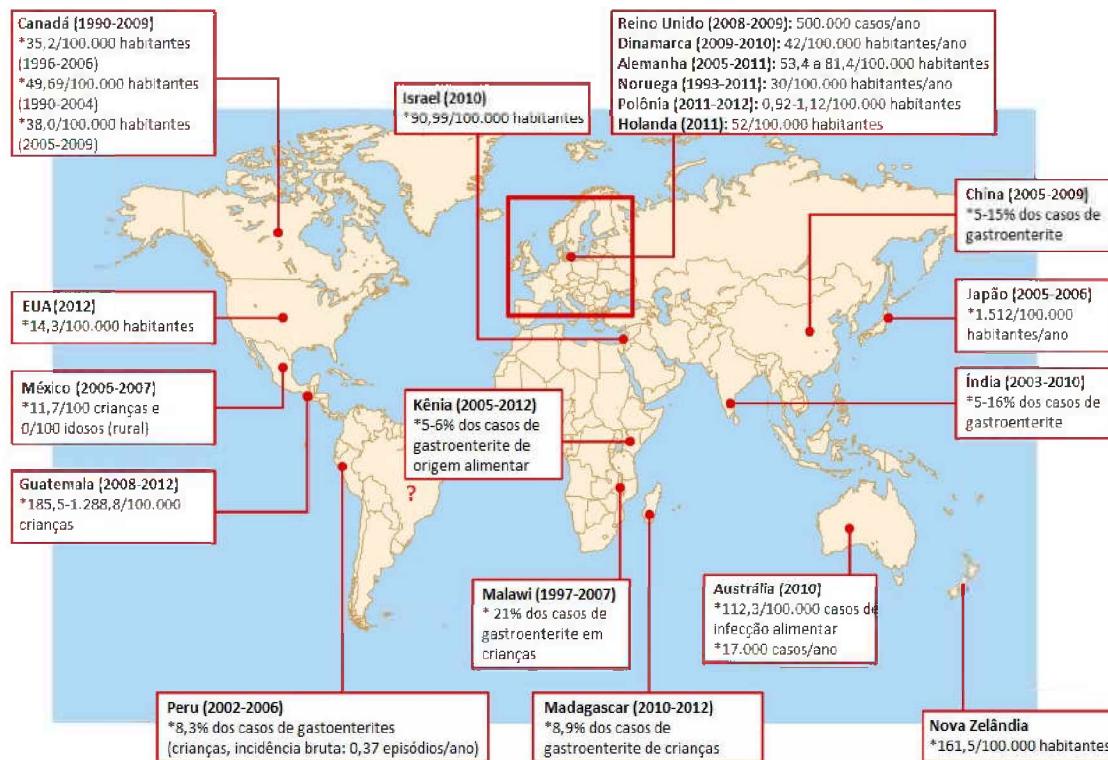
A infecção por *Campylobacter* spp. constitui uma zoonose de distribuição mundial, com graves repercussões em saúde pública e com impacto sócio-econômico significativo. A elevada incidência de campilobacteriose tornou-a a causa de doença gastrointestinal mais frequentemente reportada na Europa (EFSA, 2016).

Das espécies de *Campylobacter* identificadas, as que estão frequentemente implicadas nos surtos de doença gastrointestinal são *C. coli* e *C. jejuni*, sendo reconhecidas como as mais importantes e com maior potencial patogênico do ponto de vista da segurança alimentar (EFSA, 2016).

Há evidências que sugerem que houve um aumento na incidência de campilobacteriose no mundo nas últimas décadas, principalmente em países da América do Norte, Europa e Austrália. Embora os dados epidemiológicos de países em desenvolvimento como os da África, Ásia e Oriente Médio ainda estejam incompletos, há indícios de que a infecção por *Campylobacter* é endêmica nestas regiões. As diferenças na incidência e no número de casos relatados em diferentes países ou regiões podem ser bastante significativas. É provável que essas variações surjam, em parte, devido às diferenças na sensibilidade das metodologias de detecção, no padrão e rigidez dos protocolos de controle, problemas no sistema de vigilância, subnotificações, práticas alimentares inadequadas e disponibilidade de

reservatórios naturais para espécies de *Campylobacter* nestas regiões (Figura 1) (SADKOWSKA-TODYS; KUCHARCZYK, 2012; WAGENAAR et al., 2013).

**Figura 1:** Incidência e prevalência de campilobacteriose (*C. jejuni* e *C. coli*) no mundo. Adaptado de Kaakoush et al. (2015).



Em 2015, foram registrados 229.213 casos de campilobacteriose na União Européia (UE) sendo a mais frequente doença veiculada por alimentos, com tendência ascendente desde 2008. A taxa de notificação de campilobacteriose da UE foi de 64,8 para cada 100.000 habitantes, mas variou consideravelmente entre os estados membros (de 2 a 173,7 por 100.000 habitantes, na Letônia e República Tcheca, respectivamente) (EFSA, 2016). No entanto, a verdadeira incidência de *Campylobacter* é subestimada. De acordo com Tam et al. (2012), cada caso de campilobacteriose relatado pela vigilância representa cerca de 9,3 casos reais.

Segundo o CDC (2012), nos Estados Unidos da América, *Campylobacter* é a maior causa de diarréia bacteriana, com um milhão de casos documentados anualmente ocorrendo como eventos isolados, na sua maioria, e esporádicos. 90% destes casos estão associados à espécie *Campylobacter jejuni*, sendo o restante atribuídos a *Campylobacter coli*.

A epidemiologia das infecções por *Campylobacter* é complexa e envolve fatores como estado imunológico, idade do hospedeiro e virulência do patógeno. Há relatos de que a infecção pode ocorrer em pacientes de todas as idades, porém um estudo realizado por Nielsen et al. (2013) constatou que a infecção é mais prevalente em crianças (1 a 4 anos) e jovens adultos (15 a 24 anos) do que em outros grupos etários.

Nos países em desenvolvimento, onde *Campylobacter* é endêmica, a infecção é geralmente limitada a crianças, com incidência decrescente, de acordo com o aumento da idade, sugerindo que a exposição no início da vida pode levar ao desenvolvimento de imunidade protetora. Tanto em países em desenvolvimento quanto nos desenvolvidos, as infecções assintomáticas são comuns e contribuem na transmissão do agente pela excreção assintomática (HAVELAAR et al., 2009).

A sazonalidade pode afetar a incidência e/ou prevalência da campilobacteriose em humanos, sendo que os casos esporádicos constituem a maioria das infecções e surgem principalmente no verão, sendo muitas vezes subestimados (NIELSEN et al., 2013). Estes casos esporádicos são atribuídos à manipulação e ingestão de carne de aves crua ou mal processada, bem como às contaminações cruzadas que podem ocorrer durante o preparo simultâneo de carne de aves e alimentos crus. Segundo Jore et al. (2010), o maior número de casos de campilobacteriose no homem foram reportados durante os meses de verão. Porém, alguns estudos mostram a presença de picos mensais em detrimento à tendência sazonal (HABIB et al., 2012; MELO, 2012).

O principal fator de risco para a infecção humana é a ingestão e a manipulação de carne de aves, principalmente de frango, crua ou mal processada, sendo a responsável por 50% a 70% dos casos de campilobacteriose. Esta contaminação pode ocorrer ao longo de toda a cadeia alimentar, quer diretamente ou indiretamente por contaminação cruzada, constituindo um grave risco para a saúde humana (ELLIS-IVERSEN et al., 2009).

O relatório da EFSA indica que o consumo de carne de aves é considerado como uma das principais fontes de infecção no homem, tendo-se obtido, em 2007, 26% das amostras com resultado positivo (EFSA, 2009).

Em 2013, a *Food Standards Agency* (FSA) do Reino Unido publicou relatório oficial que demonstrava que dois terços da carne de frango vendida nos estabelecimentos britânicos apresentava contaminação com *Campylobacter*. O

agente foi responsável pela ocorrência de gastroenterites em meio milhão de pessoas e a causa de morte em 100. Já em 2015, a porcentagem de contaminação foi de 73%, tornando o problema ainda mais alarmante (FSA, 2013; 2015).

Nos Estados Unidos, a prevalência foi de 20% na carne de frango analisada no período de julho a setembro de 2014, conforme dados obtidos da *United States Department of Agriculture* (FSIS, 2015).

*Campylobacter* foi o patógeno mais encontrado nas amostras de peito de frango embalado, de acordo com o *FoodNet* no Canadá. Cerca de metade de todas as amostras avaliadas apresentaram positividade e, paralelamente, *Campylobacter* e *Salmonella* foram os agentes mais comuns de doenças gastrointestinais de causa alimentar no país (FOODNET, 2016).

*Campylobacter* apresenta elevada capacidade de sobrevivência em condições extremas durante o processo produtivo de frangos devido à habilidade de fixação nos folículos das penas e nas fendas profundas da pele da ave. Esses recessos oferecem condições ideais para a bactéria aderir e suportar as variações de condições no processamento (JANG et al., 2007).

Estudo realizado na Bélgica revelou que a prevalência de *Campylobacter* em lotes de frangos e nas carcaças dos mesmos é bastante elevada, equivalente a 41,1% e 45,9%, respectivamente (BOTTELDOORN et al., 2008). Assim como no trabalho realizado na Irlanda, no ano de 2008, no qual das 394 carcaças de frangos resfriadas estudadas, 98% estavam contaminados com *C. jejuni* (EFSA, 2010). Em alguns países membros da União Européia (EU) em 2007, a prevalência em carnes de frango frescas foi equivalente a 83%. No Canadá, a porcentagem foi de 33,7% (2146/6367) de amostras de carnes de frango resfriadas positivas de 2003 a 2010 (AGUNOS et al., 2013). No Irã, a prevalência foi de 63% e no Japão 45,8% (FAO, 2009). Dados mostram que a contaminação de carcaças de frangos varia entre 10 a 100% nos diversos países (LOPES, 2009).

No Brasil, MELO (2012) isolou *Campylobacter* spp. de 22,38% das 420 carcaças de frango resfriadas e congeladas analisadas de três estados, índice de contaminação menor do que o obtido por KUANA et al. (2008), que obtiveram resultados equivalente a 99% das carcaças resfriadas contaminadas com *Campylobacter* spp. FRANCHIN et al. (2007) ao analisarem 335 amostras de carcaças resfriadas, água e equipamentos coletados em diferentes pontos dentro da linha de abate de frangos de corte e observaram positividade para *Campylobacter*

em 71,3% das amostras.

Apesar de todos os estudos disponíveis sobre *Campylobacter* spp., a epidemiologia ainda não se encontra totalmente esclarecida, havendo algumas lacunas a nível do seu conhecimento. Em alguns países ainda não foi determinada a verdadeira incidência das infecções por este agente, sendo necessário esclarecer a importância das diferentes fontes de infecção e o papel do hospedeiro no efeito da doença (RIDLEY et al., 2008).

### 3.3 Manifestações clínicas

Para estabelecer uma infecção suficiente para causar a doença, o micro-organismo precisa sobreviver ao estresse fisiológico associado a ambientes externos e internos, tais como flutuações de temperatura, variações de pH, diferentes tipos de hospedeiro, imunidade do hospedeiro, estresse oxidativo e fornecimento de nutrientes limitado. Como todas as bactérias enteropatogênicas, as espécies do gênero *Campylobacter* evoluíram suas características, muitas das quais são determinantes de virulência que têm ajudado a contornar as defesas do hospedeiro humano e de outros hospedeiros mamíferos e aves (GUERRY, 2007).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2011), *Campylobacter* é a principal causa de formas graves de diarréia. No entanto, a maioria das pessoas apresenta recuperação em um período de dois a cinco dias, embora esta fase possa perdurar por até 10 dias. Outros sintomas incluem a febre, dores de cabeça e abdominal, indisposição, náusea, vômitos, perda de peso e cãibras. Raramente a infecção resulta em consequências que permanecem por longo prazo de forma a desenvolver doenças mais graves como sepse, aborto, meningite, abscessos e complicações como a Síndrome de Guillain-Barré.

A gastroenterite induzida por *C. coli* é clinicamente indistinguível daquela ocasionada por *C. jejuni*. O início dos sintomas geralmente ocorre 24 a 72 h após a ingestão e pode levar mais tempo para desenvolver nos infectados com uma dose baixa. O pico da doença pode durar de 24 a 48 h e pode incluir dor abdominal que imita a apendicite. Alterações como a presença de leucócitos polimorfonucleares, sangue nas fezes e colite inflamatória difusa em biópsia do cólon podem ser identificadas em pacientes infectados (BESSEDE et al., 2014).

Essas sintomatologias são semelhantes às causadas por diversos outros

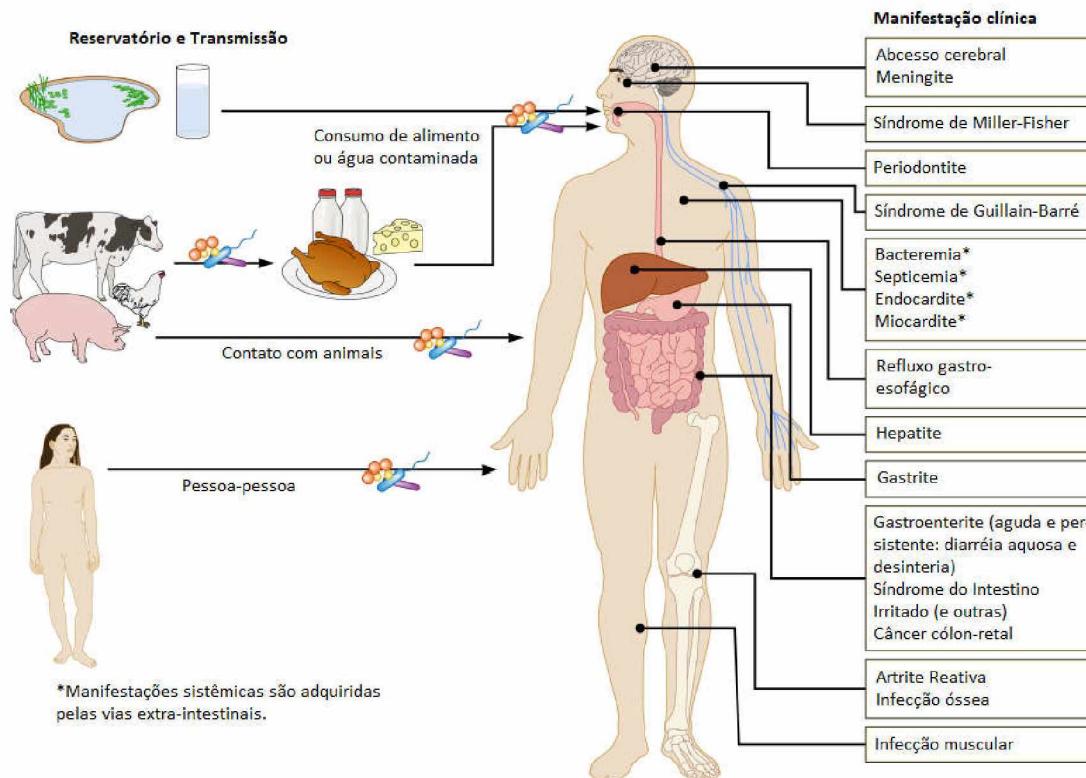
micro-organismos patogênicos entéricos, porém a baixa dose infectante de *Campylobacter* é um sério agravante (AMRI et al., 2007). Há estudos que mostram a oscilação nessa dose no hospedeiro humano. Fatores como virulência da cepa e estado imunológico do hospedeiro podem influenciar nesse aspecto. Trabalhos experimentais com infecção em humanos mostraram que a dose de 360 UFC a 800 UFC são suficientes para o início do desenvolvimento da doença (HARA-KUDO; TAKATORI, 2011; KIRKPATRICK et al., 2013).

A recuperação é rápida, geralmente uma semana. O tratamento com antibióticos só é recomendado em casos graves da doença. Repouso e fluidoterapia são indicados para reverter a maior parte da sintomatologia desta doença, que na maioria dos casos é auto-limitante. O paciente pode continuar excretando o micro-organismo durante uma média de duas a três semanas após a recuperação clínica, a não ser que tenha feito uso de medicamentos antimicrobianos (SALLAM, 2007).

Apesar de a gastroenterite ser uma condição clínica importante resultante da infecção por *Campylobacter*, estes micro-organismos também foram associados com uma série de outras condições graves no trato gastrointestinal, incluindo doenças inflamatórias no intestino (DII), doenças esofágicas, periodontite, distúrbios gastrintestinais funcionais, doença celíaca, colecistite e câncer no cólon (Figura 2) (KAAKOUSH et al., 2015).

As DII são condições inflamatórias crônicas do trato gastrointestinal que incluem a doença de *Crohn* (DC) e colite ulcerativa (CU). A patogenia em pacientes com DC é caracterizada por lesões transmurais que podem ocorrer em qualquer local ao longo da região gastrointestinal. Enquanto que os pacientes com CU são afetados pela inflamação submucosa contínua restrita ao cólon. Apesar da etiologia da DII ainda não ser bem elucidada, a hipótese geral é que elas são doenças complexas cuja a resposta imune desregulada surge como resultado das alterações provocadas por patógenos do trato gastrointestinal, levando à inflamação crônica. A importância de *Campylobacter* na DII tem sido analisada nas últimas três décadas e vários estudos já forneceram provas sólidas que demonstraram a associação entre *Campylobacter* e estes distúrbios gastrintestinais (KAAKOUSH et al., 2012; HANSEN et al., 2013; RAJILIC-STOJANOVIC et al., 2013).

**Figura 2:** Esquema dos reservatórios ambientais, vias de transmissão e manifestações clínicas associadas às espécies de *Campylobacter*. Adaptado de Kaakoush et al. (2015) e Mendonça et al. (2015).



O gênero *Campylobacter* está associado ao desenvolvimento de distúrbios gastrointestinais funcionais pós-infecciosos (DGFP). Dois tipos de DGFP receberam maior atenção: Síndrome do intestino irritado (SII) e dispepsia funcional (DF). SII é decorrente de dor abdominal recorrente ou desconforto durante pelo menos três meses com alteração da função intestinal (diarréia, constipação ou ambos). DF é caracterizada por sintomas persistentes ou recorrentes (dor ou desconforto na parte superior do abdômen) por pelo menos três meses (SAPS et al., 2008; PORTER et al., 2013; FUTAGAMI et al., 2015).

As percentagens de indivíduos com gastroenterite que desenvolvem SII pós-infeção variam de 3,7% a 36%. Entretanto, os estudos que investigaram exclusivamente a influência de *C. jejuni* associado à SII demonstraram percentuais variando de 9,0 a 13,8%, sendo que os sintomas podem persistir por até 10 anos após o evento infeccioso. Esses percentuais são superiores aos valores encontrados para infecções com *Salmonella* e com Epstein-Barr vírus. Evidências experimentais

mostraram que as toxinas de *Campylobacter* são importantes determinantes para o desenvolvimento desses quadros clínicos intestinais pós-infecciosos (MARSHALL et al., 2010; SCHWILLE-KIUNTKE et al., 2011).

A doença celíaca é um distúrbio digestivo em que o sistema imunológico reage anormalmente ao glúten, resultando em danos ao revestimento do intestino delgado. Acredita-se que a doença celíaca afete aproximadamente 1% das pessoas no mundo e sua incidência aumentou até cinco vezes em alguns países, incluindo os EUA. Em 2013, Riddle et al. (2013) publicaram um estudo mostrando o risco de doença celíaca após infecção alimentar. Eles constataram que pessoas com campilobacteriose tiveram uma taxa 3,5 vezes maior de doença celíaca do que indivíduos não expostos. Além disso, nenhum paciente exposto a qualquer outro patógeno gastrointestinal, incluindo *Salmonella*, *Shigella* e *Y. enterocolitica*, desenvolveram doença celíaca (RIDDLE et al., 2013; ALTOBELLi et al., 2014).

Evidências crescentes indicam que a perda da microbiota intestinal contribui para o desenvolvimento do câncer colo-retal. Atualmente, existem poucos estudos que comprovam a associação de *Campylobacter* no câncer cólon-retal. No entanto, estudo realizado por Warren et al. (2013), baseado na análise de metatranscriptoma em amostras de câncer cólon-retal, demonstrou co-agregação de *Campylobacter* com *Fusobacterium* e *Leptotrichia*. Após isolamento de *Campylobacter* de tecido de câncer cólon-retal, os autores identificaram uma série de genes de virulência e outras constatações que levantaram a possibilidade de associação de populações bacterianas gram-negativas, *Campylobacter* e *Fusobacterium*, em câncer colo-retal.

Além do acometimento do trato digestório, as espécies de *Campylobacter* podem causar uma série de manifestações clínicas em outras partes do corpo, como uma infecção local isolada, uma manifestação sistêmica após um episódio de enterite ou um distúrbio imunológico pós-infeccioso. Essas manifestações incluem a síndrome de Guillain-Barré, síndrome de Miller Fisher, abscessos cerebrais e meningite, bactеремia, sepse, endocardite e miocardite, artrite reativa e clínica e manifestações que resultam em complicações no trato reprodutivo (KAAKOUSH et al., 2015).

A Síndrome de Guillain-Barré (SGB) é uma condição neurológica caracterizada por um estado progressivo simétrico de fraqueza nos membros, com ou sem hiporreflexia, que pode também afetar os músculos do trato respiratório e do crânio. Os dois principais subtipos de SGB são a neuropatia axonal motora aguda

(NAMA) e a polineuropatia desmielinizante inflamatória aguda (PDIA), com cada subtipo exibindo uma imunopatogenia distinta e resposta ao tratamento. A NAMA tem a característica de progressão rápida e acentuada, e é o subtipo mais prevalente (30 a 65% dos pacientes) na Ásia e no Centro e Sul da América, enquanto a PDIA é mais prevalente na Europa e América do Norte (KUWABARA; YUKI, 2013; BAE et al., 2014).

Trata-se de uma doença auto-imune pós-infecciosa, que provoca paralisia flácida generalizada e anualmente pode acometer até quatro pessoas para cada 100.000 habitantes, de maneira progressiva com o aumento da idade e para o sexo masculino. Aproximadamente 60% a 70% dos pacientes com SGB apresentam alguma doença aguda de uma a três semanas antes dos sintomas aparecerem, sendo a infecção por *Campylobacter jejuni* a mais frequente. A correlação entre infecção por *Campylobacter* seguida da ocorrência de SGB foi comprovada em estudo realizado na Nova Zelândia, que após a implementação de medidas de higiene mais rigorosas na produção avícola ocasionou queda no número de casos de campilobacteriose e de SGB. Além disso, surtos de SGB têm sido associados a surtos de infecção por *C. jejuni* em diversos outros países (KEITHLIN et al., 2014; SIVADON-TARDY et al., 2014).

A SGB se destaca por ser a causa mais comum de paralisia neuromuscular aguda no mundo (VUCIC et al., 2009).

Quando *C. jejuni* invade o corpo humano, uma das respostas imunes é a produção de anticorpos específicos para a estrutura de lipo-oligossacarídeos (LOS) presente na membrana celular de *C. jejuni*. No entanto, o próprio corpo humano contém compostos com exatamente a mesma estrutura molecular e são encontrados na membrana celular das células nervosas humanas. Assim, a estrutura do LOS de *C. jejuni* imita a estrutura molecular do gangliosídeo, e os anticorpos produzidos em reação à membrana da célula de *C. jejuni* também reagem contra a membrana das células nervosas. Trata-se da reação cruzada entre anticorpos produzidos em resposta a LOS de *C. jejuni* e gangliosídeos humanos. O resultado é o dano do nervo que evolui para a paralisia característica da síndrome de Guillain-Barré (MURRAY et al., 2007).

Dois genes (*cj1421c* e *cj1428c*) apresentaram taxas de conservação mais altas entre as cepas isoladas de pacientes com SGB do que entre as cepas de pacientes que apresentaram apenas quadros simples de gastroenterite, sendo

importantes marcadores moleculares dessa patologia. Além disso, um gene que codifica uma glucosiltransferase (*cj1135*) foi descrito como bastante conservado em cepas cujo LOS não mimetizam gangliosídeos humanos, sugerindo que este gene pode funcionar como silenciador dessa neuropatogênese (TABOADA et al., 2007).

A Síndrome de Miller-Fisher é uma variante clínica de SGB, cuja condição é definida pela oftalmoparesia de início agudo, arreflexia e ataxia, decorrentes do desenvolvimento de anticorpos anti-LOS produzidos contra vários patógenos associados ao mimetismo molecular com gangliosídeos humanos. Destes, *C. jejuni* é o mais freqüentemente identificado. Esses anticorpos se ligam a neurônios oculomotores causando oftalmoplegia (BRASIL, 2009; HEIKEMA et al., 2013).

Outra síndrome decorrente da infecção por *C. jejuni* é a Síndrome de Reiter, ou artrite reativa. Esta síndrome é uma resposta auto-imune que provoca inflamação (artrite) em diferentes articulações em resposta à infecção por *C. jejuni*. É mais frequente em grandes articulações que suportam o peso, como joelhos e parte inferior das costas, mas outras articulações também podem ser acometidas (MURRAY, 2007).

### **3.4 Importância na produção avícola**

O Brasil ocupa atualmente a posição de segundo maior produtor e primeiro exportador de carne de frango no mundo, sendo que aproximadamente 32% de toda a produção é destinada ao mercado externo. Desde o ano de 2008, o país conquistou a colocação de maior exportador do produto, sustentando esta posição de destaque até os dias atuais, seguido dos EUA e UE. Os principais países importadores da carne de frango brasileira são Japão, Arábia Saudita, Iraque, México e UE (ABPA, 2016).

O intenso crescimento do setor avícola brasileiro se deve aos inúmeros avanços tecnológicos adotados pelas indústrias. Contudo, ao mesmo tempo em que a avicultura expandiu no mundo inteiro, aumentou, exponencialmente, a quantidade de aves alojadas, o que favoreceu a instalação, multiplicação e disseminação de agentes patogênicos. Assim, aliado a esta intensa modernização, também se fez necessário adotar inúmeros cuidados para obtenção de um produto de alta qualidade, tornando-se cada vez mais importante a prevenção e o controle de patógenos dentro da cadeia produtiva, visando evitar as enfermidades avícolas e a

ave como fonte de infecção para os seres humanos e, principalmente, atender os requisitos dos países importadores.

*Campylobacter* spp. é considerado um micro-organismo comensal em muitas espécies aviárias, tais como, frangos, perus, patos e faisões. A colonização de lotes de frangos geralmente ocorre nas primeiras duas ou três semanas de idade, em sistemas intensivos, sendo detectado entre sete a dez dias pós-infecção. Geralmente, as aves permanecem assintomáticas até atingirem a maturidade (RIDLEY et al., 2008).

As aves colonizadas podem apresentar contagens de  $10^6$  a  $10^9$  UFC/g de *Campylobacter* nas fezes e permanecem infectadas até o abate. Esta bactéria geralmente coloniza a camada de muco sobre as células epiteliais do ceco e do intestino delgado (MEADE et al., 2009; HERMANS et al., 2012). A disseminação para órgãos extra-intestinais, como o baço, a moela ou o fígado também é possível. Alguns estudos sugerem o envolvimento de *Campylobacter* em alterações observadas na mucosa intestinal e problemas com os pés e pernas das aves (WILLIAMS et al., 2013, HUMPHREY et al., 2014).

As principais fontes de contaminação dos lotes são atribuídos a baixos níveis de biossegurança, como a presença de roedores e de outros animais nas instalações, água de bebedouro não desinfetada, além da idade e do tamanho do lote (HANSSON et al., 2007).

Muitos fatores influenciam a colonização do frango, dentre eles a idade, a dose infectante e a virulência da cepa de *Campylobacter*. Vários estudos comprovam o envolvimento de vários genótipos simultaneamente ou sucessivamente durante a criação e processamento e estão relacionados à introdução subsequente de lotes ou a mutações clonais (MESSENS et al., 2009; HUE et al., 2011; MELO et al., 2013).

A transmissão de *Campylobacter* spp. pode ocorrer principalmente de forma horizontal, sobretudo através do contato com água contaminada, fezes, aves selvagens, roedores e tratadores. A transmissão vertical tem sido alvo de vários estudos, mas as formas de contágio através de ovos contaminados têm tido várias controvérsias e parece ser um evento pouco importante ou raro (BULL et al., 2006; FONSECA et al., 2011).

Alguns estudos experimentais indicam que *Campylobacter jejuni* consegue penetrar no ovo, através da colonização do oviduto, ou por contaminação fecal da

casca, contudo a sua transmissão aos pintos não está totalmente esclarecida (HORROCKS et al., 2008; PAULA et al., 2009; FONSECA et al. 2011). Estudo realizado por Fonseca et al. (2014) mostrou que apesar de ser um agente sensível ao oxigênio atmosférico, *C. jejuni* é capaz de atravessar a casca dos ovos, sobreviver aos constituintes da clara do ovo (albumém) e alcançar o vitelo. Neste estudo, a infecção causou mortalidade embrionária precoce e não foi recuperada na forma viável dos pintos nascidos.

A colonização de *Campylobacter* em pintos de duas a três semanas ocorre naturalmente por transmissão horizontal do ambiente, devido à presença dos anticorpos maternos até esse período. Diferentemente, na linhagem SPF (*specific pathogens free*) a exposição é detectada aos oito dias de vida. Após a primeira infecção de um animal, *Campylobacter* se espalha muito rapidamente, de maneira que em uma semana 95% de um lote inteiro de 20.000 frangos apresenta-se infectado (VAN GERWE et al., 2009). Esta rápida transmissão pode ser explicada pela alta excreção fecal, pela contaminação da água potável e pelo comportamento coprófago das aves.

Uma vez colonizado um animal, todo o lote fica igualmente contaminado, permanecendo desta forma até ao abate. Experimentalmente, a dose viável de *C. jejuni* necessária para colonizar as aves é de apenas 40 UFC (GORMLEY et al., 2008; McDOWELL et al., 2008).

A elevada temperatura metabólica (42°C) das aves predispõe esta espécie para ser o principal reservatório de *Campylobacter* spp. e auxilia na manutenção desse agente, uma vez que crescem melhor em ambientes com temperaturas próximas de 42°C (HORROCKS et al., 2008).

*Campylobacter* é ubíquo no meio ambiente, e as fontes de contaminação de frangos de corte são diversas. A presença de animais selvagens, outros animais de produção nas proximidades, roedores e moscas representam potenciais fontes de contaminação em lotes de frangos de corte (HERMANS et al., 2012). As moscas agem como um vetor mecânico, e sua abundância no verão pode ser uma explicação para a maior prevalência do agente nesse período (ALLAIN et al., 2014).

A água contaminada fornecida aos animais também podem contribuir para a transmissão horizontal (BULL et al., 2006). Trabalho realizado por Messens et al. (2009) constatou a similaridade entre cepas isoladas da água de bebedouros antes da introdução dos animais e aquelas recuperadas dos frangos já na granja.

Por fim, veículos, equipamentos pessoais e caixas de transporte são frequentemente contaminados por *Campylobacter* antes da chegada na fazenda (RIDLEY et al., 2011).

O transporte das aves para o matadouro também caracteriza outra forma de infecção dos animais, uma vez que esse processo aumenta o estresse desses animais, diminuindo a resistência e tornando-os mais suscetíveis. Estudos comprovam que a infecção por *Campylobacter* aumenta durante o transporte para o matadouro, uma vez que os animais defecam durante o mesmo, contaminando as suas penas e pele, bem como as gaiolas e outros animais ainda não infectados (GABRIEL, 2010).

Agunos et al. (2014) avaliaram as principais fontes de infecção de frangos de corte e concluíram que os principais pontos de risco são a inadequação dos métodos de limpeza e desinfecção das granjas entre os lotes e a presença de outros animais nas regiões adjacentes.

Além da contaminação através do contato direto, a contaminação cruzada também é de suma importância para a existência de espécies de *Campylobacter* no ambiente fabril. A periodicidade e a forma de higienização podem auxiliar na permanência desse agente, devido à capacidade de formação de biofilme em condições inóspitas ao seu crescimento, como em superfícies de vidro, aço e plástico polietileno (GUNTHER; CHEN, 2009).

A transmissão deste agente das aves infectadas e respectivas carcaças para o homem é extremamente relevante. Apesar de o número de células viáveis de *Campylobacter* spp. diminuir substancialmente após o processamento, refrigeração ou congelamento, ainda existe risco de infecção humana quando há ingestão de carne de frango mal cozida (STERN et al., 2007). Ligowska et al. (2011) destacaram que a constituição da superfície da carne de frango prolonga a sobrevivência de *C. jejuni* a 5°C, em comparação com meios de cultura em laboratório, sugerindo que os compostos presentes na carne de frango influenciam na permanência e na adaptação do micro-organismo a baixas temperaturas.

A contaminação das carcaças depende de diversas variáveis, nomeadamente da idade das aves, do nível de contaminação dos lotes e da influência de fatores relacionados com a produção, transporte e processamento. A determinação do nível de contaminação nestes produtos tem implicações na saúde pública, sendo fundamental a existência de uma rastreabilidade nas aves vivas, nas carcaças de

frango e nos seus derivados (KUANA et al., 2008).

O controle de *Campylobacter* na produção avícola é altamente benéfico para a saúde pública devido ao seu impacto ao longo da cadeia alimentar. Na produção primária, a higiene, a utilização de medidas de biossegurança e a redução da idade de abate poderia reduzir a colonização cecal das aves entre 2 a 3 log UFC/g, e consequentemente minimizaria os riscos da doença em humanos em 76-100% (ROMERO-BARRIOS et al., 2013).

De acordo com Meunier et al. (2015) e Robyn et al. (2015) a redução da colonização intestinal por *Campylobacter* parece ser a melhor estratégia para reduzir a campilobacteriose humana, mas também representa um verdadeiro desafio por causa do comportamento comensal desta bactéria no intestino de frangos de corte.

A combinação de três medidas de controle surge como uma estratégia eficaz: 1) a implementação de medidas de biossegurança como a desinfecção de equipamentos e a obrigatoriedade da utilização de medidas de higiene da equipe de trabalhadores (mãos, botas, roupas), para evitar a contaminação do lote e a transmissão do agente entre os diferentes lotes; 2) cuidados com a alimentação dos animais com o uso de substâncias inibidoras, como óleos essenciais, ácidos orgânicos, produtos derivados de plantas, pré e pró-bióticos, bacteriocinas e bacteriófagos; e 3) estratégias de imunização por imunização passiva ou vacinação (MEUNIER et al., 2015).

São raros os estudos que avaliam a utilização de estratégias de controle combinadas. Mas há expectativa de que essa combinação seja vantajosa, uma vez que pode trazer um efeito cumulativo na redução de *Campylobacter* e aos diversos mecanismos envolvidos na sua eliminação (BAFFONI et al., 2012; ROMERO-BARRIOS et al., 2013).

### **3.5 Resistência antimicrobiana em *Campylobacter* spp.**

Vários fatores intrínsecos e extrínsecos estão relacionados com a capacidade de um agente etiológico causar doença no hospedeiro, assim como com a gravidade e dificuldade no tratamento. Dessa forma, a capacidade de causar doença pode ser relacionada às características que aumentam a susceptibilidade do hospedeiro à infecção por micro-organismos do gênero *Campylobacter*, como a idade, a ocorrência de doenças concomitantes e a competência do sistema

imunológico. Porém, as características intrínsecas do agente também possuem importante influência, que podem ser avaliadas pelo seu aparato genético. Entre os fatores que podem dificultar e complicar o tratamento está a resistência aos antimicrobianos.

Dados registrados em todo mundo mostram a resistência continuamente crescente a todos os antibióticos de primeira escolha e aqueles utilizados como último recurso em bactérias de importância humana e animal. As lacunas referentes ao conhecimento da prevalência e mecanismos de resistência aos antibióticos (MRA) dificultam a elaboração de estratégias para a resolução do problema. Aliado a isso, o uso indiscriminado por várias décadas criaram situações de emergência na saúde e enorme impacto sócio-econômico (CHAUDHARY, 2016).

Segundo Aarestrup (2005), uma grande variedade de antimicrobianos é utilizada na produção de animais. Eles podem ser administrados tanto no tratamento, quanto na prevenção de doenças, como promotores de crescimento, gerando aumentos na eficiência alimentar e ganhos reais de peso. Porém, a maioria desses fármacos é utilizada em doses subterapêuticas, o que favorece a seleção, multiplicação e persistência de cepas resistentes.

Quando expostos a antimicrobianos, *Campylobacter* spp. e outras bactérias podem diminuir sua sensibilidade a estes fármacos e se tornar potenciais reservatórios de genes de resistência, que podem ser transmitidos horizontalmente a outros micro-organismos. Por este motivo, a resistência antimicrobiana de bactérias comensais do trato gastrointestinal constitui um indicador da pressão seletiva exercida pelo uso destes fármacos. Além disso, antimicrobianos podem permanecer como resíduos em produtos de origem animal, o que permite uma seleção de bactérias resistentes após o consumo desses alimentos, ou podem ser despejados no ambiente, através de efluentes humanos ou animais (FÀBREGA et al., 2008).

A possível transferência de bactérias resistentes aos antimicrobianos dos animais para o homem é um tema de grande importância e que tem mobilizado esforços de controle por parte de várias instituições internacionais, incluindo WHO (World Health Organization), OIE (World Organization for Animal Health) e Codex Alimentarius. Nesse sentido, as duas principais preocupações são: a transferência do(s) micro-organismo(s) resistente(s) que pode(m), assim, causar uma infecção de difícil controle, e a transferência do(s) gene(s) de resistência do(s) micro-organismo(s) de origem animal para o(s) micro-organismo(s) de origem humana

(BRASIL, 2008; WHO, 2014). Como *Campylobacter* spp. é considerado um patógeno zoonótico, a resistência aos antimicrobianos entre isolados no reservatório animal tem graves implicações para o tratamento de campilobacteriose em seres humanos (MOORE et al., 2006).

Em 2007, em Roma, na Itália, foi realizada uma reunião pela FAO/WHO/OIE em que foram apresentadas duas listas elaboradas pela WHO e a OIE referentes, respectivamente, aos antibióticos de uso criticamente importante para a saúde humana e animal (WHO, 2007). Esta reunião buscou identificar os antimicrobianos e analisar o risco desse fato para a saúde humana. Segundo este estudo, três classes de antimicrobianos foram consideradas como prioritárias para o desenvolvimento de medidas e estratégias para manejo da resistência bacteriana, pois apareciam em ambas as listas, sendo eles: cefalosporinas de 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> gerações, as quinolonas (incluindo as fluorquinolonas) e os macrolídeos.

As taxas de resistência aos antibióticos em bactérias isoladas de humanos, especialmente às fluoroquinolonas, subiram acentuadamente nos últimos 20 anos, e estas elevadas taxas de resistência são hoje vistas em muitas regiões do mundo. Para o tratamento de quadros de campilobacteriose, as drogas de primeira escolha são aquelas pertencentes à classe das fluoroquinolonas. Quando a resistência a esta droga é comprovada, a azitromicina (macrolídeo) é geralmente a próxima escolha de tratamento, embora a resistência aos macrolídeos também já tenha sido relatada (CDC, 2013).

O desenvolvimento de resistência aos macrolídeos e fluorquinolonas é particularmente preocupante uma vez que o uso destes antimicrobianos é defendido como terapia de primeira e de segunda linha para o tratamento de infecções de *Campylobacter*. Sabendo que a campilobacteriose é transmitida pelo consumo de alimentos, o papel do uso indiscriminado desses antibióticos nas diferentes etapas da cadeia produtiva de frangos pode promover a disseminação de cepas resistentes. Vários relatórios em todo o mundo associam infecções por *Campylobacter* resistentes a fluorquinolonas com a aprovação do uso desse antimicrobiano na produção de aves (GUPTA et al., 2004; KINANA et al., 2006; SERICHANTALERGS et al., 2007). Para combater o surgimento de cepas resistentes a fluorquinolonas nos Estados Unidos, a *Food and Drug Administration* (FDA) retirou a aprovação para o uso de fluorquinolonas em aves desde 2005 (ZHAO et al., 2010).

Os padrões de uso de antimicrobianos e seleção de resistência em uma parte do mundo, também afetam a saúde em outras regiões, já que há carreamento dos agentes em viagens internacionais e pelo comércio, constituindo outro agravante para disseminação de perfis de resistência a estas drogas. Tem-se observado que as infecções resistentes às fluoroquinolonas estão frequentemente associadas com viagens para os países desenvolvidos ou em desenvolvimento (HAKANEN et al., 2003; KASSENBORG et al., 2004). A coleta mais detalhada de tais informações pode oferecer uma forma de monitorar os padrões de resistência em partes do mundo onde a vigilância local é limitada ou inexistente. É difícil realizar estudos de controle de casos sistemáticos entre viajantes, mas a comparação das cepas destas pessoas com as isoladas de carnes, aves ou outros produtos alimentares importados dos mesmos países podem ser úteis. Esta informação é de particular valor quando combinado com dados detalhados sobre o uso de antimicrobianos em humanos e animais. Dados de prevalência da resistência são o ponto de partida para avaliar o risco associado com a resistência antimicrobiana (WHO, 2014).

Nos EUA, em 2010, 1% de *C. jejuni* isoladas de humanos foram resistentes à eritromicina (macrolídeo), 43% a tetraciclina (tetraciclina) e 22% a ciprofloxacina (fluorquinolona) (CDC, 2012). Para *C. jejuni* isoladas de carne de frangos de corte, os valores comparáveis foram de 1% para eritromicina, 36% para a tetraciclina e 22% para a ciprofloxacina (FDA, 2011). Na União Europeia, também em 2010, 2% de *C. jejuni* isoladas de humanos foram resistentes à eritromicina, 21% à tetraciclina e 52% às fluoroquinolonas. Em carne de frangos, os números foram de 2%, 22% e 50%, respectivamente (EFSA, 2012). Considerando os dados de resistência nos EUA e UE, a resistência foi geralmente maior em *C. coli* do que em *C. jejuni* (CDC, 2012; EFSA, 2012). Estudo desenvolvido na UE no ano posterior, em 2011, mostrou percentuais um pouco maiores aos encontrados em 2010. Para *Campylobacter* isolada de humanos, os níveis de resistência foram mais altos para o ácido nalidíxico (47,8%) e ciprofloxacina (44,4%), seguido de ampicilina (35,3%) e as tetraciclinas (30,5%). Baixos níveis de resistência foram observados para o antimicrobiano clinicamente importante para o tratamento de campilobacteriose, a eritromicina (média 3,5%). A multi-resistência em isolados de humanos foi alta ou muito alta em alguns países da Europa (EFSA, 2013).

Também na Europa, a resistência extremamente alta à ciprofloxacina (fluoroquinolona) foi comumente observada em *C. coli* isoladas de frangos de corte e

carne de frango (76,6% e 77,7%, respectivamente), com níveis um pouco mais baixos em *C. jejuni* (57,2% e 59,2%, respectivamente). Altos valores também foram relatados para isolados de suínos e bovinos (35,5% para 38,8%). Foram observadas diferenças importantes entre as espécies de animais e os locais de isolamento. A resistência à eritromicina foi detectada em porcentagens baixas em isolados de *Campylobacter* de frangos de corte e carne de frango (1,6% e 9,8%), com exceção de *C. coli* em frangos de corte, em que foi detectada resistência moderada (15,5%). O mais alto nível de resistência à eritromicina foi observado em *C. coli* isolados de suínos (24,5%), enquanto em *C. jejuni* isolados de gado foi muito baixo (0,8%). A resistência ao ácido nalidíxico foi comum entre isolados de *Campylobacter* de carne e de animais (32,4% e 74,6%). A multi-resistência (resistência a pelo menos três classes de antimicrobianos de acordo com valores de corte epidemiológico) foi geralmente baixa em *C. jejuni* isolados de frangos e carne de frango, e a co-resistência aos antimicrobianos de importância clínica, ciprofloxacina e eritromicina, nos mesmos isolados, não foi detectada ou registrada em valores baixos. Níveis de multi-resistência e co-resistência foram geralmente maiores em *C. coli* isoladas de frangos de corte (EFSA, 2013).

Melo (2012), ao analisar *Campylobacter* sp. isolados de carcaça de frangos resfriadas e congeladas provenientes dos Estados de Minas Gerais, Distrito Federal e Goiás (Brasil), encontrou 43,6% de resistência à norfloxacina (fluoroquinolona), 36,2% à eritromicina (macrolídeo) e tetraciclina (34,0%). Determinou também que a resistência conjunta ao macrolídeo e à fluoroquinolona, foi uma característica partilhada por 19,1% (18/94) das cepas, sendo seis *C. jejuni*, seis *C. coli* e seis *Campylobacter* spp.

O surgimento de resistência antimicrobiana em *Campylobacter* spp. tem sido uma preocupação crescente na saúde pública mundial. O isolamento em humanos e animais, de cepas de *Campylobacter* resistentes aos antimicrobianos, aumenta a dificuldade de tratamento das infecções humanas. Alguns autores associam a resistência de *Campylobacter* aos antimicrobianos ao uso indevido destes na produção animal de aves para a terapia e prevenção de doenças (DECKERT et al., 2010; BARDON et al., 2011). Além disso, estudos também têm mostrado que os seres humanos infectados com *Campylobacter* spp. resistentes a antimicrobianos têm uma maior duração da diarreia quando comparadas com as cepas suscetíveis (HELMS et al., 2005; NELSON et al., 2007).

A resolução para o problema da resistência aos medicamentos requer o uso de agentes antibacterianos com novos mecanismos de ação. Entre 1930 e 1962, a indústria de antibióticos chegou a lançar vinte novas classes de drogas no mercado. Desde então, numerosos análogos têm sido disponibilizados e consequentemente, as drogas tornaram-se menos eficazes e as bactérias mais resistentes. De acordo com algumas estimativas, são necessárias 20 novas classes de fármacos para que os antibióticos funcionem eficazmente nos próximos 50 anos (COATES et al., 2011; FDA, 2016).

### **3.6 Tipagem molecular**

A plasticidade do genoma de *Campylobacter* e a capacidade de transferência horizontal de genes surgiram como fatores importantes que influenciam em sua epidemiologia (WILSON et al., 2009). A caracterização genotípica é, dessa forma, essencial na compreensão de eventos de recombinação entre e dentro de diferentes genomas desse micro-organismo para identificar as fontes e origens de casos esporádicos e surtos. Além disso, a avaliação de fatores de virulência são importantes designadores do potencial de virulência desse agente (O'REILLY et al., 2008).

Nos últimos anos, as técnicas genotípicas foram desenvolvidas para superar as desvantagens que oneram os métodos fenotípicos utilizados para caracterizar isolados de *Campylobacter*. Uma variedade de diferentes métodos de genotipagem foram desenvolvidos para identificar diferentes *loci* genéticos nas distintas espécies de *Campylobacter*. Dentre estes, pode-se destacar o *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) e o *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD) (WASSENAAR; NEWELL, 2000).

PFGE fornece o perfil genético de um organismo com base na digestão restritiva de todo o seu genoma. As células bacterianas são imobilizadas em agarose para evitar a ruptura do DNA. O DNA genômico purificado da bactéria é submetido à digestão por enzimas de restrição que clivam a porção variável do cromossomo (por exemplo, *Smal*, *SalI*, *KpnI*) (WASSENAAR; NEWELL, 2000). A fragmentação do DNA circular bacteriano resulta em porções lineares que são visualizados por eletroforese em gel de agarose. As variações em locais de restrição ou dentro dos fragmentos de restrição resultam em diferentes perfis genéticos. Em contraste à eletroforese

convencional, a orientação do impulso é alternada, o que permite a separação de fragmentos grandes oriundos da clivagem de todo o genoma (CHAMPION et al., 2005). O poder de resolução obtido devido à clivagem do genoma inteiro pelo PFGE é extremamente alto e é considerado "Padrão-Ouro" para a genotipagem de *Campylobacter* (FITZGERALD et al., 2001).

O PFGE permite investigar a variabilidade genômica de todo o material genético entre isolados de bactérias da mesma espécie. A presença de inserções, deleções ou mutações podem ser detectadas entre os genomas de isolados bacterianos, permitindo um elevado poder discriminatório em comparação com outras técnicas (GOERING, 2010).

No entanto, a clivagem de DNA extracromossômico pode causar alguma ambiguidade nos resultados (WASSENAAR; NEWELL, 2000). Às vezes, a atividade DNAase pode interferir na atuação das enzimas de restrição tornando a estirpe não-tipável (GIBSON et al., 1994). O tratamento da amostra com formaldeído é sugerido para evitar tais problemas.

O protocolo de PFGE é complexo e demorado, além disso, a variação nos protocolos referentes às enzimas de restrição utilizadas, e condições de processamento, torna a comparação de resultados mais difícil (WASSENAAR; NEWELL, 2000). Porém é a técnica mais recomendada na avaliação genotípica de *Campylobacter* (FITZGERALD et al., 2001).

O PFGE foi aplicado com sucesso para o rastreamento de *Campylobacter* no processo produtivo das aves e na detecção de clones de *C. jejuni* altamente virulentas provenientes de infecção humana nos Estados Unidos (MELERO et al., 2012; SAHIN et al., 2012; OYARZABAL et al., 2013).

Um estudo com 183 isolados de um único laboratório clínico na Nova Zelândia demonstrou que a maioria (75%) dos isolados de *Campylobacter* poderiam ter uma origem comum por apresentar padrões indistinguíveis (GILPIN et al., 2006). Por outro lado, há estudos com isolados clínicos que comprovam a existência de um grande número de perfis de PFGE com apenas uma pequena proporção de cepas associadas a pequenos *clusters* (HEDBERG et al., 2001; NADEAU et al.; 2002).

Em linhagens altamente clonais de *C. jejuni*, o PFGE pode não ser suficientemente discriminatório para investigações epidemiológicas. A instabilidade do genoma também afeta negativamente os perfis de PFGE. Além disso, parece que a integração com bacteriófagos, por exemplo, pode alterar os perfis de PFGE,

mesmo em estirpes estritamente relacionadas (CHAMPION et al. 2005; BARTON et al., 2007).

A técnica de RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) envolve a amplificação aleatória do DNA genômico utilizando iniciadores arbitrários. As bandas são observadas por eletroforese em gel e é considerado como método simples e de baixo custo para caracterização de micro-organismos. A principal vantagem oferecida pelo RAPD é que ele não necessita de ter qualquer genética prévia ou dados adicionais sobre a cepa (BOWDITCH et al., 1993). As análises dos dados são realizadas por programas específicos que avaliam o aparecimento de bandas fortes e fracas no gel (WASSENAAR; NEWELL, 2000). O poder discriminatório da análise de RAPD depende da escolha de mais de um *primer* e das condições de amplificação. Em teoria, o método tem uma elevada repetitibilidade e é vantajoso na medida em que é rápido e apresenta baixos custos (HERNANDEZ et al., 1995). Variações entre termocicladores, protocolos e concentrações de reagentes podem influenciar na qualidade dos resultados (PENNER et al., 1993).

Uma infinidade de métodos foram projetados e testados, a fim de caracterizar *Campylobacter* e eles têm se revelado indispensáveis no fornecimento de uma melhor compreensão destes patógenos (PITTENGER et al., 2009).

Testes comparativos entre as técnicas demonstram ser adequados nessa análise. Portanto, a escolha do método para a investigação depende do poder discriminatório encontrado, da finalidade do estudo e da disponibilidade de recursos. Metodologias rápidas, como RAPD, são essenciais nas investigações de surtos em que o tempo é o fator determinante. No entanto, em estudos nacionais de grande porte, o uso de métodos mais eficazes, como PFGE, que fornecem dados mais seguros seria o mais apropriado (FOLEY et al., 2009). Dessa forma, a combinação de métodos é considerada como sendo mais informativa para a análise genotípica de patógenos como *Campylobacter*.

As metodologias de tipagem molecular têm sido fundamentais para melhorar as investigações epidemiológicas destinadas a rastrear fontes de infecções esporádicas com *Campylobacter* spp., fornecendo informações sobre os subtipos genéticos em circulação. Os produtos oriundos da indústria avícola são frequentemente contaminados com *Campylobacter* spp. e os dados de tipagem molecular podem associar a bactéria presente no alimento àquela isolada de infecções humanas (MÜLLNER et al., 2010; BATZ et al., 2012).

### 3.7 Determinantes de patogenicidade

Mesmo com a conclusão do primeiro projeto genoma de *C. jejuni* (PARKHILL et al., 2000), os mecanismos envolvidos na patogênese desse agente ainda estão sendo desvendados. Os fatores que contribuem para uma colonização bem sucedida em aves, para o estabelecimento da virulência em seres humanos e para a persistência no meio ambiente estão em constante pesquisa no meio acadêmico. Apesar da elevada disponibilidade de informações genômicas de diferentes cepas de *C. jejuni* e de ferramentas genéticas, a compreensão completa não está totalmente esclarecida (CHANDRASHEKHAR et al., 2015) e depende de mais estudos.

Para *C. jejuni* desenvolver uma infecção suficiente para causar a doença, é necessário sobreviver aos estresses fisiológicos associados com os ambientes externos e internos, tais como, as variações de temperatura e de pH nos diferentes hospedeiros, além do estresse oxidativo e do limitado fornecimento de nutrientes (DU et al., 2016).

Os fatores de virulência mais importantes que designam esse agente como patógeno humano incluem a motilidade, a quimiotaxia, a aquisição de ferro, adesão, invasão, *quorum sensing*, defesa ao estresse térmico, a resposta ao estresse térmico, a capacidade em formar biofimes e de evitar o sistema imunitário do hospedeiro. Outros possíveis fatores de virulência incluem a produção da toxina CDT (toxina citoletal distensiva) e uma virulência plasmidial, associada à expressão do gene *pVir*, encontrado em algumas cepas de *C. jejuni* (FERNANDES et al., 2010.)

Apesar disso, não existem dados suficientes que comprovem a correlação entre a presença de determinantes de virulência em *C. jejuni* e a extensa variação na manifestação clínica da doença em humanos. Provavelmente, essa dificuldade de associação está relacionada ao fato de que além dos fatores patogênicos do micro-organismo, as características do hospedeiro também devem ser consideradas na avaliação da evolução da doença (HAVELAAR et al., 2013).

Após a entrada no hospedeiro humano através do trato gastrintestinal (GI), as bactérias devem primeiramente sobreviver ao ambiente estomacal ácido para alcançar e colonizar o trato intestinal inferior. No interior do trato GI a primeira linha de defesa é representada pela camada de muco, no qual a bactéria expressa a

característica de motilidade para permitir sua penetração e interação com as células epiteliais. As bactérias podem então invadir as células epiteliais através da polimerização dos microtúbulos e microfilamentos. Após a internalização, a bactéria se mantém dentro de vesículas, local onde expressa as atividades envolvidas na patogênese da doença. Dois mecanismos utilizados por *Campylobacter* durante o curso da infecção foram propostos: o primeiro refere-se à adesão das bactérias ao intestino seguida da produção de toxinas que alteram a capacidade de absorção intestinal, gerando episódios de diarréia. O outro mecanismo envolve a invasão, proliferação e colonização das bactérias dentro da mucosa intestinal, o que levaria a respostas inflamatórias e eventualmente à ocorrência de diarréia com sangue (YOUNG et al., 2007; JANSSEN et al., 2008; DASTI et al., 2010).

### **3.7.1 Motilidade**

O flagelo polar foi a primeira estrutura externa bem caracterizada em *C. jejuni* e representa um dos mais importantes fatores de virulência envolvidos em sua patogênese. Além de permitir a rápida mobilidade, atua como adesinas que ajudam na adesão e invasão. Quando intactos e funcionais são essenciais para alcançar a motilidade ótima e permitir a colonização, que é essencial no desenvolvimento da doença (ALMOFTI et al., 2011).

Acredita-se que tanto a presença de flagelos quanto a forma de saca-rolhas de *Campylobacter* contribuem para a sua capacidade de permanecer em ambientes viscosos, como no muco intestinal, habilidade esta não encontrada nas demais bactérias flageladas (MILLS et al., 2012).

*C. jejuni* possui um único flagelo polar em uma ou ambas as extremidades da célula, que consiste de três principais componentes: o corpo basal, gancho e filamento. O filamento apresenta função de secreção de duas proteínas flagelinas, uma maior codificada por *flaA* e uma menor codificada por *flaB*. A expressão de ambos os genes garante o máximo potencial de virulência. A ausência de *flaA* indica baixa mobilidade e um flagelo reduzido em tamanho, já a mutação em *flaB* está relacionada à presença de flagelo em comprimento quase normal e com motilidade pouco inferior. A ausência de um desses genes ou ambos indica redução no potencial patogênico (ALMOFTI et al., 2011).

*C. jejuni* também mostram a capacidade de mover-se de forma reversível e

espontânea. Esta capacidade de modular a expressão flagelar é compreensível no que diz respeito ao custo energético da expressão desta característica e a necessidade de adaptação às alterações ambientais encontradas durante a infecção em um hospedeiro e a exposição ao ambiente externo (BLACKWELL, 2010).

Além da motilidade, o flagelo também desempenha funções importantes na quimiotaxia, na colonização, na auto-aglutinação, na formação de biofilmes e na evasão da resposta imune inata (MALIK-KALE, 2008; MILLS et al., 2012).

A capacidade móvel de *Campylobacter* é de extrema importância nas etapas iniciais de estabelecimento do micro-organismo no trato GI do hospedeiro. A barreira física proporcionada pela presença do muco altamente viscoso é superada pela motilidade e a entrada nas células epiteliais do hospedeiro, em seguida, representa uma estratégia para as bactérias evadirem do sistema imunitário do hospedeiro e aceder a um nicho onde não há competição com a microbiota residente (WISESSOMBAT et al., 2010).

Os flagelos de *C. jejuni* apresentam importância no mecanismo de auto-aglutinação, que é um dos primeiros passos que levam à formação de biofilmes, forma de vida importante na sua manutenção no ambiente. Além disso, as estirpes que se auto-aglutinam rapidamente associam-se em maior número a células eucarióticas, acelerando o estabelecimento da doença (GUERRY, 2007).

*C. jejuni* pode translocar através da barreira celular epitelial por meio de um mecanismo alternativo, e pode migrar da mucosa intestinal para uma variedade de sítios extra-intestinais, resultando em complicações como meningite, endocardite e bacteremia. Este mecanismo de translocação envolve as bactérias que se deslocam entre as células hospedeiras em vez de serem internalizadas por elas. Além das funções já descritas, a motilidade também contribui para a capacidade de translocação de diferentes estirpes, uma vez que a ausência de *flaA* impossibilita a translocação em *C. jejuni* (LOUWEN et al., 2012).

### 3.7.2 Quimiotaxia

Os mecanismos de quimiotaxia fazem com que o micro-organismo se movimente na direção ou no sentido oposto a um estímulo químico. Assim, a resposta quimiotática de *C. jejuni* é importante para direcionar o patógeno a locais específicos no trato intestinal que sejam favoráveis para o desenvolvimento e

multiplicação, bem como as afastam dos ambientes desfavoráveis (KONKEL et al., 2001).

A quimiotaxia bacteriana é um sistema complexo de transdução de sinal pelo qual as bactérias são capazes de reconhecer os estímulos ambientais e responder a eles com rotação flagelar (MARCHANT et al., 2002). Deste modo, quando o receptor detecta aumento na concentração de estímulos atrativos no ambiente, a bactéria permanece em movimento livre, caso contrário, sendo detectada redução na concentração do estímulo, a bactéria muda de direção para se locomover até um ambiente favorável (ZAUTNER et al., 2012).

A expressão deste mecanismo de patogenicidade é potencializada em temperatura de 37°C, temperatura fisiológica dos seres humanos (KHANNA et al., 2006).

Além da temperatura ótima encontrada no hospedeiro humano, *C. jejuni* utiliza um componente da mucina presente no muco intestinal, a L-fucose, como fonte de energia e para multiplicação. Este substrato metabólico facilita a adaptação em ambientes com baixos níveis nutricionais, o que proporciona a este micro-organismo, maior vantagem competitiva (MURAOKA; ZHANG, 2011). Estudo realizado por Alemka et al. (2012) mostrou que L-fucose, presente no hospedeiro humano, modula a patogenicidade de *C. jejuni* de uma maneira específica, o que pode explicar o fato de ser patogênica em humanos e comensal em frangos.

A quimiotaxia é necessária para o reconhecimento de locais ideais para invasão dos tecidos do hospedeiro e, através da motilidade, o agente é capaz de mover a favor do gradiente químico que apresenta condições ótimas para colonização. A sequência do genoma de *C. jejuni* revelou a presença de vários genes envolvidos na quimiotaxia, como *che* e *aer* (ZAUTNER et al., 2012).

Ainda há muito a ser compreendido em termos de como todos os elementos quimiotáticos se combinam para o controle da motilidade e do comportamento de *C. jejuni*. No entanto, sabe-se que a motilidade quimiotática é essencial para a sobrevivência do micro-organismo no hospedeiro e é um pré-requisito para causar doença em humanos (ALEMKA et al., 2012).

### 3.7.3 Adesão

Após a penetração através da camada de muco, *C. jejuni* pode interagir diretamente com a camada de células epiteliais. A adesão às células epiteliais do trato gastrintestinal do hospedeiro é um importante fator de colonização de *C. jejuni* e representa o primeiro passo no processo inicial de infecção (ALEMKA et al., 2012).

O contato feito por *C. jejuni* com o epitélio do hospedeiro provoca danos nas células epiteliais do intestino e desregulação na função de absorção. Esta ligação é realizada pelas adesinas localizadas nos flagelos e em outros componentes da superfície celular, como, nos lipopolissacarídeos (LPS) (ALEMKA et al., 2012).

As adesinas permitem a ligação do micro-organismo aos receptores da célula hospedeira de humanos, de macacos e de suínos, fato não observado em células de intestino de aves e de camundongos, embora as bactérias estivessem presentes no muco num número elevado (CHIAPPARRONE et al., 2011; BACKERT; HOFREUTER, 2013). Esses achados também explicam o fato de *C. jejuni* ser patogênica em humanos e comensal em frangos.

Algumas adesinas encontradas em estirpes de *C. jejuni* incluem CadF (*Campylobacter adhesion to fibronectin*), CapA (*Campylobacter adhesion protein*), JlpA (*jejuni lipoprotein A*) e PEB1 (*Protein Pei*) (FLANAGAN et al., 2009).

A adesina CadF é uma das mais importantes nesse mecanismo e é requerida por *C. jejuni* para expressar a máxima aderência e invasão às células do epitélio intestinal do hospedeiro. Esta adesina é uma proteína de membrana externa de 37kDa encontrada principalmente em *C. jejuni* que se liga a receptores específicos da superfície basolateral da célula hospedeira maximizando a invasão. Ela se liga à fibronectina (Fn), que é uma glicoproteína presente em regiões de junção de células do epitélio gastrintestinal. Essa ligação promove a interação entre o patógeno e a célula do hospedeiro, permite a translocação da bactéria mantendo a barreira epitelial intacta e facilita a colonização do micro-organismo (FLANAGAN et al., 2009).

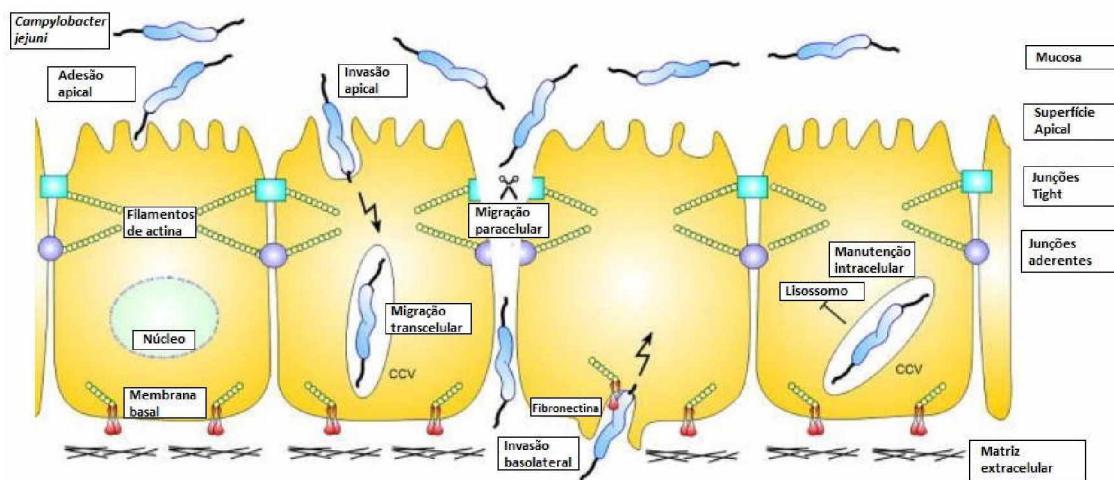
### 3.7.4 Invasão

A análise do genoma de *C. jejuni* revelou a ausência de genes de invasão típicos observados nos principais patógenos intestinais, sugerindo que o mecanismo

utilizado por este micro-organismo para invadir as células apresenta características próprias (RUBINCHIK et al., 2012).

Os enteropatógenos utilizam vários mecanismos para migrar através das células intestinais. Entretanto, o conhecimento sobre o processo de invasão de *C. jejuni* ainda é limitado. Existem duas rotas já descritas para *Campylobacter*: a translocação e a internalização (Figura 3). No primeiro caso, as bactérias atravessam pela via paracelular das células hospedeiras, removendo as junções entre as células. A internalização no epitélio intestinal permite que a bactéria alcance diferentes partes do corpo humano (fígado, baço, linfonodos mesentéricos e vasos). Nesse processo, o patógeno usa suas proteínas de superfície (adesinas, invasinas) para se ligar aos receptores da célula hospedeira, causando um rearranjo do citoesqueleto para a ocorrência da endocitose e manutenção do micro-organismo no interior de vacúolos citoplasmáticos (BACKERT; HOFREUTER, 2013; BOUWMAN et al., 2013).

**Figura 3:** Mecanismos de invasão de *Campylobacter*. Adaptado de Backert; Hofreuter (2013).



Após a internalização nas células epiteliais intestinais, *C. jejuni* se mantém no interior de vesículas (CCV) para evadir da resposta imune do hospedeiro durante um período de tempo considerável e, portanto, é capaz de causar uma infecção persistente (BUELOW et al., 2011).

Após a colonização da célula do hospedeiro, *C. jejuni* secreta a proteína CiaB

(*Campylobacter invasion antigens B*), dependente de estímulos como a presença de sais biliares, de componentes da célula hospedeira e de componentes do patógeno presentes nos flagelos (GUERRY, 2007).

O gene *ciaB* codifica a proteína CiaB de 73-kD que está associada ao mecanismo de exportação da flagelina. Essa proteína está ligada à destruição de microtúbulos da célula hospedeira de maneira a permitir a entrada e a mobilidade da bactéria no ambiente intracelular. O mecanismo de invasão produzido por CiaB induz a desestruturação de microtúbulos motores e microfilamentos celulares, além da fosforilação de proteínas citoplasmáticas, que são sinalizadoras de reações em cascata, promovendo distúrbios celulares de forma a potencializar a motilidade intracitoplasmática sem restrições (RIVERA-AMILL et al., 2001).

Outro gene de grande importância no processo invasivo por *Campylobacter* é o *pldA*. Este gene codifica uma proteína envolvida na síntese de fosfolipases da membrana externa (ZIPRIN et al., 2001). As fosfolipases constituem um subgrupo de enzimas lipolíticas que têm a capacidade de hidrolisar uma ou mais ligações éster em fosfolípideos promovendo ruptura da membrana celular em eucariotos. A proteína oriunda do gene *pldA* está localizada na membrana externa da bactéria e possui propriedade hemolítica, podendo ser responsável por danos nos tecidos durante a infecção por *C. jejuni*. A ausência na expressão desse gene promove uma redução significativa na atividade hemolítica e na capacidade de colonização intestinal (MATOBA et al., 2002).

A invasão, que ocorre por endocitose, se inicia com a sinalização na superfície da célula hospedeira e o sinal é reconhecido pelos receptores, presentes na membrana celular, que estão associados às proteínas citoplasmáticas. Estas proteínas formam uma depressão na membrana externa, quando os receptores estão ligados aos micro-organismos. Essa depressão aumenta e transforma-se em vesículas citoplasmáticas (LEVIN, 2007).

As células epiteliais infectadas apresentam inchaço, perda de microvilosidades e apoptose prematura, devido ao efeito citotóxico de *C. jejuni* (MELO et al., 2013). Posteriormente, a vesícula formada migra até a lâmina própria e então *C. jejuni* é liberada juntamente com o conteúdo da célula epitelial, desencadeando um processo inflamatório (LEVIN, 2007).

A eficiência da invasão de *C. jejuni* é cepa-dependente. Fatores de origem bacteriana são conhecidos por desempenhar um importante papel na invasão celular

e incluem a motilidade (aparelho flagelar) e a adesão (MALIK-KALE, 2008). Além disso, está associada ao tipo de célula hospedeira, já que parecem ser internalizadas de forma mais eficiente em linhagens de origem humana (HU; KOPECKO, 2000).

Alguns fatores relacionados ao hospedeiro também estão envolvidos no processo de invasão. Dentre eles, destaca-se o citoesqueleto, que compreende os microtúbulos (MT) e os microfilamentos (MF), que estão diretamente envolvidos na internalização de *Campylobacter* (FONSECA, 2011). A alteração no citoesqueleto por *C. jejuni* é mediada pelas proteínas Cdc42 e Rac1, que agem como interruptores moleculares e alteram os sinais de transdução do hospedeiro, provocando polimerização e rearranjo dos MT e MF, permitindo a internalização (KRAUSE-GRUSZCZYNASKA et al., 2007).

Apesar dos vários estudos relacionados aos processos de invasão, os mecanismos moleculares exatos envolvidos nessa etapa da infecção por *C. jejuni* ainda não são completamente compreendidos (RUBINCHIK et al., 2012).

### **3.7.5 Toxinas**

Embora a invasão de *Campylobacter* spp. seja suficiente para causar doença, a produção de toxinas também contribui no desenvolvimento de campilobacteriose (GE et al., 2008). Os efeitos citopáticos que são observados nas enterites são decorrentes não só do processo de invasão, mas também das enterotoxinas e/ou citotoxinas (ZILBAUER et al., 2008).

Citotoxinas são definidas como proteínas que provocam a morte das células alvo. Elas atuam por meio da inibição de processos celulares essenciais, por exemplo, na síntese de proteínas, na formação de filamentos de actina e na formação de poros na membrana das células alvo, resultando na morte da célula por lise (DASTI et al., 2010).

A toxina citoletal distensiva (CDT), é a mais importante delas e é codificada por três genes, *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*, sendo que os três devem ser expressos para a plena ação citotóxica. As proteínas dos genes *cdtA* e o *cdtC* funcionam no transporte da proteína CdtB, que é interiorizada pela célula hospedeira. Dentro da célula, a proteína CdtB, potencializa o bloqueio do ciclo celular, por exibir uma atividade semelhante à DNase, resultando em cortes na fita dupla do DNA. As células do

hospedeiro respondem aos cortes no DNA, bloqueando a fase G2 da divisão mitótica, induzindo uma distensão citoplasmática que leva à morte celular por apoptose em cerca de três a quatro dias após infecção (DASTI et al., 2010; MELO et al., 2013).

A atividade da CDT pode diferir ligeiramente, dependendo da linhagem celular afetada. O mecanismo patogênico de CDT está relacionado à inibição da imunidade humoral e celular, via apoptose de células do sistema imune, e pode gerar necrose do epitélio celular e fibroblastos envolvidos na reparação das lesões produzidas pelo patógeno, resultando em lenta cicatrização e indução dos sintomas da doença. Portanto, interfere na divisão e diferenciação das células das criptas intestinais, contribuindo para o desenvolvimento da diarreia (SMITH; BAYLES, 2006).

Existe uma provável relação entre a ação da toxina com os sintomas da diarreia aquosa e com a diminuição na função de absorção normal. Porém, o papel da CDT na patogênese de *Campylobacter* ainda não está totalmente esclarecido (DASTI et al., 2010).

### **3.8 Mecanismos de adaptação**

*Campylobacter jejuni* é capaz de colonizar inúmeros hospedeiros diferentes e competir contra a microbiota intestinal. Para isso, esse agente deve ser capaz de adquirir de forma eficiente uma quantidade suficiente de nutrientes e possuir estratégias adaptativas para auxiliar na sua sobrevivência e crescimento (STAHL et al., 2012).

Para ser bem sucedida, *C. jejuni* deve possuir a capacidade de sobreviver em uma ampla variedade de hospedeiros, aves e humanos, e ambientes, água ou alimentos. Isto requer um certo grau de flexibilidade adaptativa, que para essa espécie é indicada como impressionante tendo em conta o número relativamente pequeno de vias metabólicas identificadas em seu genoma (STAHL et al., 2012).

#### **3.8.1 Aquisição de ferro**

O ferro é um nutriente essencial para a sobrevivência e crescimento bacteriano, uma vez que desempenha um papel importante na catálise de muitas reações bioquímicas que são necessárias para quase todos os organismos vivos. É

um co-fator importante na síntese de DNA e nas reações que requerem transferência de elétrons. No entanto, a sua aquisição a partir do ambiente representa um problema, já que o ferro livre é quase inexistente. A disponibilidade limitante do ferro é devido à sua baixa solubilidade em água e também pela concorrência com o organismo hospedeiro e com os demais micro-organismos presentes na microbiota intestinal (RAYMOND et al., 2015).

Como resultado, as bactérias tiveram que desenvolver maneiras de adquirir ferro de seu ambiente de forma eficiente e controlada, já que o excesso de ferro também pode ser prejudicial. Na presença de oxigênio, o ferro pode causar a geração de radicais livres de oxigênio, que leva a danos ao DNA, proteínas e membranas. Por esta razão, os sistemas de armazenamento de ferro e as estratégias para combater os efeitos do estresse oxidativo também são importantes para a sobrevivência de bactérias *in vivo*. Portanto, após o processo de colonização intestinal, é essencial que *C. jejuni* seja capaz de competir de forma efetiva com a flora normal pela aquisição de ferro, para manter quantidades suficientes desse elemento a partir do hospedeiro para seu crescimento e evitar a acumulação por ser potencialmente tóxico (LOGGE, 2007).

Vários sistemas de captação de ferro foram descritos para *C. jejuni*: sideróforos (enterobactina, ferricromo e ácido rodotorúlico), absorção a partir de fontes de ferro (grupo heme, proteína transferrina), sistemas de transdução e absorção de ferro ferroso. Os sideróforos representam um dos mecanismos de absorção de Fe (III) mais eficientes, compostos por quelantes de Fe (III) de alta afinidade. Muitas bactérias entéricas, inclusive *Campylobacter*, evoluíram um sistema de furtar sideróforos (enterobactina) de outras espécies, para adquirir maior vantagem competitiva. Em *C. jejuni*, esse sistema apresenta também uma adaptação ligada à capacidade de utilização dos produtos decorrentes da hidrólise da enterobactina como mediadores do transporte de Fe (III) para o citoplasma, que é uma estratégia exclusiva que pode permitir ao patógeno explorar de forma mais eficiente os sideróforos adquiridos de outras bactérias (RAINES et al., 2016).

O gene *p19* codifica uma proteína periplasmática (permease) com tamanho de 19kDa, ferro-dependente, cuja função é o transporte de ferro. A regulação desta proteína indica uma maneira de controlar o nível desse elemento intracelularmente durante o estresse, e sua ausência está associada à incapacidade de utilizar o ferro como ácido rodotolúrico impedindo o crescimento bacteriano (BIRK, 2012).

A exigência de sistemas de captação de ferro, como o conferido pelo sequestro de sideróforos e pela proteína P19, para o sucesso na colonização do hospedeiro realça a necessidade de estudos mais detalhados para a compreensão em nível molecular das adaptações de *C. jejuni* (NAIKARE et al., 2013).

### **3.8.2 Tolerância a baixas temperaturas**

O processo de congelamento induz ao estresse em células bacterianas devido à desidratação intracelular. Está comprovado que parte dos danos causados pelo resfriamento resultam da liberação de radicais superóxido. Diante disso, a expressão de proteínas SOD (superóxido desmutase), presentes em situações de estresse, auxilia na sobrevivência de *C. jejuni* sob condições de congelamento (STEAD; PARK, 2000).

A produção de enzimas SOD demonstraram ser importantes fatores de sobrevivência para *Campylobacter*. Três tipos de enzimas SODs foram descritas: os cofatores que contêm ferro (*sodB* ou FeSOD), manganês (*sodA* ou MnSOD), e cobre e zinco (*sodC* ou CuZnSOD). Estas enzimas catalisam a quebra das moléculas de superóxido em peróxido de hidrogênio e de dioxiênio e constituem, assim, um dos principais mecanismos de defesa da célula contra o estresse oxidativo. O aumento na expressão de SOD, mediante estresse causado por baixas temperaturas, está relacionado à proteção de componentes celulares, incluindo várias enzimas citoplasmáticas, DNA, e os fatores de membrana (STINTZI; WHITWORTH, 2003).

A tolerância a baixas temperaturas em espécies de *Campylobacter* é cepa-dependente. Além disso, a manutenção desses micro-organismos sob essas condições extremas favorece a formação de células viáveis não cultiváveis (VNC), que reduzem o processo de transcrição de características de virulência (MOURA, 2013). Porém, o retorno ao estado cultivável pode ser reestabelecido através da passagem por um hospedeiro (SAMPERS et al., 2009).

Huang et al. (2012) e Kocic et al. (2012) constataram que o congelamento inibe o crescimento de *Campylobacter*, reduz seus números, mas não os elimina completamente de alimentos congelados, como a carne de frango. A capacidade de sobrevivência de *Campylobacter* spp. em condições extremas durante as diferentes etapas do processo produtivo de frangos pode estar associado à habilidade de fixação nas fendas profundas da pele da ave. Esses recessos oferecem condições

ideais para a bactéria aderir e suportar as variações de condições no processamento. Além de persistir nos folículos das penas, *C. jejuni* é capaz de penetrar na pele, pelo seu formato em espiral, e se manter protegida.

A constituição da superfície da carne de frango também auxilia na sobrevivência de *C. jejuni* a 5°C, em comparação com meios de cultura em laboratório. Isso, provavelmente, é explicado pelos compostos presentes na carne de frango que influenciam, de alguma forma, na adaptação do micro-organismo a baixas temperaturas, assim como a transcrição de genes associados à sobrevivência prolongada de *C. jejuni* (LIGOWSKA et al., 2011).

Outros mecanismos de tolerância e adaptação às baixas temperaturas por *Campylobacter* incluem a aquisição ou a biossíntese de moléculas crioprotetoras, levando a alterações da composição lipídica da membrana, de forma a mantê-la viável nessas condições (STINTZI; WHITWORTH, 2003).

### **3.8.3 Tolerância a temperaturas elevadas**

*C. jejuni* é exposta a múltiplas tensões durante seu ciclo de vida na cadeia de produção avícola e ainda é capaz de sobreviver no produto final. Esse potencial de adaptação permite ao patógeno suportar diferentes condições de estresse, incluindo a tolerância às altas temperaturas. Trata-se de fenômenos conhecidos como resposta adaptativa específica, resposta adaptativa múltipla ou proteção cruzada (XU et al., 2008; ISOHANNI et al., 2013).

Apesar das altas temperaturas encontradas durante o abate de aves, *C. jejuni* apresenta mecanismos de suporte ao estresse térmico. E estes são expressos de forma mais eficaz quando a bactéria é submetida à escassez de nutrientes e ao estresse causado pela redução do pH (REID et al., 2008; KLANČNIK et al., 2009).

A termorregulação desempenha um papel importante na expressão de genes de virulência em bactérias patogênicas, incluindo *C. jejuni*. Os micro-organismos respondem ao estresse térmico, induzindo à síntese de um grupo de proteínas altamente conservadas, cuja taxa de síntese varia com a temperatura, aumentando sua expressão rapidamente após uma elevação repentina ou em resposta a outras agressões ambientais. Já durante o estresse submetido pelo choque frio, os genes de tradução de proteínas de choque térmico reprimem sua expressão (BEALES, 2004). Além de desempenhar papéis importantes na termotolerância e lidar com

outros estresses fisiológicos, a transcrição de genes, como *dnaJ*, é essencial para o funcionamento normal das células (REID et al., 2008).

A expressão do gene *dnaJ* indica que a cepa codifica uma proteína do choque térmico, que permite à bactéria o crescimento em temperaturas superiores a 40°C, à termotolerância e um melhor desempenho na colonização do trato intestinal (KONKEL et al., 1998). As proteínas oriundas do gene *dnaJ* apresentam uma importante função na superação de variações bruscas de temperatura, de forma que o micro-organismo se torne capaz de sobreviver e adaptar-se à nova temperatura (STINTZI, 2003).

Além disso, os processos adaptativos que envolvem tolerância ao choque térmico também auxiliam na proteção de proteínas periplasmáticas que atuam no transporte de nutrientes, na glicosilação de proteínas, e no processo de respiração celular (MILLER et al., 2009). Essas proteínas estão constantemente expostas às variações térmicas e com isso podem sofrer deformações que impedem a execução de processos vitais para *C. jejuni*. Assim, a expressão de genes como *dnaJ*, *dnaK* e *htrA* é importante para degradar proteínas deformadas ou danificadas, promover a conformação correta da proteína e protegê-la de alterações que levam à desnaturação (BÆK et al., 2011).

### **3.8.4 Mecanismo de *quorum-sensing***

Vários mecanismos bacterianos de comunicação intercelular foram identificados em uma ampla gama de espécies. Estes sistemas são denominados coletivamente *quorum-sensing* (QS) e desempenham papéis importantes numa variedade de processos fisiológicos, incluindo a motilidade, a formação de biofilme, a expressão de genes de virulência e a colonização na célula hospedeira (PLUMMER, 2012).

QS refere-se ao fenômeno da comunicação célula-célula dependente de densidade entre as bactérias. Esse mecanismo é dependente da liberação de moléculas sinalizadoras chamadas auto-indutores (Als). Quando a concentração de Als atinge um determinado limiar, os micro-organismos são capazes de coordenar o seu comportamento pela regulação da expressão gênica e, assim, controlar o fenótipo bacteriano e iniciar uma resposta a nível de população (BANDARA et al., 2012).

Uma variedade de sistemas de QS foram detectados tanto em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. A primeira evidência de comunicação bacteriana veio da análise da concentração de AI-5 em *Vibrio fischeri*. Este trabalho proporcionou a base para o modelo de quorum-sensing em bactérias Gram-negativas (ENGEBRECHT; SILVERMAN, 1984).

Esse sistema é associado com uma variedade de respostas sociais interativas pelas bactérias, incluindo virulência, resistência antimicrobiana, manutenção do biofilme e sua maturação, motilidade, simbiose, agregação, transferência de plasmídeos, produção de toxinas e estabelecimento de uma infecção (BANDARA et al., 2012). Este último está associado a mecanismos de bloqueio da ativação da resposta imune do hospedeiro na presença do patógeno, até que se tenha um número de bactérias suficientes para estabelecer a infecção (JAYARAMAN; WOOD, 2008).

Em *Campylobacter*, há produção de AI-1 (autoindutor acil-hemoserina) que acumula-se no meio extracelular e difunde-se livremente no citoplasma bacteriano. Quando os níveis de AI-1 intracelulares atingem uma concentração limite-crítico, este liga-se a um ativador de transcrição celular (*luxS*) que codifica a luciferase (BASSLER, 1999), que caracteriza uma enzima metabólica chave na via de reciclagem de SAM (S-adenosilmetionina). Esse metabólito é essencial no desempenho de importantes reações biossintéticas, como na metilação do DNA bacteriano, na síntese de poliaminas e de vitaminas bacterianas (PARVEEN; CORNELL, 2011).

A atuação mais importante do gene *luxS* está associada à síntese de um novo AI denominado autoindutor-2 (AI-2) (RAJAN et al., 2005). O aumento do crescimento da população bacteriana também promove elevação nas concentrações de AI-2 no ambiente. Essas moléculas apresentam potencial de reconhecimento e inclusão de populações mistas no biofilme (XAVIER; BASSLER, 2005). Evidências mostram que AI-2 pode também emitir sinais de uma espécie para gerar resposta em outra espécie bacteriana (HOLMES et al., 2009).

Além da dupla função de LuxS, tanto como uma enzima metabólica, quanto uma proteína sintase para o precursor de AI-2, foram observadas alterações na capacidade de formação de biofilmes, nas taxas de crescimento, na produção de substâncias antimicrobianas, na mobilidade, na secreção de toxinas, na quimiotaxia

e na colonização em cepas que não produzem essa proteína (QUINONES et al., 2009).

A maioria das espécies de *Campylobacter* possui enzimas LuxS funcionais e são capazes de produzir AI-2 (PLUMMER, 2012). Porém é necessária a presença de nutrientes para a produção de AI-2, e estes são encontrados em fontes de alimentos, como leite e exsudato da carne de frangos (“*chicken juice*”), mesmo que em condições adversas, como no estresse oxidativo e em baixas temperaturas (LIGOWSKA et al., 2011; TAZUMI et al., 2011; PLUMMER, 2012; ADLER et al., 2015).

### **3.9 Forma de vida séssil**

A indústria destinada à produção de alimentos tem hoje um grande desafio para manter a inocuidade do produto que será comercializado. Dentre estes desafios, destacam-se as falhas que podem ocorrer durante os processos de higienização, que podem favorecer a permanência de micro-organismos formadores de biofilmes, como *Campylobacter* (BRONOWSKI et al., 2014).

Os biofilmes compreendem um processo de adesão entre células bacterianas a uma superfície viva ou inerte. Estas células se unem formando comunidades bacterianas, as quais são envolvidas por uma matriz polimérica composta por polissacarídeos, proteínas e ácidos nucléicos. Esta matriz extracelular promove a proteção do biofilme, de modo a dificultar o acesso de agentes biocidas, além de concentrar nutrientes e prevenir a sua desidratação (DROZD, 2012).

Normalmente os biofilmes são constituídos por micro-organismos em culturas mistas sob condições simbióticas, os quais são considerados mais resistentes aos agentes químicos utilizados comumente para limpeza e sanitização, assim como, às demais condições adversas como refrigeração, acidez, salinidade e antibióticos (HOIBY et al., 2010; GIAOURIS et al., 2012).

Uma vez presente na indústria, a bactéria pode formar biofilmes no alimento produzido, em áreas de processamento, como paredes, pisos, tubos e drenos, e em superfícies de contato, como aço inoxidável, alumínio, nylon, teflon, borracha, plástico, poliestireno e vidro (STEEACKERS et al., 2012; VIVIAN, 2014).

A indústria de abate de frango de corte gera resíduos ricos em proteína e lipídeos, os quais se depositam nas superfícies (WATNICK; KOLTER, 2000),

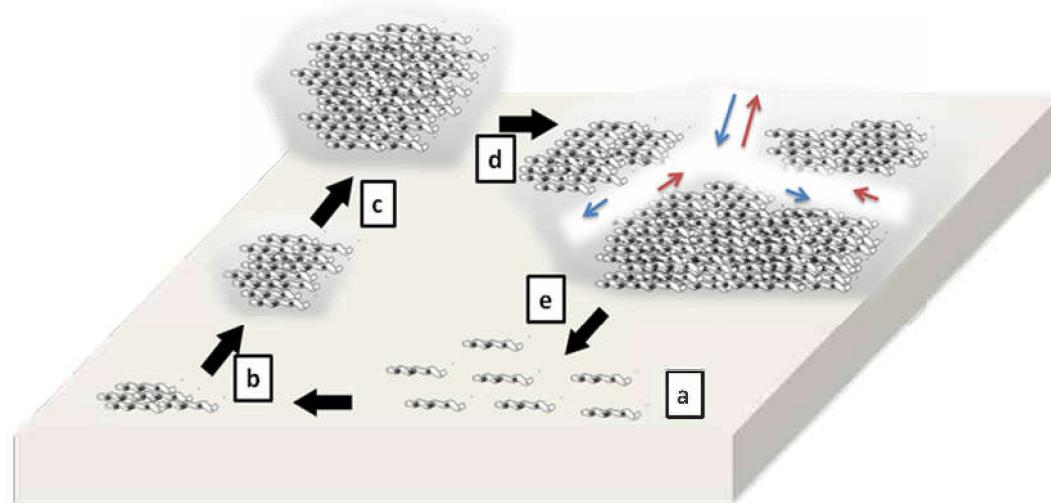
favorecendo a formação de biofilmes. Assim, estas comunidades acabam se tornando uma potencial fonte de contaminação dentro da indústria, podendo ser transferidas para o alimento, ou para suas embalagens e podem se tornar uma constante ameaça de recontaminação (LEWIS, 2001).

Os biofilmes causam perdas econômicas devido à deterioração dos alimentos e aos danos em equipamentos pela biocorrosão, e também, por prejuízos causados em humanos decorrentes das infecções de origem alimentar (DROZD, 2012).

### 3.9.1 Características dos biofilmes de *Campylobacter*

São cinco fases que compõem o ciclo da formação dessas estruturas: (a) Fase livre, (b) Fixação à superfície, (c) Micro-colônia, (d) Macro-colônia e (e) Dispersão (Figura 4).

**Figura 4:** Estágios do ciclo de formação de biofilme em *Campylobacter*. (a) Fase livre, (b) Fixação à superfície, (c) Micro-colônia, (d) Macro-colônia e (e) Dispersão. As setas indicam o caminho percorrido pelos nutrientes (azul) e excretas (vermelho) dentro dos canalículos formados no biofilme maduro. Adaptado de Rossi et al. (2016).



O primeiro estágio é caracterizado por uma fixação reversível de micro-organismo facilitada pela motilidade flagelar, que permite o alcance à superfície.

Essa ligação é de fraca intensidade e permite uma plena movimentação da bactéria, mas também permite que seja removida facilmente por processos de limpeza. Essa fraca interação inicial da bactéria com o substrato, envolve interações hidrofóbicas, forças eletrostáticas, e força de Van der Walls, que determinam a adesão entre a célula bacteriana e a superfície (VESTERLUND et al., 2005).

A fase 2 é denominada de fixação irreversível, momento em que ocorre aumento gradativo na intensidade da ligação por meio da produção contínua de exopolímeros e adesinas. Nessa etapa, a remoção das células a partir da superfície requer a ação da força mecânica, como a raspagem, ou por meio de tratamento químico. Os componentes de maior importância para esse período são os exopolímeros, as adesinas e o DNA (DNA extracelular com função estrutural). Esta fase envolve interações mais fortes do tipo dipolo-dipolo, pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas, ligações covalentes e iônicas (VESTERLUND et al., 2005).

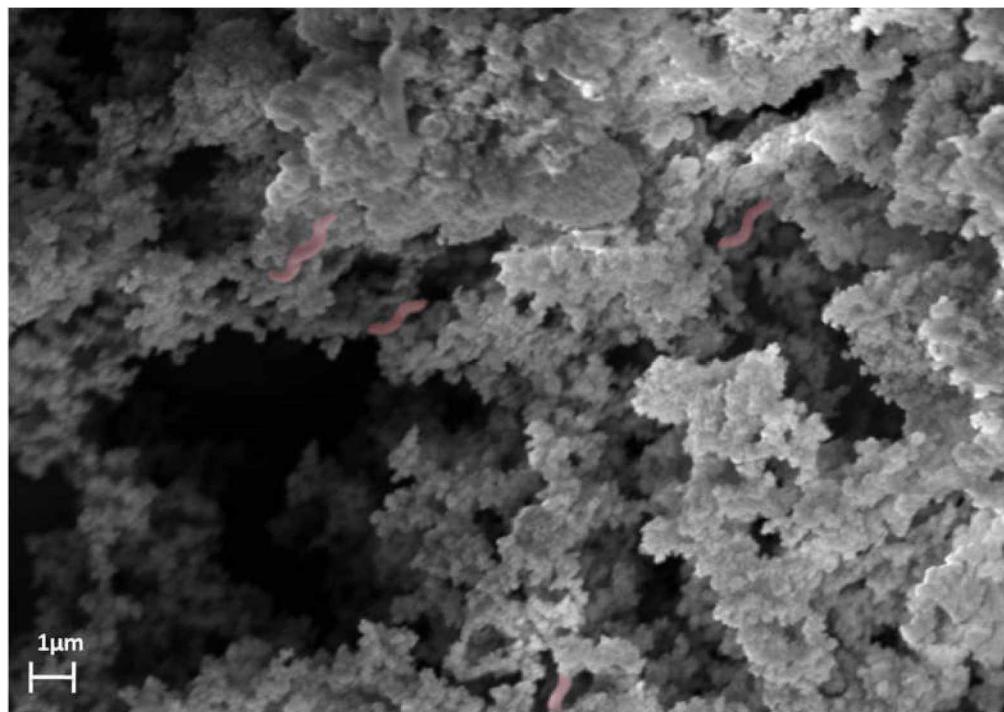
Em *Campylobacter*, observa-se um aumento exponencial na expressão dos genes ligados à motilidade flagelar (*flaA* e *flaB*), e à adesão como *cadF* e *peb4*. A motilidade bacteriana desempenha papel fundamental na migração e início da formação das micro-colônias, mediados pelo mecanismo de *quorum-sensing* (SULAEMAN et al., 2012; THEORET et al., 2012).

A formação de micro-colônias é detectada na terceira fase, que ocorre aproximadamente após quatro horas em *Campylobacter*, após a etapa de fixação, com diâmetro variando de 0,5 a 2mm. As células se tornam imóveis e o mecanismo de *quorum-sensing* é totalmente ativado e regula positivamente a expressão do gene *luxS*, que atua na auto-indução do processo de formação de biofilmes. Nesse momento, fatores extrínsecos atuam diretamente na capacidade de adesão, como as condições ambientais (aerobiose, anaerobiose, microaerofilia), o tipo de nutriente disponível e a superfície de fixação (aço inox, vidro e polipropileno) (MOE et al., 2010).

A etapa de maturação é acompanhada pela formação de macro-colônias, resultante do crescimento microbiano e recrutamento de outros micro-organismos do meio ambiente (Figura 5). Neste momento, a difusão através da matriz de exopolímeros é mais lenta do que o metabolismo celular e os gradientes químicos resultantes criam micro-nichos. Dentro destes, a morte de células bacterianas é evidente na região central, permitindo a formação de cavidades, onde a motilidade é

possível para as formas planctônicas (MONDS; O'TOOLE, 2009; CAPPITELLI et al., 2014).

**Figura 5:** Imagem de microscopia eletrônica de varredura de biofilme maduro de *Campylobacter jejuni*. Coloração computadorizada em *C. jejuni*.



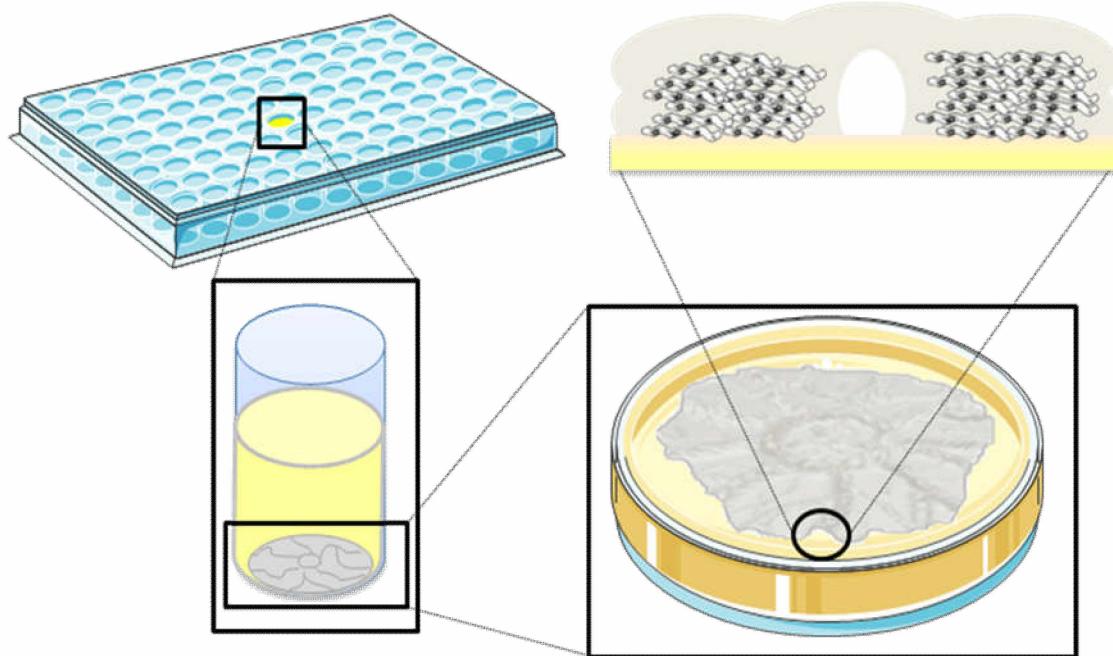
Em culturas *in vitro* essa fase tem duração de até três dias, se houver troca por meios frescos, e é acompanhada pela formação de canais que permitem a troca de nutrientes e excretas (SUNG; KHAN, 2015). A Figura 6 mostra um esquema da estrutura do biofilme bacteriano em cultura *in vitro*.

A última fase é a de dispersão de formas planctônicas para formação de novos biofilmes. Esse processo é feito passivamente, de forma independente da concentração de oxigênio (CAPPITELLI et al., 2014).

No hospedeiro animal e humano, *C. jejuni* é capaz de formar micro-colônias sobre o epitélio intestinal dentro de poucas horas após a infecção. A formação de biofilme nas superfícies do intestino impede as funções de absorção normais na mucosa ileal e pode contribuir para os sintomas da doença. A capacidade de adesão e a quimiotaxia para a mucina que compõe o muco intestinal permite a formação de “cobertores” bacterianos dentro e sob essas camadas de muco após três a quatro horas de exposição (HADDOCK et al., 2010).

Fora do hospedeiro, a forma séssil permite melhor sobrevivência em condições estressantes. As razões que permitem esse sucesso na sobrevivência são multifatoriais, mas incluem principalmente a redução da atividade metabólica e a diminuição da ação adsorvente da matriz de polímeros extracelulares, que reduz a quantidade do antimicrobiano e do agente sanitizante necessário para interagir com as células do biofilme, além de fatores específicos expressados pelas células em biofilme, como as bombas de efluxo (STEENACKERS et al., 2012).

**Figura 6:** Análise *in vitro* da formação de biofilmes de *Campylobacter*. O protocolo laboratorial é baseado na cultura da suspensão bacteriana  $DO_{600}=0,22$  em meios específicos (caldo Mueller Hinton, caldo Bolton, caldo Brucella ou caldo *chicken juice*) incubados por 48 horas em placas de 96 poços à temperatura de 37°C, em condições de microaerofilia. Posteriormente, observa-se a formação de uma massa bacteriana no fundo dos poços, que caracterizam a estrutura de um biofilme. Após cerca de 96 horas de incubação, a formação de canais de transporte de substâncias já está estabelecida e torna-se visível em microscopia eletrônica confocal e de varredura. Adaptado de Rossi et al. (2016).



O comportamento de biofilmes em culturas mistas e simples difere de forma significativa. Biofilmes compostos por diferentes espécies de bactérias, como os encontrados nas indústrias de alimentos, representam um maior risco, uma vez que

estas podem proteger umas às outras durante a aplicação de agentes químicos. É fato que em culturas mistas com *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp., *E. coli*, *Bacillus* sp. e *Enterococcus faecalis*, a sobrevivência e a persistência de *Campylobacter* é bastante evidente *in vivo*. Além disso, observa-se também mudanças estruturais e na atividade metabólica das micro-colônias. Exemplos adicionais se referem ao comensalismo de *C. jejuni* com *Pseudomonas aeruginosa*, que promove aumento na tolerância às concentrações de oxigênio ambiental por *C. jejuni* e o aumento na sobrevida de *Campylobacter* em biofilmes aquáticos compostos por diferentes espécies de protozoários (ICA et al., 2012; CULOTTI; PACKMAN, 2015).

### **3.9.2 Biofilmes de *C. jejuni* na produção avícola**

*Campylobacter* é usualmente contaminante de lotes de frangos. Alguns fatores de risco são determinantes para elevar os níveis de infecção, dentre eles, medidas de higiene inadequadas, negligência às normas de biosseguridade, presença de outros animais nas instalações, e outros. Porém, além da questão ambiental, também existe a persistência do micro-organismo na forma de biofilme nas instalações (HANNING, 2008).

A ausência de água é letal para o crescimento de micro-organismos, porém a existência de uma mínima fonte de água dentro da granja pode ser suficiente para o estabelecimento do biofilme. Os bebedouros são os mais propícios para a fixação bacteriana, sendo as porções cobertas com borracha com maior biomassa pela maior facilidade de adesão. Os sistemas de ventilação (*coolers*) também representam uma região favorável para a agregação microbiana, principalmente em situações onde há um biofilme pré-existente. Já nas etapas de processamento de frangos observam-se os maiores índices de formação de biofilmes pela grande quantidade de ambientes úmidos. São identificados vários pontos críticos durante a produção, sendo eles as cortinas de plástico, as esteiras, os tanques de escaldagem, *chiller* e os equipamentos de aço inoxidável (POMETTO; DEMIRCI, 2015).

O fato de o frango chegar ao abatedouro albergando *Campylobacter* aumenta as chances de contaminação dos equipamentos no processamento. Estudos de genotipagem de *Campylobacter* mostram claramente a similaridade das cepas

presentes no intestino do frango, em amostras ambientais e no produto final (HANNING, 2008; FAO/WHO, 2009).

A sobrevivência de *Campylobacter* na forma séssil na pele do frango representa outra forma de adaptação do micro-organismo. Esse agente é capaz de se fixar nas fendas profundas da pele e nos folículos da pena da ave. Esses recessos oferecem condições ideais para a bactéria aderir, colonizar, formar biofilmes e se manter protegidas na carcaça, mesmo sob baixas temperaturas (JANG et al., 2007).

### **3.9.3 Mecanismos intrínsecos da forma séssil**

Para o estabelecimento do biofilme, tanto variações ambientais quanto as do próprio micro-organismo correlacionam-se com os genes que são expressos por *C. jejuni* em formação séssil (EWING et al., 2009).

Os diversos genes que codificam as várias proteínas flagelares mostram claramente a necessidade de flagelos na formação de biofilmes em *C. jejuni*, uma vez que são sobre-expressos nessa forma de crescimento. A ausência de *flaA*, *flaB*, *flaC*, *flihA* ou *fliS* provoca a formação de biofilmes fracos. Muitas são as funções do flagelo para o biofilme e estão ligadas à motilidade, adesão e secreção de substâncias, sugerindo sua importância nas etapas iniciais de formação da estrutura séssil (SVENSSON et al., 2014).

A ausência de genes envolvidos na ativação da expressão do flagelo, assim como aqueles que estão envolvidos na quimiotaxia (*cheA*, *cheY* e *cetB*) também reduzem a auto-aglutinação (TURONOVA et al., 2015).

A matriz do biofilme é composta basicamente por exopolissacarídeos (EPS), proteínas e DNA e, dessa forma, os genes reguladores da produção dessas moléculas e a disponibilidade de nutrientes definem as variações quantitativas nessa composição (MAH, 2012).

Outros genes que afetam decisivamente a formação de biofilmes em *Campylobacter* são aqueles relacionados à superfície celular. As mutações que alteram a expressão e secreção de proteínas de superfície também prejudicam a formação de biofilme (NAITO et al., 2010).

A resposta ao estresse gera mudanças no metabolismo na expressão de quase a totalidade do genoma bacteriano. Tanto o aumento da expressão de

proteínas de resposta ao estresse quanto a diminuição da atividade metabólica expressam a condição séssil do micro-organismo e contribuem para a tolerância às condições adversas que são sujeitas as bactérias em biofilme. Proteínas de captação de ferro e de resposta ao estresse são altamente expressas em biofilmes. Há variação na expressão de proteínas metabólicas dependendo da necessidade, sugerindo que as alterações distintas no metabolismo marcam a transição entre os modos de crescimento planctônico e séssil (RAJASHEKARA et al., 2009).

### **3.9.4 Fatores extrínsecos ligados aos biofilmes**

Quanto às condições ambientais, são diversos os fatores que determinam a produção, desenvolvimento e manutenção do biofilme, podendo citar o pH, a temperatura, o tipo de material e a rugosidade da superfície, a presença de compostos orgânicos e inorgânicos, a condição de fluxo dinâmico, a pressão osmótica, a concentração de oxigênio, a concentração e biodisponibilidade de nutrientes, além da presença de agentes antimicrobianos no meio. Isto se deve ao fato de que diferentes condições do ambiente é que vão gerar diferentes respostas nas regulações gênicas das bactérias e desta maneira no comportamento dos biofilmes (GUINEY, 1997).

O modo de crescimento séssil é intensificado em condições de baixa quantidade de nutrientes. Esse fato é observado pela elevação da produção de LPS na matriz. Um exemplo está relacionado à utilização de meios excessivamente nutritivos, como caldo Bolton e caldo Brucella, em culturas *in vitro*, que são menos propícios para a formação de biofilme em *C. jejuni*, que o Mueller Hinton e *Chicken juice*, menos ricos em nutrientes. A deficiência de carbono, nitrogênio e fósforo está relacionada a uma maior formação de biofilmes (REESER et al., 2007).

O papel da temperatura na formação de biofilmes é mais complexo, varia entre as espécies e as alterações estão relacionadas com outras condições ambientais (SVENSSON, 2012).

Para *Campylobacter*, a condição de fluxo dinâmico não leva a uma melhor fixação. Dessa forma, testes *in vitro* são realizados em condições estáticas, uma vez que a agitação não permite a ligação do micro-organismo para formar o biofilme. De maneira contraditória, em culturas mistas de biofilmes, as taxas de agitação podem ser elevadas (ICA et al., 2012).

As propriedades físico-químicas da superfície exercem uma forte influência sobre a adesão dos micro-organismos. De maneira geral, as bactérias se aderem mais facilmente às superfícies hidrofóbicas como os plásticos, do que às hidrofílicas como vidro ou metais (DONLAN; COSTERTON, 2002).

O estresse osmótico inibe a formação de biofilme e leva à dispersão da estrutura existente. A adição de NaCl (cloreto de sódio), glicose ou sacarose diminui significativamente a formação de biofilme em *C. jejuni*, mas induz a transição para a morfologia cocóide (REESER et al., 2007).

O efeito da tensão de oxigênio na formação de biofilme em *C. jejuni* parece variar muito entre as cepas. O oxigênio parece favorecer as fases iniciais da formação do biofilme, que ocorre de maneira mais rápida nas primeiras 24 horas. Porém, após 48 horas não há diferenças significativas em condições de aerobiose ou microaerofilia (SULAEMAN et al., 2012; SVENSSON, 2012).

### **3.9.5 Controle dos biofilmes**

Diante dos problemas envolvidos na presença de biofilmes, a prevenção do seu desenvolvimento e sua eliminação representam maior segurança ao alimento produzido e ao consumidor (SREY et al., 2013).

O *design* dos equipamentos, bem como a escolha do tipo de material e revestimento utilizados dentro das indústrias alimentícias são de extrema importância na prevenção da formação de biofilme. Isto porque mesmo adotando os mais eficazes programas de limpeza e higienização, não é possível compensar os problemas causados por equipamentos falhos, que apresentem cantos inacessíveis, frestas, fendas, juntas, válvulas e articulações, que são pontos vulneráveis para o acúmulo matéria orgânica, adesão de bactérias e, consequentemente, formação de biofilmes (CHMIELEWSKI; FRANK, 2006).

Uma vez que o biofilme já está estabelecido, deve-se enfatizar os processos de limpeza utilizando ação mecânica, que é uma das principais medidas para sua eliminação ou controle (MAUKONEN et al., 2003), pelo fato do atrito agir na desestruturação da matriz expondo as camadas mais profundas e deixando os micro-organismos mais acessíveis.

Geralmente, os desinfetantes não penetram na matriz do biofilme após um procedimento de limpeza ineficiente e, portanto, não destrói todas as células do

biofilme (SIMÕES et al., 2006), atingindo apenas as camadas mais externas. O uso de altas temperaturas pode reduzir a necessidade de aplicação de forças mecânicas (MAUKONEN et al., 2003).

Além da ação mecânica, outras medidas devem ser tomadas para prevenção e controle da adesão microbiana. Nesse sentido, as instalações, equipamentos e utensílios devem ser diariamente lavados e desinfetados com o uso de substâncias microbicidas previamente aprovadas por um órgão competente.

Os produtos químicos normalmente usados para a limpeza são tensioativos ou alcalinos, utilizados para suspender e dissolver os resíduos de alimentos através da diminuição da tensão superficial, emulsionar as gorduras, e desnaturar proteínas (MAUKONEN et al., 2003).

A desinfecção é a utilização de produtos destinados à redução da população de micro-organismos a níveis suportáveis e eliminação dos patogênicos. O objetivo da desinfecção é reduzir a carga microbiana remanescente na superfície após a limpeza e evitar a sua proliferação antes de reiniciar o processo de produção. Os desinfetantes devem ser eficazes, seguros e fáceis de manipular, devem ser retirados das superfícies de maneira fácil, utilizando água, sem deixar resíduos no produto final que possam afetar o consumidor (SREY et al., 2013).

Os produtos químicos mais utilizados em processos de desinfecção são os compostos ácidos, biocidas à base de aldeído, produtos cáusticos, cloro, peróxido de hidrogênio, iodo, isotiazolinonas, ozônio, ácido peracético, fenóis, biguanidinas, surfactantes (BREMER et al., 2006; SIMÕES et al., 2006). Alguns exemplos de agentes que podem ser usados no controle e/ou eliminação de biofilmes de *Campylobacter* estão representados na Tabela 1.

As estratégias mais utilizadas na indústria envolvem a eliminação de biofilmes já instalados, por meio da remoção da matriz e/ou da biomassa bacteriana. Como medida inicial cita-se a utilização de processos de limpeza com detergentes e compostos enzimáticos, que promovem alteração brusca no pH e consequente liquefação da matriz (MACHADO, 2005).

De forma geral, os policidas atuam na inibição de adesinas essenciais ao processo de fixação de *Campylobacter* às superfícies. Os agentes quelantes de ferro impedem a disponibilidade desse elemento no processo inicial de adesão, essencial para a formação dos biofilmes. A inativação do sistema de QS envolve a utilização

de compostos que competem por sítios de ligação de moléculas auto-indutoras ou pela degradação direta dessas moléculas (BRIDIER et al., 2011).

**Tabela 1:** Principais alvos para combate de biofilmes microbianos e exemplos de agentes.

Mecanismo de ação	Exemplos	Compostos
Bloqueio da adesão bacteriana	Policidas Quelantes de ferro	2-piridona bicíclica. Lactoferrina; extratos vegetais, taninos, desinase sortase.
Inativação do QS	Competição por sítios receptores/ Degradação de Als	Furanonas halogenadas e peptídeo inibidor do RNA III (RIP)
Biofilmes maduros - Matriz	Enzimas Alteração no pH	Proteinase, tripsina, DNase, metaperiodato de sódio Detergentes ácidos/alcalinos
Biofilmes maduros - Biomassa	Nanopartículas Antissépticos Bioativos	Zinco, prata, titânio, ouro. Clorexidina, triclosan. AMPs, terpinen-4-ol.

QS= *quorum-sensing*. Als= moléculas auto-indutoras. AMP= peptídeos antimicrobianos. Adaptado de Rossi et al. (2016).

Um pré-requisito importante na escolha de um agente biocida para desinfecção da planta industrial é o preço. Entre os desinfetantes de baixo preço pode-se citar o hipoclorito de sódio. Este agente tem forte ação oxidante que destrói uma ampla gama de micro-organismos afetando processos metabólicos, interferindo na permeabilidade das membranas celulares, inibindo o transporte de substâncias além de fragmentar as proteínas e reagir com os nucleotídeos, interferindo, portanto, em processos metabólicos e no ciclo celular (ESTRELA et al., 2002). O ácido peracético também tem como mecanismo de ação o aumento da permeabilidade da célula, no entanto, ele faz isso destruindo as ligações sulfidrídicas e de enxofre da membrana das células além de desnaturar as proteínas e enzimas celulares

(BARAH, 2013). Apesar de o ácido peracético ter custo um pouco mais elevado devido à limitada capacidade de produção mundial, a baixa concentração utilizada para obter uma resposta efetiva, justifica sua utilização (KITIS, 2004).

A clorexidina é um agente com ação bactericida e bacteriostática que causa ruptura da membrana e inibe a ação da ATPase ligada a membrana das células bacterianas. Vale ressaltar que sua ação é dependente do pH e é muito reduzida na presença de matéria orgânica, como sangue (MCDONNELL, 1999).

As nanopartículas, assim como os AMPs (peptídeos antimicrobianos), surgem como uma estratégia atual para a eliminação da biomassa dos biofilmes, uma vez que são estáveis a altas temperaturas e pressão, possuem potencial inativador, penetram facilmente pela matriz, são menos propensos ao desenvolvimento de resistências, apresentam efeito mínimo sobre células humanas e podem ser usados para estender o prazo de validade comercial de produtos frescos e cárneos (COSTA et al., 2011; LU et al., 2012).

O uso de ações combinadas, associando dois ou mais tipos de tratamentos químicos, físicos ou naturais vem sendo relatada como uma medida de controle anti biofilme mais eficaz (NAZER et al., 2005). Estes tratamentos, em ação sinérgica, podem potencializar e ampliar o espectro de ações para erradicação de biofilmes.

Considerando que biofilmes são fontes constantes de contaminação dos sistemas produtivos, possuindo impacto econômico e na saúde pública, sua prevenção deve ser incluída nos objetivos dos controles de qualidade das indústrias. Dentre as ações obrigatórias em todas as estratégias, deve ser incluído o seu monitoramento, além de políticas internas, que garantam o cumprimento dos planos de higienização pré-estabelecidos, particularmente, o respeito ao intervalo entre higienizações (ROSSI et al., 2016).

## CAPÍTULO 2

### **EVOLUÇÃO DE *Campylobacter jejuni* DE ORIGEM AVÍCOLA NO BRASIL**

Artigo a ser publicado no periódico  
**Food Microbiology**

1 **EVOLUÇÃO DE *Campylobacter jejuni* DE ORIGEM AVÍCOLA NO BRASIL**2  
3 Roberta T. Melo<sup>1a</sup>; Renata R. Prado<sup>a</sup>; Eliane P. Mendonça<sup>a</sup>; Guilherme P.  
4 Monteiro<sup>a</sup>; Phelipe B. A. M. Peres<sup>a</sup>; Daise A. Rossi<sup>a</sup>5  
6 <sup>a</sup>Laboratório de Epidemiologia Molecular, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade  
7 Federal de Uberlândia, Rua Ceará s/n, Bloco 2DSala44, Bairro Umuarama, Uberlândia, MG –  
8 38402-018, Brasil9  
10 **RESUMO**11  
12 Objetivou-se comparar a prevalência de *C. jejuni* em carcaças de frangos em  
13 dois períodos (2011-2012) e (2015-2016) e verificar, nos isolados, alterações  
14 relacionadas à presença de genes de virulência, resistência antimicrobiana e  
15 similaridade filogenética. Foram avaliadas 420 e 650 carcaças,  
16 respectivamente, em cada um dos períodos, provenientes de uma mesma  
17 empresa exportadora, coletadas em diferentes regiões do Brasil. A  
18 identificação da espécie e a presença dos genes *flaA*, *pldA*, *ciaB*, *cadF* e  
19 *cdtABC* foram realizadas por PCR. A resistência antimicrobiana foi avaliada  
20 pelo método de disco difusão. A homologia entre as cepas foi determinada por  
21 RAPD-PCR. Houve redução na prevalência ( $p<0,05$ ), de 13,1% em 2011-2012  
22 para 6,8% em 2015-2016, porém o número de cepas que possuíam os genes  
23 estudados foi maior ( $p<0,05$ ) no segundo período. Houve redução significativa  
24 no perfil de resistência para os antibióticos amoxacilina e eritromicina. A  
25 similaridade foi inferior a 80% entre as cepas isoladas nos dois períodos.  
26 Assim, apesar da redução no número de isolamentos e da resistência  
27 antimicrobiana, as cepas de *C. jejuni* desenvolveram um maior potencial  
28 virulento além de se tornarem totalmente distintas filogeneticamente das cepas  
29 isoladas no primeiro período.  
3031  
32 **Palavras-chave:** Campilobacteriose. Controle. Frango. Virulência.

---

1 Autor correspondente - E-mail: roberta-melo@hotmail.com (R. T. Melo)

33 **1. Introdução**

34

35 *Campylobacter jejuni* é uma das causas bacterianas mais comuns de  
36 gastroenterite aguda de origem alimentar em humanos (Scallan et al., 2011;  
37 Perio et al., 2013). Estudos epidemiológicos indicam que o consumo da carne  
38 de frangos mal cozida ou o manuseio incorreto desse alimento é a fonte mais  
39 provável de exposição a esse agente (Luber et al., 2006; CFSPH, 2013).

40 Esse patógeno pode ser encontrado em todas as etapas ao longo da  
41 cadeia de produção de aves (Melero et al., 2012). O processo de evisceração,  
42 o contato com equipamentos e a água de escaldagem contendo  
43 *Campylobacter* podem ser a origem da contaminação das carcaças de frango  
44 durante o abate (Chantarapanont et al., 2004; Allen et al., 2007). Em  
45 contrapartida, tem sido relatado que o número de *Campylobacter* em carcaças  
46 de frango pode ser reduzido, mas não eliminado a partir da escaldagem ou  
47 processo de refrigeração (Rosenquist et al., 2006).

48 A posição de destaque do Brasil como o segundo maior produtor e o  
49 maior exportador de carne de frango no mundo, aliado ao elevado consumo  
50 nacional (ABPA, 2016), demonstram a importância econômica do setor avícola  
51 para o país. Mas isso também implica em exigências dos países importadores,  
52 que impõem regras cada vez mais rigorosas para o controle dos patógenos  
53 zoonóticos, incluindo *Campylobacter*.

54 Dados referentes à ocorrência desse agente no Brasil são pontuais e  
55 estão dispersos pelo país. Tampouco se sabe sobre aspectos evolutivos das  
56 cepas ao longo do tempo, tanto os relacionados à prevalência e à resistência  
57 antimicrobiana, como fatores genéticos relacionados à virulência e à homologia  
58 entre as cepas. O conhecimento das variações de prevalência é útil na  
59 verificação da eficácia das medidas de controle. De maneira semelhante, o  
60 estudo das alterações nos perfis de resistência e genéticos das cepas  
61 circulantes no país pode representar uma ferramenta útil na determinação da  
62 segurança biológica e na avaliação da possibilidade de alterações das  
63 características que possam representar maior risco ao consumidor.

64 Objetivou-se determinar a ocorrência de *C. jejuni* em carcaças de  
65 frangos produzidas por uma empresa exportadora brasileira em dois períodos

66 distintos e avaliar as alterações na resistência antimicrobiana e nas  
67 características gênicas relacionadas ao perfil de similaridade e aquelas que  
68 conferem virulência ao micro-organismo.

69

70

71 **2. Material e métodos**

72

73 **2.1. Desenho do estudo**

74

75 O estudo foi baseado em uma análise comparativa da prevalência e de  
76 caracteres específicos de *C. jejuni* isoladas de carcaças de frango prontas para  
77 a comercialização, provenientes de uma indústria avícola exportadora, com  
78 ciclo completo de produção.

79 A comparação foi a nível temporal, uma vez que foram amostradas 420  
80 carcaças de frangos no período de agosto de 2011 a fevereiro de 2012 e 650  
81 carcaças de setembro de 2015 a fevereiro de 2016, totalizando 1070 amostras.

82 Foi avaliada a presença de *C. jejuni* nas amostras e em cada isolado,  
83 verificada a resistência aos antibióticos amoxacilina com clavulanato,  
84 gentamicina, eritromicina e tetraciclina; a presença dos genes de virulência *flaA*  
85 (*motilidade*), *pldA* (*adesão e colonização*), *ciaB* (*invasão*), *cadF* (*colonização*) e  
86 *cdtABC* (*citotoxina*); e a proximidade genética entre os isolados dos diferentes  
87 períodos.

88 Todas as análises foram conduzidas em paralelo com cepas controle de  
89 *Campylobacter jejuni* (ATCC 33291; NCTC 11351; IAL 2383).

90

91 **2.2. Isolamento e identificação de *C. jejuni***

92

93 O estudo foi conduzido no Laboratório de Epidemiologia Molecular da  
94 Universidade Federal de Uberlândia. Todas as carcaças de frango amostradas  
95 passaram por um processo de rinsagem em sacos estéreis contendo 400mL de  
96 água peptonada 0,1% (Difco®) estéril. O volume de 30mL do produto das  
97 lavagens foi adicionado a 30mL de caldo Bolton (Oxoid ®) em dupla

98 concentração suplementado com 5% de sangue equino hemolisado e mistura  
 99 antibiótica (Oxoid ®).

100       Após incubação em atmosfera de microaerofilia (Probac do Brasil®) a  
 101 37°C por 44 horas ± 4 horas, uma alíquota de 300µL das amostras foi pipetada  
 102 no ágar *Campylobacter Blood-Free Selective Medium* (Modified CCDA-  
 103 Preston) (Oxoid®) adicionado do suplemento antibiótico (Oxoid ®) e encoberto  
 104 com uma membrana filtrante de celulose com poros de 0,65µm (Millipore®).  
 105 Após a completa filtração, as membranas foram retiradas e as placas foram  
 106 incubadas a 37° C por 44 horas ± 4 horas em atmosfera de microaerofilia  
 107 (Probac do Brasil®).

108       A identificação de *C. jejuni* foi realizada por PCR multiplex. Para a  
 109 extração do DNA foi utilizado kit Wizard® Genomic DNA Purification  
 110 (Promega). O preparo da reação PCR foi realizado com o Kit GoTaq Green  
 111 Master Mix (Promega) com inclusão de 20 picomoles do primer C1 e C4  
 112 (Invitrogen®) e 40 picomoles de pg3 e pg50 (Invitrogen®) (Tabela 1) e 2µL  
 113 (20ng) do DNA extraído.

114

115 **Tabela 1:** Primers utilizados na identificação de *Campylobacter jejuni*.

Primers	Sequência 5' → 3'	Peso molecular (pb)	Referência
pg 3	GAACTTGAACCGATTG	460 ( <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> )	Harmon et al.
pg 50	ATGGGATTTCGTATTAAC		(1997)
C1	CAAATAAGTTAGAGGTAGAATGT	160 ( <i>C. jejuni</i> )	Harmon et al.
C4	GGATAAGCACTAGCTAGCTGAT		(1997)

116

117       O protocolo de amplificação e de corrida em gel de eletroforese foi feito  
 118 de acordo com Harmon et al. (1997).

119

### 120 **2.3.Genes de virulência**

121

122       Para determinação dos genes de virulência foi utilizado o kit GoTaq  
 123 Green Master Mix – Promega®, com variações no volume final da reação, do  
 124 DNA e na temperatura de anelamento, conforme descrito na Tabela 2.

125       Os protocolos de amplificação e de corrida seguiram as respectivas  
 126 referências descritas na Tabela 2.

127

128 **Tabela 2.** Primers para identificação dos genes de virulência *flaA*, *pldA*, *cadF*, *ciaB* e *cdtABC*  
 129 em *C. jejuni*.

Genes	Primers	Sequência 5' → 3'	Tamanho (pb)	Volume/DNA/ Anelamento	Referência
<i>flaA</i>	<i>flaA-F</i>	ATGGGATTTCGTATTAACAC	1728	50uL/20ng/45°C 1min.	Hänel et al. (2004)
	<i>flaA-R</i>	CTGTAGTAATCTTAAACATTGG			
<i>pldA</i>	<i>pldA-361</i>	AAGAGTGAGGCAGAATTCCA	385	50uL/20ng/45°C 1 min.	Zheng et al. (2006)
	<i>pldA-726</i>	GCAAGATGGCAGGATTATCA			
<i>cadF</i>	<i>cadF1-F2B</i>	TTGAAGGTAATTAGATATG	400	50uL/20ng/45°C 1 min.	Zheng et al. (2006)
	<i>cadF1-R1B</i>	CTAACACCAAAGTTGAAAC			
<i>ciaB</i>	<i>ciaB1-652</i>	TGCGAGATTTTCGAGAATG	527	25uL/80ng/57°C 1 min.	Martinez et al. (2006)
	<i>ciaB1-1159</i>	TGCCCGCCTTAGAACTTACA			
<i>cdtA</i>	<i>cdtA-F</i>	CTATTACTCTATTACCCCACC	420	25uL/80ng/57°C 1 min.	Martinez et al. (2006)
	<i>cdtA-R</i>	AATTGAAACCGCTGTATTGCTC			
<i>cdtB</i>	<i>cdtB-F</i>	AGGAACCTTACCAAGAACAGCC	531	25uL/80ng/57°C 1 min.	Martinez et al. (2006)
	<i>cdtB-R</i>	GGTGGAGTATAGGTTGTTGTC			
<i>cdtC</i>	<i>cdtC-F</i>	ACTCCTACTGGAGATTTGAAAG	339	25uL/80ng/57°C 1 min.	Martinez et al. (2006)
	<i>cdtC-R</i>	CACAGCTGAAGTTGTTGGC			

130

131

## 132 2.4. Susceptibilidade antimicrobiana

133

134 O teste de resistência antimicrobiana baseou-se no método de disco  
 135 difusão conforme protocolo descrito pela *Clinical and Laboratory Standards  
 136 Institute* (CLSI, 2010) para os seguintes antibióticos: amoxacilina com  
 137 clavulanato (10µg), eritromicina (15µg), gentamicina (10µg) e tetraciclina (30µg)  
 138 (Laborclin).

139 A preparação dos inóculos para as cepas previamente isoladas e  
 140 identificadas foi realizada seguindo o método de suspensão direta das colônias,  
 141 com turbidez ajustada conforme a solução padrão de MacFarland a 0,5. As  
 142 amostras foram semeadas em ágar Mueller Hinton (MH) (Difco®) acrescido de  
 143 5% de sangue eqüino para posterior aplicação dos discos. A incubação foi feita  
 144 em atmosfera de microaerofilia a 37°C por 48 horas e em seguida foram  
 145 medidos os diâmetros dos halos de inibição (em milímetros) para classificação  
 146 como sensível, intermediário ou resistente ao antimicrobiano testado.

147

## 148 2.5. RAPD-PCR

149

150 A diversidade genética entre os isolados foi determinada pela técnica de  
151 RAPD-PCR (*Random Amplification of Polymorphic DNA*). Os iniciadores  
152 HLWL85 (5'ACGTATCTGC3') e 1290 (5'GTGGATGCGA3') foram usados na  
153 determinação do nível de similaridade das cepas isoladas nos diferentes  
154 períodos.

155 O volume final para a reação de amplificação foi de 20 $\mu$ L, composto por  
156 10ng do DNA bacteriano e pelos reagentes: 10mM de Tris-HCL; 50mM de KCl;  
157 2,0mM de MgCl<sub>2</sub> e 1U Taq DNA polimerase; 200 $\mu$ M de cada deoxinucleotídeo  
158 trifosfatado (DNTP) e 30 picomols do *primer* (Invitrogen®). Os protocolos de  
159 amplificação e eletroforese seguiram as recomendações de Akopyanz et al.  
160 (1992) e Mazurier et al. (1992).

161 Os resultados foram avaliados usando o programa GelCompar II  
162 (*Comparative Analysis of Electrophoresis Patterns*), version 1.50, Applied Maths  
163 Korthrijk, Belgium. A matriz de similaridade foi obtida por comparação entre  
164 pares de cepas usando o coeficiente de similaridade de Dice, com 1% de  
165 tolerância para cada *primer* separadamente. Para a construção do  
166 dendrograma foi utilizada a média de experimentos (*average from experiments*)  
167 obtida pelos dois *primers* pelo método UPGMA (*unweighted pair group method*  
168 *with arithmetic mean*).

169

## 170 **2.6. Análise Estatística**

171

172 A comparação entre as diferenças observadas ao longo do tempo foram  
173 realizadas por meio do teste binomial para comparação de duas proporções,  
174 com 5% de significância, utilizando o programa GraphPad Prism 6.0.

175

## 176 **3. Resultados e discussão**

177

178 Do total de 420 amostras analisadas no período entre 2011 a 2012, a  
179 prevalência foi de 13,1%, com 55 carcaças positivas para *C. jejuni*. No período  
180 de 2015 a 2016 esse valor foi significativamente inferior (p=0,0007) e  
181 equivalente a 6,8% (44/650), resultando em um total de 99 cepas isoladas.

182 A redução da porcentagem de isolamento desse agente condiz com a  
183 literatura em estudos mais recentes. Lynch et al. (2011) encontraram  
184 positividade de 13% na Irlanda do Norte ao analisar 185 carcaças de frangos.  
185 No Brasil, Carvalho et al. (2013) encontraram 11,3% de contaminação em 194  
186 carcaças analisadas e Shiaka et al. (2015) observaram um percentual de  
187 18,5% no Japão. Em contrapartida, estudos mais antigos realizados na  
188 República Tcheca demonstraram elevada contaminação, com 46% e 43% nos  
189 anos de 2006 e 2007, respectivamente (Bardon et al., 2009). No sul do Brasil,  
190 estudos realizados por Kuana et al. (2008), encontraram 68,8% de positividade  
191 das carcaças de frango analisadas.

192 A redução na porcentagem de positividade dentro da empresa avaliada  
193 neste estudo não tem relação com a questão sazonal, uma vez que as análises  
194 para ambos os períodos (2011-2012 e 2015-2016) foram realizadas  
195 praticamente na mesma época do ano (agosto a fevereiro), demonstrando uma  
196 variação percentual relativamente constante ao longo dos meses. A figura 1  
197 ilustra a distribuição da prevalência ao longo do tempo.

198 É possível que a diminuição ( $p<0,05$ ) na prevalência de *C. jejuni* seja  
199 consequência da utilização de medidas mais eficazes dentro da indústria  
200 aplicadas para o controle de *Salmonella*, pois as ferramentas utilizadas para  
201 diminuir a prevalência destes micro-organismos são também eficazes no  
202 controle de *Campylobacter* (FSIS, 2015).

203 As etapas que representam maiores riscos de contaminação cruzada  
204 incluem a escaldagem e a evisceração (Allen, 2007; FSIS, 2015). Dessa forma  
205 a inclusão de políticas de monitoramento de pontos de controle durante esses  
206 momentos podem ter contribuído para os resultados obtidos.

207 A exigência internacional por alimentos mais seguros do ponto de vista  
208 microbiológico é fator determinante para que as indústrias implantem medidas  
209 de controle de patógenos. Nos EUA, Williams et al. (2015) detectaram redução  
210 nos percentuais de isolamento de *C. jejuni* ao longo do tempo, assim como o  
211 observado no presente estudo. É de se esperar que países como EUA e Brasil  
212 apresentem diminuição de contaminação por patógenos, uma vez que ambos  
213 ocupam as melhores posições do mundo em nível de produção e exportação  
214 de carne de frangos (ABPA, 2016).

215 Apesar do sucesso referente à redução percentual nas carcaças,  
 216 observou-se um maior potencial virulento em *C. jejuni* isolados durante os  
 217 anos de 2015 e 2016. Os resultados da análise molecular para os genes *pldA*,  
 218 *cadF*, *ciaB* e *cdtABC* demonstraram um aumento significativo ( $p<0,05$ ) na  
 219 positividade exceto para o gene *flaA* em relação aos anos de 2011 e 2012  
 220 (Tabela 3). Estudos realizados em outros países também mostraram elevadas  
 221 positividades para os genes estudados (Ripabelli, 2010; Thakur et al., 2010).

222

223 **Tabela 3.** Porcentagem de genes de virulência em *C. jejuni* isolados de carcaças de frangos  
 224 em dois períodos distintos, no Brasil.

Genes de Virulência	2011-2012	2015-2016
	(N=55) n(%)	N=44 n(%)
<i>flaA</i>	41 (74,5) <sup>a</sup>	37 (84,1) <sup>a</sup>
<i>pldA</i>	35 (63,6) <sup>a</sup>	43 (97,7) <sup>b</sup>
<i>cadF</i>	37 (67,3) <sup>a</sup>	43 (97,7) <sup>b</sup>
<i>ciaB</i>	37 (67,3) <sup>a</sup>	42 (95,5) <sup>b</sup>
<i>cdtABC</i>	36 (65,5) <sup>a</sup>	43 (97,7) <sup>b</sup>

225 N – número de isolados; n, % – número e porcentagem de isolados que possuem o gene de  
 226 virulência; a,b – letras diferentes nas linhas indicam diferença significativa ( $p<0,05$ ).  
 227

228 A presença de cada um dos genes sugere uma atuação biológica e  
 229 potencialmente patogênica envolvida na infecção por *C. jejuni* (Buelow et al.,  
 230 2011). O gene *flaA* codifica a proteína flagelina, responsável pela motilidade  
 231 (Poly et. al., 2007). O gene *ciaB* é responsável pela secreção de proteínas que  
 232 atuam na invasão e colonização de células epiteliais do intestino (Cróinín et al.,  
 233 2012; Eucker e Konkel, 2012). O gene *pldA* é responsável pela adesão e  
 234 colonização. O gene *cadF* codifica uma proteína que está envolvida na ligação  
 235 interna com células epiteliais do intestino, portanto, é importante para a  
 236 colonização interna (Pickett et. al., 1999). O complexo CDT, codificado pelo  
 237 gene *cdtABC*, é necessário para a citotoxicidade na célula hospedeira,  
 238 causando interrupção do ciclo celular e consequente apoptose (Pickett et. al.,  
 239 1999; Dastiel et al., 2010; Ripabelli et al., 2010; Martinez et al., 2006).

240 Apesar do aumento percentual do gene *flaA* em 2015-2016 esse valor  
 241 não foi significativo em relação a 2011-2012. Sabe-se que a motilidade é  
 242 essencial na patogênese da cepa, e dessa forma, é possível que as cepas

243 apresentem outros mecanismos que auxiliem nessa atuação. Uma  
 244 possibilidade é que a motilidade esteja associada ao gene *flaB* para as cepas  
 245 *flaA*-mutantes, não avaliado neste estudo, mas que também é ligado a  
 246 exportação da flagelina (Cróinín et al., 2012). Sabendo que a proteína flagelina  
 247 é antigênica, é possível que, evolutivamente, a variação para a forma *flaB*  
 248 represente uma forma de evasão do sistema imune do hospedeiro. Porém, esta  
 249 hipótese necessita de mais estudos.

250 Os 12 perfis de virulência identificados na Tabela 4 reforçam a maior  
 251 patogenicidade das cepas nos períodos de 2015-2016. O perfil P1 (presença  
 252 de todos os genes) foi o mais identificado e aumentou ( $p=0,00004$ ) ao longo do  
 253 tempo. Paralelamente, a ausência de todos os genes estudados (perfil P12) foi  
 254 identificada em apenas uma cepa em 2015-2016, demonstrando uma redução  
 255 ( $p<0,05$ ) em comparação com o período anterior.

256

257 **Tabela 4.** Perfil de virulência das cepas de *C. jejuni* isoladas de carcaças de frangos em  
 258 períodos distintos, no Brasil.

Perfis de Virulência	2011-2012	2015-2016
	N= 55 n(%)	N= 44 n(%)
P1: <i>flaA</i> , <i>pldA</i> , <i>cadF</i> , <i>ciaB</i> , <i>cdtABC</i>	25 (45,5) <sup>a</sup>	37 (84,1) <sup>b</sup>
P2: <i>flaA</i> , <i>pldA</i> , <i>cadF</i> , <i>ciaB</i>	5 (9,1)	0 (0)
P3: <i>flaA</i> , <i>cadF</i> , <i>ciaB</i> , <i>cdtABC</i>	2 (3,6)	0 (0)
P4: <i>flaA</i> , <i>pldA</i> , <i>ciaB</i> , <i>cdtABC</i>	1 (1,8)	0 (0)
P5: <i>pldA</i> , <i>cadF</i> , <i>ciaB</i> , <i>cdtABC</i>	0 (0)	5 (11,4)
P6: <i>pldA</i> , <i>cadF</i> , <i>ciaB</i>	3 ( 5,5)	0 (0)
P7: <i>flaA</i> , <i>cadF</i> , <i>cdtABC</i>	1 (1,8)	0 (0)
P8: <i>pldA</i> , <i>cadF</i> , <i>cdtABC</i>	0 (0)	1 (2,3)
P9: <i>flaA</i> , <i>cdtABC</i>	7 (12,7)	0 (0)
P10: <i>cadF</i> , <i>ciaB</i>	1 (1,8)	0 (0)
P11: <i>pldA</i>	1 (1,8)	0 (0)
P12: ausência de todos os genes	9 (16,4) <sup>a</sup>	1 (2,3) <sup>b</sup>

259 N – número total de cepas; n, % – número e porcentagem de cepas que possuem o gene de  
 260 virulência; a b – letras diferentes nas linhas indicam diferença significativa ( $p<0,05$ ) para o  
 261 perfil.

262

263

264 Os resultados do teste de susceptibilidade antimicrobiana mostraram  
 265 que das 99 cepas isoladas, 47 (47,5%) apresentaram resistência à amoxacilina

266 associada ao clavulanato, quatro (4,0%) à gentamicina, 18 (18,2%) à  
267 eritromicina e 41 (41,4%) à tetraciclina.

268 A resistência aos antibióticos em bactérias é uma preocupação  
269 constante em saúde pública. A identificação de cepas resistentes à eritromicina  
270 e à tetraciclina nesse estudo é preocupante, uma vez que são fármacos de  
271 escolha no tratamento da campilobacteriose em seres humanos. Apesar disso,  
272 as porcentagens identificadas são relativamente baixas se comparadas com  
273 outros estudos que encontraram mais de 70% das cepas resistentes aos  
274 macrolídeos, tetraciclina e amoxacilina com clavulanato e podem estar  
275 relacionadas ao maior controle na utilização dessas drogas na medicina  
276 veterinária e humana (EFSA, 2015; Nguyen et al., 2016).

277 A figura 2 ilustra os resultados de resistência antimicrobiana obtidos para  
278 cada um dos períodos analisados. Não houve diferença significativa na  
279 resistência para os antibióticos gentamicina e tetraciclina ao longo do tempo.  
280 Diferentemente, para amoxacilina com clavulanato e eritromicina observou-se  
281 uma redução significativa na frequência de cepas resistentes, com  $p=0,0022$  e  
282  $p=0,0400$ , respectivamente.

283 A reduzida e constante quantidade de cepas resistentes aos  
284 aminoglicosídeos é comum na literatura e é justificada pela sua rara utilização  
285 na produção avícola. Quanto à tetraciclina, a manutenção do elevado perfil de  
286 resistência pode ser explicada pelo gene *tetO*, presente na maioria dos  
287 isolados de *Campylobacter*, responsável por codificar uma proteína de  
288 membrana que atua como uma bomba de efluxo de tetraciclina (Mazi et al.,  
289 2008; EFSA, 2015; Nguyen et al., 2016).

290 É provável que a redução na resistência à amoxacilina com clavulanato  
291 e à eritromicina esteja associada à proibição do uso dessas drogas na  
292 produção de frangos de corte, tanto pelo Ministério da Agricultura Pecuária e  
293 Abastecimento quanto pela *Food and Drug Administration*, aliado às exigências  
294 dos países importadores por produtos livres de resíduos de antibióticos  
295 (BRASIL, 2007; FDA, 2016). Isso pode ter minimizado o contato das bactérias  
296 com essas drogas reduzindo a pressão seletiva de maneira a conferir menores  
297 frequências de resistência.

298 A multirresistência, resistência a três ou mais classes de antibióticos, foi  
299 detectada em 4,0% (4/99) das cepas, sendo duas no período de 2011-2012 e  
300 duas de 2015-2016. Todas apresentaram o mesmo perfil de resistência  
301 conjunta à amoxacilina com clavulanato, eritromicina e tetraciclina.

302 O estudo da homologia entre os isolados não identificou a presença de  
303 clones, mas 19 *clusters* apresentaram cepas com similaridade superior a 80%  
304 e, portanto, consideradas como pertencentes a um mesmo genótipo (A a S)  
305 (Figura 3). Além disso, foram identificados 56 genótipos distintos, que  
306 evidenciaram a elevada heterogeneidade genética em *C. jejuni*.

307 A variabilidade identificada, tanto em relação à presença dos genes de  
308 virulência quanto ao número de *clusters* e genótipos isolados, pode estar  
309 relacionada à rápida adaptação de *C. jejuni*. A aquisição de novos elementos  
310 genéticos, que tornem esses micro-organismos mais adaptados e com maior  
311 potencial virulento, pode ocorrer por meio de mutações, transferência vertical  
312 ou horizontal de genes e recombinação, facilmente realizada por essa espécie  
313 (Sheppard et. al., 2015).

314 Essa capacidade de adaptar e alterar seu material genético foi  
315 perceptível ao longo do tempo, já que o estudo filogenético não permitiu o  
316 agrupamento de cepas isoladas em períodos distintos. Todos os *clusters*  
317 detectados apresentaram cepas do mesmo período, sendo C, D, H, I, J, K, L,  
318 M, N, O, P, Q, R e S de 2011-2012 e A, B, E, F e G de 2015-2016.

319 A identificação de um menor número de *clusters* (5/19) e um maior  
320 número de perfis distintos (33/56) nas cepas mais recentes também  
321 evidenciaram a capacidade de *C. jejuni* alterar seu material genético tornando-  
322 se mais divergentes em relação às cepas isoladas anteriormente.

323 De acordo com Sheppard et. al. (2015) os estudos de tipagem molecular  
324 são capazes de demonstrar a evolução de *Campylobacter*. Além disso,  
325 alterações genotípicas e fenotípicas são associadas ao elevado grau de  
326 estruturação genética das linhagens, sendo este o fator determinante no  
327 surgimento das populações de *Campylobacter* cada vez mais especializadas.

328 Dados da WHO (2013) apontam que a eliminação de *Campylobacter* no  
329 produto final não é necessária, e que a simples redução nos percentuais de  
330 isolamento em carne de frango é capaz de conduzir a uma redução drástica do

331 número de casos de campilobacteriose em seres humanos. Porém, os  
332 resultados deste estudo demonstram que esta afirmação deve ser avaliada  
333 criteriosamente, e outros fatores além da prevalência devem ser incluídos na  
334 avaliação do perigo à segurança do alimento.

335 A redução de *C. jejuni* e das frequências de cepas resistentes foi  
336 constatada, provavelmente pela incorporação de medidas rígidas de controle.  
337 Mas, em oposição, essas medidas proporcionaram também uma pressão de  
338 seleção por cepas geneticamente distintas e mais virulentas. Dessa forma, é  
339 possível que haja redução no número de casos de campilobacteriose, porém a  
340 ocorrência dos episódios da enfermidade poderá ser ligada a quadros mais  
341 agudos e mais graves. Logo, o controle de *Campylobacter* na carne de frango e  
342 a obrigatoriedade de sua análise devem ser repensados de forma mais  
343 cuidadosa e rigorosa, como uma medida de segurança para o consumidor.

344

#### 345 **4.Conclusão**

346

347 Houve redução significativa nos isolamentos de *C. jejuni* em carcaças de  
348 frango e na resistência antimicrobiana no período de 2015-2016 em  
349 comparação com 2011-2012. Em contrapartida, as cepas mais recentes  
350 apresentam genótipos distintos, com maior número de genes de virulência, e,  
351 portanto, maior potencial para causar quadros mais graves de  
352 campilobacteriose.

353 Este estudo indica a necessidade de implementação de medidas  
354 criteriosas de monitoramento dentro da indústria para acompanhar, não só as  
355 variações na prevalência de *C. jejuni*, mas também as alterações evolutivas em  
356 suas características fenotípicas e genotípicas.

357

#### 358 **Agradecimentos**

359

360 Ao CNPq e à FAPEMIG pelo auxílio financeiro para a execução do estudo.

361

#### 362 **Referências**

363

- 364 ABPA, Associação Brasileira de Proteína Animal, 2016. Relatórios Anuais.  
365 Relatório Anual 2016.  
366 <http://abpabr.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais>.  
367 (accessed 05.17.16).
- 368 Allen, V.M., Bull, S.A., Corry, J.E., Domingue, G., Jorgensen, F., Frost, J.A.,  
369 Whyte, R., Gonzales, A., Elviss, N., Humphrey, T.J., 2007. *Campylobacter*  
370 spp. contamination of chicken carcasses during processing in relation to  
371 flock colonisation. *Int. J. Food Microbiol.* 113, 54–61. doi:  
372 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.011
- 373 Ayres, M., Ayres Jr, M., Ayers, D.L., Santos, A.S.S., 2005. BioEstat  
374 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas.  
375 Belém: Sociedade Civil Mamirauá; Brasília; DF; Conselho Nacional de  
376 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), p. 324.
- 377 Bardon, J., Kolar, M., Cekanova, L., Hejnar, P., Koukalova, D., 2009.  
378 Prevalence of *Campylobacter jejuni* and its resistance to antibiotics in  
379 poultry in the Czech Republic. *Zoonoses Public Health.* 56, 111-116.  
380 doi: 10.1111/j.1863-2378.2008.01176.x
- 381 Brasil. Ministério da Agricultura. Regulamento da Lei no 6.198 de 26 de  
382 dezembro de 1974. Decreto no 6.296 de 11 de dezembro de 2007.  
383 Regulamento técnico sobre a inspeção e a fiscalização obrigatória dos  
384 produtos à alimentação animal e dá outras providencias. Diário Oficial da  
385 União, Brasília, 12 dezembro 2007. Seção 1, p22-29.
- 386 Buelow, D.R., Christensen, J.E., Neal-McKinney, J.M., Konkel, M.E., 2011.  
387 *Campylobacter jejuni* survival with inhuman epithelial cells is enhanced by  
388 these creted protein Cial. *Mol. Microbiol.* 80, 1296–1312.
- 389 Carvalho, A.F.de, Silva, D.M.da, Azevedo, S.S., Piatti, R.M., Genovez, M. E.,  
390 Scarcelli, E., 2013. Detection of CDT toxin genes in *Campylobacter* spp.  
391 strains isolated from broiler carcasses and vegetables in São Paulo, Brazil.  
392 *Braz. J. Microbiol.* 44, 693-699.
- 393 CFSPH, The Center of Food Security & Public Health, 2013. Zoonotic  
394 *Campylobacteriosis: Campylobacter Enteritis, Vibronic Enteritis, Vibriosis.*  
395 <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/campylobacteriosis.pdf>.  
396 (accessed 04.30.17).

- 397 Chantarapanont, W., Berrang, M.E., Frank, J.F., 2004. Direct microscopic  
398 observation of viability of *Campylobacter jejuni* on chicken skintreated with  
399 selected chemical sanitizing agents. *J. Food Prot.* 67, 1146– 1152.
- 400 Cróinín, T.Ó., Steffen, B., 2012. Host epithelial cell invasion by *Campylobacter*  
401 *jejuni*: trigger or zipper mechanism?. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2, 1-13.  
402 doi: 10.3389/fcimb.2012.00025
- 403 Dasti, J.I., Tareen, A.M., Lugert, R., Zautner, A., Gross, U., 2010.  
404 *Campylobacter jejuni*: a brief overview on pathogenicity-associated factors  
405 and disease mediating mechanisms. *Int. J. Med. Microbiol.* 300, 205–211.  
406 doi:10.1016/j.ijmm.2009.07.002
- 407 EFSA: Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator  
408 bacteria from humans, animals and food. 2015. *EFSA Journal*, 13, 2, 4036.
- 409 Eucker, T.P., Konkel, M.E., 2012. The cooperative action of bacterial fibronect  
410 in binding proteins and secreted proteins promote maximal *Campylobacter*  
411 *jejuni* invasion of host cells by stimulating membrane ruffling. *Cell.*  
412 *Microbiol.* 14, 226–238. doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01714.x
- 413 FDA. 2016. Approved Drugs. <http://www.centerwatch.com/drug-information/fda-approved-drugs> (acessed 03.15.17).
- 414
- 415 FSIS. The Food Safety and Inspection Service., 2015. DRAFT FSIS-  
416 Compliance Guideline For Controlling Salmonella and Campylobacter in  
417 Raw Poultry. <http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/6732c082-af40-415e-9b57-90533ea4c252/Controlling-Salmonella-Campylobacter-Poultry-2015.pdf?MOD=AJPERES> (accessed 12.05.16).
- 416
- 417 Hänel, I., Muller, J., Muller, W., Schulze, E., 2004. Correlation between invasion  
418 of Caco-2 eukaryotic cells and colonization ability in the chick gut in  
419 *Campylobacter jejuni*. *Vet. Microbiol.* 101, 75–82. doi:  
420 10.1016/j.vetmic.2004.04.004.
- 421
- 422 Harmon, K.M., Ramsom, G.M., Wesley, I.V., 1997. Differentiation of  
423 *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by polymerase chain reaction.  
424 *Mol. Cell. Probes.* 11,195-200. doi: 10.1006/mcpr.1997.0104
- 425
- 426 Kuana, S.L., Santos, L.R., Rodrigues, L.B., Borsoi, A., Moraes, H.L., Salle, C.  
427 T., Nascimento, V.P., 2008. Occurrence and characterization of
- 428

- 429       *Campylobacter* in the Brazilian production and processing of broilers. Av.  
430       Des. 52, 680-684. doi: 10.1637/8296-032608-Reg.1
- 431       Luber, P., Brynestad, S., Topsch, K., Scherer, K., Bartelt, E., 2006.  
432       Quantification of *Campylobacter* Species Cross-Contamination during  
433       Handling of Contaminated Fresh Chicken Parts in Kitchens. Appl. Environ.  
434       Microbiol. 72, 66-70. doi:10.1128/AEM.72.1.66-70.2006.
- 435       Lynch, O.A., Cagney, C., McDowell, D.A., Duffy, G., 2011. Occurrence of  
436       fastidious *Campylobacter* spp. In fresh meat and poultry using an adapted  
437       cultural protocol. Int. J. Food Microbiol. 150, 171-177. doi:  
438       10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.037
- 439       Martinez, I., Mateo, E., Churruca, E., Girbau, C., Alonso, R., Fernandez-  
440       astorga, A., 2006. Detection of *cdtA*, *cdtB*, and *cdtC* genes in  
441       *Campylobacter jejuni* by multiplex PCR. Int. J. Med. Microbiol. 296, 45-48.  
442       doi: 10.1016/j.ijmm.2005.08.003
- 443       Mazi, W., Senok, A.C, Al-Mahmeed, A., Arzese, A., Bindayna, K., Botta, G.,  
444       2008. Trends in antibiotic sensitivity pattern and molecular detection of  
445       tet(O)-mediated tetracycline resistance in *Campylobacter jejuni* isolates  
446       from human and poultry sources. Jpn J. Infect. Dis., 61, 82-84
- 447       Melero, B., Juntunen, P., Hänninen, M., Jaime, I., Rovira, J., 2012. Tracing  
448       *Campylobacter jejuni* strains along the poultry meat production chain from  
449       farm to retail by pulsed-field gel electrophoresis, and the antimicrobial  
450       resistance of isolates. Food Microbiol. 32, 124-128. doi:  
451       10.1016/j.fm.2012.04.020
- 452       Nguyen, T.N.M., Hotzel, H., El-Adawy, H., Tran, H.T., Le, M.T.H., Tomaso, H.,  
453       Neubauer, H., Hafez, H.M., 2016. Genotyping and antibiotic resistance of  
454       thermophilic *Campylobacter* isolated from chicken and pig meat in Vietnam.  
455       Gut Pathog. 8,19. doi: 10.1186/s13099-016-0100-x
- 456       Perio, M.A., Niemeier, R.T., Levine, S.J., Gruszynski, K., Gibbins, J.D., 2013.  
457       *Campylobacter* infection in poultry-processing workers, Virginia, USA, 2008-  
458       2011. Emerg. Infect. Dis. 19, 286-288.
- 459       Pickett, C.L., Whitehouse, C.A., 1999. The cytolethal distending toxin family.  
460       Trends Microbiol. 7, 292-297. doi: S0966-842X(99)01531-0

- 461 Poly, F., Ewing, C., Goon, S., Hickey, T.E., Rockabrand, D., Majam, G., Lee, L.,  
462 Phan, J., Savarino, N.J., Guerry, P., 2007. Heterogeneity of a  
463 *Campylobacter jejuni* protein that is secreted through the flagellar filament.  
464 Infect. Immun. 75, 3859–3867. doi: 10.1128/IAI.00159-07
- 465 Ripabelli, G., Tamburro, M., Minelli, F., Leone, A., Sammarco, M.L., 2010.  
466 Prevalence of virulence-associated genes and cytolethal distending toxin  
467 production in *Campylobacter* spp. Isolated in Italy. Comp. immunol.  
468 microbiol. Infect. dis. 33, 355–364. doi: 10.1016/j.cimid.2008.12.001
- 469 Rosenquist, H., Somme, H.M., Nielsen, N.L., Christensen, B.B., 2006. The  
470 effect of slaughter operations on the contamination of chicken carcasses  
471 with thermotolerant *Campylobacter*. Int. J. Food Microbiol. 108, 226–232.  
472 doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.12.007
- 473 Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M.A., Roy,  
474 S.L., Jones, J.L., Griffin, P.M., 2011. Foodborne illness acquired in the  
475 United States—major pathogens. Emerg. Infect. Dis. 17, 7–15. doi:  
476 10.3201/eid1701.P11101
- 477 Sheppard, S.K., Maiden, M.C., 2015. The evolution of *Campylobacter jejuni* and  
478 *Campylobacter coli*. Cold Spring Harb Perspect Biol. 7, 8. doi:  
479 10.1101/cshperspect.a018119.
- 480 Shyaka, A.A., Kusumoto, A., Chaisowwong, W., Okouchi, Y., Fukumoto, S.,  
481 Yoshimura, A., Kawamoto, K., 2015. Virulence characterization of  
482 *Campylobacter jejuni* isolated from resident wild birds in Tokachi area,  
483 Japan. J. Vet. Med. Sci. 77, 967–972. doi: 10.1292/jvms.15-0090
- 484 Silva, N., Junqueira, V.C.A., Silveira, N.F.A., Taniwaki, M.H., Santos, R.F.S.,  
485 Gomes, R.A.R., 2007. Manual de métodos de análise microbiológica de  
486 alimentos, 3<sup>a</sup> Edição, São Paulo: Varella, 2007.
- 487 Thakur, S., Zhao, S., McDermott, P.F., Harbottle, H., Abbott, J., English, L.,  
488 Gebreyes, W.A., White, D.G., 2010. Antimicrobial resistance, virulence, and  
489 genotypic profile comparison of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter*  
490 *coli* isolated from humans and retail meats.  
491 Foodborne Pathog. Dis. 7, 835–844. doi: 10.1089/fpd.2009.0487
- 492 WHO, World Health Organization, 2012. The Global View Of  
493 Campylobacteriosis. Report Of Expert Consultation.

494        [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/80751/1/9789241564601\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/80751/1/9789241564601_eng.pdf).  
495        (accessed 20.05.16)

496        Williams, M.S., Golden, N.J., Ebel, E.D., Crarey, E.T., Tate, H.P., 2015.  
497        Temporal patterns of *Campylobacter* contamination on chicken and their  
498        relationship to campylobacteriosis cases in the United States. *Int. J. Food  
499        Microbiol.* 208, 114-21. doi: [10.1016/j.ijfoodmicro.2015.05.018](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.05.018).

500        Zheng, J., Meng, J.H., Zhao, S.H., Singh, R., Song, W.X., 2006. Adherence to  
501        and invasion of human intestinal epithelial cells by *Campylobacter jejuni*  
502        and *Campylobacter coli* isolates from retail meat products. *J. Food Prot.* 69,  
503        768–774.

504

505

506

507

508

509

510

511

512

513

514 **LEGENDA DAS FIGURAS**

515

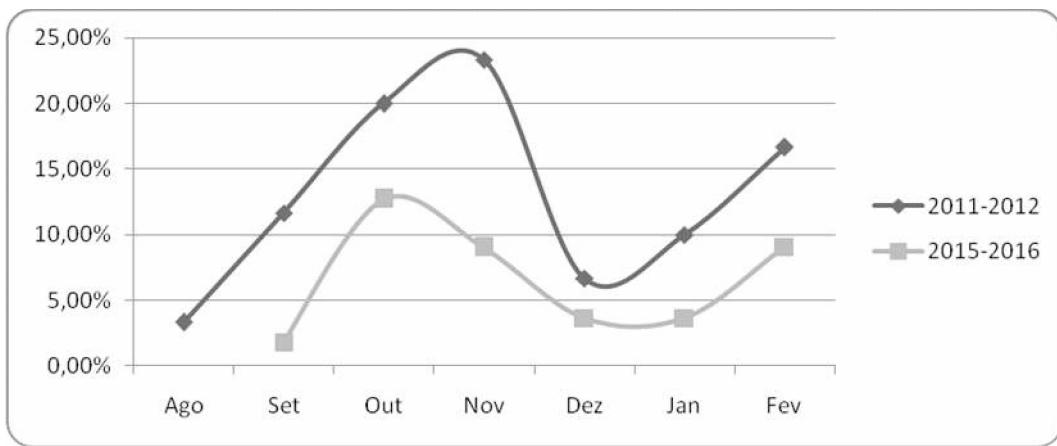
516 **Figura 1:** Variação temporal no percentual de isolamento de *C. jejuni* em  
517 carcaças de frango provenientes de uma empresa exportadora, no Brasil.

518

519 **Figura 2:** Frequência de cepas de *C. jejuni* resistentes a cada antibiótico nos  
520 períodos: (1) 2011-2012 (55 cepas) e (2) 2015-2016 (44 cepas); AMO –  
521 amoxacilina com clavulanato; GEN – gentamicina; ERI – eritromicina; TET –  
522 tetraciclina; \*p<0,05 usando teste exato de Fisher.

523

524 **Figura 3:** Dendrograma comparativo de *C. jejuni* utilizando coeficiente de  
525 similaridade de Dice com tolerância de 1% e método UPGMA com otimização  
526 de 0,80%. Perfis A ao S – diferentes *clusters*, com homologia superior a 80%.



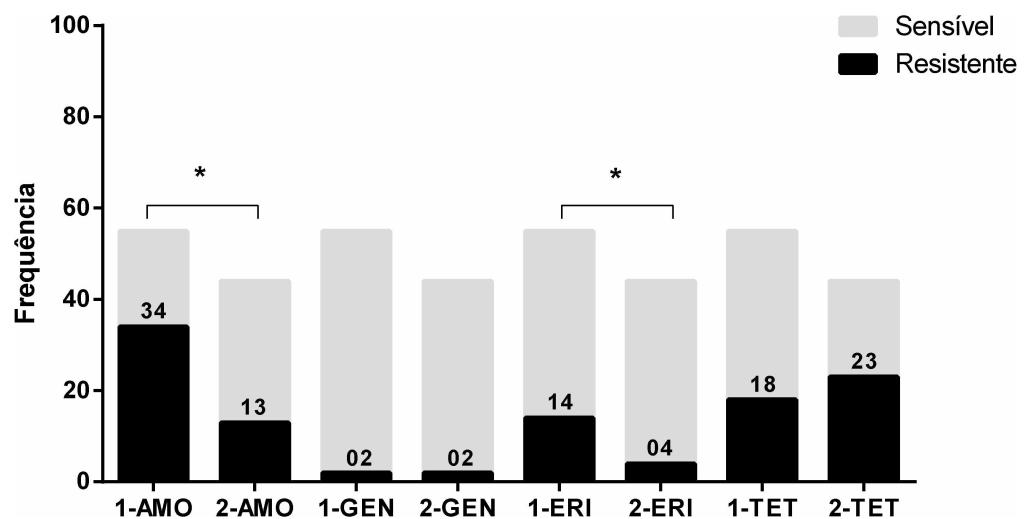
527  
528 **Figura 1**

529

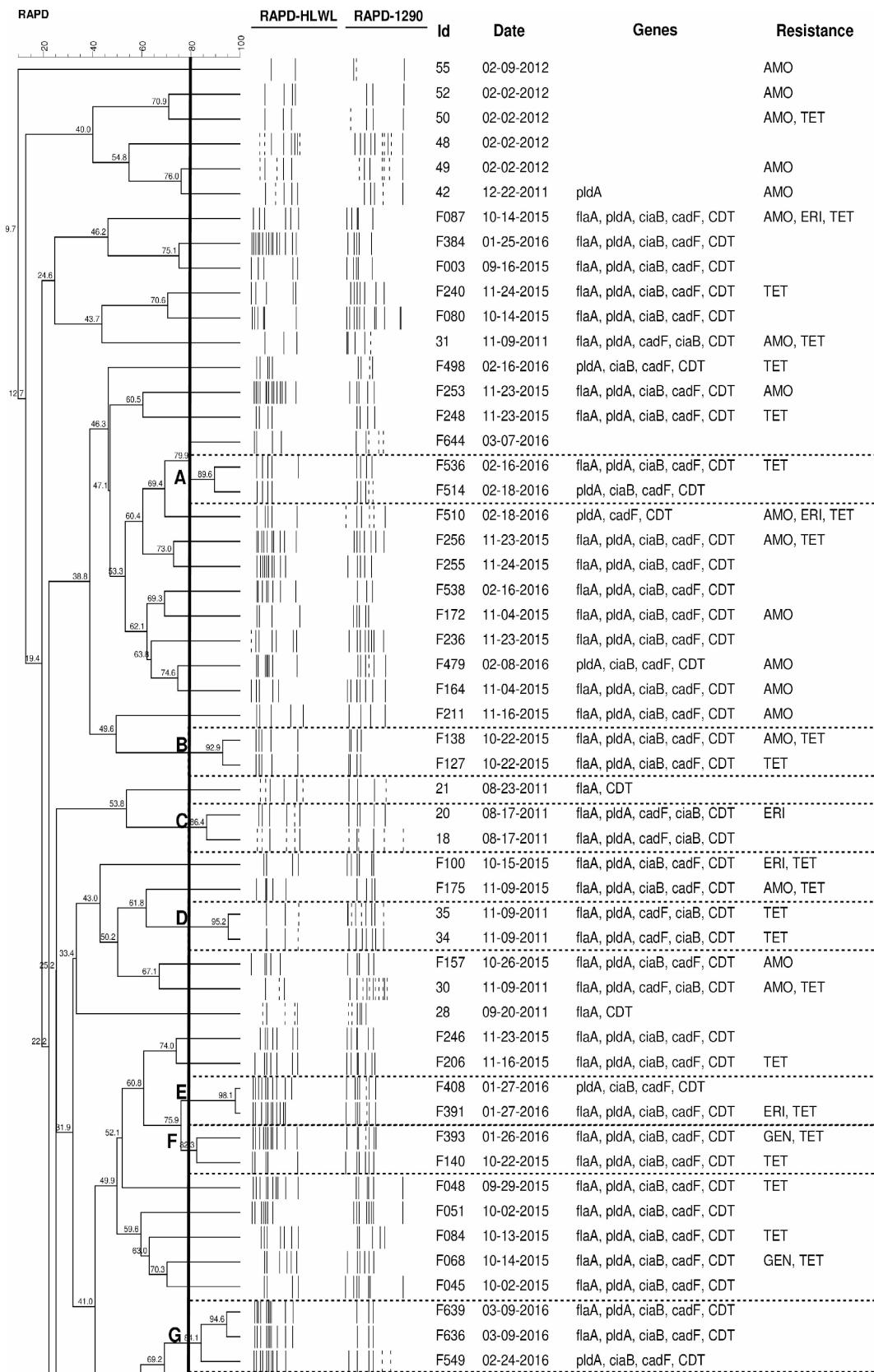
530

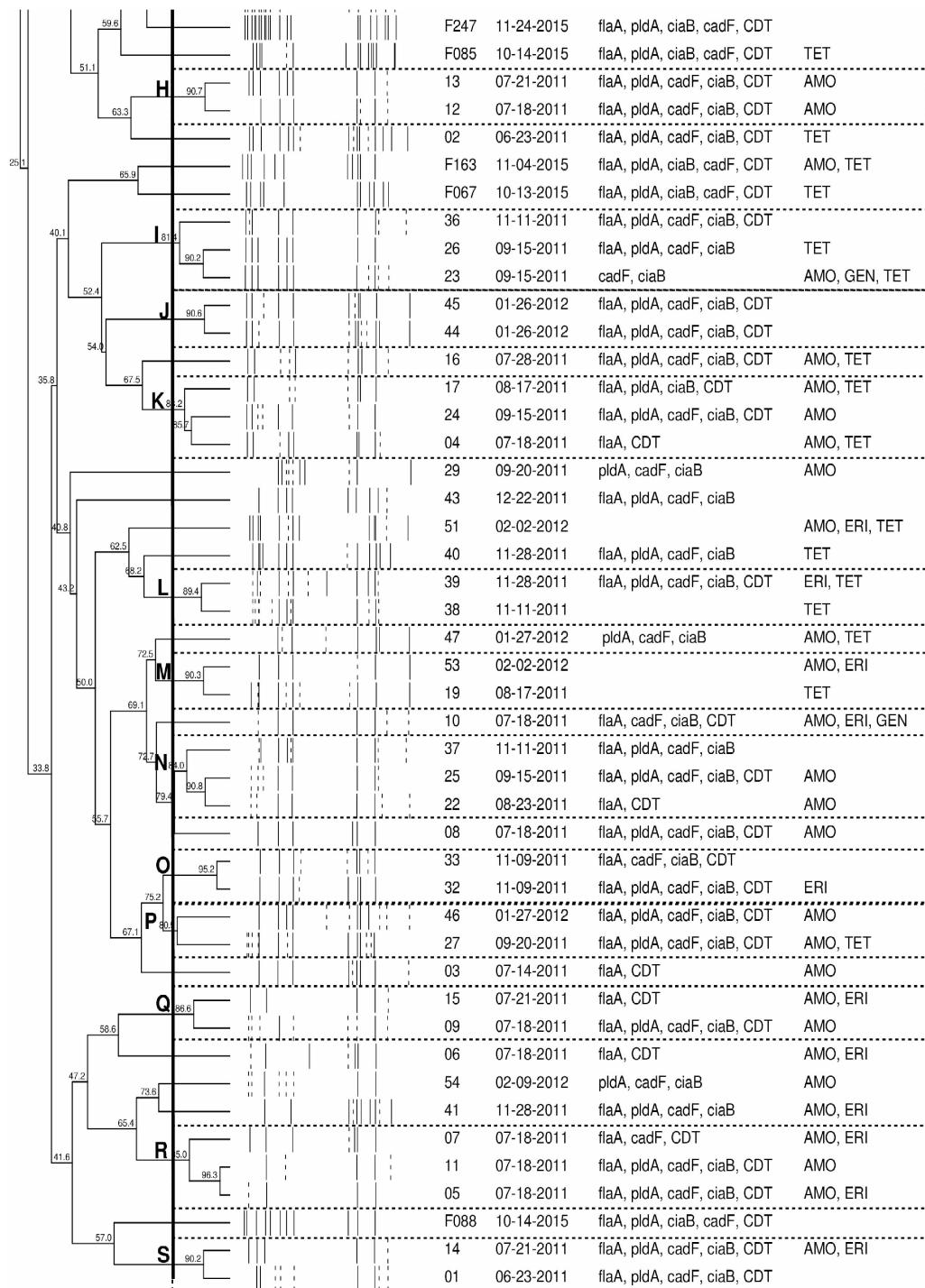
531

532



533  
534 **Figura 2**





537

538 **Figura 3**

## CAPÍTULO 3

**Intrinsic and extrinsic aspects on *Campylobacter jejuni* biofilms**

Artigo a ser publicado no periódico  
**Frontiers in Microbiology**

# 1 INTRINSIC AND EXTRINSIC ASPECTS ON *Campylobacter* 2 *jejuni* BIOFILMS

6 Roberta Torres de Melo<sup>1,2</sup>, Eliane Pereira Mendonça<sup>1,2</sup>, Guilherme Paz Monteiro<sup>1,2</sup>,  
7 Mariana Cristina Siqueira<sup>1</sup>, Clara Boaventura Pereira<sup>1</sup>, Phelipe Augusto Borba Martins  
8 Peres<sup>1</sup>, Heriberto Jaramillo Fernandez<sup>3</sup>, Daise Aparecida Rossi<sup>1,2</sup>

11 <sup>1</sup> Laboratory of Applied Animal Biotechnology, Federal University of Uberlândia,  
12 Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

14 <sup>2</sup> Laboratory of Molecular Epidemiology, Federal University of Uberlândia, Uberlândia,  
15 Minas Gerais, Brazil.

17 <sup>3</sup> Institute of Clinical Microbiology, Chile Austral University, Valdivia, Chile.

22

23 \* Corresponding author:

24 Ms. Roberta Torres de Melo

26 **Abstract**

27 Biofilm represents a way of life that allows greater survival of microorganisms in  
28 hostile habitats. *Campylobacter jejuni* is able to form biofilms in vitro and on surfaces  
29 at several points in the poultry production chain. Genetic determinants related to their  
30 formation are expressed differently between strains and external conditions are decisive  
31 in this respect. Our approach combines phylogenetic analysis and the presence of seven  
32 specific genes linked to biofilm formation in association with traditional microbiology  
33 techniques, using Mueller Hinton and chicken juice as substrates in order to quantify,  
34 classify, determine the composition and morphology of the biomass of simple and  
35 mixed biofilms of 30 *C. jejuni* strains. It also evaluates the inhibition of its formation by  
36 biocides commonly used in industry and also by zinc oxide nanoparticles. Genetic  
37 analysis showed high heterogeneity with the identification of 23 pulsotypes. Despite the  
38 diversity, the presence of *flaA*, *cadF*, *luxS*, *dnaJ*, *htrA*, *cbrA* and *sodB* genes in all  
39 strains shows the high potential for biofilm formation. This ability was only expressed  
40 in chicken juice, where they presented phenotype of a strong biofilm producer, with a  
41 mean count of 7.37 log CFU/mL and an ultrastructure characteristic of mature biofilm.  
42 The composition of simple and mixed biofilms was predominantly composed by  
43 proteins. The exceptions were found in mixed biofilms with *P. aeruginosa*, which  
44 includes a carbohydrate-rich matrix, lower ability to sessile form in chicken juice and  
45 compact architecture of the biofilm, this aspects are intrinsic to this species.  
46 Hypochlorite, chlorhexidine and peracetic acid were more effective in controlling viable  
47 cells of *C. jejuni* in biofilm, but the existence of tolerant strains indicates exposure to  
48 sublethal concentrations and development of adaptation mechanisms. This study shows  
49 that in chicken juice *C. jejuni* presents greater potential in producing mature biofilms.  
50

51 **Keywords:** Campylobacteriosis; Poultry industries; Chicken juice; Capacity of biofilm  
52 formation; Genetic apparatus; Resistance to biocides.  
53

54

55

56

57 **1. Introduction**

58 *Campylobacter jejuni* is one of the pathogens most commonly involved in food-  
59 borne gastroenteritis worldwide. It infects about one million people in the United States  
60 each year and in Europe this rate reaches more than 200,000 (Scallan et al., 2011;  
61 EFSA, 2015). In addition, an estimated number of 1/1000 clinical cases may result in  
62 more severe neurological conditions, including Guillain-Barré Syndrome (Nachamkin et  
63 al., 1998).

64 The main reservoir of this microorganism is the intestinal tract of birds and other  
65 endothermic animals, and is often isolated in chicken meat. Generally, consumption of  
66 this undercooked meat is the cause of human host infection (Guyard-Nicodeme et al.,  
67 2013). The risk is consistent with the high levels of contamination found in studies  
68 conducted in Europe, USA and United Kingdom, which shows contamination higher  
69 than 70% in chicken carcass flocks (EFSA, 2015; Lawes et al., 2012; Batz et al., 2012).

70 Due to the large number of reported cases of campylobacteriosis, it has become  
71 necessary to use epidemiological typing, method that allows the characterization and  
72 discrimination of bacterial strains. The data obtained in these investigations can be used  
73 by public health surveillance in identifying the causes of food outbreaks (Nakari, 2011).  
74 Among these methods, PFGE, pulsed-field gel electrophoresis, is considered the gold  
75 standard in bacterial epidemiological analyzes, since it allows a high discriminatory  
76 power compared to other techniques (Goering, 2010).

77 The paradox between the rigorous growth conditions of *C. jejuni* in the  
78 laboratory and the ubiquity as an effective and constant pathogen in chicken samples  
79 represents one of the most notable characteristics of *C. jejuni* (Mihaljevic et al., 2007).  
80 One of the strategies that *C. jejuni* can use to overcome its fragility in the face of  
81 environmental hostility is the ability to form biofilms. These structures represent a mode  
82 of growth and survival, in which the bacterial transits from free living to sessile form,  
83 attached to a biotic or abiotic surface surrounded by a viscous matrix that protects from  
84 stressful environmental conditions (Kostakioti et al., 2013). These communities increase  
85 the survival of this microorganism under unfavorable conditions, such as the presence  
86 of antibiotics and chemical agents (Ica et al., 2012; Joshua et al., 2006; Trachoo and  
87 Frank, 2002; Drozd et al., 2014).

88 A serious problem in the chicken processing industries is the insufficient  
89 removal of organic material composed of a complex mixture of carbohydrates, proteins,

90 lipids and sugars (Chmielewski and Frank, 2007) of the surfaces, which provides an  
91 ideal medium for microorganisms to multiply and survive. This environment assists in  
92 bacterial fixation to surfaces by altering the physicochemical properties of the surface  
93 and by the greater availability of nutrients (Hwang et al., 2012; Dat et al., 2010). Trying  
94 to simulate the nutritional conditions on the abiotic surfaces during processing, a model  
95 system with “chicken juice” (Brown et al., 2014) is used, based on the supplementation  
96 of culture medium with defrosted filter-sterilized poultry exudates (Birk et al., 2006).

97 The extracellular matrix is an essential component of bacterial biofilms, and  
98 normally, corresponds for more than 90% of the dry mass of a biofilm (Flemming and  
99 Wingender, 2010). In addition, it allows the cells to remain hydrated and metabolically  
100 active, imprisoning nutrients and liquids near the bacterial cells. It also reduces the  
101 access of large molecules, such as antimicrobials (Billings et al., 2013), allowing  
102 bacterial persistence, beyond being structurally important, once it maintains the biofilm  
103 shape and ensures its cohesion (Sutherland, 2001). Knowing the composition and  
104 architecture of the extracellular matrix of biofilms is important, as it helps in the use of  
105 tools that improve efficiency and disinfection strategies.

106 The molecular mechanisms that regulate biofilm formation of *C. jejuni* are still  
107 poorly understood. Some of the genes involved in the process include the ones  
108 responsible for cell motility (*flaA*) (Reuter et al., 2010), cell adhesion (*cadF*), quorum-  
109 sensing (*luxS*) (Plummer, 2012) and stress response (*dnaJ*, *cbrA*, *htrA* and *sodB*) (Oh  
110 and Jeon, 2014).

111 The biofilm formation is flagella-mediated at the first moment of the adhesion,  
112 together with the proteins involved in cell adhesion, although its functionality is not  
113 crucial (Svensson et al., 2014). Detection of quorum-sensing markers indicates ability  
114 of binding between cells, development and detachment of biofilm (Plummer, 2012).  
115 Already the markers involved in the stress response play a decisive role, contributing to  
116 a superexpression of the capacity of formation of sessile cells (Oh and Jeon, 2014).

117 The aim of this study was to carry out a phylogenetic analysis on *C. jejuni*  
118 strains isolated from chicken carcasses for internal and external consumption, followed  
119 by a qualitative and quantitative study on the formation of biofilms, including molecular  
120 aspects involving the presence of specific genes, the architecture and composition of  
121 these structures and also the interaction of these strains in mixed biofilms under  
122 conditions with and without supplementation with chicken juice. Finally, the objective

123 was to evaluate the performance of different chemical agents in the removal of *C. jejuni*  
124 bacterial biomass to establish control strategies at industry.

125

126

127 **2. Material and Methods**

128

129 **2.1. Strains and growth conditions**

130 The study was conducted with 30 *C. jejuni* strains from the analysis of 280  
131 cooled chicken carcasses ready for commercialization from September to November of  
132 2015, from a Brazilian poultry exporting industry, with a complete production cycle.

133 Isolation was previously performed according to International Standards  
134 Organization (ISO, 2006) and identification of the species was done by multiplex PCR  
135 according to Harmon et al. (1997). After confirmation, the strains were stored at -80 ° C  
136 in UHT skimmed milk.

137 To perform subcultures for reactivation, the strains were seeded for 48 hours in  
138 Bolton broth (Oxoid) supplemented with 5% of defibrinated ram blood (Laborclin) at  
139 37°C in microaerophilic conditions (Probac), followed by plaque peal in CCDA Agar  
140 (*Campylobacter* Blood-Free Selective Agar Base) (Oxoid) incubated under the same  
141 conditions (ISO, 2006).

142 In the adhesion and biofilm assays, the strains were cultured for 48 hours under  
143 microaerophilya at 37°C in 20 mL of Mueller Hinton broth (MH) (Difco), using as  
144 inoculum the culture present in the plates of CCDA Agar. In parallel, these assays were  
145 performed using 20 mL of Mueller Hinton broth supplemented with 5% of chicken juice  
146 (Birk et al., 2004) - equivalent to the 100% concentration according to Brown et al.  
147 (2015) - to simulate the conditions of industry. After growing and obtaining the  
148 inoculum of 10<sup>4</sup> CFU/mL of the strains corresponding to a OD<sub>600</sub>=0.22 to 0.28, the cells  
149 were centrifuged (5,000rpm, 10 minutes, 4°C) and washed twice (0.9% NaCl) before the  
150 beginning of cultures for adhesion and biofilm assays.

151 For the image analysis of simple and mixed biofilms in scanning electron  
152 microscopy (SEM) the conditions of growth and formation of biofilm was predicted for  
153 *Campylobacter*. Both, in the SEM and in the biofilm matrix composition assay, only  
154 three *C. jejuni* strains, phylogenetically distinct by PFGE and with different  
155 classifications of BFI (Biofilm Formation Index) were used.

156 In phylogenetic analysis by PFGE, the bacteria were cultured at 42 °C overnight  
157 in a brain and heart infusion agar (BHI agar) with 5% of defibrinated sheep blood under  
158 microaerophilic conditions. The present culture on the agar was resuspended in saline  
159 (0.85% NaCl) until reaching OD<sub>610</sub>=0.570-0.820 for carrying out the enzymatic  
160 digestion process.

161 Controls used in the study were *C. jejuni* strains (ATCC 33291, NCTC 11351  
162 and IAL 2383) and *C. coli* (ATCC 43478). For mixed cultures, *Escherichia coli* strain  
163 (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (PAO 1), *Salmonella Enteritidis* (ATCC  
164 13076) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) were used.

165

## 166 **2.2.Adhesion Test**

167 The adhesion test was performed according to Sulaeman et al. (2009) with  
168 modifications. Briefly, 200µl of the bacterial suspension containing 10<sup>4</sup> cells prepared  
169 in MH broth and MH with 5% of chicken juice was added in 96-well plates. After  
170 incubation for 4 hours at 37°C under microaerophylia, the adherent bacteria were  
171 washed twice with 0.9% NaCl solution and collected by scraping wells for 90 seconds.  
172 The obtained cell suspension was serially diluted and seeded in CCDA agar for  
173 enumeration in CFU. All strains were evaluated in triplicate and in three independent  
174 replicates.

175

## 176 **2.3.Qualitative biofilm formation test**

177 Biofilms were formed as described by Kudirkiene et al. (2012), with  
178 modifications. Briefly, 200µl of the bacterial suspension containing 10<sup>4</sup> cells prepared  
179 in MH broth and MH with 5% of chicken juice was added in 96-well plates. For  
180 biomass formation, the plates were incubated for 48 hours at 37°C in microaerophilic  
181 conditions.

182 After incubation, the media were removed, the wells were washed twice with  
183 0.9% NaCl solution and dried for 30 minutes at 55°C. Total biomass was measured by  
184 fixation with 0.1% Crystal Violet (LaborClin) for 5 minutes, followed by elution with  
185 alcohol-acetone solution, containing 80% of ethanol and 20% of acetone (Synth®). The  
186 eluted dye was removed from each well and placed in a new 96-well microtiter plate for  
187 reading at OD<sub>595</sub>. The assays were done with eight replicates for each strain in three

188 replicates. For the determination of the Biofilm Formation Index, the following formula  
189 was used:

190 
$$\text{BFI} = \frac{\text{BA} - \text{PC}}{\text{BS}}$$

191

192  
193 Where BFI represents the final result regarding the Biofilm Formation Index,  
194 BA the optical density obtained in the mixture of bacteria adhered, PC the absorbance  
195 value in the control wells without microorganisms, BS the optical density of the  
196 suspended cultures (Naves et al., 2008). The final classification followed Table 1.

197

#### 198 **2.4. Quantitative biofilm formation test**

199 The number of sessile cells was determined by counting in CFU. After biofilm  
200 formation as described in the previous item, the wells were washed twice with a 0.9%  
201 NaCl solution, and the biomass was removed by scraping the wells for 90 seconds. The  
202 obtained cell suspension was serially diluted and plated on CCDA agar plates to obtain  
203 the number of CFU. All the assays were performed in triplicate, on three independent  
204 occasions.

205

#### 206 **2.5. Identification of specific genes**

207 The genomic DNA was extracted by the Wizard Genomic DNA Purification Kit  
208 (Promega), following the protocol provided by the manufacturer. Purified DNA (10 ng)  
209 was used as template for all PCR reactions. The PCR conditions and primers used in  
210 this study are described in Table 2.

211 The studied genes were *flaA* (motility), *cadF* (intracellular colonization), *luxS*  
212 (quorum-sensing mechanism), *dnaJ* (thermotolerance), *htrA* (aids in growth under  
213 stress), *cbrA* (resistance to osmotic shock) and *sodB* (tolerance to oxidative stress).

214 PCR reactions were performed using the GoTaq® Green Master Mix kit  
215 (Promega) according to the manufacturer's instructions. The amplified products were  
216 subjected to 1.5% agarose gel electrophoresis using the TBE 0.5x runner buffer  
217 (Invitrogen) and as a molecular weight standard of 100pb marker (Invitrogen).

218

#### 219 **2.6. Biofilm Inhibition Test**

220 To examine the interaction between *C. jejuni* biofilms with biocides components  
221 and nanoparticles, the protocol described by Lu et al. (2012) was used. The chemical  
222 compounds tested were: Chlorhexidine 1% solution, Sodium Hypochlorite 1%,  
223 Peracetic Acid 0.8% and Zinc Oxide (ZnO) nanoparticles 6 mmol/L.

224 A 100  $\mu$ L aliquot corresponding to  $10^7$  cells was inoculated onto a sterile  
225 cellulose membrane with 0.45 $\mu$ m of porosity and 47mm of diameter on a *Brucella* agar  
226 plate (Disco) enriched with 5% of defibrinated sheep blood. The plates were incubated  
227 at 37°C in microaerophilia and in every 24 hours the membrane was transferred to a  
228 new plate, during three days.

229 Subsequently, the membrane was placed in a flask containing 20mL of MH  
230 broth with respective concentrations of the chemical compounds. The vials were  
231 incubated in microaerophylia at 37°C for 24 hours. Subsequently, the membrane was  
232 washed three times with phosphate buffer (PBS), followed by treatment in 25mL of  
233 0.1% trypsin for 15 minutes at room temperature. Thereafter, the resulting solution of  
234 the incubation underwent serial dilutions for further counting.

235

## 236 **2.7.Biofilm stability test**

237 The biofilm stability assay was performed according to the protocol described by  
238 Chaignon et al. (2007), with some modifications. Biofilms were formed into 96-well  
239 plates as described above. After 48 hours of growth, the culture medium was removed,  
240 the wells were washed twice with sterile 0.9% NaCl solution and then filled with 200 $\mu$ L  
241 of a proteinase K solution (Invitrogen, USA) on concentration of 1 mg/ml in 20 mM  
242 Tris (pH 7.5) and 100 mM NaCl or 200 $\mu$ L of a 10mM sodium metaperiodate solution  
243 (Sigma-Aldrich, USA) prepared in 50 mM acetate buffer (pH 4.5). The plates were  
244 incubated for 2 hours at 37°C. After treatment, the biofilms were washed with 200 $\mu$ L of  
245 sterile 0.9% NaCl and stained with 1% crystal violet. The absorbance was evaluated on  
246 a plate reader at 595nm with alcohol-ketone as white. The experiment was performed in  
247 biofilms of three *C. jejuni* strains formed with chicken juice. All assays were performed  
248 in eight wells, on three independent occasions.

249

## 250 **2.8.Scanning Electron Microscopy**

251 The preparation of the material for analysis in SEM was done according to  
252 Brown et al. (2014) with modifications. Simple and mixed biofilms in the MH and

253 chicken juice media were formed in glass beads with a diameter of 5 mm, respecting the  
254 growth conditions described for *Campylobacter*. After biomass formation, the samples  
255 were fixed with 2.5% glutaraldehyde and 2.5% paraformaldehyde in 0.1M buffer PBS  
256 (pH 7.4) overnight at 4°C. The fixative was removed, and the samples washed three  
257 times with PBS buffer. The beads were post-fixed with 1% osmium tetroxide for two  
258 hours and washed three times with PBS buffer. The beads were dehydrated in a series of  
259 ethanol solutions (30, 40, 50, 60, 70, 80, and 90% and then three times at 100%) for 20  
260 minutes for each step.

261 The samples were dried in CPD (Critical Drying Point) (CPD 030, Baltec,  
262 Germany) using liquid carbon dioxide as the transition fluid. The samples were coated  
263 with a 20nm thick layer of gold (SCD 050, Baltec, Germany) and visualized on MEV  
264 VP Zeiss Supra 55 SEM FEG operating at 5 kV.

265

## 266 **2.9.PFGE**

267 The isolates were typed by PFGE according to the protocol described in the  
268 CDC (2013). Digestion of the intact genomic DNA was done with 30U of the enzyme  
269 *Sma* I (Invitrogen) for 2 hours at 25°C. The DNA fragments were separated on 1%  
270 agarose gel (SeaKem Gold) in 0.5X TBE buffer in the CHEF DRIII (Bio-Rad)  
271 apparatus, for a period of 18 hours, with the following parameters, 200v, 120° angle ,  
272 Gradient of 6v/cm and buffer temperature of 14°C.

273 The gels were stained with ethidium bromide and photographed under UV light.  
274 The analysis for dendrogram formation was performed using GelCompare II software.  
275 The comparison of the band patterns was performed by the UPGMA analysis method,  
276 using the Dice similarity coefficient.

277

## 278 **2.10.Statistical analysis**

279 The obtained results were analyzed using GraphPad Prism, version 6.0.  
280 Qualitative and quantitative biofilm formation tests were evaluated using simple  
281 variance analysis (ANOVA). For the biofilm inhibition test, ANOVA was used to  
282 compare the results of the control with the resistant strains in the test groups, and to  
283 analyze the counts between the control strains and tests separately. For the simple  
284 comparisons of two variables, in the biofilm stability test, Student's t-test was used. All  
285 tests were performed at a confidence level of 95%.

286

287

288 **3. Results**

289

290 **3.1. Ability to adhere to the abiotic surface**

291 The adhesion assays were conducted in Mueller Hinton and Muller Hinton  
292 supplemented with chicken juice media with an initial bacterial concentration of  
293 approximately  $10^3$  CFU/well. The indices found showed that the ability to adhere to the  
294 polystyrene varied according to the strain.

295 The results showed that all tested strains had adhesion capacity when inoculated  
296 in Muller Hinton (MH) and MH + 5% of chicken juice, but there was a reduction in  
297 counts ( $p < 0.05$ ) compared to the initial inoculum when the strains were held at Mueller  
298 Hinton.

299 In Mueller Hinton, 46.7% (14/30) of the strains showed medium adhesion  
300 pattern, with a count above the average in all the tests, and 53.3% (16/30) of the strains  
301 showed weak adhesion by presenting lower values than those obtained in the general  
302 mean of the initial inoculum ( $p < 0.05$ ), as shown in Figure 1.

303 The values were significantly higher ( $p < 0.05$ ) when the strains were inoculated  
304 in the chicken juice, with all 30 (100%) strains classified as strongly adherent, because  
305 they had higher counts than the initial inoculum.

306 The ability of these strains to adhere strongly in conditions similar to those  
307 present in the avian industry (chicken juice) helps to explain their survival and  
308 persistence in the slaughterhouse. The four-hour incubation period was sufficient for the  
309 initial establishment of the biofilm structure, and thus could act as a constant source of  
310 contamination in the industry.

311 The nutritive particles available in chicken juice can form a thin layer above the  
312 surface of the polystyrene wells and on glass surfaces that facilitate this bacterial  
313 adhesion (Li, 2016).

314

315 **3.2. Classification and quantification of *C. jejuni* biofilms**

316 All of *C. jejuni* strains (100%) were capable of forming strong biofilms when  
317 supplemented with chicken juice by the crystal violet test. The same did not occur when  
318 in the presence of Mueller Hinton, where none of the strains presented a strong producer

319 profile under this condition. The inclusion of chicken juice promoted a significant  
320 increase in bacterial biomass, increasing in average 1.70 the Biofilm Formation Index  
321 (BFI) when compared to the value found in non-supplemented samples.

322 In the condition not supplemented with chicken juice, 10/30 (33.3%) strains did  
323 not form biofilms, 13/30 (43.3%) were classified as weak producer and 7/30 (23.3%) as  
324 medium producer.

325 These data shows that surfaces in contact with food inside the industry may  
326 harbor these biofilms, since there is a constant presence of chicken juice during the  
327 processing of chicken carcasses. If hygiene measures are not frequent and sufficiently  
328 conducted, the exudate present in the chicken carcass guarantees conditions for *C. jejuni*  
329 maintenance.

330 The data obtained in the biofilm counts proved the differences obtained in the  
331 tests with crystal violet. Starting from a constant initial inoculum ( $p>0.05$ ) in all assays,  
332 it was observed that in both, the adhesion and biofilm formation, had a significant  
333 increase in the counts obtained in Chicken juice when compared to the counts in  
334 Mueller Hinton (Table 4).

335 The results obtained in the adhesion assays showed that in relation to the initial  
336 inoculum there was a significant reduction in the counts when the strains were  
337 inoculated in MH and a significant increase in the chicken juice ( $p<0.05$ ). This fact  
338 reveals the difficulty of maintaining and developing the initial structure of the biofilm in  
339 Mueller Hinton.

340 The values obtained in the adhesion in chicken juice were similar to those found  
341 after 48 hours (biofilm) in MH, indicating another evidence of the superiority of  
342 chicken juice in the establishment of the sessile form of *C. jejuni*. In addition, the high  
343 counts detected in chicken juice after biofilm formation suggest the maturity of the  
344 biofilm in its final stages.

345

### 346 **3.3. Genetic repertoire related to sessile form of *C. jejuni***

347 Analysis of the seven genes potentially required for the formation of strong  
348 biofilms in *C. jejuni* showed that all strains (100%) have the potential to form strong  
349 biofilms, since all the genes evaluated were identified in the 30 strains.

350 These findings are consistent with the results obtained in the counts and the  
351 colorimetric test (crystal violet) of the biofilms of *C. jejuni* in the presence of chicken

352 juice. This supplement probably allowed expression of genes associated with the  
353 transition to sessile form, including the studied genes.

354

### 355 **3.4.Chemical agents reduce *C. jejuni* biofilm**

356 The use of chemical agents had a high potential for elimination of viable cells  
357 from *C. jejuni* biofilms. For all the used products, was a significant reduction in the  
358 bacterial counts in relation to the untreated biofilm. In 17/30 (56.7%) of biofilms, total  
359 elimination of the microorganism was observed for all chemical agents tested.

360 Figure 2 shows the counts obtained in the untreated biofilms, which obtained a  
361 mean value of 6.41 Log CFU/mL ( $p>0.05$ ), and the resistant biofilms treated with the  
362 different products that showed growth after 24 hours in contact.

363 The inclusion of sodium hypochlorite 1% allowed the survival of 6/30 (20.0%)  
364 of the strains, with a mean count of 1.30 log CFU/mL. This value did not differ between  
365 strains ( $p>0.05$ ), and demonstrated a reduction of about 5.11 log cycles relative to  
366 untreated biofilm.

367 There was also no difference in counts after the use of chlorhexidine 1%  
368 ( $p>0.05$ ) for 4/30 (13.3%) strains tolerant to this agent. The mean count of 1.33 log  
369 CFU/mL after treatment showed a mean decrease of 5.08 log cycles compared to the  
370 control.

371 For peracetic acid and ZnO nanoparticles (NPs), the reduction in the number of  
372 CFUs varied significantly ( $p<0.05$ ) among the tolerant strains, indicating that  
373 persistence in the presence of these agents may be a characteristic strain-dependent.

374 Seven of the 30 strains (23.3%) in the sessile form survived in the presence of  
375 peracetic acid with counts varying from 1.34 to 2.16 log of CFU/mL. Therefore, the  
376 reduction was from 4.25 to 5.07 log cycles compared to the control.

377 In the presence of ZnO NPs, it was observed that 13/30 (43.3%) strains were  
378 tolerant and presented the highest log of CFU/mL, alternating from 2.09 to 4.07. The  
379 decrease was from 2.34 to 4.32 log cycles in relation to the control.

380 In general, chlorhexidine 1%, sodium hypochlorite 1% and peracetic acid 0.8%  
381 presented equivalent efficiency in the control of *C. jejuni* biofilm ( $p>0.05$ ), due to the  
382 high number of biofilms removed and by the low counts obtained for the resistant  
383 strains. ZnO NPs presented the lowest treatment efficacy ( $p<0.05$ ).

384 Table 5 shows the resistance profiles of the agents obtained for the 13 strains  
385 that showed growth after the biofilm inhibition test.

386 The presence of biofilms resistant to disinfectant agents shows that there are  
387 probably intrinsic or extrinsic adaptive mechanisms that allow their survival. Two  
388 strains showed resistance profile VI (F206 and F246), that is, they are tolerant to all  
389 agents and may characterize a problem in the industry due to the difficulty of  
390 eliminating them and the risk of dissemination of this characteristic to other strains.

391

### 392 **3.5. Structure and composition of *C. jejuni* and mixed biofilms**

393 At the Scanning Electron Microscopy assay we observed changes in biomass  
394 formed for the three types of biofilm patterns identified in the MH: F80 (unable to  
395 produce biofilm), F255 (weak producer) and F256 (medium producer). In addition,  
396 difference in yield was noted when the substrate for its growth was supplemented with  
397 chicken juice (Figure 3).

398 Figure 3a shows the presence of isolated bacteria, indicating the inability to form  
399 biofilm in this condition. In 4c and 4e the initial formation of biofilm is observed, with  
400 primary production of extracellular matrix. Already in 3b, 3d and 3f (in chicken juice)  
401 there is formation of the mature biofilm, with a tridimensional structure of the evident  
402 matrix.

403 The composition assay performed with proteinase K and sodium metaperiodate  
404 promoted protein degradation and carbohydrate oxidation (Figure 4).

405 In both MH and chicken juice biofilms, the proteinase treatment almost  
406 completely removed the biomass formed by the three strains tested. However, the  
407 carbohydrate oxidant showed little or no effect (F255 in MH) on the biofilm produced  
408 by these strains.

409 For the mixed biofilm assays of *C. jejuni* with *Escherichia coli*, *Pseudomonas*  
410 *aeruginosa*, *Salmonella Enteritidis* and *Staphylococcus aureus* the SEM demonstrated  
411 competitive disadvantage of the three strains of *C. jejuni* tested. The predominance of  
412 the other species was clear as shown in Figure 5, indicating the selection pressure  
413 exerted by the other species on *C. jejuni*.

414 In Figure 6 was possible to verify the alteration in the biomass formed by the  
415 crystal violet method compared to the control group composed of simple biofilm of only  
416 *C. jejuni*.

417 In practically all the tests, there was a higher production of biomass in relation to  
418 the control. The exception is in the mixed biofilms with *P. aeruginosa* that exhibited a  
419 different behavior from that found for the other species. In the presence of MH, the  
420 biofilm production was exacerbated ( $p<0.001$ ), but in chicken juice the biomass was  
421 significantly lower, showing that some factor present in chicken juice could inhibit the  
422 transition to sessile form in this specie.

423 This fact was also observed in SEM, by the formation of a denser biomass in  
424 MH when compared to chicken juice (Figure 5e and 5f).

425 The assays concerning to the composition of the matrix for mixed cultures are  
426 probably more related to the other species and not, in fact, to *C. jejuni*. For all mixed  
427 biofilms the composition was predominantly proteic, except for mixed biofilms with *P.*  
428 *aeruginosa* whose presence of carbohydrates was more evident (data not shown).

429

### 430 **3.6. Genetic diversity of *C. jejuni***

431 23 pulsotypes (A-V) were identified by PFGE, being 17 of them characterized as  
432 distinct profiles (Figure 7).

433 Five profiles (A, I, K, M and U) were classified as clusters with homology  
434 higher than 80%, composed of strains with the same genotype. The M-type pulse was  
435 designated as a clone because it showed 100% of similarity.

436 The K, M and U pulsotypes, grouped isolated strains on the same date,  
437 indicating possible cross-contamination among the samples. However, the A and I  
438 pulses presented isolated strains at different dates suggesting the persistence of this  
439 genotype in the industry, probably due to the biofilm formation.

440

441

## 442 **4. Discussion**

443

### 444 **4.1. Biofilms of *C. jejuni***

445 During the last decade, *C. jejuni* has been regularly presented as the leading  
446 cause of bacterial foodborne infections in Europe and the USA. Given the importance to  
447 public health of this zoonosis, it is relevant to understand the survival mechanisms  
448 adopted by this pathogen.

449 One of the mysteries of the genus *Campylobacter* is that it is a pathogenic  
450 microorganism that survives successfully in the host and industrial environment under  
451 stressful conditions, and paradoxically is a mandatory microaerophilic that survives  
452 poorly under controlled laboratory conditions. In addition, in comparison to other agents  
453 causing foodborne disease, such as *E. coli* and *Salmonella* spp., *C. jejuni* needs a low  
454 infective dose (500-800 CFU) to cause disease in the host (Black et al., 1988). Although  
455 this may contribute to infection, it is still unclear what allows the bacteria to survive  
456 during transmission under adverse conditions.

457 Survival in a biofilm would be an explanation to protect bacteria from various  
458 environmental stresses, antimicrobial agents and/or disinfectants and the immune  
459 response of the host.

460 In this study we found that these structures represent a reservoir of cells and that  
461 the level of biofilm formation by *C. jejuni* is clearly increased under conditions similar  
462 to those found in the industry with the presence of chicken juice.

463 The detection of viable cells in significant quantities in biofilms formed in  
464 chicken juice corroborates the idea that survival and persistence in the production chain  
465 may represent the main problem of contamination in final product. Despite the use of  
466 microaerophilya for this study, it is known that the mature biofilm can provide an  
467 adequate environment for microaerophilic growth allowing the ideal conditions for  
468 maintenance and dissemination of this pathogen (Reuter et al., 2010).

469 The biofilm formation involves the succession of several steps, starting with  
470 initial adhesion. For this reason, *C. jejuni*'s ability to adhere to a inert surface was  
471 investigated, in order to subsequently assess their ability to initiate and develop the  
472 biofilm. The adhesion capacity was variable and lower in the 30 strains tested in MH.  
473 The delayed adhesion profile may indicate less ability to acquire the sessile form, but  
474 may also be related to the need for a prolonged period of contact with the surface to lead  
475 to a stronger future adhesion (Turonova et al., 2015). In contrast, in chicken juice the  
476 counts showed high adhesion capacity for all strains. The medium supplemented with  
477 chicken juice allowed a better condition for adhesion to the inert surface (Li, 2016).

478 The results obtained in both colorimetric and quantitative tests revealed the  
479 superiority of chicken juice in relation to MH.

480 Chicken carcass exudates contain a complex mixture of carbohydrates, proteins,  
481 lipids and sugars (Chmielewski and Frank, 2007), providing an ideal medium for the

482 proliferation and survival of bacteria. The accumulation of these organic materials  
483 allows the formation of micro-layers on the surfaces that aid in bacterial fixation,  
484 together with greater availability of nutrients (Hwang et al., 2012).

485 Thus, in the industrial environment, the presence of meat-based exudates may  
486 exacerbate the problem of contamination by *C. jejuni*. Our results add and are consistent  
487 with the findings of Brown et al. (2015) who also detected the efficiency of chicken  
488 juice at different concentrations in the biofilm production for five *Campylobacter*  
489 strains.

490

#### 491 **4.2. Genetic apparatus of *C. jejuni***

492 Once the phenotypic characterization was performed concerning the sessile kind  
493 of living, analysis of the specific genes revealed that all strains possess the genes  
494 required to develop a biofilm.

495 Thus, gene identification in the strains of *C. jejuni* did not reveal any acquisition  
496 or exclusion of genes that could explain the differences in the classification of the  
497 biofilms formed in MH. In contrast, the identification of all the genes surveyed in all  
498 strains is consistent with the strong producer character obtained in chicken juice.  
499 Therefore, chicken juice is likely to provide all the necessary conditions for expression  
500 of the genetic potential recorded by the presence of *flaA*, *cadF*, *luxS*, *dnaJ*, *htrA*, *cbrA*  
501 and *sodB* genes. And that same ability is not detected in MH.

502 The genes linked to quorum-sensing, adhesion, adverse conditions and motility  
503 were all previously described as important for the acquisition of the sessile form  
504 (Kalmokoff et al., 2006; Svensson et al., 2009; Howlett et al., 2012; Sulaeman et al.,  
505 2012; Avila-Ramirez et al., 2013; van Alphen et al., 2014).

506 There are reports that flagellar expression is required for the formation of  
507 biofilms by *C. jejuni* (Reeser et al., 2007; Lehtola et al., 2006), including *flaA* and *flaB*  
508 genes (Reuter et al., 2010). However, the absence of these characteristics does not  
509 completely prevent the acquisition of the sessile form. The advantage in the expression  
510 of this characteristic is due to the initial fixation, biofilm structuring, orientation to a  
511 pre-existing biofilm in addition to the correlation with other non-flagellar extracellular  
512 proteins that contribute indirectly to the sessile lifestyle (Howard et al., 2009; Kim et  
513 al., 2015).

514 Numerous genes in *Campylobacter* were previously described as mediators of  
515 adhesion in vitro. Among them, the *cadF* gene that encodes the binding proteins CadF  
516 fibronectin (Konkel et al., 2010).

517 Several enzymes and proteins are already described by the involvement in  
518 bacterial protection against oxidative stress, whose action is related to peroxide or  
519 superoxide detoxification. Among them, the enzyme superoxide dismutase (SodB)  
520 appears as a major regulator in *C. jejuni* (Kim et al., 2015; Flint et al., 2014).

521 Some quorum-sensing systems have already been detected in *Campylobacter*.  
522 The production of AI-1 (acyl-homoserine autoinducer) represents one of these  
523 mechanisms, which accumulates in the extracellular environment and diffuses freely in  
524 the bacterial cytoplasm, which at high levels binds to a cellular transcription enhancer  
525 (*luxS*) that encodes the luciferase, a metabolic key enzyme in the SAM recycling  
526 pathway (S-adenosylmethionine). This metabolite is essential in the performance of  
527 important biosynthetic reactions such as the methylation of bacterial DNA, the synthesis  
528 of polyamines and bacterial vitamins. The most important performance of the *luxS* gene  
529 is associated with the synthesis of a new AI called autoinducer-2 (AI-2). Increased  
530 bacterial population growth also promotes elevation of AI-2 concentrations in the  
531 environment. The *luxS* gene acts in the formation of several molecular compounds,  
532 which together are called AI-2 variants. These molecules have potential for recognition  
533 and inclusion of mixed populations and of the same species in biofilms (Xavier and  
534 Bassler, 2005).

535 Much of *C. jejuni* has functional LuxS enzymes and is capable of producing AI-  
536 2. However, the presence of nutrients is necessary for the production of AI-2, and these  
537 are found in foods such as milk and chicken juice, even when the microorganisms are  
538 kept under adverse conditions, such as in oxidative stress and in low temperatures  
539 (Plummer, 2012; Ligowska et al., 2011; Parveen and Cornell, 2011; Tazumi et al.,  
540 2011).

541

#### 542 **4.3.Strategies for the elimination of viable cells of sessile *C. jejuni***

543 In the poultry industry investigated, the chemical agents: peracetic acid 0.8%,  
544 sodium hypochlorite 1% and chlorhexidine 1%; are used by the quality control team.  
545 On the other hand, ZnO NPs, represent a potential sanitizing agent for experimental use,  
546 with no usual application in hygiene in the food producing industries.

547 The results showed that the three agents used in the industry routine were more  
548 effective in elimination, although 9/30 (30.0%) of the strains were identified to be  
549 tolerant to at least one of them. In contrast, ZnO NPs showed less efficacy with 13/30  
550 (43.3%) resistant strains and with counts higher than the other agents.

551 The presence of tolerant strains to different sanitizers suggests that the use of  
552 these agents in the routine of the industrial environment in an inadequate way can result  
553 in the sublethal exposure to these biocides, representing a real risk for the adaptation of  
554 these bacteria, besides positively influencing the production of biofilms (Keeratipibul  
555 and Techaruvichit, 2012; Techaruvichit et al., 2016).

556 As for ZnO NPs it is possible that tolerant bacteria have already acquired  
557 characteristics that confer this resistance, such as the presence of efflux pumps, ZnO  
558 resistance genes and the ability to maintain intact the integrity of membrane. This  
559 characteristic has already been identified in *Escherichia coli* and *Enterococcus faecium*  
560 (Mileyeva-Biebesheimer, 2011).

561 Although the use of chemical compounds provides benefits in disinfection, they  
562 have the limitation of not destroying the residual structures of the biofilm matrix that  
563 may facilitate their resurgence or maintenance (Ohsumi et al., 2015). Thus, special  
564 efforts are required for the complete removal of highly adherent biofilms adapted to *C.*  
565 *jejuni* biocides (Techaruvichit, 2016).

566 Probably, the effectiveness in the control is possible by the association of  
567 hygiene plans with different agents, respecting the periods between cleaning, besides  
568 strategies, like the periodical rotation of biocides.

569

#### 570 **4.4. Architecture and constitution of *C. jejuni* and mixed biofilms**

571 For the three *C. jejuni* strains under sessile form in the glass beads, with MH  
572 substrate plus chicken juice, it was observed in SEM that the structure of the biofilm  
573 was quite similar, with a more expanded and stable architecture, besides the presence of  
574 irregular coverage along the surface of the sphere, consistent with the presence of  
575 several macrocolonies. Differently, in MH, this pattern varied according to the strain, so  
576 that the most developed structure observed was the presence of microcolonies that  
577 indicate the immature stage of the biofilm.

578 A study by Bronnec et al. (2016) compared the ultrastructure of two strains of *C.*  
579 *jejuni* in biofilm under microaerophilic and aerobiose conditions. The authors concluded

580 that the differences revealed the formation of mature and immature biofilm, being a  
581 strain-dependent characteristic.

582 The variations in the architecture of the formed biofilms can have relation not  
583 only with the nutrient available to the bacterium, but also because it is a strain-  
584 dependent character. Turonova et al. (2015) showed that *C. jejuni* NCTC 11168  
585 produces biofilm with multilayer type structure, while *C. jejuni* 81-176 was able to form  
586 finger-like biofilm with an open ultrastructure.

587 The capacity to form biofilm with open ultrastructure composed of wells and  
588 channels was identified in the three strains of *C. jejuni* tested in the presence of chicken  
589 juice. This type of heterogeneous structure gives the characteristic of a mature biofilm,  
590 which allows the formation of interconnected fluxes that aid in the access to nutrients  
591 for the cellular aggregates and in the drainage of the metabolic residues (Donlan and  
592 Costerton, 2002).

593 The composition assays allowed to identify that all strains reduced biomass with  
594 treatment with sodium metaperiodate and proteinase K, the last one being more  
595 significant. Thus, the treatment of biomass with products of proteolytic action can be  
596 considered an effective mechanism for partial degradation, allowing a better penetration  
597 of antimicrobial agents into the matrix. Although the use of proteinase K is expensive in  
598 the poultry industry, the effectiveness of the tests opens the prospects for the chemical  
599 industry to the development of other similar proteolitics and of lower cost, since they  
600 will probably not require the necessary purity to be used in molecular techniques.

601 Considering the proteic nature of biofilms, it is possible that the association of  
602 potent proteolitics in association with sanitizers is an adequate strategy in the  
603 prevention of *C. jejuni* biofilms.

604 The centesimal composition of MH and chicken juice was compared and it was  
605 found that the analysis of 100mL of chicken juice has 2.79% of protein and 0.06% of  
606 carbohydrates. MH contains 1.85% protein and 0.2% of carbohydrate. Even with only  
607 5% of chicken juice in the trials, the presence of a higher protein build-up added to the  
608 existence of blood and other unassessed components may have provided *C. jejuni* not  
609 only with the microaerophilic condition required for this microorganism, as well as a  
610 greater presence of iron, important conditions for its metabolism and consequent  
611 survival and multiplication, which may have had a positive influence on biofilm  
612 formation.

613 For the mixed biofilms it was observed that there was an increase in the formed  
614 biomass. This increase was significant depending on the microorganism to which the  
615 interaction occurred and the medium used. In addition, there was variability in the  
616 composition of the formed biofilm.

617 The competitive disadvantage of *C. jejuni* visualized in the SEM indicates that  
618 probably the identified variations in biomass and in the constitution may be more  
619 related to the characteristics of the other species than to the interaction itself.

620 SEM images demonstrated that the configuration of mixed biofilms presented  
621 the same pattern found in the monospecific biofilm of *C. jejuni*, in both MH and  
622 chicken juice. The exception was restrict to the interaction with *Pseudomonas*  
623 *aeruginosa* that presented in addition a more compact and flat conformation with the  
624 presence of well delimited pores, and it was also identified a higher biomass in MH in  
625 comparison with chicken juice, that presented a significant difference ( $p<0.001$ ) in the  
626 colorimetric assay.

627 The predominance of the other species in detriment of *C. jejuni*, in mixed  
628 biofilms, may be related to the biofilm formation time, since *C. jejuni* is a fastidious and  
629 demanding specie. In addition, the prevalence of other species in mixed biofilms has  
630 also been described previously and may indicate the existence of selection pressure  
631 exerted under *C. jejuni* in the first days.

632 According to Culotti and Packman (2015) only after three days of formation of  
633 the mixed biofilm of *C. jejuni* and *P. aeruginosa* was it possible to observe the presence  
634 of dispersed and discrete colonies of *C. jejuni*, which were present only on the surface  
635 of the biofilm formed by *P. aeruginosa*. In addition, the authors also detected that there  
636 was a predominance of *P. aeruginosa* biofilm morphology that remained unchanged in  
637 the *C. jejuni* presence and exhibited the same typical characteristics of the simple *P.*  
638 *aeruginosa* biofilm.

639 Several authors have already stated that both, co-inoculation and the inclusion of  
640 *C. jejuni* in pre-established biofilms facilitates subsequent growth of the sessile form of  
641 this agent (Culotti and Packman, 2015; Zhang et al., 2013; Culotti and Packman, 2014).

642 Aswathanarayan and Vittal (2013) have suggested that different bacterial species  
643 secrete enzymes that modify the composition of extracellular polymeric substance  
644 (EPS) of biofilms in response to external stresses, resulting in changes in the biofilm

645 architecture in a specific environment. In this way, the inclusion of different species in  
646 two substrates (MH and chicken juice) promoted these modifications.

647 The exception found in mixed biofilms with *P. aeruginosa* in chicken juice may  
648 represent a specific characteristic of this specie. Many animal macromolecules have  
649 been reported with the ability to form an adherent film, but not always capable of  
650 improving biofilm formation. For example, bovine serum albumin reduces formation of  
651 biofilms in *S. aureus* (Xu et al., 2008) and *Burkholderia cepacia* (Hwang et al., 2012).  
652 On the other hand, it is important for adhesion in *Cronobacter* (Healy et al., 2010).  
653 These differences also correlate with changes in the ability to express absorption  
654 proteins, leading to a variability in time to biofilm formation (Brown et al., 2015). In  
655 addition, the composition of the *P. aeruginosa* biofilm matrix is predominantly of  
656 polysaccharides, mainly alginate (Mann and Wozniak, 2012), which confers a  
657 differentiated structure, which can be detected in SEM and may represent another  
658 explanation for difficulty in adherence in the presence of chicken juice.

659

#### 660 **4.5.Genotyping**

661 The high heterogeneity found in *C. jejuni* strains is due to the fact that most of  
662 them are naturally competent to take the DNA present in the environment and promote  
663 recombination in their genome, that is, they execute the transformation mechanism  
664 effectively, due to production of extracellular DNase (Clark et al. 2014).

665 The presence of strains with high percentage of phylogenetic similarity in  
666 different flocks and in the same one, was also reported by other authors who stated that  
667 slaughter conditions may be the main responsible for the presence of strains with a high  
668 degree of homology in samples from the same flock, such as the equipment used in  
669 animal processing and cross-contamination (Petersen and Wedderkopp, 2001; Workman  
670 et al., 2008).

671 Our approach has shown that the ability of *C. jejuni* in developing a structured  
672 biofilm is highly variable depending on the strain when maintained in MH. However,  
673 when there is supplementation with chicken juice, all strains present a strong biofilm  
674 producer pattern. The chicken juice allows a greater fixation of *C. jejuni* as it assigns a  
675 surface more conditioned to bacterial adhesion.

676 Genome analysis revealed the high potential of strains in the acquisition of  
677 sessile lifestyle, phenotypically proven in chicken juice. Its variable behavior in MH

678 and chicken juice, apparently results from modifications in the expression of genes  
679 involved in stress response, adhesion and biofilm formation.

680 The existence of tolerant strains to the tested biocides and most used in the  
681 poultry industry suggests the existence of exposure to sublethal concentrations,  
682 representing a real risk for the development of adaptation mechanisms.

683 The ultrastructure of simple and mixed biofilms showed the early maturity range  
684 when in chicken juice compared to MH. However, in biofilms with *P. aeruginosa* this  
685 pattern is inverted, probably due to the particular characteristics of this species.

686 Identification of the predominantly protein composition of *C. jejuni* biomass and  
687 also in mixed biofilms may aid in the future development of agents of action with  
688 proteolytic approach as a prevention and strategy of control. However, it is noteworthy  
689 that in mixed culture with *P. aeruginosa* there is predominance of a polysaccharide  
690 matrix.

691 Phylogenetic diversity was evidenced by the presence of 23 pulsotypes, which  
692 confirms the intrinsic characteristic of *C. jejuni* to easily recombine its genome by gene  
693 transformation.

694

## 695 **5.Acknowledgment**

696 To CNPq and FAPEMIG for the provision of financial resources for the  
697 execution of the study and to the exporting company responsible for granting the  
698 samples.

699

## 700 **6.References**

701 Aswathanarayan, J.B., and Vittal, R.R. (2013). Microbial biofilms and their control by  
702 various antimicrobial strategies, in *Microbial pathogens and strategies for combating*  
703 *them: science, technology and education*, ed. A. Méndez-Vilas (Badajoz: Formatec),  
704 124–133.

705

706 Avila-Ramirez, C., Tinajero-Trejo, M., Davidge, K.S., Monk, C.E., Kelly, D.J. and  
707 Poole, R.K. (2013). Do globins in microaerophilic *Campylobacter jejuni* confer  
708 nitrosative stress tolerance under oxygen limitation? *Antioxid. Redox Signal.* 18, 424–  
709 431. doi: 10.1089/ars.2012.4750

710

711 Batz, M.B., Hoffmann, S., and Morris, J.G. (2012). Ranking the disease burden of 14  
712 pathogens in food sources in the United States using attribution data from outbreak

- 713 investigations and expert elicitation. *J. Food Prot.* 75, 1278-1291. doi: 10.4315/0362-  
714 028X.JFP-11-418
- 715
- 716 Billings, N., Millan, M.R., Caldara, M., Rusconi, R., Tarasova, Y., Stocker, R. et al.  
717 (2013). The extracellular matrix component Psl provides fast-acting antibiotic defense in  
718 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathog.* 9:e1003526. doi:  
719 10.1371/journal.ppat.1003526
- 720
- 721 Birk, T., Ingmer, H., Andersen, M.T., Jorgensen, K., and Brondsted, L. (2004). Chicken  
722 juice, a food-based model system suitable to study survival of *Campylobacter jejuni*.  
723 *Lett. Appl. Microbiol.* 38, 66–71. doi: 10.1046/j.1472-765X.2003.01446.x
- 724
- 725 Birk, T., Rosenquist, H., Brondsted, L., Ingmer, H., Bysted, A., Christensen, B.B. et al.  
726 (2006). A comparative study of two food model systems to test the survival of  
727 *Campylobacter jejuni* at -18 degrees C. *J. Food Prot.* 69, 2635–2639. PMID: 17133806.
- 728
- 729 Biswas, B., Hannon, S.J., Townsend, H.G.G., Andrew, P., and Allan, B.J. (2011) Genes  
730 coding for virulence determinants of *Campylobacter jejuni* in human clinical and cattle  
731 isolates from Alberta, Canada, and their potential role in colonization of poultry. *Int  
732 Microbiol.* 14, 25-32. doi: 10.2436/20.1501.01.132
- 733
- 734 Black, R.E., Levine, M.M., Clements, M.L., Hughes, T.P., and Blaser, M.J. (1988).  
735 Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *J. Infect. Dis.* 157, 472–479.  
736 PMID: 3343522.
- 737
- 738 Bronnec, V., Turonova, H., Bouju, A., Cruveiller, S., Rodrigues, R., Demnerova, K. et  
739 al. (2016). Adhesion, biofilm formation, and genomic features of *Campylobacter jejuni*  
740 Bf, an atypical strain able to grow under aerobic conditions. *Front. Microbiol.* 7, 1002.  
741 doi: 10.3389/fmicb.2016.01002
- 742
- 743 Brown, H.L., Reuter, M., Hanman, K., Betts, R.P., and van Vliet, A.H.M. (2015).  
744 Prevention of biofilm formation and removal of existing biofilms by extracellular  
745 DNases of *Campylobacter jejuni*. *PLoS ONE.* 10(3):e0121680.  
746 doi:10.1371/journal.pone.0121680
- 747
- 748 Brown, H.L., Reuter, M., Salt, L.J., Cross, K.L., Betts, R.P., van Vliet, A.H.M. et al.  
749 (2014). Chicken juice enhances surface attachment and biofilm formation of  
750 *Campylobacter jejuni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 7053-7060. doi:  
751 10.1128/AEM.02614-14
- 752

- 753 Center Disease and Control – CDC (2013). Standardized Laboratory Protocol for  
754 Molecular Subtyping of *Campylobacter jejuni* by Pulsed Field Gel Electrophoresis  
755 (PFGE). PulseNet USA. The National Molecular Subtyping Network for Foodborne  
756 Disease Surveillance.
- 757
- 758 Chaignon, P., Sadovskaya, I., Ragunah, Ch., Ramasubbu, N., Kaplan, J.B, Jabbouri S. et  
759 al. (2007). Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on  
760 their chemical composition. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1, 125-132. doi:  
761 10.1007/s00253-006-0790-y
- 762
- 763 Chmielewski, R.A.N., and Frank, J.F. (2007). Inactivation of *Listeria monocytogenes*  
764 biofilms using chemical sanitizers and heat, in *Biofilms in the food environment*, ed.  
765 H.P. Blaschek, H.H. Wang, and M.E. Agle (London, UK: Blackwell Publishing, Ltd.),  
766 73-104. doi: 10.1002/9780470277782.ch4
- 767
- 768 Clark, C.G., Chong, P.M., McCorrister, S.J., Mabon, P., Walker, M. and Westmacott,  
769 G.R. (2014). DNA sequence heterogeneity of *Campylobacter jejuni* CJIE4 prophages  
770 and expression of prophage genes. *PLoS One.* 9: e95349. doi:  
771 10.1371/journal.pone.0095349 PMID: 24756024
- 772
- 773 Culotti, A., and Packman, A.I. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* promotes *Escherichia*  
774 *coli* biofilm formation in nutrient-limited medium. *PLoS One.* 9:e107186. doi:  
775 10.1371/journal.pone.0107186
- 776
- 777 Culotti, A., and Packman, A.I. (2015). *Pseudomonas aeruginosa* facilitates  
778 *Campylobacter jejuni* growth in biofilms under oxic flow conditions. *FEMS Microbiol.*  
779 *Ecol.* 91:fiv136. doi: 10.1093/femsec/fiv136
- 780
- 781 Dat, N.M., Hamanaka, D., Tanaka, F., and Uchino, T. (2010). Surface conditioning of  
782 stainless steel coupons with skim milk solutions at different pH values and its effect on  
783 bacterial adherence. *Food Control.* 21, 1769-1773. doi:  
784 <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.06.012>
- 785
- 786 Datta, S., Niwa, H., and Itoh, K. (2003). Prevalence of 11 pathogenic genes of  
787 *Campylobacter jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler  
788 and bovine faeces. *J. Med. Microbiol.* 52, 345-348. doi: 10.1099/jmm.0.05056-0
- 789
- 790 Donlan, R.M., and Costerton, J.W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically  
791 relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 167-193. doi:  
792 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002

- 793
- 794 Drozd, M., Chandrashekhar, K., and Rajashekara, G. (2014). Polyphosphate-mediated  
795 modulation of *Campylobacter jejuni* biofilm growth and stability. *Virulence*. 5, 680-  
796 690. doi: 10.4161/viru.34348
- 797
- 798 EFSA - European Food Safety Authority. The European Union summary report on  
799 trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013.  
800 EFSA Journal, 13(1): 162 p., 2015.
- 801
- 802 Elvers, K.T., and Park, S.F. (2002). Quorum sensing in *Campylobacter jejuni*: detection  
803 of a *luxS* encoded signaling molecule. *Microbiology*. 148, 1475-1481. doi:  
804 10.1099/00221287-148-5-1475
- 805
- 806 Flemming, H.C., and Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 8,  
807 623-633. doi:10.1038/nrmicro2415
- 808
- 809 Flint, A., Sun, Y.Q., Butcher, J., Stahl, M., Huang, H., and Stintzi, A. (2014). Phenotypic  
810 screening of a targeted mutant library reveals *Campylobacter jejuni* defenses against  
811 oxidative stress. *Infect. Immun.* 82, 2266-2275. doi: 10.1128/IAI.01528-13
- 812
- 813 Goering, R.V. (2010). Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and  
814 interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infect. Genet. Evol.*  
815 10, 866-875. doi: 10.1016/j.meegid.2010.07.023
- 816
- 817 Guyard-Nicodeme, M., Tresse, O., Houard, E., Jugiau, F., Courtillon, C., Manaa, K.E.  
818 et al. (2013). Characterization of *Campylobacter* spp. transferred from naturally  
819 contaminated chicken legs to cooked chicken slices via a cutting board. *Int. J. Food  
820 Microbiol.* 164, 7-14. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.03.009
- 821
- 822 Hanel, I., Muller, J., Muller, W., and Schulze, E. (2004). Correlation between invasion  
823 of Caco-2 eukaryotic cells and colonization ability in the chick gut in *Campylobacter  
824 jejuni*. *Vet. Microbiol.* 101, 75-82. doi: 10.1016/j.vetmic.2004.04.004
- 825
- 826 Harmon, K.M., Ramson, G.M., and Wesley, I.V. (1997). Differentiation of  
827 *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by polymerase chain reaction. *Mol. Cell  
828 Probes*. 11, 195-200. doi: 10.1006/mcpr.1997.0104
- 829
- 830 Healy, B., Cooney, S., O'Brien, S., Iversen, C., Whyte, P., Nally, J. et al. (2010).  
831 *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*): an opportunistic foodborne pathogen.  
832 *Foodborne Pathog. Dis.* 7, 339-350. doi: <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2009.0379>

- 833
- 834 Howard, S.L., Jagannathan, A., Soo, E.C., Hui, J.P., Aubry, A.J., Ahmed, I. et al. (2009).  
835 A *Campylobacter jejuni* glycosylation island important in cell charge, legionaminic acid  
836 biosynthesis and colonization of chickens. *Infect. Immun.* 77, 2544–2556. doi:  
837 10.1128/IAI.01425-08.
- 838
- 839 Howlett, R.M., Hughes, B.M., Hitchcock, A., and Kelly, D.J. (2012). Hydrogenase  
840 activity in the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni* depends upon a novel ABC-  
841 type nickel transporter (NikZYXWV) and is SlyD-independent. *Microbiology* 158,  
842 1645–1655. doi: 10.1099/mic.0.054130-0.
- 843
- 844 Hwang, G., Kang, S., El-Din, M.G., and Liu, Y. (2012). Impact of conditioning films on  
845 the initial adhesion of *Burkholderia cepacia*. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*. 91, 181-  
846 188. doi: 10.1016/j.colsurfb.2011.10.059
- 847
- 848 Ica, T., Caner, V., Istanbullu, O., Nguyen, H.D., Ahmed, B., Call, D.R. et al. (2012).  
849 Characterization of mono- and mixed-culture *Campylobacter jejuni* biofilms. *Appl  
850 Environ. Microbiol.* 78, 1033-1038. doi: 10.1128/AEM.07364-11
- 851
- 852 International Standards Organization. ISO 10272-1: Microbiology of food and animal  
853 feeding stuffs – horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter*  
854 spp. – Part 1: detection method. (2006) ISO 10272-1:2006.
- 855
- 856 Joshua, G.W., Guthrie-Irons, C., Karlyshev, A.V., and Wren, B.W. (2006). Biofilm  
857 formation in *Campylobacter jejuni*. *Microbiology*. 152, 387-396.  
858 doi: 10.1099/mic.0.28358-0
- 859
- 860 Kalmokoff, M., Lanthier, P., Tremblay, T.L., Foss, M., Lau, P.C., Sanders, G., et al.  
861 (2006). Proteomic analysis of *Campylobacter jejuni* 11168 biofilms reveals a role for  
862 the motility complex in biofilm formation. *J. Bacteriol.* 188, 4312–4320. doi:  
863 10.1128/JB.01975-05.
- 864
- 865 Keeratipibul, S., and Techaruwichit, P. (2012). Tracking sources of *Listeria*  
866 contamination in a cooked chicken meat factory by PCRRAPD-based DNA  
867 fingerprinting. *F. Control.* 27, 64–72. doi:  
868 <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.02.026>
- 869
- 870 Kim, J., Park, C., and Kim, Y. (2015). Role of *flgA* for flagellar biosynthesis and biofilm  
871 formation of *Campylobacter jejuni* NCTC11168. *J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 1871-  
872 1879. doi: 10.4014/jmb.1504.04080.

- 873
- 874 Konkel, M.E., Larson, C.L., and Flanagan, R.C. (2010). *Campylobacter jejuni* FlpA  
875 binds fibronectin and is required for maximal host cell adherence. *J. Bacteriol.* 192,  
876 68–76. doi:10.1128/JB.00969-09.
- 877
- 878 Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., and Hultgren, S.J. (2013). Bacterial biofilms:  
879 development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era.  
880 *Cold Spring Harbor Perspect. Med.* 3, a010306. doi: 10.1101/cshperspect.a010306
- 881
- 882 Kudirkiene, E., Cohn, M.T., Stabler, R.A., Strong, P.C.R., Serniene, L., Wren, B. W. et  
883 al. (2012). Phenotypic and genotypic characterizations of *Campylobacter jejuni* isolated  
884 from the broiler meat production process. *Curr. Microbiol.* 65, 398–406. doi:  
885 10.1007/s00284-012-0170-z
- 886
- 887 Lawes, J.R., Vidal, A., Clifton-Hadley, F.A., Sayers, R., Rodgers, J., Snow, L. et al.  
888 (2012). Investigation of prevalence and risk factors for *Campylobacter* in broiler flocks  
889 at slaughter: results from a UK survey. *Epidemiol. Infect.* 140, 1725–1737. doi:  
890 10.1017/S0950268812000982
- 891
- 892 Lehtola, M.J., Pitkanen, T., Miebach, L., and Miettinen, I.T. (2006). Survival of  
893 *Campylobacter jejuni* in potable water biofilms: a comparative study with different  
894 detection methods. *Water Sci. Technol.* 54, 57–61. PMID: 17037133.
- 895
- 896 Li, J. (2016). The effects of meat juice on biofilm formation of *Campylobacter* and  
897 *Salmonella*. [master's thesis]. [British Columbia]: University of British Columbia.
- 898
- 899 Ligowska, M., Cohn, M.T., Stabler, R.A., and Wren, B.W., Andbrondsred, L. (2011).  
900 Effect of chicken meat environment on gene expression of *Campylobacter jejuni* and its  
901 relevance to survival in food. *Int. J. Food Microbiol.* 5, 111–115. doi:  
902 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.027.
- 903
- 904 Lu, X., Samuelson, D.R., Rasco, B.A., and Konkel, M.E. (2012). Elucidation of the  
905 antimicrobial effect of diallyl sulfide on *Campylobacter jejuni* biofilms. *J. Antimicrob.  
906 Chemother.* 67, 1915–1926. doi: 10.1093/jac/dks138.
- 907
- 908 Mann, E.E., and Wozniak, D.J. (2012). *Pseudomonas* biofilm matrix composition and  
909 niche biology. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 893–916. doi: 10.1111/j.1574-  
910 6976.2011.00322.x.
- 911
- 912 Mihaljevic, R.R., Sikic, M., Klancnik, A., Brumini, G., Mozina, S.S., Abram, M. et al.

- 913 (2007). Environmental stress factors affecting survival and virulence of *Campylobacter*  
914 *jejuni*. *Microb. Pathog.* 43, 120-125. doi: 10.1016/j.micpath.2007.03.004.
- 915
- 916 Mileyeva-Biebesheimer, O (2011). An investigation into metal oxide nanoparticle  
917 toxicity to bacteria in environmental systems using fluorescence based assays. [master's  
918 thesis]. [Toledo]: University of Toledo Digital Repository.
- 919
- 920 Nachamkin, I., Allos, B.M., and Ho, T. (1998). *Campylobacter* species and Guillain-  
921 Barré syndrome. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 555-567. PMCID: PMC88896.
- 922
- 923 Nakari, UM (2011). *Identification and epidemiological typing of Campylobacter strains*  
924 *isolated from patients in Finland*. Helsinki, Finland: National Institute for Health and  
925 Welfare (THL). 126 pages. ISBN 978-952-245-465-2 (printed); ISBN 978-952-245-  
926 466-9 (pdf)
- 927
- 928 Naves, P., Del Prado, G., Huelves, L., Gracia, M., Ruiz, V., and Blanco, J. (2008).  
929 Measurement of biofilm formation by clinical isolates of *Escherichia coli* is method-  
930 dependent. *J. Appl. Microbiol.* 105, 585-590. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03791.x
- 931
- 932 Oh, E., and Jeon, B. (2014). Role of alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) in the  
933 biofilm formation of *Campylobacter jejuni*. *PLoS One.* 9: e87312. doi:  
934 10.1371/journal.pone.0087312
- 935
- 936 Ohsumi, T., Takenaka, S., Wakamatsu, R., Sakaue, Y., Narisawa, N., Senpuku, H. et al.  
937 (2015). Residual structure of *Streptococcus mutans* biofilm following complete  
938 disinfection favors secondary bacterial adhesion and biofilm re-development. *PLOS*  
939 *ONE*. 10:e0116647. doi:<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0116647>
- 940
- 941 Parveen, N., and Cornell, K.A. (2011). Methylthio adenosine/S-adenosyl-l-omocysteine  
942 nucleosidase, a critical enzyme for bacterial metabolism. *Mol. Microbiol.* 79, 7-20. doi:  
943 10.1111/j.1365-2958.2010.07455.x
- 944
- 945 Petersen, L., and Wedderkopp, A. (2001). Evidence that certain clones of  
946 *Campylobacter jejuni* persist during successive broiler flock rotations. *Appl. Environ.*  
947 *Microbiol.* 67, 2739-2745. doi: 10.1128/AEM.67.6.2739-2745.2001
- 948
- 949 Plummer, P.J. (2012). LuxS and quorum-sensing in *Campylobacter*. *Front Cell Infect.*  
950 *Microbiol.* 2, 1-9. doi: 10.3389/fcimb.2012.00022
- 951
- 952 Reeser, R.J., Medler, R.T., Billington, S.J., Jost, B.H., and Joens, L.A. (2007).

- 953 Characterization of *Campylobacter jejuni* biofilms under defined growth conditions.  
954 *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1908–1913. doi: 10.1128/AEM.00740-06.
- 955
- 956 Reuter, M., Mallett, A., Pearson, B.M., and van Vliet, A.H.M. (2010). Biofilm  
957 formation by *Campylobacter jejuni* is increased under aerobic conditions. *Appl.*  
958 *Environ. Microbiol.* 76, 2122-2128. doi: 10.1128/AEM.01878-09
- 959
- 960 Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M.A., Roy, S.L. et  
961 al. (2011). Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. *Emerg.*  
962 *Infect. Dis.* 17, 7-15. doi: 10.3201/eid1701.P11101.
- 963
- 964 Sulaeman, S., Hernould, M., Schaumann, A., Coquet, L., Bolla, J.M., Dé, E. et al.  
965 (2012). Enhanced adhesion of *Campylobacter jejuni* to abiotic surfaces is mediated by  
966 membrane proteins in oxygen-enriched conditions. *PLoS ONE.* 7:e46402. doi:  
967 10.1371/journal.pone.0046402.
- 968
- 969 Sulaeman, S., Le Bihan, G., Rossero, A., Federighi, M., De, E., and Tresse, O. (2009).  
970 Comparison between the biofilm initiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter*  
971 *coli* strains to an inert surface using BioFilm Ring Test. *J. Appl. Microbiol.* 108, 1303–  
972 1312. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04534.x
- 973
- 974 Sutherland, I.W. (2001). The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial  
975 environment. *Trends Microbiol.* 9, 222–227. doi:10.1016/S0966-842X(01)02012-1
- 976
- 977 Svensson, S.L., Davis, L.M., MacKichan, J.K., Allan, B.J., Pajaniappan, M., Thompson,  
978 S.A. et al. (2009). The CprS sensor kinase of the zoonotic pathogen *Campylobacter*  
979 *jejuni* influences biofilm formation and is required for optimal chick colonization. *Mol.*  
980 *Microbiol.* 71, 253–272. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06534.x
- 981
- 982 Svensson, S.L., Pryjma, M., and Gaynor, E.C. (2014). Flagella-mediated adhesion and  
983 extracellular DNA release contribute to biofilm formation and stress tolerance of  
984 *Campylobacter jejuni*. *PLoS One.* 9:e106063. doi: 10.1371/journal.pone.0106063
- 985
- 986 Tazumi, A., Negoro, M., Tomiyama, Y., Misawa, N., Itoh, K., et al. (2011). Uneven  
987 distribution of the *luxS* gene with in the genus *Campylobacter*. *Brit. J. Biomed Sci.* 68,  
988 19–22. PMID: 21473257
- 989
- 990 Techaruvichit, P., Takahashi, H., Kuda, T., Miya, S., Keeratipibul, S., and Kimura, B.  
991 (2016). Adaptation of *Campylobacter jejuni* to biocides used in the food industry  
992 affects biofilm structure, adhesion strength, and cross-resistance to clinical

- 993 antimicrobial compounds, *Biofouling*, 32, 827-839, doi:  
994 10.1080/08927014.2016.1198476  
995  
996 Trachoo, N., and Frank, J.F. (2002). Effectiveness of chemical sanitizers against  
997 *Campylobacter jejuni*-containing biofilms. *J. Food Prot.* 65, 1117-1121. PMID:  
998 12117244.  
999  
1000 Turonova, H., Briandet, R., Rodrigues, R., Hernould, M., Hayek, N., and Stintzi, A.  
1001 (2015). Biofilm spatial organization by the emerging pathogen *Campylobacter jejuni*:  
1002 comparison between NCTC 11168 and 81-176 strains under microaerobic and oxygen-  
1003 enriched conditions. *Front. Microbiol.* 6:709. doi: 10.3389/fmicb.2015.00709.  
1004  
1005 van Alphen, L.B., Wenzel, C.Q., Richards, M.R., Fodor, C., Ashmus, R.A., Stahl, M. et  
1006 al. (2014). Biological roles of the O-methyl phosphoramidate capsule modification in  
1007 *Campylobacter jejuni*. *PLoS ONE*. 9:e87051. doi: 10.1371/journal.pone.0087051.  
1008  
1009 Workman, S.N., Mathison, G.E., and Lavoie, M.C. (2008). An investigation of sources  
1010 of *Campylobacter* in a poultry production and packing operation in Barbados. *Int. J.*  
1011 *Food Microbiol.* 121, 106–111. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.10.014  
1012  
1013 Xavier, K.B., and Bassler, B.L. (2005). Interference with AI-2-mediated bacterial cell-  
1014 cell communication. *Nature*. 437, 750–753. doi: 10.1038/nature03960.  
1015  
1016 Xu, C-P., Boks, N.P., de Vries, J., Kaper, H.J., Norde, W., Busscher, H.J. et al. (2008).  
1017 *Staphylococcus aureus*-fibronectin interactions with and without fibronectin-binding  
1018 proteins and their role in adhesion and desorption. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 7522–  
1019 7528. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00948-08>  
1020  
1021 Zhang, W., Sileika, T., and Packman, A. (2013) Effects of fluid flow conditions on  
1022 interactions between species in biofilms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 84, 344–54. doi:  
1023 10.1111/1574-6941.12066  
1024  
1025 Zheng, J., Meng, J.H., Zhao, S.H., Singh, R., and Song, W.X. (2006). Adherence to and  
1026 invasion of human intestinal epithelial cells by *Campylobacter jejuni* and  
1027 *Campylobacter coli* isolates from retail meat products. *J. Food Prot.* 69, 768–774.  
1028 PMID: 16629018.  
1029  
1030  
1031

1032 **DETAILED FINANCIAL MOVEMENT**1033 **Materials for use in microbiology**

<b>Item</b>	<b>Identification</b>	<b>Price</b>
01	Microaerophilic generator	R\$ 3067,40
02	Materials for microbiological analysis (disposable)	R\$ 3857,32
03	Defibrillated sheep's blood	R\$ 4440,87
04	Culture media for <i>Campylobacter</i>	R\$ 23572,00
05	Cellulose membrane	R\$ 4445,00
06	NP of zinc oxide	R\$ 311,13
<b>TOTAL</b>		R\$ 39693,72

1034

1035 **Materials for use in molecular biology**

<b>Item</b>	<b>Identification</b>	<b>Price</b>
01	Molecular weight marker	R\$ 2985,00
02	Taq platinum DNA polymerase	R\$ 511,00
03	Materials for PFGE	R\$ 11241,12
04	PBS Buffer	R\$ 629,00
05	DNA Extraction Kit	R\$ 1745,00
06	Materials for molecular biology analysis (disposable)	R\$ 3585,30
07	Materials for PCR	R\$ 547,00
06	PCR primers	R\$ 388,72
<b>TOTAL</b>		R\$ 21632,14

1036

1037

1038

1039

1040

1041

1042

1043

1044

1045

1046

1047 **TABLES**

1048

1049 Table 1. Classification of biofilm formation index

Strong	Medium	Weak	Nonexistent
$\geq 1.10$	0.70-1.10	0.35-0.69	$< 0.35$

1050

1051

1052

1053

1054 Table 2. PCR conditions, nucleotide sequences and amplicon sizes for the specific *Campylobacter jejuni* primers used in this study

1055

Genes	Primers	Sequence 5' → 3'	Size (pb)	DNA (ng)	Primer (pmol)	PCR Conditions	Reference
<i>flaA</i>	flaA-F	ATGGGATTCGTATTAACAC	1728	50	10	94°C - 10min; 30 cicles: 94°C - 1min, 47°C - 1min, 72°C - 1min; 72°C - 10min	Hanel et al. (2004)
	flaA-R	CTGTAGTAATCTTAAACATTG					
<i>cadF</i>	cadFI-F2B	TTGAAGGTAATTAGATATG	400	40	40	94°C - 10min; 30 cicles: 94°C - 1min, 47°C - 1min, 72°C - 1min; 72°C - 10min	Zheng et al. (2006)
	cadFI-R1B	CTAATACCTAAAGTTGAAAC					
<i>luxS</i>	luxS-1	AGGCAAAGCTCCTGGTAAGGCCAA	1080	50	10	94°C - 3min; 30 cicles: 94°C - 30s, 55°C - 1min, 72°C - 1min; 72°C - 10min	Elvers and Park (2002)
	luxS-2	GGATCCGTATAGGTAAGTCATTGCTCC					
<i>dnaJ</i>	dnaJ F	AAGGCTTGGCTCATC	720	20	20	95°C - 2min; 30 cicles: 94°C - 1min, 46°C - 1min, 72°C - 1min; 72°C - 5min	Datta et al. (2003)
	dnaJ R	CTTTTGTTCATCGTT					
<i>htrA</i>	htrA F	TAATACGACTCACTATAAGGTAAAG	1393	10	10	95°C - 1min; 35 cicles: 95°C - 30s, 50°C - 1min, 72°C - 1min; 72°C - 5min	Datta et al. (2003)
	htrA R	TTTAGCAAGTGCTTTATTGCT					
<i>cbrA</i>	cbrA F	AAAACCATTGCGATATAACCCAAAC	1165	10	10	95°C - 1min; 35 cicles: 95°C - 30s, 50°C - 1min, 72°C - 1min; 72°C - 5min	Biswas et al. (2011)
	cbrB R	T					
<i>sodB</i>	sodB F	TAATACGACTCACTATAAGGGCATT	638	20	20	95°C - 2min; 30 cicles: 94°C - 1min, 46°C - 1min, 72°C - 1min; 72°C - 5min	Biswas et al. (2011)
	sodB R	TGCATAAAAGCTAACTGATCC					

1056 Table 3. Classification of strains, according to the BFI (Biofilm Formation Index),  
 1057 under the different enrichment conditions  
 1058

Identification	Mueller Hinton (MH)		MH + 5% of <i>Chicken juice</i>	
	BFI	Classification	BFI	Classification
F 03	0.476	Weak	1.926	Strong
F 45	0.261	Nonexistent	2.199	Strong
F 48	0.119	Nonexistent	2.243	Strong
F 51	0.280	Nonexistent	2.105	Strong
F 67	0.721	Medium	2.2665	Strong
F 68	0.388	Weak	2.558	Strong
F 80	0.326	Nonexistent	2.114	Strong
F 84	0.625	Weak	2.226	Strong
F 85	0.417	Weak	2.086	Strong
F 87	0.310	Nonexistent	1.937	Strong
F 88	0.482	Weak	1.988	Strong
F 100	0.304	Nonexistent	1.632	Strong
F 127	0.897	Medium	2.338	Strong
F 138	0.576	Weak	2.362	Strong
F 140	0.847	Medium	2.190	Strong
F 157	0.841	Medium	2.302	Strong
F 163	0.393	Weak	2.377	Strong
F 164	0.560	Weak	2.343	Strong
F 172	0.513	Weak	2.344	Strong
F 175	0.491	Weak	2.165	Strong
F 206	0.320	Nonexistent	2.178	Strong
F 211	0.327	Nonexistent	2.437	Strong
F 236	0.677	Weak	1.864	Strong
F 240	0.917	Medium	2.658	Strong
F 246	0.492	Weak	2.141	Strong
F 247	0.970	Medium	2.339	Strong
F 248	0.266	Nonexistent	2.143	Strong
F 253	0.325	Nonexistent	2.429	Strong
F 255	0.644	Weak	2.423	Strong
F 256	0.964	Medium	2.761	Strong

1059

1060

1061

1062

1063

1064 Table 4. Counts obtained in the assays for adhesion analysis and biofilm formation in  
 1065 the 30 strains of *C. jejuni*

Mediums	Mean counts ± standard deviation (Log CFU/mL)		
	Initial inoculum	Adhesion	Biofilm
Mueller Hinton	4.15 ± 0.29 Aa	3.13 ± 0.35 aB	5.30 ± 0.38 aC
Chicken juice	4.10 ± 0.32 Aa	5.00 ± 0.49 bB	7.37 ± 0.23 bC

1066 Different lowercase letters in the columns and different capital letters on the lines  
 1067 indicate significant difference.

1068

1069

1070 Table 5. Resistance profiles to chemical agents tested on 13 biofilms of *C. jejuni*

Chemical Agents			Profile	Number of strains
ZnO NPs			I	4 (30.8%)
ZnO NPs	Chlorhexidine		II	1 (7.7%)
Peracetic acid	ZnO NPs		III	2 (15.4%)
Hypochlorite	ZnO NPs	Chlorhexidine	IV	1 (7.7%)
Peracetic acid	Hypochlorite	ZnO NPs	V	3 (23.1%)
Peracetic acid	Hypochlorite	ZnO NPs	Chlorhexidine	VI
				2 (15.4%)

1071

1072

1073

1074

1075

1076

1077

1078

1079

1080

1081

1082

1083

1084 **FIGURES LEGEND**

1085

1086 Figure 1: Difference between adhesion and the mean of initial inoculum obtained in the  
1087 counts (log of CFU/mL) of *C. jejuni* in the Mueller Hinton and Chicken juice. Error  
1088 bars indicate the standard deviation for the means of the counts obtained for each strain  
1089 at three repetitions.

1090 Figure 2: Biofilm counts of *C. jejuni* (log CFU/mL) in the control test (30 strains) and  
1091 maintained for 24 hours in peracetic acid solution 0.8% (7 strains), sodium hypochlorite  
1092 1% , ZnO NP 6mM (13 strains), and chlorhexidine 1% (4 strains). \*p <0.01; \*\*p<0.001  
1093 using one way Anova for the counts in the samples of the same treatment.

1094 Figure 3: SEM images for three *C. jejuni* strains with different BFI (biofilm formation  
1095 index) in MH (**A** = nonexistent, **C** = weak and **E** = medium), and strong producers in  
1096 chicken juice (**B**, **D** and **F**) (Computerized staining in *C. jejuni* in **F**).

1097 Figure 4: Effect of treatment with sodium metaperiodate and proteinase K on the  
1098 biofilm of three *C. jejuni* strains. Results represent means with standard deviation (error  
1099 bars) of three independent experiments. 1 (F 80 in Mueller Hinton), 2 (F 80 in chicken  
1100 juice), 3 (F 255 in Mueller Hinton), 4 (F 255 in chicken juice), 5 (F 256 in Mueller  
1101 Hinton) and 6 (F 256 in Chicken juice). \* p<0.05; \*\* p<0.001 using one way Anova.

1102 Figure 5: SEM images for mixed biofilms. *C. jejuni* with *Salmonella Enteritidis* in MH  
1103 (**A**) and in Chicken Juice (CJ) (**B**), with *Staplylococcus aureus* in MH (**C**) and in CJ  
1104 (**D**), with *Pseudomonas aeruginosa* in MH (**E**) and in CJ (**F**) and with *Escherichia coli*  
1105 in MH (**G**) and in CJ (**H**). Computerized staining in *C. jejuni* in (**C**) and (**G**).

1106 Figure 6: Changes in biomass of mixed biofilms of *C. jejuni*. Results represent means  
1107 with standard deviation (error bars) of three independent experiments. \* p<0.05; \*\*  
1108 p<0.01; \*\*\* p<0.001 using Student's T test for comparisons with the control (*C. jejuni*).

1109 Figure 7: Dendrogram generated by computerized analysis (Gel Compare II) of DNA  
1110 profiles of *C. jejuni* strains, based on pulsed field electrophoresis (PFGE). The analysis  
1111 was performed by the Dice/UPGMA method (tolerance parameter of 0.5%, optimization  
1112 of 0.5%, homology  $\geq$  80%).

1113

1114

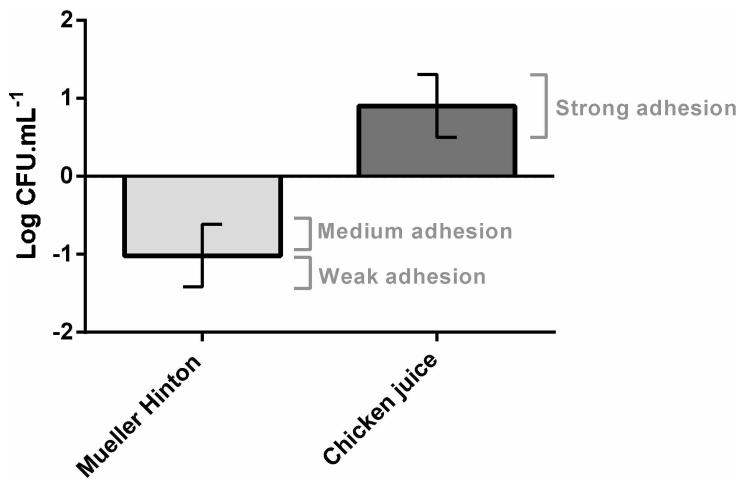
1115

1116

1117

1118

1119



1120

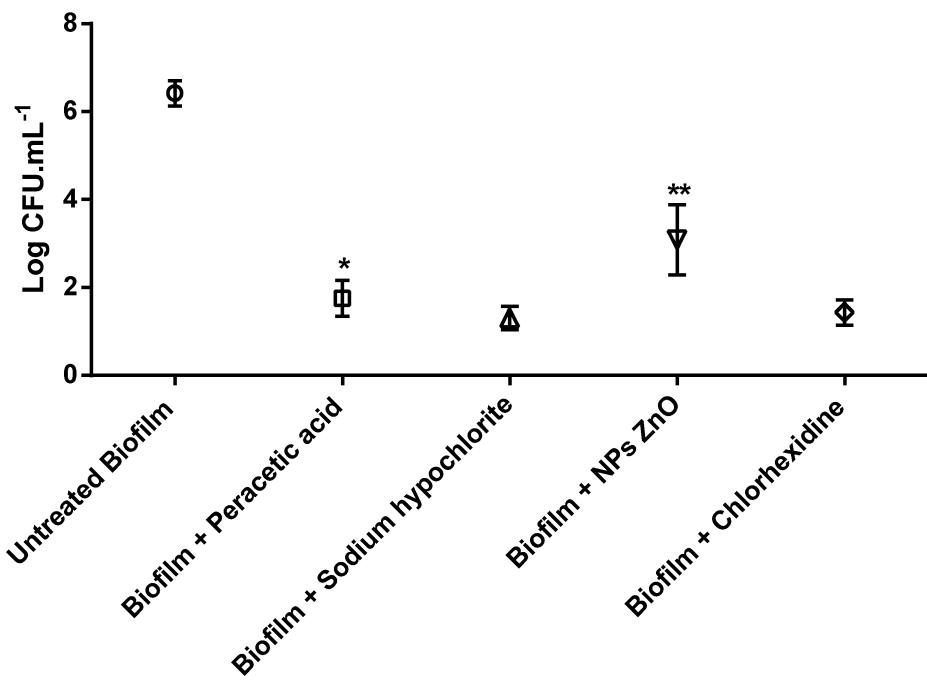
1121 **Figure 1**

1122

1123

1124

1125



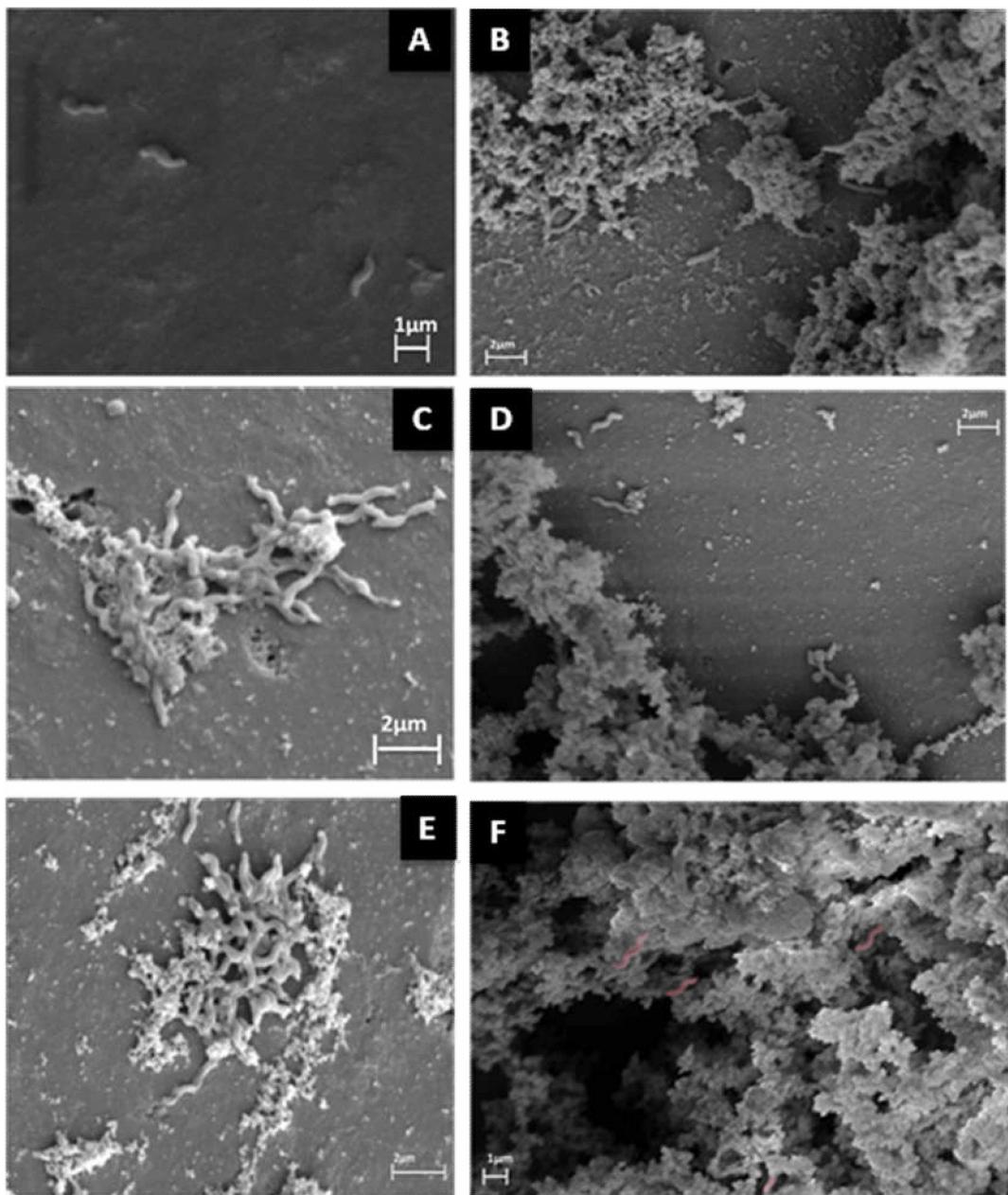
1126

1127 **Figure 2**

1128

1129

1130



1131

1132 **Figure 3**

1133

1134

1135

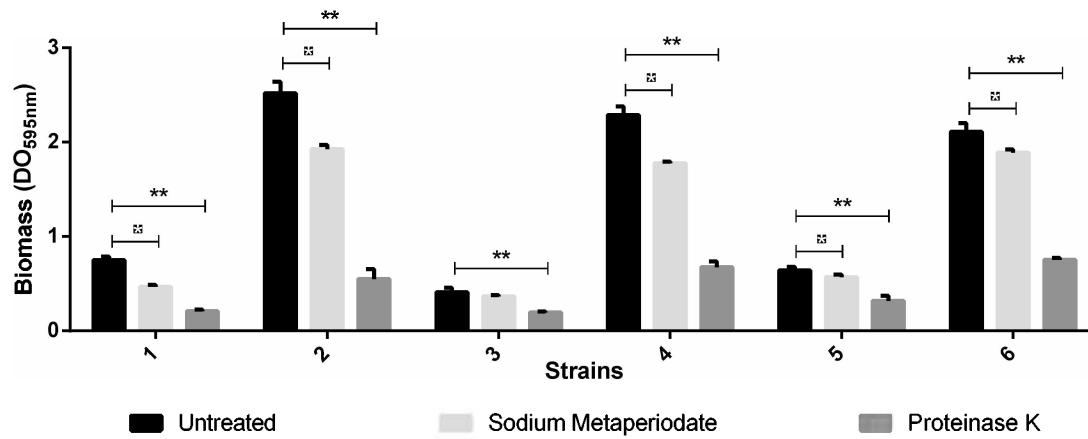
1136

1137

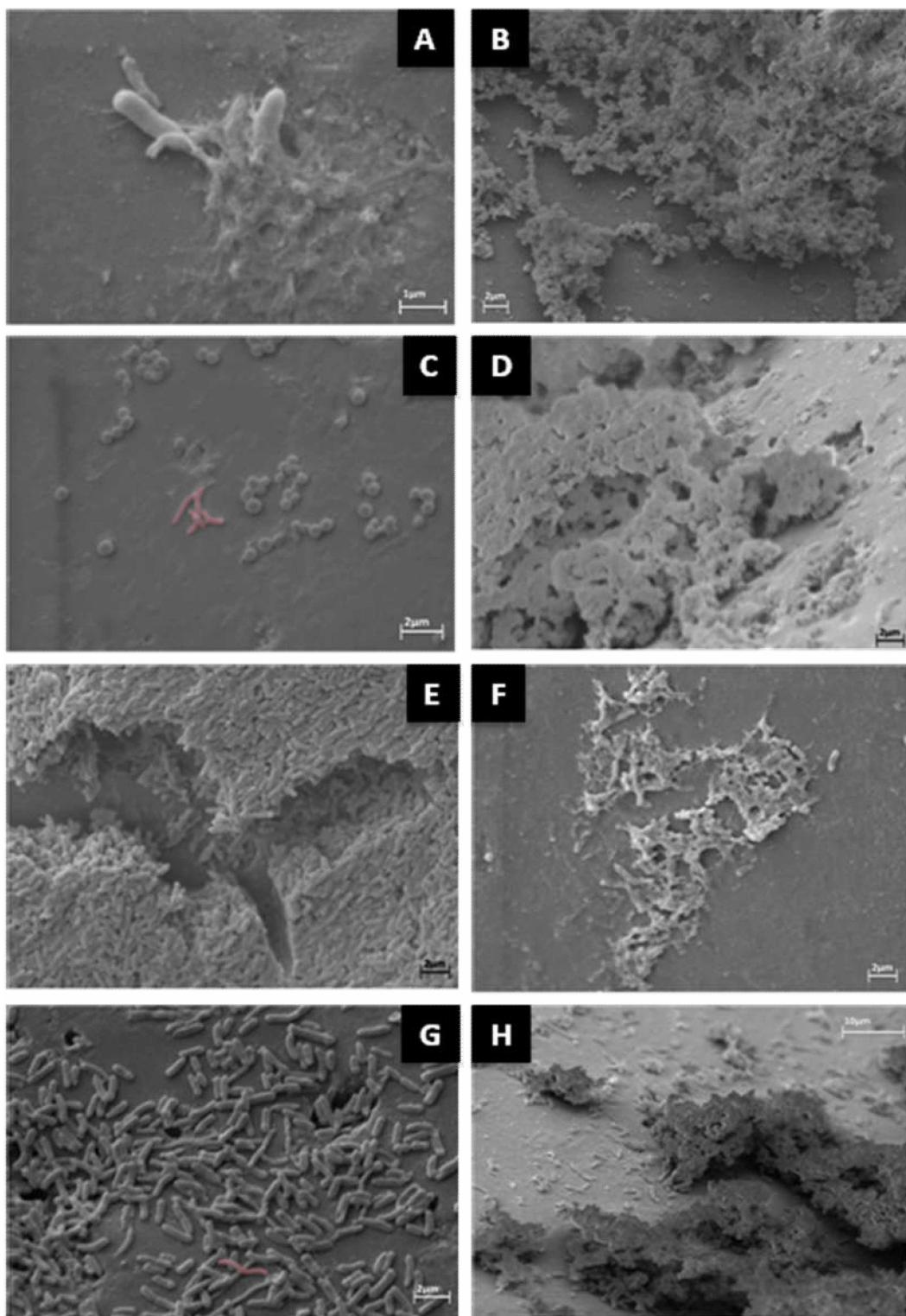
1138

1139

1140

1141  
1142**Figure 4**

1143  
1144  
1145  
1146  
1147  
1148  
1149  
1150  
1151  
1152  
1153  
1154  
1155  
1156  
1157  
1158  
1159  
1160  
1161  
1162  
1163



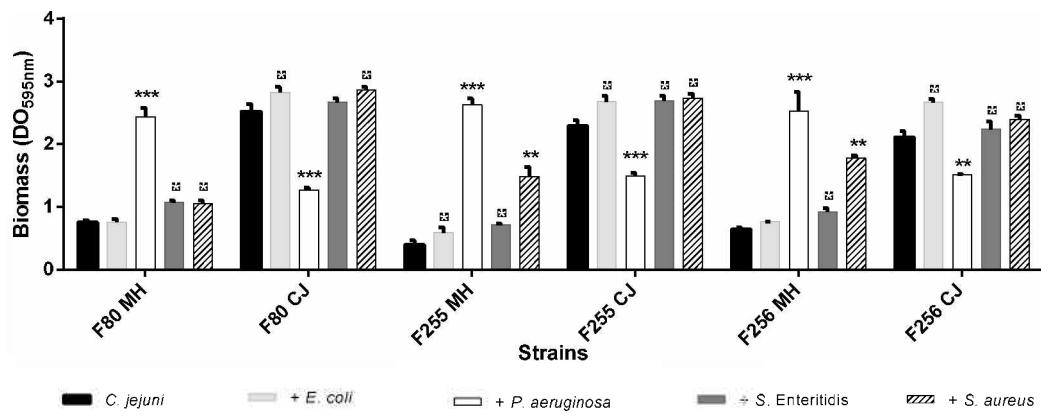
1164

1165 **Figure 5**

1166

1167

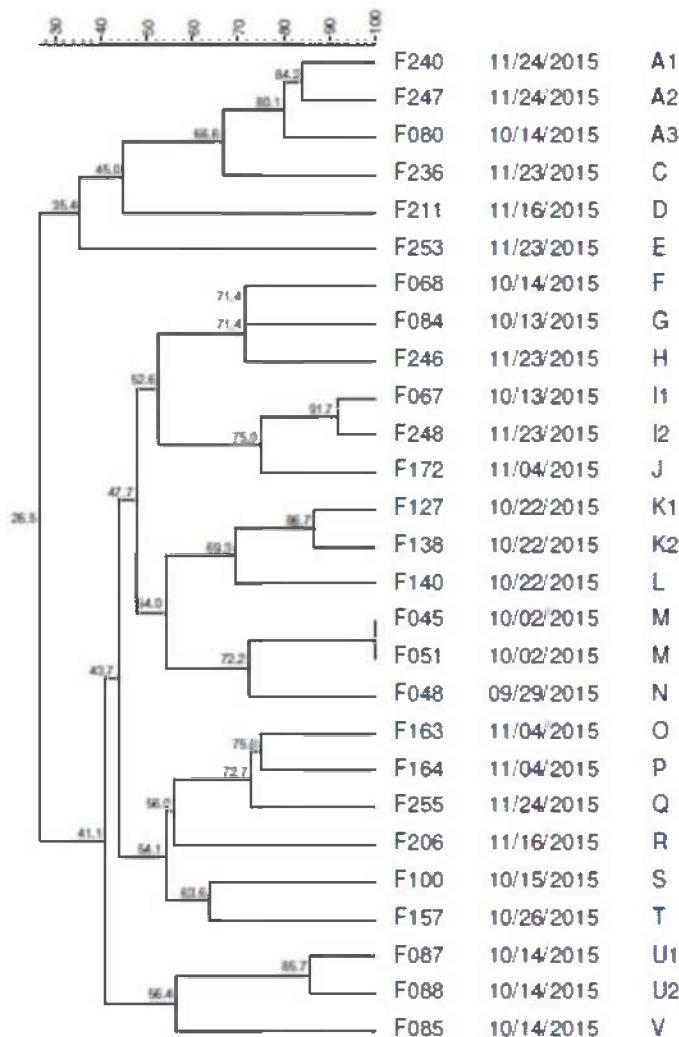
1168



1169

**Figure 6**

## PFGE



1171

**Figure 7**

## CAPÍTULO 4

**Relação genotípica entre linhagens humanas e avícolas de *Campylobacter jejuni***

Artigo a ser publicado no periódico  
**Foodborne Pathogens and Disease**

1    **RELAÇÃO GENOTÍPICA ENTRE LINHAGENS HUMANAS E AVÍCOLAS DE**  
2    ***Campylobacter jejuni***

3

4

5

6

7

8

9

10        Roberta Torres de Melo<sup>a\*</sup>; Eliane Pereira Mendonça<sup>a</sup>; Guilherme Paz  
11        Monteiro<sup>a</sup>; Phelipe Augusto Borba Martins Peres<sup>a</sup>; Daise Aparecida Rossi<sup>a</sup>

12

13

14

15

16

17

18

19        <sup>a</sup> Laboratório de Epidemiologia Molecular, Faculdade de Medicina Veterinária,  
20        Universidade Federal de Uberlândia, Rua Ceará s/n, Bloco 2DSala44, Bairro  
21        Umuarama, Uberlândia, MG – 38402-018, Brasil

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33        \* Autor correspondente:

34        Ms. Roberta Torres de Melo. E-mail: roberta-melo@hotmail.com.

35

36 **RESUMO**

37 Objetivou-se avaliar comparativamente aspectos genéticos de 64 cepas de *C.*  
38 *jejuni*, sendo 44 isoladas de carcaças de frangos destinados ao comércio  
39 interno e externo (2015-2016) e 20 provenientes de pacientes hospitalizados  
40 com gastroenterite causada pelo micro-organismo (2000-2006). As linhagens  
41 foram correlacionadas quanto à presença dos genes *flaA*, *pldA*, *cadF*, *ciaB*,  
42 *cdtABC*, *luxS*, *dnaJ*, *cbrA*, *htrA*, *cstII* e *neuA* por meio de PCR e quanto à  
43 proximidade filogenética por PFGE. Do total de cepas estudadas, 28 (43,7%)  
44 apresentaram todos os genes estudados, sendo que 25 (89,3%) delas  
45 tratavam-se de cepas de origem avícola. A análise de tipagem molecular  
46 identificou cinco pulsotipos, os quais nenhum deles agrupou cepas de  
47 diferentes origens. Apesar das linhagens humanas serem de pacientes  
48 hospitalizados, estas apresentaram limitada capacidade de virulência e de  
49 adaptação às condições adversas quando comparadas às oriundas de  
50 carcaças de frangos, além de serem totalmente distintas na tipagem molecular.  
51 Todavia, a capacidade de causar Síndrome de Guillain-Barré é igual para  
52 ambas as linhagens. De forma geral, as cepas avícolas, por serem mais  
53 recentes, apresentam-se mais especializadas para adaptar ao ambiente,  
54 invadir e causar doença no hospedeiro humano.

55

56 **Palavras-chave:** Campilobacteriose. Patogenicidade. Síndrome de Guillain-  
57 Barré. Tipagem molecular.

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69 **1. Introdução**

70

71 A avicultura brasileira é um dos setores do agronegócio que mais gera  
72 lucros para o país. A posição de destaque do Brasil, como segundo maior  
73 produtor e maior exportador de carne de frangos no mundo, promove  
74 constantes preocupações quanto aos padrões de qualidade e a garantia da  
75 segurança alimentar ao consumidor (ABPA, 2016).

76 A qualidade microbiológica é um dos pilares mais importantes para a  
77 exportação e para o mercado interno. Dessa forma, a presença de micro-  
78 organismos zoonóticos deve ser constantemente monitorada ao longo de todo  
79 processo produtivo avícola. Dentre esses micro-organismos, espécies do  
80 gênero *Campylobacter* têm merecido especial atenção pelo crescente número  
81 de casos de gastroenterites no mundo.

82 Dados obtidos de órgãos de vigilância epidemiológica como a EFSA  
83 (*European Food Safety Authority*), na União Européia (UE), e o CDC (*Centers*  
84 *for Disease Control and Prevention*), nos EUA, apontam que esse agente afeta  
85 2,4 milhões de pessoas por ano nos EUA, e nove milhões na UE, com  
86 elevados custos associados a perdas de produtividade e com sistema de saúde  
87 pública (CDC, 2015; EFSA, 2015). No Brasil, esses dados ainda são escassos,  
88 provavelmente sub-notificados e não fidedignos à realidade, devido à ausência  
89 de metodologias de isolamento e identificação de baixo custo e fácil execução,  
90 além da inexistência de legislação que determine a obrigatoriedade da análise  
91 e os números máximos tolerados para esse micro-organismo nos alimentos de  
92 origem animal, principalmente na carne de frango.

93 A campilobacteriose é caracterizada por apresentar desde diarreia  
94 aquosa, moderada e autolimitante, até uma disenteria sanguinolenta, com  
95 presença de muco e células sanguíneas brancas, podendo ser acompanhada  
96 de dores de cabeça e abdominal, febre, indisposição, náusea e vômitos,  
97 sintomatologia semelhante à causada por diversos outros patógenos entéricos  
98 (WHO, 2013). A baixa dose infectante de *Campylobacter*, cerca de 400 a 500  
99 células, representa um maior risco para a infecção (Amri *et al.*, 2007; Ivanovic,  
100 2012). A maioria das pessoas infectadas apresenta recuperação em um  
101 período de dois a cinco dias. Apesar disso, em alguns casos, a infecção pode

102 resultar em doenças mais graves como sepse, aborto, meningite, abscessos e  
103 complicações como a Síndrome de Guillain-Barré (SGB), caracterizada por  
104 uma paralisia flácida que pode levar a morte por insuficiência respiratória  
105 (WHO, 2013).

106 Devido ao grande número de casos notificados de campilobacteriose na  
107 Europa e EUA, tornou-se necessária a utilização de métodos moleculares de  
108 caracterização genética e de tipagem epidemiológica que permitem a  
109 discriminação das estirpes bacterianas e o conhecimento do potencial de  
110 virulência e adaptação. Os dados obtidos nesses testes podem ser utilizados  
111 pela vigilância em saúde pública na identificação das causas de surtos  
112 alimentares e na compreensão dos riscos (Nakari, 2011).

113 Dentre esses métodos o PFGE, *pulsed-field gel electrophoresis*, é  
114 considerado padrão-ouro em análises epidemiológicas bacterianas. O PFGE  
115 permite investigar a variabilidade genômica a nível de todo o material genético  
116 entre isolados de bactérias da mesma espécie. A presença de inserções,  
117 deleções ou mutações podem ser detectadas entre os genomas de isolados  
118 bacterianos, permitindo um elevado poder discriminatório em comparação com  
119 outras técnicas (Goering, 2010).

120 Diante da importância nacional no mercado avícola, objetivou-se analisar  
121 comparativamente cepas de *C. jejuni* isoladas de carcaças de frangos  
122 destinadas ao consumo interno e externo e isoladas de pacientes clínicos  
123 humanos quanto à proximidade genética, a disseminação de diferentes perfis  
124 genéticos e o perfil patogênico por meio da presença de fatores de virulência,  
125 de adaptação e de genes ligados à SGB.

126

## 127 **2. Material e métodos**

128

### 129 **2.1. Linhagens bacterianas**

130

131 O estudo baseou-se na análise de 64 cepas de *C. jejuni*: 19  
132 provenientes da coleção de *Campylobacter* Fiocruz-RJ (CCAMP), uma do  
133 Instituto Adolf Lutz de Ribeirão Preto e 44 de carcaças de frangos pertencentes

134 à Coleção de cepas do Laboratório de Epidemiologia Molecular da  
135 Universidade Federal de Uberlândia (CLEM) (Tabela 1).

136 Todas as linhagens foram cultivadas, confirmadas e armazenadas com  
137 crioprotetor em ultrafreezer a -80°C. A cepa de *C. jejuni* NCTC 11351 foi  
138 utilizada em todos os testes.

139

## 140 **2.2. Confirmação da espécie**

141

142 A reativação das cepas foi feita em caldo de enriquecimento seletivo  
143 Bolton (Oxoid®) com 5% de sangue desfibrinado de carneiro (Laborclin®) sob  
144 condições de microaerofilia a 37°C por 44 horas ± 4 horas. Em seguida, as  
145 amostras foram semeadas em ágar *Campylobacter Blood-Free Selective*  
146 *Medium* (Modified CCDA-Preston) (Oxoid®). As colônias bacterianas foram  
147 utilizadas para identificar *C. jejuni* bioquimicamente (teste de hidrólise do  
148 hipurato) e por PCR-multiplex.

149 O DNA foi obtido a partir do kit Wizard® Genomic DNA Purification  
150 (Promega) e a PCR foi feita com o Kit GoTaq Green Master Mix (Promega)  
151 associado aos primers C1 (5'CAAATAAGTTAGAGGTAGAATGT3') - C4 (5'  
152 GGATAAGCACTAGCTAGCTGAT3') e pg3 (5'GAACTTGAACCGATTG3') –  
153 pg50 (5'ATGGGATTCGTATTAAC3') (Invitrogen®) (Harmon *et al.*, 1997).

154

## 155 **2.3. Detecção de genes específicos**

156

157 Um total de onze genes de virulência e resistência adaptativa (*flaA* -  
158 motilidade, *pldA* - colonização extracelular, *ciaB* - invasão, *cadF* - colonização  
159 intracelular, *cdtABC* - produção de toxinas, *luxS* - mecanismo *quorum-sensing*,  
160 *dnaJ* - termotolerância, *htrA* - crescimento sob estresse e *cbrA* - resistência ao  
161 choque osmótico, *cstII* e *neuA* – síndrome de Guillain-Barré) foram avaliados  
162 nas linhagens de *C. jejuni* por meio de PCR. Todas as reações foram feitas  
163 com o Kit GoTaq Green Master Mix (Promega). Os genes foram identificados  
164 por meio de iniciadores e condições de amplificação específicos (Tabela 2).

165

## 166 **2.4. PFGE**

167

168 A PFGE foi conduzida de acordo com o padrão CDC PulseNet (CDC,  
169 2013) com o equipamento CHEF Mapper III (Bio-Rad). O DNA genômico foi  
170 digerido com a enzima de restrição *SmaI* (Invitrogen). O marcador de peso  
171 molecular de 1Kb (Promega) foi utilizado na comparação das bandas formadas.

172 As cepas foram emblocadas em solução contendo agarose SKG e  
173 proteinase K (20 mg/mL). Os blocos de agarose foram transferidos para  
174 tampão de lise celular a 54°C durante 15 min sob agitação orbital. Quatro  
175 lavagens em água ultrapura e tampão TE foram realizadas sob as mesmas  
176 condições. Os *plugs* foram, então, digeridos com 40 U de *SmaI* à temperatura  
177 ambiente durante 2 horas.

178 Os fragmentos de DNA foram separados em gel de agarose (SeaKem  
179 Gold) 1% em tampão TBE 0,5X, por um período de 18 horas, com os seguintes  
180 parâmetros, 200v, ângulo de 120°, gradiente de 6v/cm e temperatura do  
181 tampão de 14°C.

182 Os géis foram corados com brometo de etídio e fotografados sob luz UV.  
183 A análise para formação do dendrograma foi realizada utilizando software  
184 GelCompare II. A comparação dos padrões de bandas foi realizada pelo  
185 método de análise UPGMA, utilizando o coeficiente de similaridade de Dice.

186

## 187 **2.5. Análise Estatística**

188

189 Para determinar diferenças entre as cepas com relação aos genes  
190 estudados foi utilizado o teste binomial para comparação de duas proporções,  
191 com 5% de significância, por meio do programa GraphPad Prism 6.0.

192

## 193 **3. Resultados e discussão**

194

195 A presença de genes associados à virulência e à adaptação está  
196 descrita na Tabela 3. De maneira geral, observou-se que as cepas de origem  
197 avícola apresentaram maior potencial patogênico e adaptativo ( $p<0,05$ ), exceto  
198 em relação aos genes *flaA*, *cstII* e *neuA* que não apresentaram diferença  
199 significativa com as linhagens humanas.

200 Resultados distintos foram encontrados em estudo realizado por Oh *et*  
201 *al.* (2017) com cepas provenientes de fezes de humanos e de frangos isoladas  
202 no período de 2007 a 2010. Os autores não identificaram diferença significativa  
203 na detecção dos genes *flaA*, *cadF*, *racR*, *dnaJ*, *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* para as  
204 diferentes linhagens. Rodrigues *et al.* (2015) também não identificaram  
205 diferenças na virulência em *C. jejuni* provenientes de crianças e de cães em  
206 2010 e 2011.

207 É provável que a extensa diferença relacionada ao ano de isolamento  
208 das cepas tenha influenciado nos resultados, uma vez que as linhagens  
209 humanas são de 2000 a 2006 e as de carcaças são de 2015 e 2016. Alguns  
210 estudos já avaliaram aspectos da história evolutiva de *C. jejuni*, e demonstram  
211 que esse micro-organismo utiliza de mecanismos de mutação e recombinação  
212 gênica para criar uma população mais virulenta e adaptada aos diversos  
213 ambientes. Essas alterações levam ao surgimento de novas linhagens, que  
214 colocam em risco a população exposta, tornam as técnicas de prevenção na  
215 indústria e na medicina humana ineficazes e mostram a necessidade de  
216 aprimoramento constante das formas de controle do agente (Sheppard e  
217 Maiden, 2015; Frazão *et al.*, 2017).

218 A presença do gene *flaA* em ambas as linhagens não variou, mostrando  
219 a importância da motilidade como característica relativamente conservada  
220 nessa espécie. Os genes de virulência *cadF*, *ciaB* e *pldA* foram encontrados  
221 com maior frequência nas linhagens de carcaças, confirmando o maior  
222 potencial invasivo, de adesão e colonização do hospedeiro no estabelecimento  
223 da doença. A reduzida quantidade de cepas humanas que apresentaram os  
224 genes *cdtABC* (3/20 – 15%) e *luxS* (9/20 – 45%), evidencia a limitada  
225 toxicidade dessas estirpes em causar quadros invasivos ligados à apoptose de  
226 células hospedeiras, assim como a restrita capacidade de formar biofilmes no  
227 intestino e em ambientes externos. Paralelamente, a fragilidade das linhagens  
228 humanas sob condições adversas de temperatura, estresse nutricional e  
229 osmótico foi superior às cepas avícolas (Poly *et al.*, 2007; Dasti *et al.*, 2010;  
230 Feodoroff *et al.*, 2010; Cróinín *et al.*, 2012, Eucker e Konkel, 2012).

231 A presença dos genes ligados à SGB não diferiu entre as linhagens  
232 ( $p>0,05$ ). A identificação de ambos os genes (*cstII* e *neuA*) foi detectada em 47

233 (73,4%) cepas, sendo 31 (66,0%) de carcaças e 16 (34,0%) de humanos, e 53  
234 (82,8%) apresentaram pelo menos um desses genes. Resultados semelhantes  
235 foram encontrados por Hardy *et al.* (2011) e Amon *et al.* (2012), que não  
236 encontraram diferenças quanto a presença desses genes em cepas de  
237 humanos e de aves.

238 Vários estudos já indicaram que as regiões terminais do lipo-  
239 oligossacarídeo de *C. jejuni* são responsáveis pela produção de anticorpos  
240 auto-imunes que atacam gangliosídeos humanos, responsáveis pela SGB  
241 (Prendergast e Moran, 2000; Ang *et al.*, 2002). Dentre essas regiões, a enzima  
242 sialiltransferase codificada pelo gene *cstII* e a enzima de ativação do ácido  
243 siálico traduzida pelo gene *neuA* mostraram relação direta com a SGB  
244 associada a *C. jejuni* (Van Belkum *et al.*, 2001; Amon *et al.*, 2012).

245 A elevada quantidade de cepas com potencial de causar neuropatia  
246 após o evento da campilobacteriose, tanto nas linhagens humanas quanto  
247 avícolas, evidencia o risco de desenvolvimento de SGB em humanos. Porém,  
248 os resultados estatísticos sugerem que os isolados responsáveis por causar  
249 SGB em humanos não são selecionados por fatores ambientais ou específicos  
250 do hospedeiro e que, provavelmente, a ocorrência da doença auto-imune é  
251 dependente principalmente de fatores do paciente como imunidade humoral e  
252 celular (Amon *et al.*, 2012).

253 Os 16 perfis de virulência identificados na Tabela 4 reforçam a maior  
254 patogenicidade e resistência adaptativa das cepas de frangos, uma vez que o  
255 perfil P1 (presença de todos os genes) foi o mais identificado. Dessa forma,  
256 mesmo tratando-se de cepas isoladas de humanos com sintomatologia clínica,  
257 o maior potencial patogênico de estirpes avícolas é incontestável e denota o  
258 perigo representado pelo consumo do frango cru ou mal-cozido para o  
259 desenvolvimento de uma forma grave e aguda de campilobacteriose no  
260 hospedeiro humano. Além disso, demonstram a importância de práticas que  
261 evitem a contaminação cruzada durante o preparo destes alimentos nas  
262 residências e restaurantes.

263 Cinco pulsotipos (genótipos), com similaridade superior a 80% foram  
264 identificados no estudo filogenético entre as cepas, sendo quatro de carcaças  
265 de frangos (A, B, C e E) e um composto de duas cepas humanas (D) (Figura

266 1). Cada pulsotipo agrupou somente duas cepas, evidenciando a elevada  
267 heterogeneidade genética em *C. jejuni*.

268 Todos os *clusters* apresentaram linhagens isoladas no mesmo ano e  
269 com características genéticas semelhantes. Os pulsotipos B, C e E  
270 apresentaram em comum a presença de todos os genes estudados. Já no  
271 pulsotipo A uma das cepas não apresentou *flaA*, e em D uma das cepas não  
272 apresentou *cdtABC*. Essa variação é condizente com o grau de homologia  
273 inferior a 100%, que permite a existência de pequenas alterações no genoma.

274 A ausência de agrupamentos com cepas de humanos e de frangos deixa  
275 mais evidente o distanciamento genético entre elas, comprovando mais uma  
276 vez divergências relacionadas às características de virulência e de adaptação  
277 identificadas nessas linhagens e a provável evolução que as populações de *C.*  
278 *jejuni* sofreram ao longo do tempo.

279 A similaridade em linhagens de diferentes origens foi identificada por  
280 Frazão *et al.* (2017) no Brasil e por Oh *et al.* (2017) na Coréia. Todavia, essa  
281 homologia só foi detectada em cepas isoladas no mesmo ano ou com até um  
282 ano de diferença entre elas, o que justifica a diferença encontrada em nosso  
283 estudo. A rápida adaptação molecular por recombinação genética em *C. jejuni*  
284 permite a formação de populações bastante distintas filogeneticamente,  
285 impedindo o agrupamento das estirpes e permitindo sua constante evolução e  
286 especialização ao longo do tempo (Sheppard *et al.*, 2015).

287

288

#### 289 **4. Conclusão**

290

291 O potencial de virulência e adaptação nas linhagens provenientes de  
292 carcaças de frangos foi mais evidente do que nas cepas humanas, o que  
293 comprova o risco crescente de ocorrência de casos graves de  
294 campilobacteriose em humanos associados ao consumo de carne de frango  
295 crua ou mal cozida. Ambas as linhagens apresentaram potencial elevado de  
296 causar SGB em humanos, porém a expressão dessa doença é dependente  
297 principalmente do estado imunológico do hospedeiro. A diferença relacionada à  
298 presença dos genes entre as linhagens humanas e avícolas, aliada ao

299 distanciamento filogenético das cepas detectado na tipagem molecular faz  
300 sugerir que a elevada variação no período de isolamento das cepas possa ter  
301 ocasionado alterações genéticas de maneira a gerar populações mais  
302 especializadas nas estirpes mais recentes.

303

304 **Agradecimentos**

305

306 Ao CNPq e à FAPEMIG pelo auxílio financeiro para a execução do estudo.

307

308 **Referências**

309

310 ABPA, Associação Brasileira de Proteína Animal, 2016. Relatórios Anuais.

311 Relatório Anual 2016. Disponível em:  
312 <http://abpabr.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais>.  
313 Acesso em: 30.04.2017.

314 Amon P, Klein D, Springer B, Jelovcan S, Sofka D, Hilbert F. Analysis of  
315 *Campylobacter jejuni* isolates of various sources for *loci* associated with  
316 Guillain–Barré Syndrome. Eur J Microbiol Immunol 2012; 2:20–23.

317 Amri A, Senok A, Ismaeel A, Al-Mahmeed A, Botta G. Multiplex PCR for direct  
318 identification of *Campylobacter* spp. in human and chicken stools. J Med  
319 Microbiol 2007; 56:1350-1355.

320 Ang CW, Laman JD, Willison HJ, Wagner ER, Endtz HP, De Klerk MA, Tio-  
321 Gillen AP, Van den Braak N, Jacobs BC, Van Doorn PA: Structure of  
322 *Campylobacter jejuni* lipopolysaccharides determines antiganglioside  
323 specificity and clinical features of Guillain–Barré and Miller Fisher patients.  
324 Infect Immun 2000; 70:1202–1208.

325 CDC: Center Disease and Control. Standardized Laboratory Protocol for  
326 Molecular Subtyping of *Campylobacter jejuni* by Pulsed Field Gel  
327 Electrophoresis (PFGE). PulseNet USA. The National Molecular Subtyping  
328 Network for Foodborne Disease Surveillance. 2013.

329 CDC: Center for Disease Control and Prevention. National Center for Emerging  
330 and Zoonotic Infectious Diseases, 2015. Available:

- 331            <http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/siseases/campylobacter>.  
332            Acess: 04.29.2017.
- 333            Cróinín TÓ, Steffen B, Host epithelial cell invasion by *Campylobacter jejuni*:  
334            trigger or zipper mechanism? *Cell Infect Microbiol* 2012; 2:1-13.
- 335            Dasti JI, Tareen AM, Lugert R, Zautner AE, Gross U. *Campylobacter jejuni*: a  
336            brief overview on pathogenicity associated factors and disease-mediating  
337            mechanisms. *Int J Med Microbiol* 2010; 300:205–211.
- 338            Datta S, Niwa H, Itoh K. Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter*  
339            *jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler  
340            and bovine faeces. *J Med Microbiol* 2003; 52:345-348.
- 341            EFSA: European Food Safety Authority. Summary Report on antimicrobial  
342            resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and  
343            food. 2015. *EFSA Journal*, 13, 2, 4036.
- 344            Elvers KT, Park SF. *Quorum sensing in Campylobacter jejuni*: detection of a  
345            *luxS* encoded signaling molecule. *Microbiol* 2002; 148:1475–1481.
- 346            Eucker TP, Konkel ME. The cooperative action of bacterial fibronectin binding  
347            proteins and secreted proteins promote maximal *Campylobacter jejuni*  
348            invasion of host cells by stimulating membrane ruffling. *Cell Microbiol*  
349            2012; 14:226–238.
- 350            Feodoroff B, Ellström P, Hyytiäinen H, Sarna S, Hänninen ML, Rautelin H.  
351            *Campylobacter jejuni* isolates in finnish patients differ according to the  
352            origin of infection. *Gut Pathog* 2010; 2:22.
- 353            Frazão MR, Medeiros MIC, Duque SS, Falcão JP. Pathogenic potential and  
354            genotypic diversity of *Campylobacter jejuni*: a neglected food-borne  
355            pathogen in Brazil. *J Med Microbiol* 2017; 66:350-359.
- 356            Goering RV. Pulsed field gel electrophoresis: A review of application and  
357            interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infect*  
358            *Genet Evol* 2010; 10:866-875.
- 359            Hänel I, Muller J, Muller W, Schulze E. Correlation between invasion of Caco-2  
360            eukaryotic cells and colonization ability in the chick gut in *Campylobacter*  
361            *jejuni*. *Vet Microbiol* 2004; 101:75–82.

- 362 Hardy CG, Lackey LG, Cannon J, Price LB, Silvergeld EK. Prevalence of  
363 potentially neuropathic *Campylobacter jejuni* strains on commercial broiler  
364 chicken products. *Int J Food Microbiol* 2011; 145:395–399.
- 365 Harmon KM, Ramsom GM, Wesley IV. Differentiation of *Campylobacter jejuni*  
366 and *Campylobacter coli* by polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes*  
367 1997; 11:195-200.
- 368 Ivanovic S. *Campylobacter* as a cause of gastroenteritis in humans and  
369 animals. *Afr J Microbiol Res* 2012; 6:1651-1657.
- 370 Martinez I, Mateo E, Churruca E, Girbau C, Alonso R, Fernandezastorga A.  
371 Detection of *cdtA*, *cdtB*, and *cdtC* genes in *Campylobacter jejuni* by  
372 multiplex PCR. *Int J Med Microbiol* 2006; 296:45-48.
- 373 Nakari UM. *Identification and epidemiological typing of Campylobacter strains*  
374 *isolated from patients in Finland*. Helsinki, Finland: National Institute for  
375 Health and Welfare, 2011.
- 376 Oh JY, Kwon YK, Wei B, Jang HK, Lim SK, Kim CH, Jung SC, Kang MS.  
377 Epidemiological relationships of *Campylobacter jejuni* strains isolated from  
378 humans and chickens in South Korea. *J Microbiol* 2017; 55:13–20.
- 379 Poly F, Ewing C, Goon S, Hickey TE, Rockabrand D, Majam G, Lee L, Phan J,  
380 Savarino NJ, Guerry P. Heterogeneity of a *Campylobacter jejuni* protein  
381 that is secreted through the flagellar filament. *Infec Immun* 2007; 75:3859–  
382 3867.
- 383 Prendergast MM, Moran AP. Lipopolysaccharides in the development of the  
384 Guillain–Barré syndrome and Miller Fisher syndrome forms of acute  
385 inflammatory peripheral neuropathies. *J Endotoxin Res* 2000; 6:341–359.
- 386 Rodrigues CG, Melo RT, Fonseca BB, Martins PA, Ferreira FA, Araújo MBJ,  
387 Rossi DA. Occurrence and characterization of *Campylobacter* spp.  
388 isolates in dogs, cats and children. *Pesq Vet Bras* 2015; 35:365-370.
- 389 Sheppard SK, Maiden MC. The evolution of *Campylobacter jejuni* and  
390 *Campylobacter coli*. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015; 7.
- 391 Van Belkum A, Van den Braak N, Godschalk P, Ang W, Jacobs B, Gilbert M,  
392 Wakarchuk W, Verbrugh H, Endtz H. A *Campylobacter jejuni* gene  
393 associated with immune-mediated neuropathy. *Nat Med* 2001; 7:752–753.

394 WHO: World Health Organization. The global view of campylobacteriosis. 2013.

395 Available:

396 [https://extranet.who.int/iris/restricted/bitstream/10665/80751/1/978924156](https://extranet.who.int/iris/restricted/bitstream/10665/80751/1/9789241564601_eng.pdf)

397 4601\_eng.pdf. Acess: 03.27.2017.

398 Zheng J, Meng JH, Zhao SH, Singh R, Song WX. Adherence to and invasion of  
399 human intestinal epithelial cells by *Campylobacter jejuni* and  
400 *Campylobacter coli* isolates from retail meat products. J Food Prot 2006;  
401 69:768–774.

402

403

404

405

406

407

408

409

410

411

412

413

414

415

416

417

418

419

420

421

422

423

424

425

426

427 **TABELAS**

428

429 **Tabela 1:** Características das 64 linhagens de *C. jejuni*.

Linhagem	Ano de Isolamento	Origem	Material	Estado de Isolamento
IAL 2383	--	Humana	Fezes	SP
CCAMP 504	2000	Humana	Fezes	RJ
CCAMP 505	2000	Humana	Fezes	RJ
CCAMP 507	2000	Humana	Fezes	RJ
CCAMP 508	2000	Humana	Fezes	RJ
CCAMP 509	2000	Humana	Fezes	RJ
CCAMP 510	2000	Humana	Fezes	RJ
CCAMP 511	2001	Humana	Fezes	RJ
CCAMP 513	2001	Humana	Fezes	RJ
CCAMP 589	2001	Humana	Fezes	RJ
CCAMP 590	2001	Humana	Fezes	RJ
CCAMP 591	2001	Humana	Fezes	RJ
CCAMP 592	2001	Humana	Fezes	RJ
CCAMP 593	2001	Humana	Fezes	RJ
CCAMP 596	2001	Humana	Fezes	RJ
CCAMP 598	2003	Humana	Fezes	RJ
CCAMP 600	2003	Humana	Fezes	RJ
CCAMP 602	2004	Humana	Fezes	RJ
CCAMP 613	2006	Humana	Fezes	RJ
CCAMP 677	2006	Humana	Fezes	RJ
CLEM 003	2015	Alimento	Carcaça Frango	MG
CLEM 045	2015	Alimento	Carcaça Frango	MG
CLEM 048	2015	Alimento	Carcaça Frango	MG
CLEM 051	2015	Alimento	Carcaça Frango	MG
CLEM 067	2015	Alimento	Carcaça Frango	MG
CLEM 068	2015	Alimento	Carcaça Frango	MG
CLEM 080	2015	Alimento	Carcaça Frango	MG
CLEM 084	2015	Alimento	Carcaça Frango	MG
CLEM 085	2015	Alimento	Carcaça Frango	MG
CLEM 087	2015	Alimento	Carcaça Frango	MG
CLEM 088	2015	Alimento	Carcaça Frango	MG
CLEM 100	2015	Alimento	Carcaça Frango	MG
CLEM 127	2015	Alimento	Carcaça Frango	MG
CLEM 138	2015	Alimento	Carcaça Frango	MG

CLEM 140	2015	Alimento	Carcaça Frango	MG
CLEM 157	2015	Alimento	Carcaça Frango	MG
CLEM 163	2015	Alimento	Carcaça Frango	MG
CLEM 164	2015	Alimento	Carcaça Frango	MG
CLEM 172	2015	Alimento	Carcaça Frango	MG
CLEM 175	2015	Alimento	Carcaça Frango	MG
CLEM 206	2015	Alimento	Carcaça Frango	MG
CLEM 211	2015	Alimento	Carcaça Frango	MG
CLEM 236	2015	Alimento	Carcaça Frango	MG
CLEM 240	2015	Alimento	Carcaça Frango	MG
CLEM 246	2015	Alimento	Carcaça Frango	MG
CLEM 247	2015	Alimento	Carcaça Frango	MG
CLEM 248	2015	Alimento	Carcaça Frango	MG
CLEM 253	2015	Alimento	Carcaça Frango	MG
CLEM 255	2015	Alimento	Carcaça Frango	MG
CLEM 256	2015	Alimento	Carcaça Frango	MG
CLEM 384	2016	Alimento	Carcaça Frango	MG
CLEM 391	2016	Alimento	Carcaça Frango	MG
CLEM 393	2016	Alimento	Carcaça Frango	MG
CLEM 408	2016	Alimento	Carcaça Frango	MG
CLEM 479	2016	Alimento	Carcaça Frango	MG
CLEM 498	2016	Alimento	Carcaça Frango	MG
CLEM 510	2016	Alimento	Carcaça Frango	MG
CLEM 514	2016	Alimento	Carcaça Frango	MG
CLEM 536	2016	Alimento	Carcaça Frango	MG
CLEM 538	2016	Alimento	Carcaça Frango	MG
CLEM 549	2016	Alimento	Carcaça Frango	MG
CLEM 636	2016	Alimento	Carcaça Frango	MG
CLEM 644	2016	Alimento	Carcaça Frango	MG
CLEM 650	2016	Alimento	Carcaça Frango	MG

430 IAL: Coleção do Instituto Adolfo Lutz; CCAMP: Coleção *Campylobacter* da FIOCRUZ; CLEM:  
 431 Coleção do LEM-UFU.

432

433

434

435

436

437

438

439 **Tabela 2.** Primers para identificação dos genes de virulência e de resistência adaptativa em *C.*  
 440 *jejuni*.

Genes	Primers	Sequência 5' → 3'	Tamanho (pb)	Volume/DNA/ Anelamento	Referência
<i>flaA</i>	<i>flaA-F</i> <i>flaA-R</i>	ATGGGATTCGTATTAACAC CTGTAGTAATCTAAACATTTG	1728	50uL/20ng/45°C 1min.	Hanel et al. (2004)
<i>pldA</i>	<i>pldA-361</i> <i>pldA-726</i>	AAGAGTGAGGCAGAAATTCCA GCAAGATGCCAGGATTATCA	385		
<i>cadF</i>	<i>cadF1-F2B</i> <i>cadF1-R1B</i>	TTGAAGGTAATTAGATATG CTAATACCTAAAGTTGAAAC	400	50uL/20ng/45°C 1 min.	Zheng et al. (2006)
<i>ciaB</i>	<i>ciaB1-652</i> <i>ciaB1-1159</i>	TGCGAGATTTTCGAGAATG TGCCCGCCTAGAACCTTACA	527		
<i>cdtA</i>	<i>cdtA-F</i> <i>cdtA-R</i>	CTATTACTCCTATTACCCACC AATTGAAACCGCTGTATTGCTC	420		
<i>cdtB</i>	<i>cdtB-F</i> <i>cdtB-R</i>	AGGAACCTTACCAAGAACAGCC GGTGGAGTATAGGTTGTTGTC	531	25uL/80ng/57°C 1 min.	Martinez et al. (2006)
<i>cdtC</i>	<i>cdtC-F</i> <i>cdtC-R</i>	ACTCCTACTGGAGATTGAAAG CACAGCTGAAGTTGTTGTTGGC	339		
<i>luxS</i>	<i>luxS-1</i> <i>luxS-2</i>	AGGCAAAGCTCTGGTAAGGCCAA GGATCCGTATAGGTAAGTTCATTTTG CTCC	1080	25uL/50ng/55°C 1 min.	Elvers, Park (2002)
<i>dnaJ</i>	<i>dnaJ-F</i> <i>dnaJ-R</i>	AAGGCTTTGGCTCATC CTTTTGTTCATCGTT	720	25uL/20ng/46°C 1 min.	Datta et al. (2003)
<i>htrA</i>	<i>htrA-F</i> <i>htrA-R</i>	TAATACGACTCACTATAGGGTAAGTTT AGCAAGTGCTTTATTGTC	1393		
<i>cbrA</i>	<i>cbrA-F</i> <i>cbrA-R</i>	AAAACCATTGCGATATAACCCAAACT TAATACGACTCACTATAGGGTCAACTC TATCCTTGCCATTATCTT GTAGATATTGCTTTGGTTTGCTG	1165	25uL/10ng/50°C 1 min.	Datta et al. (2003)
<i>cstII</i>	<i>cstII-F</i> <i>cstII-R</i>	GTTATTATTGCTGGAAATGGACCAAGT ACATATAGACCCCTGAGGTAATTCTTT	400	25uL/20ng/52°C 1 min.	Amon et al. (2012)
<i>neuA</i>	<i>neuA-F</i> <i>neuA-R</i>	GCTCGTGGTGGCTAAAGGG ATTGCACCATTGCTCATATA	500		

441

442

443

444

445

446

447

448

449

450

451

452

453

454 **Tabela 3.** Porcentagem de genes de virulência em *C. jejuni* de origem humana e avícola.

Genes de Virulência	Carcaças de frangos	Fezes de humanos	Valor de P
	N=44 n(%)	N=20 n(%)	
<i>flaA</i>	37 (84,1) <sup>a</sup>	20 (100,0) <sup>a</sup>	0,0882
<i>pldA</i>	43 (97,7) <sup>a</sup>	14 (70,0) <sup>b</sup>	0,0029
<i>cadF</i>	43 (97,7) <sup>a</sup>	13 (65,0) <sup>b</sup>	0,0008
<i>ciaB</i>	42 (95,5) <sup>a</sup>	14 (70,0) <sup>b</sup>	0,0091
<i>cdtABC</i>	43 (97,7) <sup>a</sup>	03 (15,0) <sup>b</sup>	<0,0001
<i>luxS</i>	44 (100,0) <sup>a</sup>	09 (45,0) <sup>b</sup>	<0,0001
<i>dnaJ</i>	44 (100,0) <sup>a</sup>	14 (70,0) <sup>b</sup>	0,0005
<i>cbrA</i>	43 (97,7) <sup>a</sup>	12 (60,0) <sup>b</sup>	0,0002
<i>htrA</i>	43 (97,7) <sup>a</sup>	15 (75,0) <sup>b</sup>	0,0096
<i>cstII</i>	34 (77,3) <sup>a</sup>	17 (85,0) <sup>a</sup>	0,7385
<i>neuA</i>	33 (75,0) <sup>a</sup>	16 (80,0) <sup>a</sup>	0,7588

455 N – número de isolados; n, % – número e porcentagem de isolados que possuem o gene de  
 456 virulência; a,b – letras diferentes nas linhas indicam diferença significativa pelo teste exato de  
 457 Fisher ( $p<0,05$ ).

458

459

460

461

462

463

464

465

466

467

468

469

470

471

472

473

474

475

476

477 **Tabela 4.** Perfis genéticos das linhagens humanas e avícolas de *C. jejuni*

Perfis de Virulência	Carcaças de frangos	Fezes de humanos
	N= 44 n(%)	N= 20 n(%)
P1: <i>flaA</i> , <i>pldA</i> , <i>cadF</i> , <i>ciaB</i> , <i>cdtABC</i> , <i>luxS</i> , <i>dnaJ</i> , <i>cbrA</i> , <i>htrA</i> , <i>cstII</i> , <i>neuA</i>	25 (56,8) <sup>a</sup>	03 (15,0) <sup>b</sup>
P2: <i>pldA</i> , <i>cadF</i> , <i>ciaB</i> , <i>cdtABC</i> , <i>luxS</i> , <i>dnaJ</i> , <i>cbrA</i> , <i>htrA</i> , <i>cstII</i> , <i>neuA</i>	04 (9,1)	0
P3: <i>flaA</i> , <i>pldA</i> , <i>cadF</i> , <i>ciaB</i> , <i>cdtABC</i> , <i>luxS</i> , <i>dnaJ</i> , <i>cbrA</i> , <i>htrA</i> , <i>neuA</i>	02 (4,5)	0
P4: <i>flaA</i> , <i>pldA</i> , <i>cadF</i> , <i>ciaB</i> , <i>cdtABC</i> , <i>luxS</i> , <i>dnaJ</i> , <i>cbrA</i> , <i>htrA</i> , <i>cstII</i>	02 (4,5)	0
P5: <i>pldA</i> , <i>cadF</i> , <i>ciaB</i> , <i>cdtABC</i> , <i>luxS</i> , <i>dnaJ</i> , <i>cbrA</i> , <i>htrA</i> , <i>cstII</i>	01 (2,3)	0
P6: <i>flaA</i> , <i>pldA</i> , <i>cadF</i> , <i>ciaB</i> , <i>cdtABC</i> , <i>luxS</i> , <i>dnaJ</i> , <i>cbrA</i> , <i>htrA</i>	08 (18,2)	0
P7: <i>pldA</i> , <i>cadF</i> , <i>cdtABC</i> , <i>luxS</i> , <i>dnaJ</i> , <i>cbrA</i> , <i>htrA</i> , <i>cstII</i> , <i>neuA</i>	01 (2,3)	0
P8: <i>flaA</i> , <i>pldA</i> , <i>cadF</i> , <i>ciaB</i> , <i>luxS</i> , <i>dnaJ</i> , <i>cbrA</i> , <i>htrA</i> , <i>cstII</i> , <i>neuA</i>	0	07 (35,0)
P9: <i>flaA</i> , <i>pldA</i> , <i>cadF</i> , <i>ciaB</i> , <i>dnaJ</i> , <i>cbrA</i> , <i>htrA</i> , <i>cstII</i> , <i>neuA</i>	0	02 (10,0)
P10: <i>flaA</i> , <i>pldA</i> , <i>cadF</i> , <i>ciaB</i> , <i>dnaJ</i> , <i>htrA</i> , <i>cstII</i> , <i>neuA</i>	0	01 (5,0)
P11: <i>flaA</i> , <i>pldA</i> , <i>ciaB</i> , <i>cbrA</i> , <i>htrA</i> , <i>cstII</i> , <i>neuA</i>	0	01 (5,0)
P12: <i>flaA</i> , <i>pldA</i> , <i>cadF</i> , <i>ciaB</i> , <i>dnaJ</i> , <i>htrA</i> , <i>cstII</i>	0	01 (5,0)
P13: <i>luxS</i> , <i>dnaJ</i> , <i>cstII</i> , <i>neuA</i>	01 (2,3)	0
P14: <i>flaA</i> , <i>dnaJ</i> , <i>htrA</i>	0	01 (5,0)
P15: <i>flaA</i> , <i>cstII</i> , <i>neuA</i>	0	02 (10,0)
P16: <i>flaA</i>	0	02 (10,0)

478 N – número total de cepas; n,% – número e porcentagem de cepas que possuem o gene de  
 479 virulência; a b – letras diferentes nas linhas indicam diferença significativa ( $p<0,05$ ) para o perfil  
 480 através do teste exato de Fisher.

481

482

483

484

485

486

487

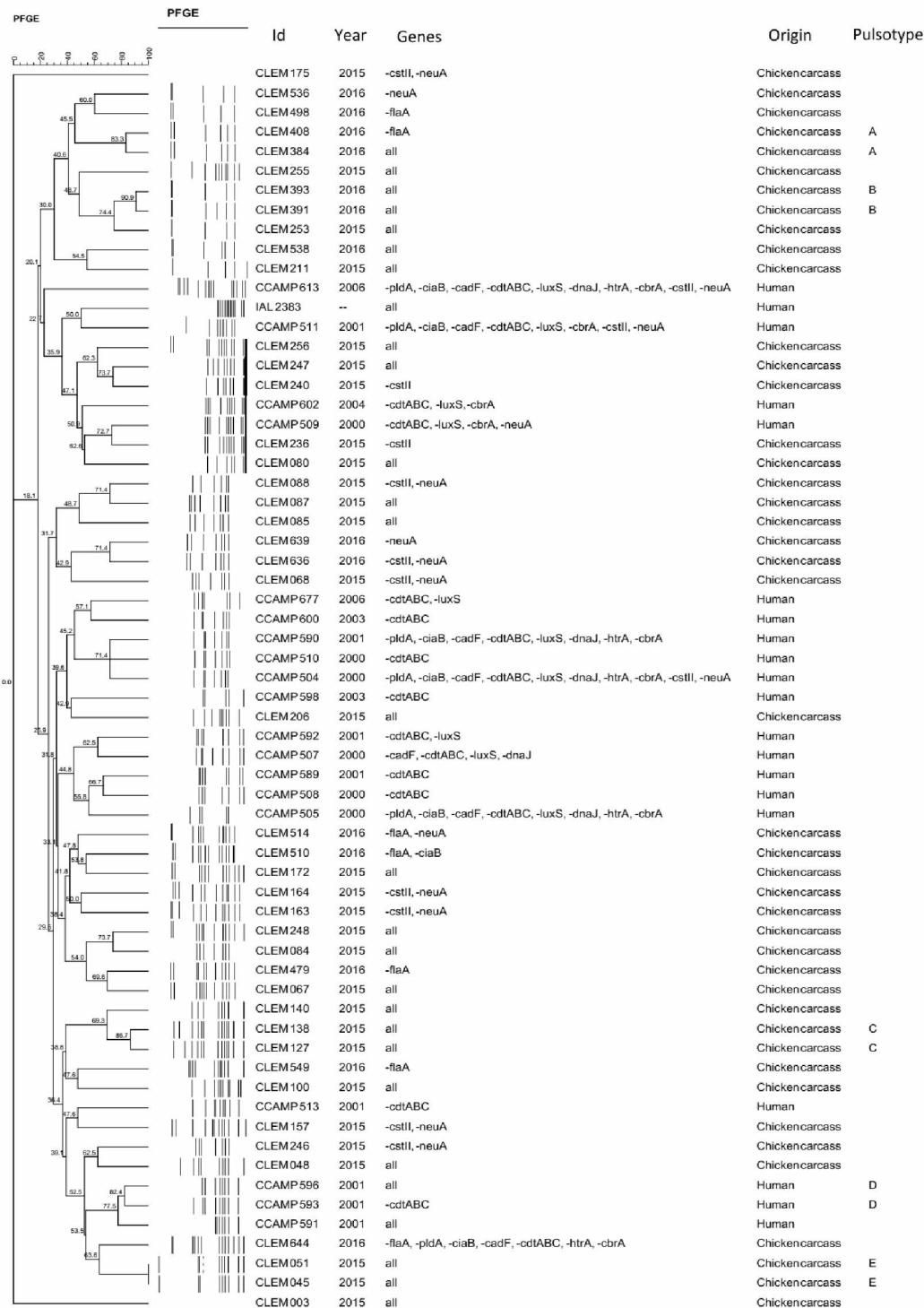
488

489

490 **LEGENDA DA FIGURA**

491

492 **Figura 1:** Dendrograma gerado por análise computadorizada (Gel Compare II)  
 493 de perfis de DNA de linhagens humanas e avícolas de *C. jejuni*, baseado na  
 494 eletroforese em campo pulsado (PFGE). A análise foi realizada pelo método de  
 495 Dice/UPGMA (parâmetro de tolerância de 0,5%, otimização de 0,5%,  
 496 homologia  $\geq 80\%$ ).



497

**Figura 1**

499

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante da importância que *C. jejuni* representa para a saúde pública mundial, os dados apresentados são relevantes, pois permitem uma caracterização geral de linhagens humanas e de origem avícola no Brasil.

De forma geral, o segundo capítulo permitiu constatar que *C. jejuni* de origem avícola sofreu modificações genotípicas e fenotípicas ao longo do tempo. As estratégias utilizadas na indústria para controle de patógenos alimentares promoveram uma redução significativa nos isolamentos de *C. jejuni* em carcaças de frango e na resistência antimicrobiana. Todavia as linhagens mais recentes apresentam-se mais especializadas e com maior potencial virulento para causar doença em humanos.

Paralelamente, o capítulo quatro também identificou diferenças genotípicas em cepas de humanos e de carcaças de frangos. A patogenicidade e a capacidade de resistir às condições adversas foi menor nas linhagens humanas, o que foi condizente com o elevado distanciamento genético identificado na análise de tipagem molecular em relação às linhagens avícolas. Essas diferenças, indicam que, mesmo se tratando de cepas causadoras de casos clínicos em um período anterior, sua virulência foi inferior em relação às cepas avícolas mais recentemente isoladas, em virtude do aperfeiçoamento que *C. jejuni* adquire ao longo do tempo por meio de recombinações genéticas. A semelhança cabe ao elevado potencial que ambas as linhagens possuem em causar SGB após a infecção em humanos.

O terceiro capítulo comprovou que a capacidade de formação de biofilmes simples e mistos por *C. jejuni* é cepa-dependente quando em MH. Porém, na presença do suplemento CJ, todas produzem biofilmes de forte intensidade, com uma ultra-estrutura altamente madura e predominantemente protéica, e provavelmente, expressam de forma mais efetiva seu potencial genético para aquisição do estilo de vida séssil. A exceção cabe aos biofilmes mistos com *Pseudomonas aeruginosa* que foram mais intensos em MH e com matriz rica em carboidratos. A tolerância aos biocidas pelos biofilmes de *C. jejuni* representa um risco real no controle do desenvolvimento de mecanismos de adaptação. A diversidade genética destacou mais uma vez a característica intrínseca de *C. jejuni* de realizar transformação gênica.

Os resultados encontrados no presente trabalho mostram a capacidade de *C. jejuni* se adaptar e adquirir mecanismos de virulência ao longo dos anos. Além de sua persistência no ambiente industrial mediante a formação de biofilmes altamente estáveis e resistentes. Os testes de susceptibilidade aos antibióticos e aos desinfetantes na indústria mostram que a exposição constante a esses agentes seleciona cepas mais adaptadas, assim como a recíproca é verdadeira.

Para um melhor conhecimento desse patógeno, faz-se necessário a continuidade deste estudo com outros determinantes de virulência e resistência, e assim avaliar a real ameaça que representa para saúde pública. O controle desse micro-organismo na produção avícola, representa um desafio para os profissionais da área de saúde animal, além de todas as implicações sanitárias e de saúde pública. Diante da posição de destaque do Brasil no setor, tal situação pode prejudicar as exportações brasileiras frente a importadores cada vez mais exigentes por produtos livres de patógenos.

Por fim, este estudo indica a necessidade de implementação de medidas criteriosas de monitoramento dentro da indústria e na saúde pública para acompanhar, não só as variações na prevalência de *C. jejuni* em humanos e em produtos avícolas, mas também as alterações evolutivas em suas características fenotípicas e genotípicas.

## REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F.M. Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.96, n. 4, p.271-281, 2005.
- ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório anual 2016**. Disponível em: [http://abpa-br.com.br/storage/files/versao\\_final\\_para\\_envio\\_digital\\_1925a\\_final\\_abpa\\_relatorio\\_anual\\_2016\\_portugues\\_web1.pdf](http://abpa-br.com.br/storage/files/versao_final_para_envio_digital_1925a_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web1.pdf). Acesso em: 11/04/2017.
- ADLER, L. et al. The signalling molecule Autoinducer-2 is not internalised in *Campylobacter jejuni*. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr**, v. 128, n. 3-4, p. 111-116, 2015.
- AGUNOS, A. et al. A systematic review characterizing on-farm sources of *Campylobacter* spp. for broiler chickens. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, e104905, 2014.
- AGUNOS, A. et al. Ciprofloxacin resistant *Campylobacter* spp. in retail chicken, Western Canada. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 7, p. 1121 – 1124, 2013.
- ALEMKA, A.; CORCIONIVOSCHI, N.; BOURKE B. Defense and adaptation: the complex inter-relationship between *Campylobacter jejuni* and mucus. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, n. 2, v. 15, p. 1-6, 2012.
- ALLAIN, V. et al. Prevalence of and risk factors for *Campylobacter* colonisation in broiler flocks at the end of the rearing period in France. **British Poultry Science**, v. 55, n. 4, p. 452-459, 2014.
- ALMOFTI, Y. A. et al. The physiologic and phenotypic alterations due to macrolide exposure in *Campylobacter jejuni*. **International Journal of Food Microbiology**, n. 151, v. 1, p. 52-61, 2011.
- ALTOBELLINI, E. et al. 2014. Burden of celiac disease in Europe: a review of its childhood and adulthood prevalence and incidence as of September 2014. **Annali di Igiene: Medicina Preventiva e di Comunità**, v. 26, n. 6, p. 485–498.
- AMRI, A. et al. Multiplex PCR for direct identification of *Campylobacter* spp. in human and chicken stools. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. 10, p. 1350-1355, 2007.
- AZEVEDO, N. F.; CERCA, N. **Biofilms in: health, environment, industry**. 1 ed. Porto: Publindústria, 2012. 396 p.
- BACKERT, S.; HOFREUTER, D. Molecular methods to investigate adhesion, transmigration, invasion and intracellular survival of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 95, n. 1, p. 8-23, 2013.
- BAE, J. S. et al. Guillain-Barré syndrome in Asia. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 85, n. 8, p. 907-913, 2014.

BÆK, K. T. et al. Different Contributions of HtrA protease and chaperone activities to *Campylobacter jejuni* stress tolerance and physiology. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 77, n. 1, p. 57-66, 2011.

BAFFONI, L. et al. A *Bifidobacterium*-based symbiotic product to reduce the transmission of *C. jejuni* along the poultry food chain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, n. 2, p. 156-161, 2012.

BANDARA, H. M. H. N. et al. Microbial chemical signaling: a current perspective. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 217-249, 2012.

BARAH, F. Non-Antibiotic Biocides: An Updated Review. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education**. Badajoz, Spain: Formatex Research Centre, 2013. p. 598-607.

BARDON, J. et al. Prevalence of thermotolerant *Campylobacter* spp. in broilers at retail in the Czech Republic and their antibiotic resistance. **Food Control**, v. 22, n. 2, p. 328-332, 2011.

BARTON, C. et al. Temperate bacteriophages affect pulsed-field gel electrophoresis patterns of *Campylobacter jejuni*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 386-391, 2007.

BASSLER, B. L. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, n. 6, p. 582-587, 1999.

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.

BEALES, N. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 3, n. 1, p. 1-20, 2004.

BESSEDE, E. et al. Comparison of characteristics of patients infected by *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter fetus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 328-330, 2014.

BIGGS, P. J. et al. Whole-genome comparison of two *Campylobacter jejuni* isolates of the same sequence type reveals multiple loci of different ancestral lineage. **PLoS One**, v. 6, n. 11, e27121, 2011.

BIRK, T. et al. Acid stress response and protein induction in *Campylobacter jejuni* isolates with different acid tolerance. **BMC Microbiology**, v. 12, p. 174-186, 2012.

BLACKWELL, G. **Regulation of flagellin glycosylation genes in *Campylobacter jejuni*: influence of NssR, the nitrosative stress response regulator**. 2010. 278 f.

Thesis (Doctor of Philosophy School of Biosciences) - University of Birmingham, Birmingham, 2010.

BOLTON, D. J. *Campylobacter* virulence and survival factors. **Food Microbiology**, v. 48, p. 99-108, 2015.

BOTTELDOORN, N. et al. Quantification of *Campylobacter* spp. in chicken carcass rinse by real-time PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, n. 6, p. 1909-1918, 2008.

BOUWMAN, L. I.; NIEWOLD, P.; VAN PUTTEN, J. P. Basolateral invasion and trafficking of *Campylobacter jejuni* in polarized epithelial cells. **PLoS One**, v. 8, n. 1, e54759, 2013.

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.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas. Síndrome de Guillain-Barré**. Portaria SAS/MS nº 497, de 23 de dezembro de 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Relatório do monitoramento da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em Enterococos e salmonelas isolados de carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil**. Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango (PREBAF). Brasília, jan. 2008. 186p.

BREMER, P. J.; FILLERY, S.; MCQUILLAN, A. J. Laboratory scale clean-in-place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, n. 3, p. 254-262, 2006.

BRIDIER, A. et al. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. **Biofouling the Journal of Bioadhesion and Biofilm Research**, v. 27, n. 9, p. 1017-1032, 2011.

BRONOWSKI, C.; JAMES, C. E.; WINSTANLEY, C. Role of environmental survival in transmission of *Campylobacter jejuni*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 356, n. 1, p. 8-19, 2014.

BUELOW, D. R. et al. *Campylobacter jejuni* survival within human epithelial cells is enhanced by the secreted protein Cial. **Molecular Microbiology**, v. 80, n. 5, p. 1296-312, 2011.

BULL, S. A. et al. Sources of *Campylobacter* spp. colonizing housed broiler flocks during rearing. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 1, p. 645-652, 2006.

BUTZLER, J. P.; DE BOECK, M.; GOOSSENS, H. New selective medium for isolation of *Campylobacter jejuni* from faecal specimens. **The Lancet**, v. 321, n. 8328, p. 818, 1983.

CAPPITELLI, F.; POLO, A.; VILLA, F. Biofilm formation in food processing environments is still poorly understood and controlled. **Food Engineering Reviews**, v. 6, n. 1, p. 29–42, 2014.

CARPENTIER, B.; CERF, O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. **Journal of Applied Microbiology**, v. 75, n. 6, p. 499–511, 1993.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **National antimicrobial resistance monitoring system: enteric bacteria - 2010 - Human Isolates Final Report**. Atlanta, Georgia 2012. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/narms/pdf/2010-annual-report-narms.pdf>> Acesso em: 6 jul. 2014.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Campylobacter investigation Guideline**. Kansas Disease Investigation Guidelines. 2012. 16 p.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Travelers' Health. In: MAHON, B. E. **Chapter 3: Infectious diseases related to travel: Campylobacteriosis**. 2013. Disponível em: <<http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2014/chapter-3-infectious-diseases-related-to-travel/campylobacteriosis>> Acesso em: 25 mar 2017.

CHAMPION, O. L., et al. Comparative phylogenomics of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals genetic markers predictive of infection source. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 44, p. 16043–16048, 2005.

CHANDRASHEKHAR, K. et al. Transducer like proteins of *Campylobacter jejuni* 81-176: role in chemotaxis and colonization of the chicken gastrointestinal tract. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 5, n. 46, p. 1-12, 2015.

CHAUDHARY, A. S. A review of global initiatives to fight antibiotic resistance and recent antibiotics' discovery. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 6, n. 6, p. 552–556, 2016.

CHIAPPARRONE, M. L. et al. Quantitative analysis of *Campylobacter fetus venerealis* adhesion to bovine reproductive tract cell cultures. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.48, n.1, p. 73-78, 2011.

CHMIELEWSKI, R. A. N.; FRANK, J. F. A predictive model for heat inactivation of *Listeria monocytogenes* biofilm on rubber. **LWT – Food Science and Technology**, v. 39, n. 1, p. 11–19, 2006.

COATES, R. M. A.; HALLS, G.; HU, Y. Novel classes of antibiotics or more of the same? **British Journal of Pharmacology**, v. 163, n. 1, p. 184–94, 2011.

COSTA, F. et al. Covalent immobilization of antimicrobial peptides (AMPs) onto biomaterial surfaces. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 4, p. 1431–1440, 2011.

CULOTTI, A.; PACKMAN, A. I. *Pseudomonas aeruginosa* facilitates *Campylobacter jejuni* growth in biofilms under oxic flow conditions. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 91, n. 12, pp. fiv136, 2015.

DAMJANOVA, I. et al. From farm to fork follow-up of thermotolerant campylobacters throughout the broiler production chain and in human cases in a Hungarian county during a ten-months period. **International Journal of Food Microbiology**, v. 150, n. 2 - 3, p. 95–102, 2011.

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

DAVIS, M. A.; CONNER, D. E. Survival of *Campylobacter jejuni* on poultry skin and meat at varying temperatures. **Poultry Science**, v. 86, n.4, p. 765–767, 2007.

DECKERT, A. et al. Prevalence and antimicrobial resistance in *Campylobacter* spp. isolated from retail chicken in two health units in Ontario. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 7, p. 1317-1324, 2010.

DEKEYSER, P. et al. Acute enteritis due to related vibrio: First positive stool cultures. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 125, n. 4, p. 390-392, 1972.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. M. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Review**, v. 15, n. 2, p. 167–193, 2002.

DROZD, M. R. ***Campylobacter jejuni* survival strategies and counter-attack**: an investigation of *Campylobacter* phosphate mediated biofilms and the design of a high-throughput small-molecule screen for TAT inhibition. 2012. 173f. Thesis (Degree Doctor of Philosophy in the Graduate School of the Ohio State University) - Graduate Program in Veterinary Preventive Medicine, 2012.

DU, X. et al. cj0371: A Novel Virulence-Associated Gene of *Campylobacter jejuni*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1094, 2016.

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. **EFSA Journal**, v. 8, n. 3, p. 1503, 2010.

EFSA - European Food Safety Authority. Community Summary Report: Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic agents in the European Union in 2007. **EFSA Journal**, v. 223, 312 p., 2009.

EFSA - European Food Safety Authority. ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union Summary report on antimicrobial

resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2010. **EFSA Journal**, v. 10, n. 3, p. 2598, 2012.

EFSA - European Food Safety Authority. ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2011. **EFSA Journal**, v. 11, n. 5, p. 3196, 2013.

EFSA - European Food Safety Authority. European Centre for Disease Prevention and Control. **EFSA explains zoonotic diseases: *Campylobacter***. 2 p., 2014.

EFSA - European Food Safety Authority. ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Foodborne Outbreaks in 2015. **EFSA Journal**, v. 14, n. 12, 231p. 2016.

ELLIS-IVERSEN, J. et al. Risk Factors for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in young cattle on English and Welsh farms. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 88, n. 1, p. 42-48, 2009.

ENGEBRECHT, J.; SILVERMAN, M. Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 13, p. 4154-4158, 1984.

ESCHERICH, T. Beitrage zur kenntniss der darmbacterien. III. Ueber das vorkommen von vibrionen im darmcanal und stuhlgangen der sauglinge. **Münchener Med Wochenschrift**, v. 33, p. 815-817, 1886.

ESTRELA, C. et al. Mechanism of action of sodium hypochlorite. **Brazilian Dental Journal**, v. 13, n. 2, p. 113-117, 2002.

EWING, C. P.; ANDREISHCHEVA, E.; GUERRY, P. Functional characterization of flagellin glycosylation in *Campylobacter jejuni* 81-176. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 22, p. 7086-7093, 2009.

FÀBREGA, A. et al. Quinolone resistance in the food chain. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 31, n. 4, p. 307-315, 2008.

FAO / WHO - Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization. **Risk assessment of *Campylobacter* spp. in broiler chickens: Technical Report**. Microbiological Risk Assessment Series No. 12, Geneva, 132pp, 2009.

FAO / WHO - Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization. **Salmonella and *Campylobacter* in chicken meat**. Microbiological Risk Assessment Series No. 19., Geneva, 69 pp, 2009.

FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Approved Drugs**. 2016. Disponível em: <<http://www.centerwatch.com/drug-information/fda-approved-drugs>> Acesso em: 15 mar. 2016.

FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Retail Meat Report - National Antimicrobial Resistance Monitoring System**. Washington DC: Food and Drug Administration, 2011.

FERNANDES, M. et al. Study of cytolethal distending toxin (cdt) in *Campylobacter coli* using a multiplex polymerase chain reaction assay its distribution among clinical and food strains. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 1, p. 103-106, 2010.

FITZGERALD, C. et al. Evaluation of methods for subtyping *Campylobacter jejuni* during an outbreak involving a food handler. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 7, p. 2386-2390, 2001.

FLANAGAN, R. C. et al. Examination of *Campylobacter jejuni* putative adhesions leads to the identification of a new protein, designated FlpA, required for chicken colonization. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 6, p. 2399-2407, 2009.

FOLEY, S. L.; LYNNE, A. M.; NAYAK, R. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram negative bacterial foodborne pathogens. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 4, p. 430-440, 2009.

FONSECA, B. B. et al. Transfer, viability and colonisation of *Campylobacter jejuni* in the chicken vitellus and in embryos. **British Poultry Science**, v. 52, n. 3, p. 279-86, 2011.

FONSECA, B. B. et al. *Campylobacter jejuni* in commercial eggs. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 76-79, 2014.

FONSECA, B. B. **Resposta celular à infecção por *Campylobacter jejuni* em embriões e explants de íleo de aves e participação do citoesqueleto e lisossomos no processo de invasão em células Caco-2**. 2011. 124 f. Tese (Doutorado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

PUBLIC HEALTH AGENCY OF CANADA. FoodNet Canada 2014 Short Report. **FoodNet Canada**, 2016.

FSIS - Food Safety and Inspection Service. "Quarterly Progress Report on Salmonella and *Campylobacter*: Testing of Selected Raw Meat and Poultry Products: Preliminary Results, July 2014 to September 2014". **United States Department of Agriculture**, 2015.

FRANCHIN, P. R.; OGLIARI, P. J.; BATISTA, C. R. Frequency of thermophilic *Campylobacter* in broiler chickens during industrial processing in a Southern Brazil slaughterhouse. **British Poultry Science**, v. 48, n. 2, p. 127-132, 2007.

FSA – Food Standards Agency. *Campylobacter* survey: cumulative results from the full 12 months (Q1 – Q4). **Food Standards Agency**, 2015.

FSA – Food Standards Agency. FSA warns that chicken bacteria could be next meat scandal. **The Telegraph**, 2013.

FUTAGAMI, S.; ITOH, T.; SAKAMOTO, C. Systematic review with metaanalysis: post-infectious functional dyspepsia. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 41, n. 2, p. 177-188, 2015.

GABRIEL, M. R. **Campylobacter spp. na cadeia produtiva de suínos**. 2010. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

GARCÍA-SÁNCHEZ, L. et al. *Campylobacter jejuni* survival in a poultry processing plant environment. **Food Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 185-192, 2017.

GIAOURIS, E.; CHORIANOPOULOS, N.; NYCHAS, G. J. Effect of temperature, pH, and water activity on biofilm formation by *Salmonella enterica* Enteritidis PT4 on stain less steel surfaces as indicated by the bead vortexing method and conductance measurements. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 10, p. 2149-2154, 2012.

GIBSON, J. R.; SUTHERLAND, K.; OWEN, R. J. Inhibition of DNase activity in PFGE analysis of DNA from *Campylobacter jejuni*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 19, n. 5, p. 357-358, 1994.

GILPIN, B. et al. Application of pulsed-field gel electrophoresis to identify potential outbreaks of campylobacteriosis in New Zealand. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 406-412, 2006.

GOERING, R. V. Pulsed field gel electrophoresis: A review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 7, p. 866-875, 2010.

GORMLEY, F. J. et al. Has retail chicken played a role in the decline of human campylobacteriosis? **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 2, p. 383-390, 2008.

GRUNTAR, I. et al. *Campylobacter jejuni* contamination of broiler carcasses: population dynamics and genetic profiles at slaughterhouse level. **Food Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 97-101, 2015.

GUERRY, P. *Campylobacter* flagella: not just for motility. **Trends in Microbiology**, vol. 15, n.10, p. 456-461, 2007.

GUINEY, D. G. Regulation of bacterial virulence gene expression by the host environment. **Journal of Clinical Investigation**, v. 99, p. 565-569, 1997.

GUNTHER, N.; CHEN, C. The biofilm forming potential of bacterial species in the genus *Campylobacter*. **Food Microbiology**, v. 26, n. 1, p. 44-51, 2009.

- GUPTA, A. et al. Antimicrobial resistance among *Campylobacter* strains, United States, 1997–2001. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 6, p. 1102–1109, 2004.
- GUTIÉRREZ-MARTÍN, C. B. et al. Evaluation of efficacy of several disinfectants against *Campylobacter jejuni* strains by a suspension test. **Research in Veterinary Science**, v. 91, n. 3, p. 44–47, 2011.
- HABIB, I. et al. *Campylobacter* contamination in broiler carcasses and correlation with slaughterhouses operational hygiene inspection. **Food Microbiology**, v. 29, n. 1, p. 105–112, 2012.
- HADDOCK, G. et al. *Campylobacter jejuni* 81-176 forms distinct microcolonies on in vitro infected human small intestinal tissue prior to biofilm formation. **Microbiology**, v. 156, n. 10, p. 3079–3084, 2010.
- HAKANEN, A. et al. Fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* isolates in travelers returning to Finland: association of ciprofloxacin resistance to travel destination. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 2, p. 267 - 270, 2003.
- HANNING, I. **Capture, survival, colonization and virulence of *Campylobacter jejuni* in poultry biofilms**. 2008. 174 f. Dissertation (Doctor of Philosophy in Cell and Molecular Biology) - University of Arkansas, Arkansas, 2008.
- HANSEN, R. et al. The microaerophilic microbiota of de-novo paediatric inflammatory bowel disease: The BISCUIT Study. **PLoS One**, v. 8, n. 3, e58825, 2013.
- HANSSON, I. et al. Correlations between *Campylobacter* spp. prevalence in the environment and broiler flocks. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 3, p. 640–649, 2007.
- HARA-KUDO, Y.; TAKATORI, K. Contamination level and ingestion dose of foodborne pathogens associated with infections. **Epidemiology and Infection**, v. 139, n. 10, p. 1505–1510, 2011.
- HAVELAAR, A. H. et al. Estimating the true incidence of campylobacteriosis and salmonellosis in the European Union, 2009. **Epidemiology and Infection**, v. 141, n. 2, p. 293–302, 2013.
- HAVELAAR, A. H. et al. Immunity to *Campylobacter*: its role in risk assessment and epidemiology. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 1–22, 2009.
- HEDBERG, C. W. et al. Limitations of pulsed-field gel electrophoresis for the routine surveillance of *Campylobacter* infections. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 184, n. 2, p. 242–244, 2001.
- HEIKEMA, A. P. et al. Sialic acid-binding Ig-like lectin-7 specifically recognizes *Campylobacter jejuni* strains associated with oculomotor weakness in Guillain-Barre syndrome and Miller Fisher syndrome. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 2, p. E106–E112, 2013.

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

HERMANS, D. et al. Poultry as a host for the zoonotic pathogen *Campylobacter jejuni*. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, n. 2, p. 89-98, 2012.

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. 685-696, 1995.

HOIBY, N. et al. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 35, n. 4, p. 322-332, 2010.

HOLMES, K., et al. AI-2 does not function as a quorum sensing molecule in *Campylobacter jejuni* during exponential growth in vitro. **BMC Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 214, 2009.

HORROCKS, S. M. et al. Incidence and ecology of *Campylobacter jejuni* and *coli* in animals. **Anaerobe**, v. 15, n. 1-2, p. 18-25, 2009.

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

HUANG, J. et al. An inactivation kinetics model for *Campylobacter jejuni* on chicken meat under low-temperature storage. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, n. 6, p. 513-516, 2012.

HUE, O. et al. *Campylobacter* contamination of broiler caeca and carcasses at the slaughterhouse and correlation with *Salmonella* contamination. **Food Microbiology**, v. 28, n. 5, p. 862-868, 2011.

HUMPHREY, S. et al. *Campylobacter jejuni* is not merely a commensal in commercial broiler chickens and affects bird welfare. **MBio**, v. 5, n. 4, e01364-01314, 2014.

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.

ISOHANNI, P. et al. Heat stress adaptation induces cross-protection against lethal acid stress conditions in *Arcobacter butzleri* but not in *Campylobacter jejuni*. **Food Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 431-435, 2013.

JANG, K. I. et al. Morphology and adhesion of *Campylobacter jejuni* to chicken skin under varying conditions. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 202-206, 2007.

- JANSSEN, R. et al. Host-pathogen interactions in *Campylobacter* infections: the host perspective. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 3, p. 505-518, 2008.
- JAYARAMAN, A.; WOOD, T. K. Bacterial quorum sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 10, n. 1, p. 145-167, 2008.
- JORE, S. et al. Trends in *Campylobacter* incidence in broilers and humans in six European countries, 1997-2007. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 93, n. 1, p. 33-41, 2010.
- KAAKOUSH, N. O. et al. Microbial dysbiosis in pediatric patients with Crohn's disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 10, p. 3258-3266, 2012.
- KASSENBORG, H. et al. Fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* infections: eating poultry outside of the home and foreign travel are risk factors. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 3, p. S279- S284, 2004.
- KEITHLIN, J. et al. Systematic review and meta-analysis of the proportion of *Campylobacter* cases that develop chronic sequelae. **BMC Public Health**, v. 14, n. 1, p. 1203, 2014.
- KEUM-IL, J. et al. Morphology and adhesion of *Campylobacter jejuni* to chicken skin under varying conditions. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 202-206, 2007.
- KHANNA, M. R.; BHAVSAR, S. P.; KAPADNIS, B. P. Effect of temperature on growth and chemotactic behaviour of *Campylobacter jejuni*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 84-90, 2006.
- KINANA, A. D. et al. Genetic diversity and quinolone resistance in *Campylobacter jejuni* isolates from poultry in Senegal. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 5, p. 3309-3313, 2006.
- KIRKPATRICK, B. D. et al. Lack of homologous protection against *Campylobacter jejuni* CG8421 in a human challenge model. **Clinical Infectious Diseases**, v. 57, n. 8, p. 1106-1113, 2013.
- KITIS, M. Disinfection of wastewater with peracetic acid: a review. **Environment International**, v. 30, n. 1, p. 47-55, 2004.
- KLANCNIK, A. et al. Stress response and pathogenic potential of *Campylobacter jejuni* cells exposed to starvation. **Research in Microbiology**, v. 160, n. 5, p. 345-352, 2009.
- KOCIC, B. et al. Survival of *Campylobacter jejuni* in chicken meat, chicken skin and chicken liver at low temperatures. **Bratislavské Lekarske Listy**, n. 113, n. 6, p. 354-356, 2012.

- KONKEL, M. E.; et al. The Pathogenesis of *Campylobacter jejuni*-mediated Enteritis. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 55-71, 2001.
- KONKEL, M. E. et al. Characterization of the thermal stress response of *Campylobacter jejuni*. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 8, p. 3666-3672, 1998.
- KRAUSE-GRUSZCZYNSKA, M. et al. Role of the small Rho GTPases Rac1 and Cdc42 in host cell invasion of *Campylobacter jejuni*. **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 2431-2444, 2007.
- KUANA, S. L. et al. Pré-enriquecimento e isolamento directo para identificação de *Campylobacter* em swabs cloacais e carcaças de frango. **Acta Scientiae Veterinarie**, v. 36, n. 1, p. 21-24, 2008.
- KUWABARA, S.; YUKI, N. Axonal Guillain-Barre syndrome: concepts and controversies. **The Lancet Neurology**, v. 12, n. 12, p. 1180-1188, 2013.
- LEVIN, R. *Campylobacter jejuni*: a review of its characteristics, pathogenicity, ecology, distribution, subspecies characterization and molecular methods of detection. **Food Biotechnology**, v. 21, n. 4, p. 271-347, 2007.
- LEVY, A. J. A gastro-enteritis outbreak probably due to a bovine strain of vibrio. **J Infect Dis**. 1946;18:243-258.
- LEWIS, K. Riddle of biofilm resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 999-1007, 2001.
- LIGOWSKA, M. et al. Effect of chicken meat environment on gene expression of *Campylobacter jejuni* and its relevance to survival in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, n. 1, p. S111-S115, 2011.
- LODGE, K. B. **A molecular investigation of *Campylobacter jejuni* pathogenesis**. 2007. 345 f. Thesis (Doctor of Philosophy in Applied Sciences) - Engineering and Technology RMIT University, Melbourne, 2007.
- LOPES, G. V. ***Campylobacter* spp. no abate e varejo**: ocorrência em carcaças de bovinos para exportação e em cortes refrigerados de aves e bovinos. 2009. 103 f. Dissertação (Mestrado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- LOUWEN, R. et al. *Campylobacter jejuni* translocation across intestinal epithelial cells is facilitated by ganglioside-like lipooligosaccharide structures. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 9, p. 3307-3318, 2012.
- LPSN – **List of Prokaryotic Names with standing in nomenclature**, 2015. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/campylobacter.html>> Acesso em: 09 abr. 2017.
- LU, X. et al. Antimicrobial effect of diallyl sulfide on *Campylobacter jejuni* biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 8, p. 1915-1926, 2012.

MACHADO, S. M. O. **Evaluation of the antimicrobial effect of benzalkonium chloride surfactant in controlling the formation of undesirable biofilms.** 2005. Dissertation - Universidade do Minho, Minho, 2005.

MAH, T. F. Biofilm-specific antibiotic resistance. **Future microbiology**, v. 7, v. 9, p. 1061-1072, 2012.

MALAEB, L. et al. Do biological-based strategies hold promise to biofouling control in MBRs? **Water Research**, v. 47, n. 15, p. 5447-5463, 2013.

MALIK-KALE, P. **Alteration of genetic content and gene expression modulate the pathogenic potential of *Campylobacter jejuni*.** 2008. 212 f. Dissertation (Doctor of Philosophy Microbiology) - Washington State University, Washington, 2008.

MAN, S. M.; KAAKOUSH, N. O.; MITCHELL, H. M. The role of bacteria and pattern-recognition receptors in Crohn's disease. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 8, n. 1, p. 152-168, 2011.

MARCHANT, J.; WREN, B.; KETLEY, J. Exploiting genome sequence: predictions for mechanisms of *Campylobacter* chemotaxis. **Trends in Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 155-159, 2002.

MARSHALL, J. K. et al. 2010. Eight year prognosis of postinfectious irritable bowel syndrome following waterborne bacterial dysentery. **Gut**, v. 59, n. 5, p. 605-611, 2010.

MATOBA, Y.; KATSUBE, Y.; SUGIYAMA, M. The crystal structure of prokaryotic phospholipase A<sub>2</sub>. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 22, p. 20059-20069, 2002.

MATYAR, F. et al. Antibiotic and heavy metal resistance in Gram-negative bacteria isolated from the Seyhan Dam Lake and Seyhan River in Turkey. **Annals of Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 1033-1040, 2014.

MAUKONEN, J. et al. Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. , p. 327-356, 2003.

MCDONNELL, G.; RUSSELL, A. D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1, p. 147-179, 1999.

McDowell, S. W. et al. *Campylobacter* spp. in conventional broiler flocks in Northern Ireland: epidemiology and risk factors. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 84, n. 3-4, p. 261-276, 2008.

MEADE, K. G. et al. Comparative in vivo infection models yield insights on early host immune response to *Campylobacter* in chickens. **Immunogenetics**, v. 61, n.2, p. 101-110, 2009.

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.

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. et al. *Campylobacter jejuni* strains isolated from chicken meat harbor several virulence factors and represent a potential risk to humans. **Food Control**, v. 33, n. 1, p. 227-231, 2013.

MENDONÇA, E. P. et al. Campylobacteriosis: an emerging zoonosis, underdiagnosed and underreported by public health agencies in Brazil. **Bioscience Journal**, v. 31, n. 5, p. 1458-1474, 2015.

MERIC, G. et al. A reference pan-genome approach to comparative bacterial genomics: identification of novel epidemiological markers in pathogenic *Campylobacter*. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e92798, 2014.

MESSENS, W. et al. Multiple typing for the epidemiological study of contamination of broilers with thermotolerant *Campylobacter*. **Veterinary Microbiology**, v. 138, n. 1-2, p. 120-131, 2009.

MEUNIER, M. et al. Control strategies against *Campylobacter* at the poultry production level: biosecurity measures, feed additives and vaccination. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, n. 5, p. 1139-1173, 2015.

MILLER, C. E.; WILLIAMS, P. H.; KETLEY, J. M. Pumping iron: mechanisms for iron uptake by *Campylobacter*. **Microbiology**, v. 155, n. 10, p. 3157-3165, 2009.

MILLS, D. C. et al. Increase in *Campylobacter jejuni* invasion of intestinal epithelial cells under **Erro! A referência de hiperlink não é válida.**lowoxygen coculture conditions that reflect the in vivo environment. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 5, p. 1690-1698, 2012.

MOE, K. K. et al. The mode of biofilm formation on smooth surfaces by *Campylobacter jejuni*. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 72, n. 4, p. 411-416, 2010.

MONDS, R. D.; O'TOOLE, G. A. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 73-87, 2009.

MOORE, J. E. et al. The epidemiology of antibiotic resistance in *Campylobacter*. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 7, p. 1955-1966, 2006.

MOURA, M. S. **Influência de crioprotetores e pré-adaptação na viabilidade e produção de transcritos por cepas de *Campylobacter jejuni* mantidas a 20°C.** 2013, 74 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.

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.

MURAOKA, W. T.; ZHANG, Q. Phenotypic and genotypic evidence for L-fucose utilization by *Campylobacter jejuni*. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 5, p. 1065-1075, 2011.

MURRAY, P. R. et al. **Manual of Clinical Microbiology**, 9 ed, Washington: ASM Press, 2007.

NADEAU, E.; MESSIER, S.; QUESSY, S. Prevalence and comparison of genetic profiles of *Campylobacter* strains isolated from poultry and sporadic cases of campylobacteriosis in humans. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 1, p. 73-78, 2002.

KAAKOUSH, N. O. et al. Global epidemiology of *Campylobacter* infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 687-720, 2015.

NAIKARE, H. et al. *Campylobacter jejuni* ferric-enterobactin receptor CfrA is TonB3 dependent and mediates iron acquisition from structurally different catechol siderophores. **Metallomics**, v. 5, n. 8, p. 988-996, 2013.

NAITO, M. et al. Effects of sequential *Campylobacter jejuni* 81-176 lipooligosaccharide core truncations on biofilm formation, stress survival, and pathogenesis. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 8, p. 2182-2192, 2010.

NAZER, A. et al. Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. *Typhimurium*: a synergistic effect? **Food Microbiology**, v. 22, n. 5, p. 391-398, 2005.

NCBI – National Center for Biotechnology Information. GenBank, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>> Acesso em: 29 mar. 2017.

NELSON, J. et al. Fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* species and the withdrawal of fluoroquinolones from use in poultry; a public health success story. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, n. 7, p. 977-980, 2007.

NIELSEN, H. L. et al. High incidence of *Campylobacter* concisus in gastroenteritis in North Jutland, Denmark: a population-based study. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 5, p. 445-450, 2013.

OH, E.; McMULLEN, L.; JEON, B. High prevalence of hyper-aerotolerant *Campylobacter jejuni* in retail poultry with potential implication in human infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1263, 2015.

OIE - Who World Organization for Animal Health. **List of antimicrobials of veterinary importance**. Report of the 75th general session (Resolution n° XXVIII). Paris, France, 2007, 25 p.

O'REILLY, L. C.; INGLIS, T. J.; UNICOMB, L. Australian multicentre comparison of subtyping methods for the investigation of *Campylobacter* infection. **Epidemiology and Infection**, v. 134, n. 4, p. 768-779, 2006.

OYARZABAL, O. A. et al. Improved protocol for isolation of *Campylobacter* spp. from retail broiler meat and use of pulsed field gel electrophoresis for the typing of isolates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 95, n. 1, p. 76-83, 2013.

PALYADA, K.; THREADGILL, D.; STINTZI, A. Iron acquisition and regulation in *Campylobacter jejuni*. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 14, p. 4714-4729, 2004.

PARKHILL, J. et al. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. **Nature**, v. 403, n. 6770, p. 665-668, 2000.

PARVEEN, N.; CORNELL, K. A. Methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase, a critical enzyme for bacterial metabolism. **Molecular Microbiology**, v. 79, n. 1, p. 7-20, 2011.

PAULA, A. T. et al. Viability of *Campylobacter jejuni* in commercial eggs. **Bioscience Journal**, v. 25, n. 6, p. 143-148, 2009.

PENNER, G. A. et al. Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. **PCR Methods and Applications**, v. 2, n. 4, p. 341-345, 1993.

PITTENGER, L. G. et al. Genotyping *Campylobacter jejuni* by comparative genome indexing: an evaluation with pulsed-field gel electrophoresis and flaA SVR sequencing. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 3, p. 337-349, 2009.

PLUMMER, P. J. LuxS and quorum-sensing in *Campylobacter*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, n. 22, p. 1-9, 2012.

POMETTO, A. L.; DEMIRCI, A. **Biofilms in the food environment**, 2 ed, New Jersey: John Wiley & Sons, 2015. 320 p.

PORTER, C. K. et al. Pathogen-specific risk of chronic gastrointestinal disorders following bacterial causes of foodborne illness. **BMC Gastroenterology**, v. 13, n. 46, p. 1-7, 2013.

PRACHANTASENA, S. et al. Distribution and genetic profiles of *Campylobacter* in commercial broiler production from breeder to slaughter in Thailand. **PLoS One**, v. 11, n. 2, p. 1-16, 2016.

PUBMLST – Public databases for molecular typing and microbial genome diversity. Disponível em: <<http://pubmlst.org/>> Acesso em: 10 fev. 2017.

QUINONES, B. et al. Autoinducer-2 production in *Campylobacter jejuni* contributes to chicken colonization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 1, p. 281-285, 2009.

RAINES, D. J. et al. Bacteria in an intense competition for iron: key component of the *Campylobacter jejuni* iron uptake system scavenges enterobactin hydrolysis product. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 21, p. 5850-5855, 2016.

RAJAN, R. et al. Crystal structure of S-ribosylhomocysteinase (LuxS) in complex with a catalytic 2-ketone intermediate. **Biochemistry**, v. 44, n. 10, p. 3745-3753, 2005.

RAJASHEKARA, G. et al. Functional characterization of the twin-arginine translocation system in *Campylobacter jejuni*. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 8, p. 935-945, 2009.

RAJILIC-STOJANOVIC, M. et al. Phylogenetic analysis of dysbiosis in ulcerative colitis during remission. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 19, n. 3, p. 481-488, 2013.

RAYMOND, K. N.; ALLRED, B. E.; SIA, A. K. Coordination chemistry of microbial iron transport. **Accounts of Chemical Research**, v. 48, n. 9, p. 2496-2505, 2015.

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.

REID, A.N. et al. Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in the response to acidic pH and stomach transit. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 5, p. 1583-1597, 2008.

RIDDLE, M. S. et al. Pathogen-specific risk of celiac disease following bacterial causes of foodborne illness: a retrospective cohort study. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 58, n. 11, p. 324-3245, 2013.

RIDLEY, A. M. et al. Genetic instability is associated with changes in the colonization potential of *Campylobacter jejuni* in the avian intestine. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, n. 1, p. 95-104, 2008.

RIDLEY, A. et al. Potential sources of *Campylobacter* infection on chicken farms: contamination and control of broiler-harvesting equipment, vehicles and personnel. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 233-244, 2011.

RIVERA-AMILL, V. et al. Secretion of the virulence associated *Campylobacter* invasion antigens from *Campylobacter jejuni* requires a stimulatory signal. **Journal of Infectious Diseases**, v. 183, n. 11, p. 1607-1616, 2001.

ROBYN, J. et al. Thermotolerant *Campylobacter* during broiler rearing: risk factors and intervention. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 14, n. 2, p. 81-105, 2015.

ROMERO-BARRIOS, P. et al. Quantitative microbiological risk assessment (QMRA) of food-borne zoonoses at the European level. **Food Control**, v. 29, n. 2, p. 343-349, 2013.

ROSSI, D. A. et al. Biofilms of *Salmonella* and *Campylobacter* in the poultry industry. In: MANAFI, M. **Poultry Science**, 2016.

RUBINCHIK, S.; SEDDON, A.; KARLYSHEV, A. V. Molecular mechanisms and biological role of *Campylobacter jejuni* attachment to host cells. **European Journal of Microbiology and Immunology**, v. 2, n. 1, p. 32-40, 2012.

SADKOWSKA-TODYS, M.; KUCHARCZYK, B. Campylobacteriosis in Poland in 2010. **Przeglad Epidemiologiczny**, v. 66, n. 2, p. 255-258, 2012.

SAHIN, O. et al. Molecular evidence for zoonotic transmission of an emergent, highly pathogenic *Campylobacter jejuni* clone in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 680-687, 2012.

SALLAM, K. I. Prevalence of *Campylobacter* in chicken and chicken by-products retailed in Sapporo area, Hokkaido, Japan. **Food Control**, v. 18, n. 9, p. 1113-1120, 2007.

SAMPERS, I. et al. Processing practices contributing to *Campylobacter* contamination in Belgian chicken meat preparations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, n. 2, p. 297-303, 2009.

SAPS, M. et al. Post-infectious functional gastrointestinal disorders in children. **Journal of Pediatrics**, v. 152, n. 6, p. 812-816, 2008.

SCHWILLE-KIUNTKE, J. et al. Postinfectious irritable bowel syndrome: follow-up of a patient cohort of confirmed cases of bacterial infection with *Salmonella* or *Campylobacter*. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 23, n. 11, p. e479-e488, 2011.

SERICHANTALERGS, O. et al. Emerging fluoroquinolone and macrolide resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates and their serotypes in Thai children from 1991 to 2000. **Epidemiology and Infection**, v. 135, n. 8, p. 1299 – 1306, 2007.

SILVA, J. et al. *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: a review. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, n. 200, p. 1 – 12, 2011.

SIMÕES, M. et al. Control of flow-generated biofilms using surfactants – Evidence of resistance and recovery. **Food and Bioproducts Processing**, v. 84, n. 4, p. 338– 345, 2006.

SIVADON-TARDY, V. et al. Increased incidence of *Campylobacter jejuni* associated Guillain-Barre syndromes in the Greater Paris area. **Epidemiology and Infection**, v. 142, n. 8, p. 1609–1613, 2014.

SKARP, C.P.A. et al. Campylobacteriosis: The role of poultry meat. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 2, p. 103–109. 2016.

SKIRROW, M.B. *Campylobacter* enteritis: A "new" disease. **Br Medical Journal**, v. 2, n. 6078, p. 9-11, 1977.

SMITH, J. L.; BAYLES, D. O. The contribution of cytolethal distending toxin to bacterial pathogenesis. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 32, n. 4, p. 227-248, 2006.

SREY, S. et al. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 572–585, 2013.

STAHL, M. et al. Nutrient acquisition and metabolism by *Campylobacter jejuni*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, n. 5, p. 1-10, 2012.

STEAD, D.; PARK, S. F. Roles of Fe superoxide dismutase and catalase in resistance of *Campylobacter coli* to freeze-thaw stress. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 7, p. 3110–3112, 2000.

STEENACKERS, H. et al. *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 502–531, 2012.

STERN, N. J. et al. Frequency and enumeration of *Campylobacter* species from processed broiler carcasses by weep and rinse samples. **Poultry Science**, v. 86, n. 2, p. 394-399, 2007.

STINTZI, A.; WHITWORTH, L. Investigation of the *Campylobacter jejuni* cold-shock response by global transcript. **Genome Letters**, v. 2, n. 1-2, p. 18-27, 2003.

STINTZI, A. Expression profile of *Campylobacter jejuni* in response to growth temperature variation. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 6, p. 2009–2016, 2003.

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, p. e46402, 2012.

SUNG, K.; KHAN, S. Biofilm development by *Campylobacter jejuni*. In: POMETTO III, A. L.; DEMIRCI, A. (Ed.). **Biofilms in the Food Environment**, 2 ed. John Wiley & Sons, 2015. p. 29-50.

SVENSSON, S. L. **Molecular mechanisms of *Campylobacter jejuni* survival:** characterization of the CprRS two-component regulatory system and biofilm formation. 2012. 152 f. Thesis (Doctor in Microbiology and Immunology) - University of British Columbia, Vancouver, 2012.

SVENSSON, S. L.; PRYJMA, M.; GAYNOR, E. C. Flagella-mediated adhesion and extracellular DNA release contribute to biofilm formation and stress tolerance of *Campylobacter jejuni*. **PLoS One**, v. 9, n. 8, pp. e106063, 2014.

TABOADA, E. N. et al. Comparative genomic analysis of *Campylobacter jejuni* associated with Guillain-Barre and Miller Fisher syndromes: neuropathogenic and enteritis-associated isolates can share high levels of genomic similarity. **BMC Genomics**, v. 8, n. 1, p. 359, 2007.

TAM, C. C. et al. Longitudinal study of infectious intestinal disease in the UK (IID2 study): incidence in the community and presenting to general practice. **Gut**, v. 61, n. 1, p. 69-77, 2012.

TAZUMI, A. et al. Uneven distribution of the luxS gene within the genus *Campylobacter*. **British Journal of Biomedical Science**, v. 68, n. 1, p. 19-22, 2011.

TEH, A. H. T.; LEE, S. M.; DYKES, G. A. 2014. Does *Campylobacter jejuni* form biofilms in food-related environments? **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 17, p. 5154-5160, 2014.

TETTELIN, H. et al. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of streptococcus agalactiae: Implications for the microbial "pan-genome". **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 39, p. 13950-13955, 2005.

THEORET, J. R. et al. The *Campylobacter jejuni* dps homologue is important for in vitro biofilm formation and cecal colonization of poultry and may serve as a protective antigen for vaccination. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, n. 9, p. 1426-1431, 2012.

THOMAS, M. T. et al. Two respiratory enzyme systems in *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 contribute to growth on L-lactate. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 48-61, 2011.

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.

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. 6, p. 709, 2015.

VAN GERWE, T. et al. Quantifying transmission of *Campylobacter jejuni* in commercial broiler flocks. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 3, p. 625-628, 2009.

VANDAMME, P.; DE LEY, J. Proposal for a new family, *Campylobacteraceae*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 41, n. 3, p. 451-455, 1991.

VESTERLUND, S. et al. Measurement of bacterial adhesion in vitro evaluation of different methods. **Journal of Microbiological Methods**, v. 60, n. 2, p. 225-233, 2005.

VIVIAN, R. C. **The evaluation of biofilm formation and sensitivity to peracetic acid of *Salmonella* spp. isolated from poultry abattoir.** Dissertation - Universidade Estadual Paulista, 2014.

VUCIC, S.; KIERNAN, M C.; CORNBLATH, D. R. Guillain-Barré syndrome: an update. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 733-741, 2009.

WAGENAAR, J. A.; FRENCH, N. P.; HAVELAAR, A. H. Preventing *Campylobacter* at the source: why is it so difficult? **Clinical Infectious Diseases**, v. 57, n.11, p. 1600-1606, 2013.

WARREN, R. L. et al. Co-occurrence of anaerobic bacteria in colorectal carcinomas. **Microbiome**, v. 1, n. 1, p. 16, 2013.

WASSENAAR, T. M.; NEWELL, D. G. Genotyping of *Campylobacter* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2000.

WATNICK, P.; KOLTER, R. Minireview: biofilm, city of microbes. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 10, p. 2675-2679, 2000.

WHO - World Health Organization. **Antimicrobial resistance global report on surveillance.** 2014. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf)> Acesso em: 13 ago 2016.

WHO - World Health Organization. **Water-related diseases.** 2011. Disponível em: <[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/diseases/campylobacteriosis/en/](http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/campylobacteriosis/en/)> Acesso em: 23 ago. 2011.

WILLIAMS, L. K. et al. *Campylobacter* infection has different outcomes in fast- and slow-growing broiler chickens. **Avian Diseases**, v. 57, n. 2, p. 238-241, 2013.

WILSON, D. J. et al. Rapid evolution and the importance of recombination to the gastroenteric pathogen *Campylobacter jejuni*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 26, n. 2, p. 385-397, 2009.

WISESSOMBAT, S. et al. Enhancement of viable *Campylobacter* detection by chemotactic stimuli. **Journal of Microbiological Methods**, v. 82, n. 2, p. 170-176, 2010.

XAVIER, K. B.; BASSLER, B. L. Interference with AI-2-mediated bacterial cell-cell communication. **Nature**, v. 437, n. 7059, p. 750-753, 2005.

- XU, H.; LEE, H. Y.; AHN, J. Cross-protective effect of acid-adapted *Salmonella enterica* on resistance to lethal acid and cold stress conditions. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 290-297, 2008.
- YOUNG, K. T.; DAVIS, L. M.; DIRITA, V. J. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 665-679, 2007.
- ZAUTNER, A. E. et al. Chemotaxis in *Campylobacter jejuni*. **European Journal of Microbiology & Immunology**, v. 2, n. 1, p. 24-31, 2012.
- ZHAO, S. et al. Antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolates from retail meat in the United States between 2002 and 2007. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 24, p. 7949-7956, 2010.
- ZILBAUER, M. et al. *Campylobacter jejuni* mediated disease pathogenesis: an update. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene**, v. 120, n. 2, p. 123-129, 2008.
- ZIPRIN, R. L. et al. Role of *Campylobacter jejuni* potential virulence genes in cecal colonization. **Avian Diseases**, v. 45, n. 3, p. 549-557, 2001.