

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

PHELIPE AUGUSTO BORBA MARTINS PERES

**PERFIL VIRULENTO, DISSEMINAÇÃO FENOTÍPICA E DISTRIBUIÇÃO
ESPACIAL E SAZONAL DE *Campylobacter jejuni* ISOLADAS DE
CARÇAÇAS DE FRANGO NO BRASIL**

UBERLÂNDIA

2020

PHELIPE AUGUSTO BORBA MARTINS PERES

**PERFIL VIRULENTO, DISSEMINAÇÃO FENOTÍPICA E DISTRIBUIÇÃO
ESPACIAL E SAZONAL DE *Campylobacter jejuni* ISOLADAS DE
CARÇAÇAS DE FRANGO NO BRASIL**

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

Área de concentração: Saúde Animal
Orientadora: Prof^a. Dra. Daise Aparecida Rossi

UBERLÂNDIA

2020

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

P437	Peres, Phelipe Augusto Borba Martins, 1995-
2020	<p>PERFIL VIRULENTO, DISSEMINAÇÃO FENOTÍPICA E DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL E SAZONAL DE <i>Campylobacter jejuni</i> ISOLADAS DE CARCAÇAS DE FRANGO NO BRASIL [recurso eletrônico] / Phelipe Augusto Borba Martins Peres. - 2020.</p> <p>Orientadora: Daise Aparecida Rossi. Coorientadora: Ana Laura Grazziotin . Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Ciências Veterinárias. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.532 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Veterinária. I. Rossi, Daise Aparecida, 1963-, (Orient.). II. , Ana Laura Grazziotin, 1985-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.</p>

CDU: 619

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

PHELIPE AUGUSTO BORBA MARTINS PERES

**PERFIL VIRULENTO, DISSEMINAÇÃO FENOTÍPICA E DISTRIBUIÇÃO
ESPACIAL E SAZONAL DE *Campylobacter jejuni* ISOLADAS DE
CARÇAÇAS DE FRANGO NO BRASIL**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias da
Universidade Federal de Uberlândia,
como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Mestre em
Ciências Veterinárias

Área de concentração: Saúde Animal

Uberlândia, 08 de julho de 2020.

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

Prof. Dra. Cíntia Silva Minafra e Rezende – DMV – UFG

Prof. Dr. Heriberto Fernández Jaramillo - IMC/UACH



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias

BR 050, Km 78, Campus Glória, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: (34) 2512-6811 - www.ppgcv.famev.ufu.br - mesvet@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	CIÊNCIAS VETERINÁRIAS				
Defesa de:	DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO Nº PPGCV/010/2020				
Data:	20 de julho de 2020	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	16:55
Matrícula do Discente:	11812MEV010				
Nome do Discente:	PHELIPE AUGUSTO BORBA MARTINS PERES				
Título do Trabalho:	PERFIL VIRULENTO, DISSEMINAÇÃO FENOTÍPICA E DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL E SAZONAL DE <i>Campylobacter jejuni</i> ISOLADAS DE CARCAÇAS DE FRANGOS NO BRASIL				
Área de concentração:	SAÚDE ANIMAL				
Linha de pesquisa:	CLÍNICA MÉDICA E INVESTIGAÇÃO ETIOLÓGICA				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	EPIDEMIOLOGIA DE ZOOSE				

Reuniu-se por Videoconferência (meio eletrônico) a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, assim composta: Professores Doutores: **Cíntia Silva Minafra e Rezende - UFG; Heriberto Fernández Jaramillo - UACH; Daise Aparecida Rossi** orientadora do candidato.

Iniciando os trabalhos a presidente da mesa, Dra. Daise Aparecida Rossi, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Daise Aparecida Rossi, Professor(a) do Magistério Superior**, em 21/07/2020, às 09:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cintia Silva Minafra e Rezende, Usuário Externo**, em 21/07/2020, às 10:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **HERIBERTO FERNANDEZ, Usuário Externo**, em 21/07/2020, às 11:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2135005** e o código CRC **95B63A7F**.

À Deus, à minha família
e amigos em todos
os sentidos, pelo apoio,
amor e confiança.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A emoção de redigir uma dissertação, envolve o estudo a investigação a inovação e a escrita científica, mas vai muito além, envolve o sentimento de gratidão no seu mais amplo sentido.

A história dessa dissertação começa de um pequeno sonho, de um aluno, que sonhava em ser um pesquisador, sonho difícil com as atuais situações do país. Foram muitas “pedras” encontradas nesse percurso, confesso que muitas vezes chorei e pensei em desistir, mas nesse percurso encontrei pessoas incríveis que me fizeram seguir em frente. Por isso quero aqui tentar de alguma forma deixar meu OBRIGADO.

Primeiramente agradeço de todo meu coração à Deus, que em todos os momentos da minha vida esteve ao meu lado, me protegendo contra todo mal e me sustentando em todos os momentos felizes e tristes, sinto sua presença todos os dias em minha vida. Agradeço aos meus pais Ronan e Edna, que com todas as dificuldades, nunca deixaram transparecer, permitindo que eu pudesse continuar sonhando. A eles tenho a imensa alegria de ter certeza que entendem o meu afastamento tão precoce para que tudo fosse possível, e peço desculpas “mami” por ter feito você chorar. A minha “maninha” Marcella que nunca deixo de pensar em você todos os dias, obrigado por muitas vezes você ter acreditado mais em mim do que eu mesmo, sinto todos os dias suas orações.

A minha querida orientadora “mamis” Daise, que com a distância da minha família, tornou-se minha segunda mãe, obrigado por todas as preocupações, pelo carinho, até às vezes que eu sonhava demais, e você sempre sabia me trazer ao mundo real, às vezes com palavras duras, mas que me fizeram amadurecer bastante, me inspiro em você como pesquisadora e como mulher.

Aos meus amigos quero dizer que sem vocês eu não teria alcançado tantas coisas em minha vida. Em momentos difíceis que procurei me encontrar em meio a tantas adversidades do mundo, sempre lembrarei dos momentos alegres que sempre pude compartilhar com vocês. Com vocês foi possível imaginar viver, nem que seja por um curto tempo, um mundo sem discriminação e com o respeito ao amor em todas as suas formas.

Ao meu amigo Neto, companheiro de “AP”, nossa amizade tornou-se intensa nos últimos anos após tantas portas na cara, mas hoje agradeço pela amizade, você foi importante por não me deixar só, nessa fase tão difícil da minha vida, todas as suas brincadeiras irreverentes e até suas caretas nos dias ruins, nunca vou esquecer os dias que se dispôs a me ajudar no “Lab”.

Ao meu querido amigo Guilherme “Gui”, bom falar sobre você é meio complicado, me faltam palavras para descrever, mas você me ajudou em tantos momentos, que entendo que além de amigo, você foi um anjo que Deus colocou em minha vida. Todos nossos momentos trabalhando juntos, e divertindo juntos com “Thi” e “Lau”, sempre manteve o ambiente gostoso de viver.

Ao meu amigo Felipe, quero agradecer por estar presente desde nossa infância, Deus trilhou nossos caminhos novamente depois de tamanha distância, obrigado por sempre me ouvir nos momentos difíceis, e por acreditar que meu jeito irreverente de levar a vida, de uma forma divertida possa render planos futuros, com toda sua criatividade. A minha amiga Priscila “Pri”, que com tantas palavras e histórias sempre me deixaram mais alegre, até por ouvir nos desabafos e por sempre acreditar mais em mim do que eu mesmo.

A minha querida amiga Thais, que nos momentos bons e ruins, sempre me ouvia e estava pronta para me aconselhar em todos os momentos de minha vida e pelos cafés, que sempre me faziam desabafar além de sua presença irreverente no lab que me alegrava todos os dias.

Agradeço imensamente aos meus queridos “alunos/amigos”, pois assim senti com vocês o prazer de ensinar no mais intenso sentido, Eduarda, Arthur, Marcelo, Adriel e Ana Buiatte que sempre esteve comigo nos momentos de aperto extremo (boa sorte no seu estudo amiga), sem vocês esse projeto não seria possível, muito obrigado pelo carinho esforço dedicado ao nosso propósito, vocês podem sempre contar comigo.

Quero aqui deixar meu abraço também as minhas inspiradoras como pesquisadoras e como amigas Professoras Roberta, Eliane e Bia, vocês me ensinaram tantas coisas que nem sei como agradecer, só tenho a dizer que são um orgulho para nosso grupo de pesquisa e serve de exemplo como mulheres empoderadas, tenho orgulho de conviver todo esse tempo com vocês, em especial carinho a minha amiga “Rob”, sem você esse projeto não teria um

resultado tão bonito.

Outra mulher empoderada que posso deixar de agradecer profundamente, minha amiga Natassia, que destaca-se como profissional de exímia responsabilidade e que me ensinou coisas que nunca imaginei aprender e que me fez acreditar que a dedicação vale a pena, tudo é questão de tempo, muito obrigado pelos conselhos e por sua amizade.

Quero deixar aqui registrado o meu abraço a todos do LABIO/LEPIMOL, que todos esses 5 anos, ter me recebido nessa casa tão especial com imenso carinho, tornou-se minha segunda família: Tchesca, Silvia e meu querido amigo Marcelo, você foi um pai pra mim, todos os momentos de alegria no laboratório me fizeram levar a vida de forma mais leve e obrigado por todos os conselhos e também por todo o esforço nesse projeto.

À minha co-orientadora, Professora Ana Laura, por ter me auxiliado nas dúvidas e correções, especialmente nas partes de análise proteômica, meu muito obrigado.

Ao Professor Dr. Deivid, que conheço desde minha graduação e passei a acompanhar de longe toda sua dedicação em seus projetos e seus destaques como pesquisador, suas colaborações sempre foram incríveis em nosso grupo e serve de inspiração para minha vida.

À professora Dra. Cíntia, que com toda sua dedicação a pesquisa no país, também com *Campylobacter*, compõe essa banca nos prestigiando com suas considerações. Ao professor Dr. Heriberto, que sua presença nessa banca antes de tudo, nos enche de orgulho pela dedicação à pesquisa em diversas áreas principalmente com *Campylobacter*, e sua trajetória como pesquisador que nos faz continuar acreditando na pesquisa do país.

O meu muito obrigado a Universidade Federal de Uberlândia (UFU), minha segunda casa que sinto orgulho de fazer parte dessa gigante família, todos esses 6 anos me fizeram amadurecer a cada dia que estava dentro dos seus portões, com todos os momentos especiais que vivi. Especialmente ao Instituto de Biologia (INBIO), a Faculdade de Medicina Veterinária e ao Programa e Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV). E finalmente agradeço a FAPEMIG e CAPES, pela minha bolsa de pesquisa e pelos esforços para valorizar os estudantes no país.

Todo meu carinho

Os verdadeiros são poucos.
Mas são o suficiente para mim.

(ADELE Laurie Blue Adkins)

RESUMO

Campylobacter está entre os quatro patógenos mais incriminados em doenças diarreicas de origem alimentar em todo o mundo e *C. jejuni* é a espécie mais envolvida na campilobacteriose. Dentre as fontes da enfermidade aos humanos, o consumo da carne de frango mal cozida tem merecido destaque, e por isso, além da saúde pública, também há impacto na economia. A dissertação foi dividida em dois capítulos. O primeiro capítulo descreve as considerações gerais, relatando informações relevantes para a contextualização do leitor sobre o tema proposto, os objetivos gerais e os específicos. O segundo capítulo, registra o estudo epidemiológico de 359 cepas de *C. jejuni* isoladas de 114 carcaças de frango resfriadas, abatidas em estabelecimentos registrados sob inspeção federal e habilitados para o comércio interno e externo entre os anos de 2017 e 2018. Os isolamentos foram realizados em laboratório oficial do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento utilizando a metodologia proposta pela ISO 10272-1:2017 para o gênero e o espectrômetro de massa (MALDI TOF®) para a identificação da espécie. As cepas foram avaliadas por PCR convencional para um painel de 14 genes de virulência categorizados como: i) formação de biofilmes - *flaA* (motilidade) e *luxS* (mecanismo *quórum sensing*); ii) sistemas de secreção - *cdtABC* (secreção de citotoxina distensiva) e *hcp* (sistema de secreção tipo VI); iii) invasão e colonização - *cadF* (colonização intracelular), *ciaB* (invasão celular) e *pldA* (invasão/colonização); iv) adaptação ao estresse - *dnaJ* (termotolerância), *htrA* (auxílio no crescimento sob estresse) e *cbrA* (resistência ao choque osmótico); e v) indução à Síndrome de Guillain-Barré - *cstII* (SGB) e *neuA* (SGB). Os resultados foram utilizados para criar perfis, determinar os índices de variabilidade, virulência e multivirulência das cepas. O georreferenciamento identificou zonas quentes de isolamento, virulência e multivirulência. Os espectros obtidos na identificação das espécies pela espectrometria de massa, foram utilizados para a construção de um dendrograma, para avaliar a distribuição das cepas.

Palavras-chave: Campilobacteriose. Multivirulência. Georreferenciamento. MALDI-TOF.

ABSTRACT

Campylobacter is among the four pathogens most incriminated in foodborne diarrheal diseases worldwide and *C. jejuni* is the most involved species in campylobacteriosis. Among the sources of illness to humans, the consumption of undercooked chicken meat has been highlighted, and for this reason, in addition to public health, there is also an impact on the economy. The dissertation was divided into two chapters. The first one describes the general considerations, reporting relevant information to the reader's context on the proposed theme, and also the general and specific aims of the study. The second chapter records the epidemiological study of 359 strains of *C. jejuni* isolated from 114 chilled chicken carcasses, slaughtered in establishments registered under federal inspection, and qualified for internal and external trade between the years 2017 and 2018. The isolations were performed in an official laboratory of the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply using the methodology proposed by ISO 10272-1: 2017 for the genus and the mass spectrometer (MALDI TOF®) for the identification of the species. The strains were evaluated by conventional PCR for a panel of 14 virulence genes categorized as: i) biofilm formation - *flaA* (motility) and *luxS* (quorum-sensing mechanism); ii) secretion systems - *cdtABC* (distensive cytotoxin secretion) and *hcp* (type VI secretion system; iii) invasion and colonization - *cadF* (intracellular colonization), *ciaB* (cell invasion) and *pldA* (invasion/colonization); iv) adaptation to stress - *dnaJ* (thermotolerance), *htrA* (aid in growth under stress) and *cbrA* (resistance to osmotic shock); and v) induction of Guillain-Barré Syndrome - *cstII* (SGB) and *neuA* (SGB). The results were used to create profiles, determine the variability, virulence, and multivirulence indexes of the strains. The spectra obtained in the identification of the species by mass spectrometry, were used for the construction of a dendrogram, to evaluate the distribution of the strains.

Keywords: Campylobacteriosis. Multivirulence. Georeferencing. MALDI-TOF.

LISTA DE TABELAS E QUADROS

CAPÍTULO 2

- Tabela 1.** Frequências de genes de virulência em *C. jejuni* isoladas de carcaças de frangos entre outubro de 2017 e julho de 2018. 71
- Tabela 2.** Perfis de virulência classificados de acordo com as categorias dos genes estudados em *C. jejuni* isoladas de carcaças de frangos entre outubro de 2017 e julho de 2018. 71
- Tabela 3.** Índice de variabilidade dos perfis de virulência de *C. jejuni* isoladas de carcaças de frangos por estabelecimento de abate. 74
- Tabela 4.** Distribuição de frequência de cepas virulentas e multivirulentas por estabelecimentos. 74
- Tabela 5.** Índices de variabilidade, frequências de cepas e de perfis de virulência identificados em *C. jejuni* isoladas de carcaças de frango. 75
- Tabela 6.** Distribuição das cidades conforme o valor percentual de cepas de *C. jejuni* virulentas e multivirulentas isoladas em municípios localizados em três estados brasileiros (A, B e C). 79

Tabela 7.	Frequência de virulência e multi-virulência de cepas e perfis por sazonalidade.	80
Tabela 8.	Condições da PCR, sequências de nucleotídeos e tamanhos dos amplicons para identificar genes de virulência em <i>C. jejuni</i>	92

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Mecanismo de invasão, 1 - colonização da mucosa intestinal, 2 - mecanismo de invasão por internalização, 3 - mecanismo de invasão por translocação de *Campylobacter jejuni*. Adaptado de Backert et al. (2013). 52
- Figura 2.** Mecanismo de internalização do complexo CDT nas células do hospedeiro. (1) complexo CDT, (2) membrana nuclear, (3) subunidade B, (4) DNA fragmentado. Adaptado de Young et al. (2007). 54
- Figura 3.** Mecanismo de reconhecimento do sistema imune do hospedeiro. (1) célula neural, (2) *C. jejuni*, (3) gangliosídeo, (4) LOS. Adaptado de Walencka et al. (2018). 56
- Figura 4.** Representação esquemática da espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF. (A) Representação da ionização por laser, túnel de vóo e detector de sinal; (B) Espectro de massas (SIGMA-ALDRICH, 2020). 59

CAPÍTULO 2

- Figura 1.** Índice de variabilidade de *C. jejuni* por amostra de acordo com o número de colônias isoladas. A barra de erros indica o desvio padrão, *p < 0,05; **p < 0,01 pelo teste de Kruskall-Wallis. 73
- Figura 2.** Frequência relativa de cepas virulentas e multivirulentas por estado. V: Virulência; M: Multivirulência; P: perfis; S: cepas; Estados: A, B e C; * p<0,05; ** p<0,005 - One way Anova e Fisher test. 76
- Figura 3.** Gráfico de calor definido com base nas cores extremas do verde ao vermelho que indicam a frequência relativa de cada categoria de virulência estudada de acordo com o estado e os meses de isolamento de *C. jejuni*. A, B, C: estado de isolamento das cepas. BF: Biofilm formation group (frequência de um ou mais genes). SS: Secretion system (frequência de um ou mais genes). IC: Invasion/Colonization (frequência de um ou mais genes). SA: Stress adaptation (frequência de um ou mais genes). GBS: Síndrome de Guillain-Barré (frequência de um ou mais genes). V: índice de cepas virulentas. MV: índice de cepas multi-virulentas. X: ausência de isolados. (software GraphPad Prism 8.0.1). 77
- Figura 4.** Índices de variabilidade e multivirulência de *C. jejuni* ao longo de tempo de isolamento. Linha tracejada (---) separa índices baixos e médios dos valores de alta variabilidade genética. 80

Figura S1. Dendrograma construído de acordo com o perfil espectral (MSP) dos isolados de *Campylobacter jejuni*. O estado de origem dos isolados e o perfil gênico de virulência são indicados por barra de cores: (a) verde, vermelho e amarelo representam os estados A, B e C, respectivamente; (b) magenta, azul e branco representam os perfis multivirulento, virulento e não estabelecido, respectivamente.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AE – Adaptação ao estresse

AI – Auto Indutor

ATCC – American Type Culture

B – Formação de Biofilme

CAMCHAIN - *Campylobacter* in chicken production: survival, virulence and control

CAMCON - *Campylobacter* control - novel approaches in primary poultry production

CAMPYBRO - Control of *Campylobacter* infection in broiler flocks through two-steps strategy: nutrition and vaccination

CAMPYSAFE – *Campylobacter* safety

CDC – Center for Disease Control and Prevention

CDT – Toxina de Distensão Citoletal

CE – Commission European

DESI - Ionização por dessorção de *spray* de elétrons

DTA – Doença Transmitida por Alimentos

EI – Ionização eletrônica

ESI - Ionização por *spray* de elétrons

EU – European Union

FAB – Bombardeamento rápido de átomos

FDA – Food and Drug Administration

FNBP - *Fibronectin-binding proteins*

GPHIN - Global Public Health Intelligence Network

HCCA - ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico

IAL – Instituto Adolfo Lutz

IC – Invasão Colonização

INFOSAN - International Food Safety Authorities Network

ISSO – International Organization for Standardization

LEPIMOL - Laboratório de Epidemiologia Molecular

LOS – Lipolissacarídeos

MALDI - Ionização por dessorção a laser assistida por matriz

MAPA – Ministério da Pecuária e Abastecimento

mCCDA - Modified Charcoal-Cefoperazone-Deoxycholate Agar

MS – Mass spectrometry

MSP - Main Spectra Projections

MV – Multivirulência

NCBI – National Center for Biotechnology Information

NCTC – National Collection of Type Cultures

OMC – World Trade Organization

PNCP - Programa Nacional de Controle de Patógenos

PUBMLST – Public database for molecular typing and microbial genome diversity

QS – Quorum Sensing

RASFF - Rapid Alert System for Food and Feed

RFR - Reportable Food Registry

SAM - S-adenosilmetionina

SB – Indução à Síndrome de Guillain-Baré

SDS-PAGE - Extraction and polyacrylamide gels electrophoresis analysis

SGB – Síndrome de Guillain-Barré

SIF – Sistema de Inspeção Federal

SII – Síndrome do Intestino Irritável

SPS - Sanitary and Phytosanitary Measures Agreement

SS – Sistema de Secreção

SVS-MS – Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde

T6SS – Type VI secretion system

Tip – Proteínas do tipo Indutor

TOF - Time-of-Flight

UPGMA - Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

V – Virulência

I.Var. – Índice de Variabilidade

VNC – Viável não cultivável

WHO – World Health Organization

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

PHELIPE AUGUSTO BORBA MARTINS PERES - Nascido em Araguari, Estado de Minas Gerais, em 19 de janeiro de 1995, filho de Ronan Martins Peres e Edna Maria Borba Martins Peres. Biólogo, graduado em dezembro de 2017 pelo Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia - UFU. Em 2018 iniciou o mestrado na mesma instituição, no Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV-UFU). Tem experiência nas seguintes áreas: microbiologia, patógenos de origem alimentar, biologia molecular, epidemiologia e saúde pública.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	21
1 INTRODUÇÃO	22
2 OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo Geral	25
2.2 Objetivos Específicos	25
3 REVISÃO DE LITERATURA	26
3.1 <i>Campylobacter</i> spp.	26
3.2 <i>Campylobacter</i> e segurança alimentar	28
3.3 Infecção sinais clínicos, tratamento e prevenção da campilobacteriose	32
3.4 <i>Campylobacter</i> na cadeia produtiva avícola	37
3.5 Fatores de virulência associados à <i>Campylobacter</i>	43
3.6 Matrix Associated Laser Desorption-Ionization – Time of Flight (MALDITOF)	57
CAPÍTULO 2 – Multivirulência e disseminação fenotípica de <i>Campylobacter jejuni</i> veiculadas pela carne de frango no Brasil.	65
REFERÊNCIAS	106
ANEXOS	126
1 Normas do periódico PLOS Pathogens - Capítulo 2	126

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira ocupa posição de destaque, por ser o maior exportador e o segundo maior produtor mundial de carne de frango desde 2008 (ABPA, 2020). O setor é também fundamental para a economia brasileira, pois gera milhões de empregos (AVISITE, 2020).

Este protagonismo da avicultura brasileira leva também à responsabilidade para a implementação de ações que favoreçam o aumento da produtividade, da sanidade dos animais e inocuidade da carne produzida. A segurança alimentar é uma preocupação mundial, já que doenças transmitidas pelos alimentos atingem 550 milhões de pessoas em todo o mundo (WHO, 2020). Assim, a garantia da segurança dos alimentos de origem animal é responsabilidade das indústrias, que devem ser acompanhadas e fiscalizadas pelos serviços de inspeção.

Entre as bactérias causadoras de infecções e transmitidas pelo consumo de alimentos aos humanos, *Campylobacter* é a mais prevalente e altamente associada ao consumo de carne de frango contaminada, permanecendo entre os quatro patógenos mais incriminados em doenças diarreicas de origem alimentar (EFSA, 2018; PISOSCHI, 2018; WHO, 2020). Dentre as espécies, *Campylobacter jejuni* é a mais envolvida na campilobacteriose humana (WHO, 2013).

A campilobacteriose é uma doença zoonótica, caracterizada como uma gastroenterite aguda, geralmente autolimitante, com sintomas que incluem diarreia, que pode ser acompanhada de sangue, febre, cólicas estomacais, náuseas e vômitos. Em casos mais raros pode ocorrer o desenvolvimento de complicações como artrite, síndrome do intestino irritável e necessidade de

hospitalização. A complicação mais grave pós infecção é o desenvolvimento da Síndrome de Guillain-Barré (SGB), que chega a representar 40% dos casos nos Estados Unidos e pode levar ao óbito (CDC, 2020).

Vários fatores estão associados à infecção por *Campylobacter*, tanto relacionados ao hospedeiro como às características intrínsecas do gênero, espécies ou cepas. Como fatores que podem ser relacionados à maior virulência, casos mais graves e maior oportunidade de encontrar um hospedeiro suscetível destacam-se a motilidade, adesão, invasão, produção de toxinas, captação de ferro e resistência aos antimicrobianos. Porém, nem todos os fatores e genes envolvidos nessas e outras características estão ainda completamente compreendidos (DASTI et al., 2010; BOLTON et al., 2015).

A necessidade de maior conhecimento sobre os diferentes fatores epidemiológicos ligados à infecção humana por *Campylobacter*, vêm instigado estudos mais detalhados, e por esse motivo, desde 2011 diversos projetos foram desenvolvidos na Europa (CAMCON, CAMPYBRO, CAMCHAIN, CAMPYSAFE). Esses projetos visam a melhor compreensão do patógeno por meio de estudos epidemiológicos, que buscam com seus resultados, a implementação de um melhor controle na produção primária, redução das infecções por intervenções na nutrição dos animais e até o desenvolvimento de vacinas (KOUTSOUMANIS et al., 2020).

No Brasil, os relatos de *Campylobacter* como patógeno alimentar é provavelmente subnotificado ou não identificado, já que seu monitoramento não é exigido para nenhum grupo de alimentos (BRASIL, 2001).

A preocupação com esse micro-organismo baseia-se nos índices observados no Brasil e em outros países da América do Norte, Europa e Japão,

onde as taxas de contaminação de frangos de corte e subprodutos pós processamento variam de 8 a 100%. Estes índices indicam alta contaminação e risco à saúde pública pelo consumo de carne de frango mal cozida (SUZUKI; YAMAMOTO, 2009; MELO et al., 2019; MUHANDIRAMLAGE et al., 2020).

Considerando que há alta produção e consumo de carne de frango no país, e também o grande volume exportado, estudos da disseminação e caracterização de *Campylobacter* isoladas de frangos brasileiros, são salutares e necessários. O maior conhecimento sobre o potencial virulento das cepas circulantes e outros fatores relacionados à epidemiologia podem auxiliar na avaliação do risco e orientar medidas para sua prevenção.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Determinar o potencial virulento de cepas de *C. jejuni* isoladas de carcaças de frangos de corte destinadas ao comércio interno e externo.

2.2. ESPECÍFICOS

Determinar em cepas de *C. jejuni* isoladas de carcaças de frangos:

- a presença de genes de virulência e adaptação ambiental: *pldA*, *ciaB*, *cadF*, *cbrA*, *htrA*, *cdtABC*, *dnaJ*, *flaA*, *hcp* e *luxS*;
- a presença dos genes *neuA* e *cstII*, envolvidos no desenvolvimento da Síndrome de Guillain-Barré;
- utilizar os dados genotípicos para criar perfis de virulência (V) e multivirulência (MV);
- correlacionar os resultados do painel de genes de virulência, adaptação ambiental e genes ligados a SGB;
- verificar se há diferenças entre perfis de virulência por estado, cidade, meses ou estabelecimentos;
- identificar por gráficos de calor pontos quentes de frequências de cepas virulentas nos estados e por sazonalidade;
- Demonstrar a disseminação dos perfis de virulência utilizando espectrometria de massa.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. *Campylobacter* spp.

O gênero *Campylobacter* pertence à família *Campylobacteraceae*, que agrupa 44 espécies e 16 subespécies (LPSN, 2020). É representado por bacilos gram-negativos que possuem formato de bacilo curvo espiralado que lembram o formato de uma “asa de gaivota”, com tamanho variando de 0,2-0,8 μ m x 0,5-5 μ m, não formadores de esporos (DONNISON e ROSS, 2014). A maioria das espécies possuem flagelo polarizado ou em ambas as extremidades, mas as espécies *C. gracilis* e *C. showae* fogem do padrão por ser imóvel e possuir múltiplos flagelos, respectivamente (SILVA et al., 2011).

As espécies termofílicas, *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari*, são as usualmente incriminadas como causa de gastroenterite humana, e possuem como características a capacidade de produzir as enzimas catalase e oxidase, serem fastidiosas em relação a nutrientes e microaerófilas (5% O₂, 10% CO₂, e 85% N₂). Sobrevivem em pH variando de 4,9 a 9,0, com faixa ótima em 6,5 a 7,5 e o crescimento ótimo acontece a 42°C, sendo incapaz de se multiplicar em temperaturas abaixo de 30°C (GARÉNAUX et al., 2008).

Vários meios de cultivo líquidos ou sólidos vêm sendo testados e recomendados para a recuperação e isolamento de espécies termofílicas de *Campylobacter*, entre eles, os caldos Preston e Bolton, ágar Skirrow e ágar mCCDA. Em ágar Skirrow as colônias apresentam coloração rosada pálida e no ágar mCCDA, na maioria das vezes, são características as colônias com coloração cinza com um brilho metálico (OIE, 2008; HABIB et al., 2011).

Os métodos de análise mais utilizados e aceitos pela comunidade científica e órgãos internacionais de harmonização de metodologias para o isolamento e enumeração são os recomendados pela ISO 10272 (ISO, 2006).

Outra característica do gênero *Campylobacter* que é motivo de estudo, é que em condições ambientais estressantes e desfavoráveis para o seu crescimento, pode ocorrer a mudança de sua morfologia. Nessas condições, os micro-organismos degeneram da forma espiralada para formas cocoides, que não crescem em meios de cultivo, conhecidas como VBNC (viáveis mas não cultiváveis). Estas formas são consideradas como uma fase degenerativa do ciclo de vida, mas estudos tem demonstrado que algumas espécies ainda são infectantes, além de exibir maior resistência aos antibióticos que a forma cultivável e a capacidade de manutenção da virulência, principalmente após a reativação em um hospedeiro suscetível. Além disso, embora ainda não comprovado para muitas espécies, podem permanecer no estado VBNC por longos períodos, permitindo a persistência no ambiente e maior chance de propagação (OLIVER, 2010; RODRIGUES et al., 2015). Assim, a forma VBNC é uma estratégia de sobrevivência em resposta a condições ambientais adversas e um importante reservatório de patógenos no meio ambiente (DEL MAR LLEÒ et al., 2007).

A nível genômico, o gênero possui como genoma de referência a cepa *C. jejuni* NCTC 1168, sequenciada no ano 2000, onde Parkhill et al. (2000) identificaram a extensão em 1,64 Mpb. Porém, Zhao et al. (2016) comentam que a falta de estudos de comparação dos genomas sequenciados de *Campylobacter* isolados de alimentos, o que dificulta uma análise gênica mais robusta, que possibilitaria um entendimento mais claro de seu potencial virulento.

Os genomas já depositados em bibliotecas gênicas permitiram identificar a média no conteúdo de % GC (guanina-citosina) em 30,4%, com contagem média de 1642 proteínas e tamanho médio de 1,68 Mpb. Em 2020, 1629 genomas já foram depositados no *National Center for Biotechnology Information* - NCBI, sendo 176 completos, e no portal *Public MultiLocus Sequence Typing* – PubMLST, 50.138 genomas estão disponíveis. Estes são os bancos de dados mais robustos nos Estados Unidos e Reino Unido (NCBI, 2020; PUBMLST, 2020).

3.2. *Campylobacter* e segurança alimentar

Mundialmente, a segurança alimentar é motivo de preocupação dos governos, já que, além dos riscos individuais e à saúde pública, as doenças transmitidas por alimentos (DTA's) afetam também a economia. Isso, devido ao afastamento de trabalhadores, inutilização de alimentos contaminados e prejuízos no comércio interno e externo. Dentre os setores afetados destaca-se o de exportação de produtos de origem animal que devem atender a padrões estabelecidas no Acordo sobre a Aplicação de Medidas Sanitárias e Fitossanitárias (SPS) da (OMC) Organização Mundial do Comércio (WHO, 2015).

O comércio globalizado, juntamente com a extensiva produção de alimentos de origem animal, que envolve uma cadeia produtiva complexa, gera instabilidade na segurança alimentar, que muitas vezes se traduz em surtos (HUSSAIN; DAWSON, 2013). Pelas múltiplas oportunidades de contaminação são necessárias medidas mitigadoras em toda a cadeia, que no caso de

alimentos de origem animal, vão desde a produção primária no campo até a residência do consumidor e inclui sanidade dos animais, condições de produção, higiene e instalações de abate, manipulação, armazenamento, higienização, além da qualidade da água (VALERO et al., 2016).

Bactérias do gênero *Campylobacter* estão presentes no trato intestinal de animais endotérmicos, como aves, gado, porcos, ovelha, entre outros. Quando estes animais são utilizados na produção de alimentos pode haver a contaminação da carne e posterior infecção humana, pela ingestão de produtos mal cozidos (WHO, 2020).

Representantes do gênero *Campylobacter* também estão presentes em fezes de animais de estimação, como cães e gatos que, por contaminação cruzada ou direta, podem chegar aos humanos. O envolvimento de cães domésticos na campilobacteriose humana pode ser comprovado por um surto envolvendo 17 estados nos Estados Unidos entre os anos de 2016 e 2018, que confirmou 113 pessoas comprovadamente infectadas por análises laboratoriais e sintomas consistentes. Em 23 pessoas (22%) foi necessária a hospitalização, mas não houve mortes. O sequenciamento de genomas demonstrou que isolados de animais e humanos infectados eram geneticamente relacionados, demonstrando a fonte comum de infecção (MONTGOMERY et al. 2018). Outro surto envolvendo 13 estados e 30 infectados por *C. jejuni* está em andamento e análises genômicas preliminares indicam tratar-se da mesma cepa envolvida no surto anterior (CDC, 2019).

Apesar do envolvimento de cães domésticos, o consumo de alimentos de origem animal contaminados, especialmente a carne de frango, permanece como a principal fonte de infecção para os humanos (EFSA, 2020).

Nos Estados Unidos da América, dados do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) mostram que o gênero *Campylobacter* é o mais comumente identificado em infecções alimentares desde 2013, sendo *C. jejuni* a espécie mais incriminada. Os índices de infecção são de 20 a cada 100.000 habitantes, o que afeta 1,5 milhões de pessoas por ano, com a ingestão de leite cru e carnes de frangos contaminados a principal causa das infecções em humanos (CDC, 2019; USDA, 2019).

A Europa tem índices alarmantes de campilobacteriose, com aproximadamente 64 casos a cada 100.000 habitantes em 2018, sendo a zoonose alimentar mais identificada em todo o continente desde 2005. *C. jejuni* é também a espécie mais incriminada em alimentos de origem animal como leite e carne de frangos, as fontes mais comuns. Os prejuízos com a doença chegam a 2,4 bilhões de euros, com Alemanha, Reino Unido e República Tcheca, os países com maior número de casos confirmados (EFSA, 2019).

Dados atuais e confiáveis sobre os números da campilobacteriose humana e fontes de infecção mais comuns não são facilmente obtidos em todos os países ou continentes. Muitos países, principalmente os subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, não possuem sistema de vigilância ativos ou o monitoramento e a comprovação são insuficientes (FAO, 1999).

Assim, apesar de não haver dados sumarizados, há registros de *Campylobacter*, no continente africano em publicações científicas e relatos de campilobacteriose humana desde 1997, acometendo principalmente crianças menores de cinco anos, que destacam *C. jejuni* como a espécie mais envolvida (GAHAMANYI et al., 2020). Naquele continente, estudo demonstrou que a carne de frango é importante fonte de infecção, pois análise de frangos destinados à

alimentação humana provenientes da província de Mafikeng determinou 30% (126/408) de positividade para *Campylobacter* spp., com 16,7% dos isolados identificados como *C. jejuni*. (BISSONG e ATEBA, 2019).

Os estudos no continente asiático também não são compilados e divulgados institucionalmente, mas há diversos relatos de campilobacteriose humana, principalmente no sudoeste em países como a China, Japão e Índia (KAAKOUSH et al., 2015).

Estima-se que na China, 118 pessoas a cada 100.000 habitantes sejam acometidas pela campilobacteriose pelo consumo de carnes de frangos contaminados. Anteriormente, o número de infectados era ainda maior, já que entre os anos de 2010 e 2011, as taxas foram de 293 e 352 por 100.000 habitantes, respectivamente (HUANG et al., 2018).

Desde 2003 campilobacteriose está na lista das principais DTA's identificadas pelos centros de notificação no Japão, onde afeta principalmente jovens de 10 a 20 anos. *C. jejuni* também é a espécie mais prevalente e os dados reforçam o consumo de carnes de frango crua ou mal cozida como a principal forma de infecção, devido aos hábitos alimentares da população (VETCHAPITAK e MISAWA, 2019).

Na Índia, *Campylobacter* spp. foi associado a quadros de gastroenterite entre os anos de 2008 a 2010, quando representou 7% de todos os patógenos identificados. *C. jejuni* foi a espécie mais identificada e os infectados eram principalmente crianças menores de cinco anos (MUKHERJEE et al., 2013).

Na Austrália, *Campylobacter* spp. está entre os patógenos mais incriminados em casos de gastroenterites transmitidas por alimentos, representando até 70% de todos os casos identificados em 2010 (KIRK, 2010).

No Brasil, nos dados oficiais do Serviço de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS-MS) não há registro da identificação de *Campylobacter* em nenhum surto alimentar nos últimos anos (FRAZÃO et al., 2017; SILVA et al., 2018). Esse micro-organismo aparece somente em um compilado de surtos ocorridos entre os anos de 2000 a 2011, em que é indicado como responsável por três episódios (BRASIL, 2012). Apesar da falta de registros no SVS-MS, pesquisas tem demonstrado que é alta a incidência em carcaças de frangos brasileiros (MELO et al., 2019; WURFEL et al., 2019). Adicionalmente, há descrição de cepas com alto potencial patogênico por possuir genes de virulência, de resistência aos antimicrobianos e capacidade de formar biofilmes (MELO et al., 2017).

A legislação do Ministério da Saúde que regulamenta alimentos (RDC N° 12 de 2001) não preconiza a análise de *Campylobacter* em nenhum grupo de alimentos. A revisão desta resolução (IN 60 de 23/12/2019) que foi publicada no Diário Oficial da União em 26/12/2019, também não prevê a análise do micro-organismo em nenhum grupo de alimentos (BRASIL, 2019).

3.3. Infecção, sinais clínicos, tratamento e prevenção da campilobacteriose

A infecção humana por *Campylobacter* é associada a uma ampla variedade de fontes, incluindo a ingestão de carne de ave crua ou mal coccionada, laticínios não pasteurizados, outros produtos de origem animal e água contaminada, além do contato com fezes de animais domésticos como cães e gatos (CDC, 2020). Dentre as espécies envolvidas na doença, *C. jejuni*

é a mais prevalente e associada à casos e surtos humanos (KAAKOUSH, 2015).

Posteriormente à infecção por *C. jejuni*, ocorre a colonização em massa das criptas do intestino, que se inicia pela adesão ao epitélio mucoso e degradação das mucinas (proteínas glicolisadas) presentes na camada de células epiteliais. Após, os micro-organismos conseguem invadir e se acoplar às estruturas celulares e iniciam a produção de toxinas, que entre outros efeitos, aumentam a produção de líquidos na luz intestinal (O CRÓINÍN e BACKERT, 2012; STAHL e VALLANCE, 2015). A instalação da infecção causa danos severos às criptas intestinais e liberação de citocinas, além do recrutamento de todas as células da resposta imune, que passam a interagir entre si, objetivando a remoção das células bacterianas (JUNG et al. 1995; MURPHY; COGAN; HUMPHREY, 2011).

Os sinais clínicos iniciam-se de dois a cinco dias após a infecção, podendo variar de um a 10 dias, com duração média de três a seis dias, mas ocorre excreção da bactéria nas fezes por semanas após a recuperação. Os sinais clássicos incluem diarreia, frequentemente sanguinolenta, dor abdominal, febre, dor de cabeça e náusea, podendo ser acompanhada de vômito. Além da gastroenterite, há relatos pouco comuns de infecções extra intestinais como bacteremia (sepse), hepatite, pancreatite, e até abortos espontâneos. Como consequências pós infecção, pode ocorrer o desenvolvimento da Síndrome do Intestino Irritável (IBS) em 5 a 20% dos pacientes e artrite reativa em 1 a 5%, e ainda uma síndrome bastante grave, a Síndrome de Guillain-Barré (SGB), uma desordem autoimune que pode levar à morte por insuficiência respiratória (CDC, 2019; WHO, 2020).

Na maioria dos casos de campilobacteriose não há necessidade de tratamento específico, sendo realizado somente o tratamento sintomático, com a reposição de eletrólitos pela hidratação. Porém, em infecções mais severas, quando ocorre a invasão das células da mucosa intestinal, danificando os tecidos, é necessária a administração de antibióticos, sendo a azitromicina (macrolídeo) e as fluorquinolonas as drogas mais utilizadas. Apesar de serem as drogas de primeira e segunda escolha, respectivamente, recomenda-se o uso prévio de testes de susceptibilidade para garantir um tratamento eficaz (CDC, 2019; WHO, 2020).

A preocupação com o uso da antibioticoterapia empírica deve-se ao relato frequente de resistência aos antimicrobianos em cepas de *Campylobacter*, incluindo drogas das classes de primeira e segunda escolha. (IOVINE, 2013).

Na América Latina há relatos de alta resistência às fluorquinolonas em cepas de *Campylobacter* isoladas de seres humanos, animais domésticos, produtores de alimentos, alimentos de origem aviária, aves silvestres e fontes ambientais em diversos países. Além disso, há evidências do envolvimento da cadeia alimentar na transmissão das cepas resistentes de animais de produção para os humanos (FERNÁNDEZ e PÉREZ-PÉREZ, 2016).

Ainda na América Latina, no Brasil, a resistência a outras classes de antimicrobianos também vem sendo descrita para *C. jejuni*. Melo e colaboradores (2019) testaram 99 cepas isoladas de carcaças de frango nos anos de 2011–2012 e 2015–2016 a quatro classes de antimicrobianos e encontraram 77 (77,8%) cepas resistentes à tetraciclina, 55 (55,6%) à associação ácido clavulânico-amoxicilina, 25 (25,3%) a eritromicina e nove (9,1%) à gentamicina.

O sequenciamento do gene *flaA* foi utilizado para avaliar 602 cepas de *C. jejuni* isoladas na cadeia avícola (fezes, carcaças e carne de frango) e cepas isoladas de pacientes humanos na Polônia para determinar perfis multirresistentes. A maioria dos isolados era resistente à ciprofloxacina (556 - 92,4%), ácido nalidíxico (538 - 89,4%) e tetraciclina (412 - 68,4%), sendo os isolados da cadeia avícola mais resistentes à ciprofloxacina que as cepas isoladas de pacientes humanos. Baixo número de isolados, independentemente da origem, foram resistentes à estreptomicina (111 - 18,4%) e apenas 5/624 (0,8%) isolados exibiu resistência a eritromicina, todos recuperados nas amostras da cadeia avícola. Padrões de multirresistência foram identificados em 110 (18,3%) dos isolados recuperados de todas as fontes, sendo a maioria (92 - 15,3%) resistentes à ciprofloxacina, ácido nalidíxico, estreptomicina e tetraciclina (WIECZOREK; WOLKOWICZ e OSEK, 2019).

Igwaran e Okoh (2020) avaliaram padrões de suscetibilidade antimicrobiana e determinantes genéticos de resistência em espécies de *Campylobacter* isolados de 248 amostras de carnes cruas disponíveis no varejo (açougues, supermercados e mercados abertos) em dois distritos na África do Sul. A análise gênica demonstrou provável resistência fenotípica contra 12 antibióticos pertencentes a nove famílias de antimicrobianos. Todos isolados (100%) apresentaram resistência fenotípica à clindamicina, (97,08%) a ampicilina, (94,17%) a tetraciclina, (93,75%) a doxiciclina, (87,03%) a eritromicina, (84,58%) a azitromicina, (83,75%) a ceftriaxona, (76,25%) a ciprofloxacina, (71,67%) ao clorofenicol, (64,58%) a gentamicina, (54,58%) a levofloxacina (23,33%) ao imipenem.

A prevenção da campilobacteriose é complexa e envolve ações em toda a cadeia de produção de alimentos, especialmente os de origem animal (LIU e GUPTA, 2018). Particularmente na avicultura, os cuidados devem iniciar na produção das aves nas granjas com ações que visem diminuir o número de animais infectados, que incluem boas práticas de manejo sanitário e ambiental, potabilidade da água, qualidade da ração e controle de moscas. O trato intestinal das aves infectadas é fonte importante de contaminação das carcaças durante o abate, pois sempre há risco de rompimento intestinal ou contaminação cruzada via equipamentos e instrumentos (ZHANG e SAHIN, 2019).

Na produção dos alimentos de origem animal, são necessárias medidas de controle em todas as etapas de processamento. O estabelecimento de diretrizes para possibilitar a garantia da segurança alimentar, baseia-se na ciência, como a aplicação das boas práticas de higiene, na análise de risco e por meio da avaliação dos níveis de controle de um determinado patógeno (FAO, 2009).

As dificuldades na higienização e consequente controle de *Campylobacter* nas indústrias pode ser explicada, em parte, pela capacidade de formar biofilmes (MELO et al., 2017; ZHONG et al., 2020). A produção de biofilmes é uma forma de vida que permite a manutenção do patógeno em ambientes bióticos e abióticos, onde as bactérias produzem uma matriz extracelular que permite sua sobrevivência frente a condições adversas (KAAKOUSH et al., 2015).

Garcia-Sanchez e colaboradores (2019) analisaram a produção de biofilmes por 45 cepas de *C. jejuni* nas temperaturas de 25°C, 30°C e 37°C em superfícies de poliestireno e aço inoxidável. Verificaram que todas as cepas

possuíam a capacidade de formar biofilme em ambas as superfícies, com maior intensidade na temperatura de 37°C.

Testes com 30 cepas de *C. jejuni* isoladas de carcaças de frango brasileiros também mostraram alta capacidade de formação de biofilmes fortes. Nesse mesmo estudo, foram testados os agentes clorexidina 1%, hipoclorito de sódio 1%, ácido peracético 0,8% e nanopartículas de óxido de zinco 6 mmol/L na prevenção da formação de biofilmes, sendo o hipoclorito de sódio, clorexidina e ácido peracético os mais eficazes no controle. Porém, duas cepas foram resistentes a todos os desinfetantes testados, caracterizando um problema para a higienização industrial, dificuldade de eliminação e risco de disseminação dessa característica para outras cepas (MELO et al., 2017).

Além dos controles na produção primária e abate, a prevenção da campilobacteriose humana inclui cuidados na manipulação e preparo dos alimentos tanto nas cozinhas domésticas, como industriais, atentando-se para a conservação e cocção corretas, além da prevenção de contaminações cruzadas (WHO, 2020).

3.4. *Campylobacter* na cadeia produtiva avícola

A carne de frangos tornou-se um produto altamente consumido em todo o mundo, e somente no ano de 2015, o consumo mundial *per capita* saltou de 3,2 para 13,8 kg (Wei et al., 2017), provavelmente, por apresentar baixo teor de gordura, ser rica em proteínas e ter preço acessível. Porém, as características intrínsecas desse alimento também o tornam frágil, merecendo atenção dos consumidores e produtores quanto a inocuidade e formas adequadas de preservação (LEYGONIE; BRITZ; HOFFMAN, 2012).

A avicultura brasileira destaca-se no mundo por se manter desde 2008 como o maior exportador de carnes de frangos e o segundo maior produtor. Dos produtos exportados pelo Brasil, a carne de frango e seus derivados correspondem a 66% do total atingindo 13 milhões de toneladas e receita de 6.994 milhões de dólares em 2019, demonstrando a importância do setor para a economia. A exportação é realizada principalmente para países da União Europeia, Reino Unido (ABPA, 2020). A produção e abate concentram-se principalmente nos estados da região sul, que juntos representam 64,8% da produção brasileira, sendo 35,69% no estado do Paraná, 15,40% em Santa Catarina e 14,32% do Rio Grande do Sul. Do total produzido, 78,41% das carcaças são destinadas à exportação (ABPA, 2020).

Devido ao protagonismo da avicultura brasileira, o país trabalha com alto nível tecnológico e respeita as normas sanitárias nacionais e internacionais buscando a segurança alimentar. Porém são vários os desafios sanitários, que incluem o monitoramento e mitigação de bactérias zoonóticas como *Salmonella* spp., *Escherichia coli* patogênicas, *Listeria monocytogenes* e várias outras (OMORODION; ODU, 2019).

Além das bactérias zoonóticas tradicionalmente implicadas na saúde humana, representantes do gênero *Campylobacter* tem se mostrado emergentes como patógeno alimentar, considerando o alto número de casos e surtos no mundo (CDC, 2020; EFSA, 2019). Assim, também devem ser continuamente monitoradas quanto a prevalência, resistência aos antimicrobianos, potencial virulento, fontes de infecção dos animais e humanos e formas de controle.

São várias as vias que contribuem para a infecção e disseminação de *Campylobacter* entre as aves e muitos estudos demonstram que a prevalência é

alta nas aves comerciais. Em estudo realizado por Silva e colaboradores (2014) foi detectado positividade de 61% (61/100) em amostras de fezes de aves com idades de 40 a 45 dias de 17 aviários da região sul do estado do Rio Grande do Sul. Na Europa as contaminações de carne de frango por *Campylobacter* correspondem a 37,5%, Alemanha, Eslováquia, França e Espanha estão entre os países com mais relatos de surtos de campilobacteriose (EFSA, 2019). Adicionalmente, também tem sido demonstrado que isolados de fezes de aves também possuíam alto potencial virulento e alta resistência aos antimicrobianos (FRAZÃO et al., 2017).

Nos aviários, a transmissão horizontal é a principal fonte de carreamento do patógeno, e envolve o uso de água não tratada, manejo inadequado do lixo e presença de moscas, que são importantes carreadores mecânicos (SAHIN et al, 2015). Já em água não tratada, estudos já demonstraram a sobrevivência de *Campylobacter* no interior de amebas, tornando estes protozoários importantes na manutenção do micro-organismo no ambiente (MEDINA et al., 2014; HOEPERS et al., 2016; VILLANUEVA; MEDINA e FERNÁNDEZ, 2016).

Na infecção das aves também há o envolvimento de animais silvestres e domésticos que frequentam o entorno do aviário (SAHIN; MORISHITA; ZHANG, 2002). Animais como aves domésticas e selvagens podem ser importantes disseminadores, já que podem carrear em sua microbiota intestinal espécies de *Campylobacter*, incluindo *C. jejuni*, na maioria das vezes, sem qualquer sinal clínico (CORRY e ATABAY, 2001).

A transmissão vertical de *Campylobacter* em aves comerciais é considerado um evento raro ou inexistente, já que o patógeno somente é detectado após a segunda ou terceira semana de vida, mesmo que tenham sido

gerados de lotes de aves previamente infectados (HERMANS et al., 2012). Porém, a mortalidade precoce de embriões gerados de ovos SPF infectados com *C. coli* no saco aéreo foi demonstrada por Rossi e colaboradores (2012). Fonseca e colaboradores (2014) mantiveram ovos comerciais e SPF em contato com *C. jejuni* e concluíram que o consumo de ovos comerciais não é um fator de risco para a infecção humana por *Campylobacter*.

Aves previamente infectadas aumentam o risco de contaminação das carcaças durante o abate e manipulação no frigorífico, com maior chance de contaminação do ambiente e consequente contaminação cruzada (EFSA, 2010). Isso devido a etapa de evisceração, que é o ponto mais crítico no processamento, pois o acidental extravasamento do conteúdo intestinal ou mesmo o contato, favorecem a contaminação das carcaças, considerando a alta concentração do patógeno no intestino (HUE et al., 2011).

A presença de *Campylobacter* no setor avícola brasileiro, tanto nas aves como nas carcaças e na carne, estão registradas em diversos estudos (SIERRA-ARGUELLO et al., 2016; BORTOLI et al., 2017; GOMES et al., 2018; DE OLIVEIRA et al., 2019; PROIETTI et al., 2020).

Analisando cortes de carnes de frangos de duas marcas comerciais do Sul do país, uma apenas para comercialização ao mercado interno e outra também para exportação, Wurfel e colaboradores (2019) detectaram positividade de *Campylobacter* em 33/36 (91,7%). Concluíram que além da alta positividade, as cepas também apresentavam alta variabilidade genética.

Ainda no Sul do país, Borges e colaboradores (2020) pesquisaram a presença de *Campylobacter* em cloacas de frangos e nas carcaças durante o processamento de abate, após a passagem pelo *chiller*, resfriamento e

congelamento. Obtiveram positividade de 88,9% (16/18), 22,2% (4/18), 22,2% (4/18) e 11,1% (2/18) nas cloacas, pós *chiller*, resfriamento e congelamento, respectivamente. Concluíram que o recebimento de aves infectadas aumenta as possibilidades de contaminação cruzada e corrobora a característica de sobrevivência do patógeno, frente as diversas condições ambientais.

Já um estudo comparativo entre isolamentos de *C. jejuni* em carcaças de frango realizados nos anos de 2011-2012 e 2015-2016 detectou a redução da prevalência de 13,1% (55/420) para 6,8% (44/650) no segundo período. As análises foram realizadas em carcaças abatidas em três unidades industriais de uma indústria habilitada para o comércio nacional e exportação. Concluíram que a redução na prevalência pode estar relacionada com a implementação do Programa Nacional de Controle de Patógenos (PNCP) pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) pela Portaria SDA N°17/2013 (BRASIL, 2013). Apesar da redução, observaram que houve aumento no potencial virulento e da resistência aos antimicrobianos pelas cepas isoladas no segundo período, entre 2015 e 2016 (MELO et al., 2019).

O MAPA criou a Portaria SDA nº 17/2013 em conjunto com a Comissão Científica Consultiva em Microbiologia de Produtos de Origem Animal com o objetivo de aumentar a segurança alimentar. Toda a carne de frango exportada para os países europeus deve obedecer às normas descritas nos Regulamentos da União Europeia, que inclui o controle de *Campylobacter* (BRASIL, 2013; MELO et al., 2019).

Diversos países importadores de carnes de frangos do Brasil possuem eficientes sistemas de vigilância e monitoramento dos principais patógenos transmitidos pelos alimentos, entre os mais conhecidos estão o International

Food Safety Authorities Network (INFOSAN - WHO), Reportable Food Registry (RFR) - EUA, Global Public Health Intelligence Network (GPHIN) - Canadá e o Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) – EU. Na União Europeia, o *Rapid Alert System for Food and Feed* – RASFF, emite alertas sobre a detecção de micro-organismos que apresentam potencial risco a saúde pública, indicando o país importador e exportador, alimento incriminado e nível de medidas a serem tomadas baseado no risco (VAN ASSELT et al., 2010; CHEFTEL, 2011; ZACH, et al., 2012; VAN DER SPIEGEL; VAN DER FELS-KLERX; MARVIN, 2012; PIGLOWSKI, 2020). Neste sistema estão disponíveis duas notificações sobre *Campylobacter* em carne de frangos brasileira, uma em 2004 notificada pela Bélgica e outra em 2017 pela Espanha (RASFF, 2020).

Em 23 de agosto de 2017, a Comissão Europeia publicou o Regulamento (CE) 1495/2017, que entrou em vigor em 2018. Esse documento faz um resgate histórico das últimas publicações sobre *Campylobacter* desde 2004 e disponibiliza informações epidemiológicas, além da preconização de exigências para importação. Estabelece também que os critérios para controle de *Campylobacter*, deverão seguir as mesmas recomendações já adotadas para o controle de *Salmonella*. O padrão estabelecido para *Campylobacter* foi de no máximo 1000 UFC/g (EU, 2017).

No Regulamento CE 2017/1495, o método indicado para detecção de *Campylobacter* é a norma internacional ISO 10272-2, sendo indicados métodos de amostragem não destrutivos, com armazenamento e transporte das amostras conforme a norma ISO 17604 (ISO, 2006a; ISO, 2006b).

Antecipando-se às demandas e possíveis exigências mundiais, em julho de 2017, o MAPA, publicou o memorando N° 218/2017/

CRISC/CGPE/DIPOA/MAPA/DAS/MAPA, propondo a pesquisa e quantificação de *Campylobacter* em carcaças de aves em estabelecimentos com serviço de inspeção federal (SIF) nos estados da região sul do país. O objetivo foi quantificar e estimar a prevalência de *Campylobacter* spp. em carcaças de frangos abatidos em estabelecimentos registrados junto ao SIF. As amostras analisadas foram as mesmas utilizadas no Programa de Controle e Monitoramento de *Salmonella* spp, determinados pela IN nº 20, de 21 de outubro de 2016 (BRASIL, 2016).

3.5. Fatores de virulência associados a *Campylobacter*

Como na maioria das enfermidades infecciosas, a gravidade, sinais e sintomas da campilobacteriose humana estão relacionados a características relacionadas ao hospedeiro e ao agente infeccioso. No caso de *C. jejuni*, as oportunidades de infectar o hospedeiro e causar quadros mais ou menos graves envolve fatores como a adaptação ambiental, possuir características de virulência específicas para determinadas ações no hospedeiro e outros mecanismos moleculares relacionados a modulação da expressão de seu aparato gênico, como a quimiotaxia, motilidade, resistência aos antimicrobianos, alteração das vias de sinalização do hospedeiro, indução da morte celular, capacidade de evasão das defesas do sistema imune, aquisição de ferro, adesão e invasão. Apesar disso, ainda restam muitas lacunas a serem elucidadas, principalmente quando se deseja comparar regiões codificadoras do genoma entre isolados de animais e humanos (DATTA et al., 2003; BISWAS et al., 2011; EPPS et al., 2013; KOVÁCS et al., 2020).

Assim, apesar da importância de *Campylobacter* na saúde pública e do banco de dados disponíveis em genomas depositados, que já ultrapassa 1600, o entendimento da patogênese da espécie ainda é incompleto. Essas informações são particularmente importantes quando se deseja comparar os mecanismos de adaptação ambiental, virulência, comensalismo e a capacidade de causar doenças em humanos por *C. jejuni* com os de outros patógenos já compreendidos (BURNHAM e HENDRIXSON, 2018).

As características de *C. jejuni* que aumentam sua capacidade de se adaptar ao ambiente também são consideradas fatores de virulência, já que sua sobrevivência aumenta a chance de encontrar um hospedeiro suscetível. Além disso, no ambiente, em contato com outras cepas da mesma espécie e gênero, ou mesmo com outros gêneros, há favorecimento de trocas gênicas. Para garantir sua sobrevivência, as bactérias do gênero *Campylobacter*, necessitam adaptar-se aos estresses do ambiente, como as variações de temperaturas, dessecação, níveis de oxigênio, estresse osmótico, além dos diferentes agentes químicos que são utilizados para seu controle nas indústrias (BRONOWSKI et al., 2014).

Dentre as características de adaptação mais importantes e já descritas para *C. jejuni* estão a termotolerância, resistência ao estresse oxidativo e mecanismo de *quorum sensing*, porém outros fatores relacionados a virulência como adesão e motilidade também estão envolvidos (DASTI et al., 2010).

Em patógenos como *C. jejuni*, a termorregulação é um fator importante para a expressão de genes de virulência. Existe um controle limiar entre a expressão e a repressão de genes frente ao estresse térmico, geralmente com aumento na expressão com o aumento da temperatura e repressão no caso de

queda. As baixas temperaturas reprimem a expressão de genes para a tradução de proteínas de choque térmico (BEALES, 2004).

C. jejuni necessita de requisitos específicos para seu crescimento e geralmente são menos resistentes a estresses ambientais que outros gêneros bacterianos (PARK, 2002). A análise do seu genoma demonstrou que diversos genes de resposta ao estresse nas variações de temperatura já descritos em outras espécies, não estão presentes, permitindo inferir que as variações genotípicas podem ter papel importante na seleção de cepas em ambientes estressantes. (MURPHY; CARROLL e JORDAN, 2005; HUMPHREY; BRIEN e MADSEN, 2007; HABIB; UYTENDAELE e ZUTTER, 2010).

Em relação a termotolerância, parece que a presença e expressão do gene *dnaJ* é uma das características mais importantes. Em temperaturas acima de 40°C, o gene *dnaJ* codifica proteínas do choque térmico que conferem termotolerância em ambientes como o trato gastrointestinal de aves, que pode superar essa temperatura (KONKEL, 1998). Esse gene também permite que *C. jejuni* responda melhor às menores temperaturas que são encontradas em alimentos em condições de varejo (BASERISALEHI e BAHADOR, 2011).

C. jejuni é exigente quanto as condições atmosféricas, exigindo condições de microaerofilia (3-5% de oxigênio) para seu crescimento e multiplicação (ADAMS e MOSS, 2014). Porém, no trato gastrointestinal das aves, no ambiente, alimentos e até ter a oportunidade de infectar humanos, *Campylobacter* é exposta a atmosferas desfavoráveis, que podem causar a deformação de proteínas importantes para sua sobrevivência. Nessas condições é necessário a ação de proteases, que garantem a remoção dessas proteínas deformadas. Os genes *htrA* e *cbrA* codificam proteínas que atuam como proteases e realizam a

remoção de proteínas deformadas, e também possuem função de chaperoninas ao evitar ou reverter ligações inapropriadas durante o dobramento das proteínas (LIPINSKA et al., 1989; SKORKO-GLONEK et al., 1997; CLAUSEN et al., 2011). Assim, as proteínas codificadas pelo gene *htrA*, apresentam importante função no crescimento sob estresse oxidativo, além de ser liberada no ambiente extracelular, auxiliando outras bactérias na migração para tecidos mais profundos, aumentando assim a patogenicidade (BACKERT et al., 2018).

A comunicação intercelular entre micro-organismos, denominado *quorum sensing* (QS), é identificado em diversos gêneros bacterianos, inclusive *Campylobacter*, e possui importância em diversos processos fisiológicos, como motilidade, formação de biofilmes, expressão de genes de virulência e colonização da célula hospedeira (PLUMMER, 2012).

No processo de comunicação QS, as células bacterianas liberam pequenas moléculas químicas auto-indutoras (AIs), que facilitam o comportamento em grupo, facilitando às bactérias responder às mudanças na população por meio das concentrações das moléculas dispersas pelo grupo, podendo assim desencadear a expressão de genes, entre outras funções essenciais para sua sobrevivência (WANG et al., 2020). Entre os micro-organismos existem diferenças em relação à classe de moléculas sinalizadoras, que podem ser aminoácidos e peptídeos no caso de bactérias gram-positivas ou derivados de ácidos graxos no caso de bactérias gram-negativas (KLEEREBEZEM et al., 1997; SHAPIRO, 1998).

Em *Campylobacter*, a comunicação ocorre com a atuação do AI-1 autoindutor acil-hemoserina em níveis altos no citoplasma das células bacterianas. O AI-1 se liga com o ativador de transcrição celular *luxS* que codifica

a luciferase, imprescindível na produção de S-adenosilmetionina (SAM), que é importante para a metilação do DNA bacteriano, síntese de poliaminas e vitaminas bacterianas (BASSLER, 1999; PARVEEN e CORNELL, 2011).

O gene *luxS* também atua na síntese de AI-2 (autoindutor S- ribosil-homocisteinase), que aumenta proporcionalmente com o crescimento bacteriano e possui, como função, o reconhecimento da entrada de populações mistas no biofilme (WINZER et al., 2002 ; De KEERSMAECKER et al., 2005 ; RAJAN et al., 2005). As enzimas funcionais produzidas pelo gene *luxS* são bastante conservadas em espécies de *Campylobacter*, mas para a produção do AI-2, são necessários nutrientes que podem ser encontrados em diferentes fontes alimentares, como o exudato de carnes de frangos “*chicken juice*” (PLUMMER, 2012; LIGOWSKA et al., 2011).

No gênero *Campylobacter* os flagelos possuem função fundamental para a motilidade, mas também está relacionado a outras funções biológicas como quimiotaxia, colonização, adesão, virulência e secreção (BURNHAM; HENDRIXSON, 2018; SUBRAMANIAN; KEARNS, 2019). Para a produção do flagelo íntegro e funcional é necessária a expressão de mais de 50 genes, coordenados por uma complexa rede reguladora (GRINNAGE-PULLEY et al., 2016; LIANG e CONNERTON, 2018).

C. jejuni apresenta um flagelo polar em uma ou ambas extremidades, que apresentam três estruturas distintas: corpo basal, gancho e filamento. Dois genes, *flaA* e *flaB*, são fundamentais na construção do filamento pois codificam as proteínas estruturais do filamento, a maior codificada pelo *flaA* e a menor pelo *flaB*. As flagelinas codificadas, garantem o potencial máximo de virulência da

espécie e a ausência de uma delas pode reduzir o potencial patogênico das cepas (ALMOFTI et al., 2011).

Nas etapas iniciais da infecção, a propulsão em forma de saca rolhas dos flagelos é imprescindível para a movimentação do corpo celular helicoidal e permite a adesão e colonização das células bacterianas frente ao ambiente mucoso do intestino (HERMANS et al., 2012). Já nos processos de adesão, a motilidade mediada pelos flagelos é primordial para garantir a adesão em superfícies bióticas e abióticas e envolve estruturas altamente glicosadas como as flagelinas (SULAEMAN et al., 2012; SCHMIDT et al., 2019; KLANCNIK et al., 2020).

A quimiotaxia é caracterizada como o processo pelo qual as células bacterianas movimentam-se em resposta à um sinal químico, podendo ser atraídas ou repelidas. Esse processo depende da comunicação entre as vias quimioefetoras com os quimiorreceptores das células bacterianas (PORTER et al., 2011; PARKINSON et al., 2015).

A quimiotaxia estimula a mobilidade quimiotática de *C. jejuni* e permite que as células bacterianas penetrem na camada mucosa do trato gastrointestinal para os posteriores processos de adesão, colonização e invasão (HENDRIXSON e DIRITA, 2004; CHANG e MILLER, 2006). O reconhecimento dos estímulos químicos, garante a rotação do flagelo, que responde em casos de alta concentração de estímulos com o movimento, e quando ocorre a falta de estímulos, altera seu trajeto em busca de ambientes favoráveis (BALDVINSSON et al., 2014).

A quimiotaxia em *C. jejuni* é potencializada em temperatura de 37°C, o que explica sua sobrevivência na temperatura fisiológica humana. A l-fucose, um

carboidrato presente no muco intestinal das células de mamíferos, e é um quimioatraente importante, garante energia e propicia ambiente favorável à sua multiplicação (KHANNA; BHAVSAR e KAPADNIS, 2006; STAHL et al., 2011). Em estudo realizado por Alemka et al. (2012), foi possível observar que a l-fucose, modula a patogenicidade de *C. jejuni* de maneira específica e por estar presente no intestino humano, pode explicar apenas o comensalismo em frangos.

A espécie *C. jejuni* quando comparada com outras espécies como *E. coli* e *Salmonella*, possui um repertório de genes mais complexo, o que a torna um modelo de estudo interessante (LERTSEHTAKARN; OTTEMANN e HENDRIXSON, 2011; DAY et al., 2016). A espécie possui aproximadamente dez quimiorreceptores, também chamados de proteínas do tipo transdutor (Tlps) e dois receptores específicos, com funções variando de acordo com o ambiente em que está inserida, podendo atuar no reconhecimento de estímulos extracelulares e na detecção de alterações fisiológicas intracelulares (MARCHANT; WREN e KETLEY, 2002; DAY et al., 2012).

A adesão é essencial para que *C. jejuni* realize a infecção. Para isso é necessário superar diversas barreiras do trato gastrointestinal, sendo a principal, a resposta imune da mucosa intestinal do hospedeiro para a colonização do jejuno e íleo (van VLIET e KETLEY, 2001). Para o início da colonização, a adesão das células bacterianas ao epitélio gastrointestinal é primordial e ocorre com a participação das adesinas, que são proteínas que permitem a ligação do micro-organismo aos receptores das células (HERMANS et al., 2011; BACKERT; HOFREUTER, 2013; DUARTE et al., 2015).

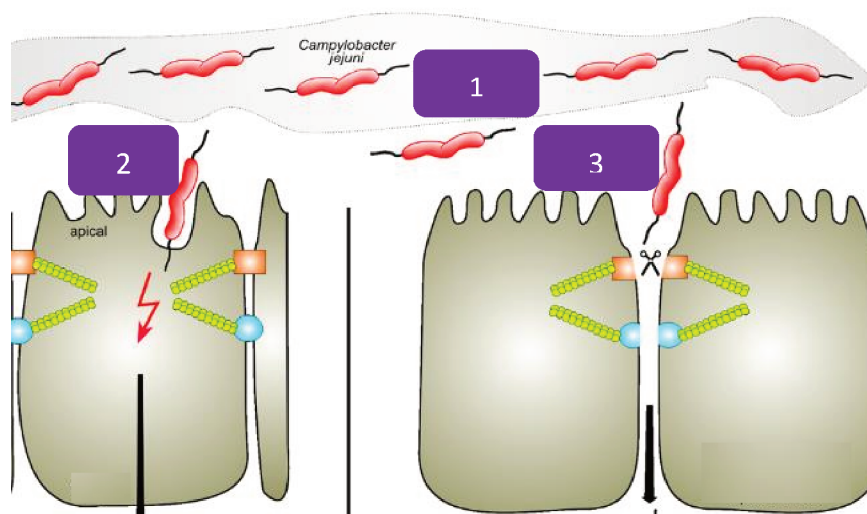
As adeninas estão presentes em diversas espécies animais e são classificadas como *Fibronectin-binding proteins* (FBNP's) - proteínas de ligação a fibronectina, e são as responsáveis pela ligação das células bacterianas com a fibronectina. O estudo dessas proteínas é necessário por ser um fator importante no estabelecimento da infecção (TALUKDAR et al., 2020).

Em *C. jejuni* são descritas pelo menos duas FBNPs, CadF e FlpA, sendo CadF, envolvida na adesão de *Campylobacter* à fibronectina. Essa adesina possui o peso molecular de 37kDa e é codificada pelo gene *cadF* localizado em um operon bicistrômico de 960pb (KONKEL et al., 1997). A codificação da proteína de membrana CadF é realizada pelo gene *cadF*, que é conservado no gênero, e essa proteína induz à resposta imune maciça. O processo de adesão inicia-se com a ligação da adesina às fibronectinas localizadas entre as junções das células do epitélio intestinal, permitindo a translocação das células bacterianas e facilitando a colonização (MALGORZATA et al., 2007; FLANAGAN et al., 2009; MEUNIER et al., 2017).

Após o processo de adesão, as células bacterianas conseguem iniciar a invasão da camada do epitélio gastrointestinal, e dessa forma, adquire proteção frente ao sistema imune do hospedeiro nesse novo nicho (KONKEL et al., 1999; HORNEF et al., 2002). Porém, o processo de invasão de *Campylobacter* ainda não está totalmente esclarecido, já que mesmo após a análise de diversos genomas observou-se a falta de alguns genes de invasão conservados na maioria das outras bactérias, o que permite inferir que a espécie possui mecanismos próprios de invasão que ainda não foram totalmente descritos (Ó CRÓINÍN e BACKERT, 2012). Também não são completamente conhecidos os mecanismos envolvidos na infecção humana (FSA, 2019).

Dentre os mecanismos próprios já conhecidos e envolvidos no processo de invasão de *C. jejuni* são descritos dois processos distintos, a translocação e a internalização (Figura 1). Na translocação, as células bacterianas atravessam as células do epitélio gastrointestinal, através da migração paracelular (entre as junções celulares), já na internalização, as células bacterianas atravessam o citoplasma das células do hospedeiro. A internalização é dependente de mecanismos como o reconhecimento de receptores de membranas, que permitem a formação de um vacúolo pela endocitose das células intestinais (BACKERT; HOFREUTER, 2013).

Figura 1: Mecanismo de invasão, 1 - colonização da mucosa intestinal, 2 - mecanismo de invasão por internalização, 3 - mecanismo de invasão por translocação de *Campylobacter jejuni*. Adaptado de Backert et al. (2013).



Após a entrada nas células, *C. jejuni* consegue sobreviver em estruturas chamadas de vacúolos contendo *Campylobacter*, evadindo a resposta imune do hospedeiro, mesmo após a depleção de ATP das células infectadas, sendo capaz de causar infecções persistentes. A esse processo ainda é atribuída a

facilitação da indução da translocação de outras bactérias não invasivas (BOUWMAN; NIEWOLD e VAN PUTTEN, 2013; CAMPANA; BAFFONE, 2020).

Após a colonização por *C. jejuni*, o gene *ciaB* é expresso e secreta a proteína CiaB, que é uma proteína de 73,1kDa, que funciona como transportadora da flagelina A. A proteína CiaB atua destruindo os microtúbulos e outras estruturas importantes para a estabilidade celular como os microfilamentos intracelulares, e permite alta motilidade das células bacterianas nas células dos hospedeiros (KONKEL et al., 1999; CHRISTENSEN; PACHECO e KONKEL, 2009).

Outro gene que também participa dos processos invasivos de *C. jejuni* é o *pldA*, que codifica a proteína fosfolipase A1 com peso molecular de 33,4kDa. Essa proteína está envolvida na síntese de fosfolipases presentes na membrana externa, são lipolíticas e causam a perda estrutural e ruptura da membrana das células do hospedeiro, e por isso, é considerada um importante fator de virulência da espécie (GRANT et al., 1997). Após o início do processo de infecção das células, ocorre a distensão das mesmas, devido ao efeito citotóxico, resultando em alterações nas vilosidades, além da apoptose prematura (MELO et al., 2013).

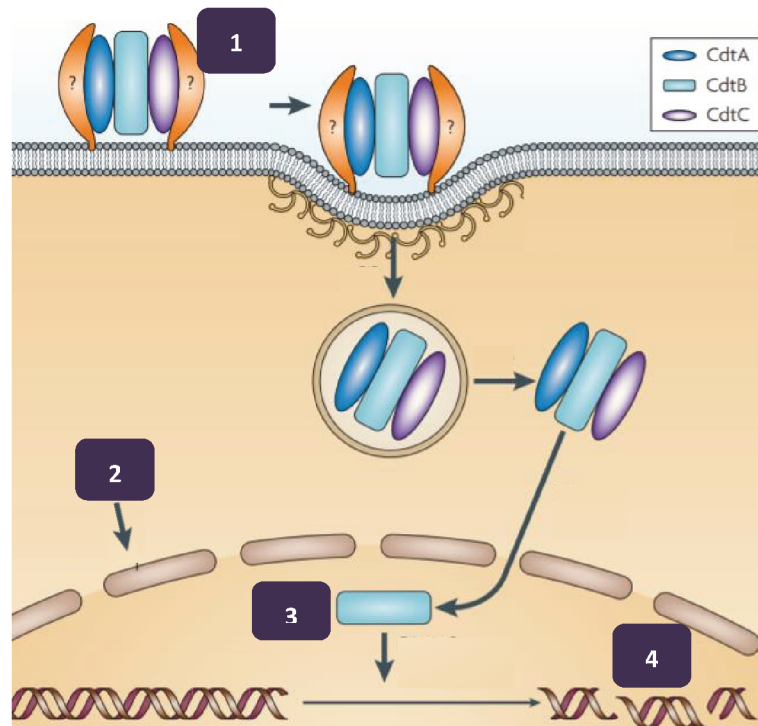
A citotoxicidade é outro fator importante na patogenicidade de *C. jejuni*, pois a distensão citoletal pela produção de toxinas é uma das características de virulência da espécie. As toxinas são proteínas que atuam inibindo processos essenciais nas células do hospedeiro, como a síntese de proteínas e produção de actina para a estabilidade celular, resultando na abertura de poros, e induzindo assim, à morte celular (DASTI et al., 2010; GHORBANALIZADGAN; BAKHSHI e NAJAR-PEERAYEH 2018).

Entre as toxinas produzidas por *C. jejuni*, uma das mais conhecidas e estudadas é a toxina citoletal distensiva (CDT), que é composta por um complexo de três subunidades codificadas por três genes (*cdtA*, *cdtB*, *cdtC*). Cada uma das subunidades tem sua função no processo citotóxico, sendo as subunidades A e C, responsáveis pelo transporte e internalização da subunidade B para a célula do hospedeiro, atuando diretamente no ciclo celular, por meio de cortes do material genético, interrompendo o ciclo celular, e assim, bloqueando a fase G2 da divisão celular (Figura 2). Esses processos levam a distensão do citoplasma das células causando a morte celular por apoptose (HAMIDIAN et al., 2011; MELO et al., 2013). A interrupção do ciclo celular das células do epitélio intestinal pode interferir diretamente em sua renovação, e assim, estar envolvida em casos graves de campilobacteriose. Porém, mais estudos são necessários para correlacionar eficientemente a capacidade em produzir estas toxinas com a patogenia (FAÏS et al., 2016).

Os mecanismos de atuação do complexo CDT variam de acordo com o nicho em que estão inseridos, podendo ter a capacidade de modular a fisiologia das células, e assim, os processos imunomodulatórios podem levar ao desenvolvimento de um ambiente pró-inflamatório, interferindo negativamente na regeneração tecidual (FOX et al., 2004; FAÏS et al., 2016).

Outros mecanismos de patogenicidade que têm sido investigados são os sistemas de secreção do tipo VI (T6SS). Estes sistemas funcionam como micro injeções capazes de transportar moléculas para células procarióticas ou eucarióticas vizinhas, permitindo a alteração das células durante a patogênese e contribuindo para as infecções sistêmicas (BLEUMINK-PLUYM et al., 2013; RUSSELL et al., 2011).

Figura 2: Mecanismo de internalização do complexo CDT nas células do hospedeiro. (1) complexo CDT, (2) membrana nuclear, (3) subunidade B, (4) DNA fragmentado. Adaptado de YOUNG et al. (2007).



Em *C. jejuni* o T6SS tem sido identificado em cepas isoladas de diferentes fontes, inclusive de aves. O sistema desempenha papel fundamental nos processos de infecção, como adesão, invasão e colonização *in vivo*, no entanto, ainda faltam informações para determinar a distribuição e sua função na patogênese (LERTPIRIYAPONG et al., 2012; SERICHANTALERGS et al., 2020).

O mecanismo do T6SS baseia-se em sua estrutura em formato de lança, onde duas proteínas (VipA e VipB), recobrem um nanotubo de hexâmeros empilhados (*hemolysin-coregulated proteins* - Hcp), formando o corpo da lança, (SILVERMAN et al., 2012). No processo ativo, o nanotubo é injetado no alvo, sendo capaz de se refazer para novos “disparos” (KAPITEIN et al., 2013; SANA;

LUGO e MONACK, 2017). O gene *hcp* é um indicador da presença do T6SS, e relacionado a casos graves de campilobacteriose (HARRISON et al. 2014; SIMA et al. 2018).

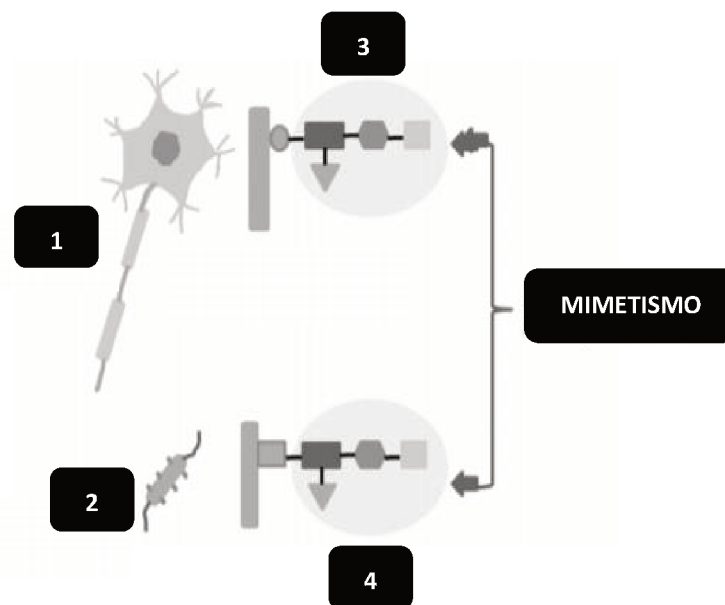
Os primeiros relatos da síndrome de Guillain Barré (SGB) datam de 1916, quando eram descritos como uma fraqueza muscular dos membros. Posteriormente, a síndrome foi descrita corretamente como uma desativação neuromuscular imunomediada prolongada que pode evoluir para dificuldades respiratórias e conseqüentemente morte (TAM et al., 2006; GOODFELLOW e WILLISON, 2016; WIJDICKS e KLEIN, 2017). A paralisia pode durar semanas, e na maioria das vezes, requer cuidados médicos intensivos e pode causar sequelas permanentes (WILLISON et al., 2016).

A infecção prévia por *C. jejuni* é fortemente associada ao desenvolvimento da síndrome, estimando-se que 40% dos casos de SGB nos Estados Unidos são desencadeados pela campilobacteriose (CDC, 2019). A síndrome, que é caracterizada como uma polineuropatia desmielinizante, inicia pelo reconhecimento por mimetismo molecular entre estruturas de lipolissacarídeos (LOS) da superfície bacteriana com os gangliosídeos do hospedeiro (Figura 3). Ocorre assim, uma reação do sistema imune que produz anticorpos em resposta aos LOS da célula bacteriana, que atinge também os gangliosídeos do hospedeiro, causando danos severos aos nervos que evolui para paralisia (ANG et al., 2004; WALENCKA et al., 2018).

C. jejuni possui em sua estrutura uma sialiltransferase, uma enzima que transfere resíduos de ácido siálico às proteínas e participa na biossíntese de LOS semelhantes aos gangliosídeos que estão presentes nas membranas das células nervosas. Assim, os genes envolvidos na codificação das estruturas

presentes na membrana de *C. jejuni*, servem como marcadores importantes de cepas neuropatogênicas (XU et al., 2010).

Figura 3. Mecanismo de reconhecimento do sistema imune do hospedeiro. (1) célula neural, (2) *C. jejuni*, (3) gangliosídeo, (4) LOS. Adaptado de WALENCKA et al. (2018).



Os genes *cj1421c* e *cj1428c* são indicadores importantes pois são conservados na maioria das cepas neuropatogênicas. Outro gene, o *cj1135*, também está envolvido na síndrome pois atua como silenciador da neuropatogênese, por ser identificado principalmente em cepas em que os LOS não mimetizam estruturas ganglionares (TABOADA et al., 2007).

Outros genes considerados como marcadores são *neuA* e *cstII*, que codificam estruturas como o acetilneuraminato, responsável pela ativação do ácido siálico e sialiltransferase, respectivamente. Estas estruturas são reconhecidas pelo sistema imune do hospedeiro que responde com ações que

contribuem para o desenvolvimento da síndrome (YURI; KOGA, 2006; AMON et al., 2012).

3.6. *Matrix Associated Laser Desorption-Ionization – Time of Flight (MALDITOF)*

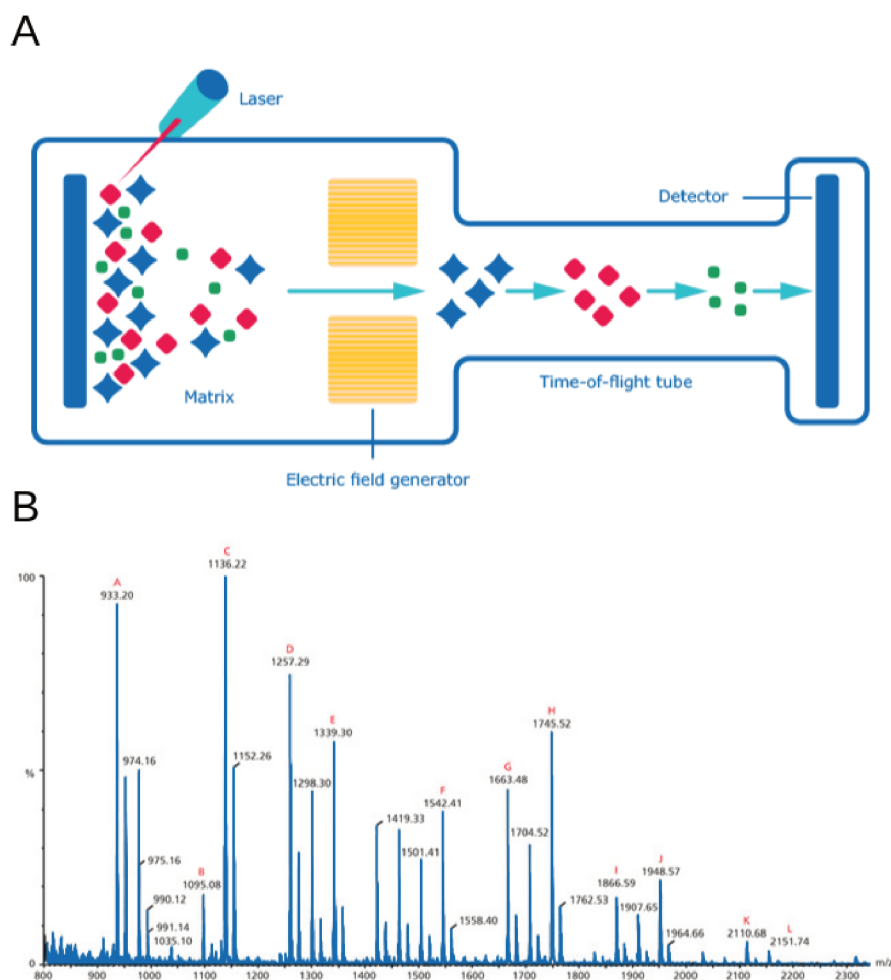
A espectrometria de massas (do inglês, mass spectrometry – MS) é uma técnica analítica que mensura o sinal iônico de um composto por meio da razão da sua massa pela carga (m/z). A técnica permite a identificação de compostos químicos a partir de um composto isolado e também a partir de misturas complexas por meio da determinação das massas moleculares de seus constituintes na forma ionizada.

No procedimento padrão de MS (WATSON e SPARKMAN, 2007), a amostra (que pode ser líquida, sólida ou gasosa) é ionizada por bombardeamento de elétrons. A ionização pode levar à ruptura das moléculas da amostra em fragmentos carregados ou simplesmente tornar a amostra carregada sem fragmentação. As moléculas ionizadas são separadas de acordo com a razão m/z ao serem sujeitas a passagem por um campo elétrico ou magnético. Durante a passagem pelo campo, íons que apresentem uma mesma razão m/z irão sofrer a mesma taxa de deflexão (ou seja, o mesmo tipo de alteração na velocidade devido à influência do campo).

Ao passar pela influência do campo, os analisadores de massas separam os íons de acordo com a relação m/z . Por fim, os íons são detectados por um mecanismo capaz de identificar partículas carregadas que amplificam o sinal e geram correntes elétricas. As correntes elétricas são processadas por meio de

softwares que transformam o sinal elétrico em espectro de massas (sinal de intensidade dos íons como uma função da massa pela carga) (Figura 4).

Figura 4. Representação esquemática da espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF. (A) Representação da ionização por laser, túnel de voo e detector de sinal; (B) Espectro de massas (SIGMA-ALDRICH, 2020).



Os espectrômetros de massa podem apresentar uma variedade de fontes de ionização (SIUZDAK, 2004). Destacam-se os seguintes tipos: ionização por bombardeamento rápido de átomos (FAB), ionização eletrônica (EI), ionização por spray de elétrons (ESI), ionização por dessorção de *spray* de elétrons (DESI) e ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI), entre outras.

Dentre elas, a fonte de ionização do tipo MALDI permite a dessorção dos peptídeos e proteínas a partir da bactéria íntegra, de células vegetativas, de esporos, de vírus e de fungos sem a necessidade de uma separação extensa, ou seja, é uma ionização branda (RUELLE et al., 2004). Por este motivo, e ainda, pela capacidade de analisar moléculas de massas elevadas, de conseguir analisar misturas complexas e pela alta sensibilidade mesmo para baixas quantidades de amostras, a ionização do tipo MALDI tem sido amplamente usada para detecção de bactérias (SIUZDAK, 2006).

A ionização MALDI pode ser associada ao analisador do tipo “Tempo de Vôo” (do inglês, Time-of-Flight ou TOF), cujo princípio básico é que íons de diferentes m/z são dispersos no tempo durante seu vôo pelo campo de comprimento conhecido (Figura 4A). Sabendo que todos os íons começam a trajetória ao mesmo tempo, as moléculas ionizadas mais leves irão chegar primeiro ao detector de sinal em comparação às mais pesadas. Por meio da técnica de MALDI-TOF é possível identificar as espécies de bactérias comparando o espectro de massas obtido da amostra com os espectros das espécies de referência do banco de dados da análise.

Na era das tecnologias ômicas, a técnica de MALDI-TOF se apresenta como uma ferramenta automatizada e de larga-escala de análise proteômica quando comparada a outras técnicas, como SDS-PAGE, e por isso representa uma escolha vantajosa. A automação na análise de proteínas por meio do MALDI-TOF têm contribuído grandemente na área de microbiologia, sendo uma técnica aplicada na tipagem de cepas e taxonomia (Pauker et al., 2018), em estudos epidemiológicos (WILLIAMSON et al., 2008), na bioprospecção de micro-organismos produtores de um determinado composto (KAROLSKI et al.,

2018), na detecção de agentes usados como armas biológicas (RAJORIA et al., 2020), na detecção de patógenos transmissíveis pela água (EMAMI et al., 2012) e alimentos (JADHAV et al., 2018) ou presentes em amostras biológicas (urina e sangue) (HAIKO et al., 2016), na detecção de resistência aos antibióticos (IDELEVICH et al., 2018), entre outros.

As vantagens do MALDI-TOF são: a alta resolução para discriminar centenas de espécies de micro-organismos, muitas vezes em nível de subespécie (LIÉBANA-MARTOS, 2018); a capacidade de identificação de espécies em amostras mistas (várias cepas) (YANG et al., 2018); a rapidez e a acurácia da técnica que pode ser usada para identificação de bactérias fastidiosas, como *Mycobacterium tuberculosis*, diminuindo o tempo de diagnóstico microbiológico (ANGELETTI, 2017) e baixo custo dos reagentes. Além disso, a técnica tem sido aprimorada para detecção direta de patógenos em amostras, tais como urina, sangue e líquido cefalorraquidiano (HAIKO et al., 2016).

Por outro lado, as desvantagens da técnica estão relacionadas à necessidade de um banco de espectros abrangendo uma grande diversidade de espécies, uma vez que a identificação depende da comparação de espectros de referência; o alto custo do equipamento e os bancos de espectros privados; a necessidade de cultivo prévio da amostra (obtenção de colônias) para discriminação de algumas espécies (tais como *Shigella* e *Escherichia coli*) (PAAUWA et al., 2015). Já a estabilidade dos marcadores é dependente do alcance da massa, ou seja, a técnica apresenta limitações quando muitas proteínas apresentam a mesma razão m/z (DEMARCO e FORD, 2013).

A técnica de MALDI-TOF tem mostrado potencial para substituir as

técnicas microbiológicas convencionais e moleculares usadas rotineiramente nos laboratórios. Os sistemas de identificação por MALDI-TOF são aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) (ISRAR et al. 2020). Desse modo, a técnica tem sido amplamente usada nos laboratórios de diagnóstico microbiológico, na indústria farmacêutica e alimentícia.

Considerando os patógenos de origem alimentar, recentemente, a identificação das espécies do gênero *Campylobacter* por meio da técnica de MALDI-TOF tem sido aceita. Um trabalho inicial de padronização da técnica para identificação de seis espécies (*C. coli*, *C. jejuni*, *C. helveticus*, *C. lari*, *C. sputorum* e *C. upsaliensis*) determinou as proteínas biomarcadoras de espécie (MANDRELL et al., 2005). Proteínas citosólicas, incluindo GroES, HU/Hcj e RplL, predominaram como proteínas biomarcadores de alta intensidade, possivelmente devido à baixa massa molecular comparada com a maioria das proteínas e pela condutividade à ionização no MALDI-TOF. Interessantemente, pesquisa demonstrou que dentro de uma mesma espécie, nem sempre o biomarcador comum é identificado em todos os isolados, demonstrando a necessidade de se trabalhar com um conjunto de biomarcadores de espécie para evitar falsos negativos. Além disso, os biomarcadores podem apresentar polimorfismos de sequência não sinônimas (mudanças de aminoácidos) que fornece variabilidade intraespecífica e pode ser considerada para análises populacionais (MANDRELL et al., 2005).

A comparação entre métodos convencionais, moleculares e o MALDI-TOF na identificação de espécies do gênero *Campylobacter* também tem sido avaliada (BESSÉDE et al., 2010; LAWTON et al., 2018). A análise de identificação de 1007 isolados de *Campylobacter* (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. fetus*, *C.*

lari, *C. sputorum*, *C. upsaliensis*) mostrou que a acurácia (99,4-100%) do MALDI-TOF é similar a técnica padrão ouro (PCR e sequenciamento) e superior (50-100%) aos métodos convencionais (testes fenotípicos). Os resultados da acurácia do MALDI-TOF para identificar as espécies de *Campylobacter* é corroborada por achados de outros estudos (LAWTON et al., 2018). Entretanto, a técnica de MALDI-TOF não se mostrou eficiente para identificar as espécies em amostras mistas (BESSÉDE et al., 2010). Em condições de amostras mistas de *Campylobacter* em proporções conhecidas e controladas (MANDRELL et al., 2005), foi observado que o MALDI-TOF consegue detectar corretamente as espécies quando a linhagem em menor proporção representa apenas de 5-10% da mistura.

Análises de distância entre isolados baseadas em dados de MALDI-TOF têm se mostrado eficientes para discriminar várias espécies de bactérias (SUTTISUNHAKUL et al., 2017; SEUTLEMEZIAN et al., 2018). Dendrogramas construídos a partir de dados de MALDI-TOF são eficientes para resolver a separação de espécies dentro do gênero *Campylobacter*, incluindo a discriminação entre *C. jejuni* e *C. coli*, que são espécies geneticamente similares (KOLÍNSKÁ et al., 2008). Entretanto, não tem se observado concordância na topologia das árvores quando se compara, para os mesmos isolados, o dendrograma construído a partir de dados de MALDI-TOF e a análise filogenética com dados de Whole Genome Sequencing (WGS) ou da sequência do gene 16S ribossomal (LAWTON et al., 2018).

A baixa concordância de topologia está, possivelmente, relacionada a diferença entre os métodos, uma vez que o MALDI-TOF representa o fenótipo baseado, principalmente, em proteínas ribossomais, enquanto dados de WGS

representam o genótipo baseado em sequências completas ou fragmentos de DNA. Ainda assim, mais estudos são necessários para avaliar a adequação das análises de distância e agrupamento de isolados baseados em dados de MALDI-TOF para futuros estudos epidemiológicos.

CAPÍTULO 2

Multivirulência e disseminação fenotípica de *Campylobacter jejuni* veiculadas pela carne de frangos no Brasil.

Artigo a ser publicado no periódico

PLOS Pathogens

1 **Multivirulência e disseminação fenotípica de *Campylobacter jejuni***
2 **veiculadas pela carne de frangos no Brasil**

3

4

5 **Multivirulência de *Campylobacter jejuni* no Brasil**

6

7

8 Phelipe Augusto Borba Martins Peres^{1*}; Roberta Torres de Melo¹; Paulo Marcel
9 Armendaris²; Fabiano Barreto²; Tiago Follmann Perin²; Ana Laura Grazziotin¹,
10 Guilherme Paz Monteiro¹, Eduarda Cristina Alves Lourenzatto, Daise Aparecida
11 Rossi¹

12

13 ¹Laboratório de Epidemiologia Molecular

14 ²Laboratório Federal de Defesa Agropecuária/RS - LFDA/RS, Porto Alegre/RS

15

16

17 *Autor Correspondente:

18 E-mail: lipe-peres1@hotmail.com

19

20

21

22

23

24

25

26

27

Abstract

Campylobacter jejuni is the pathogen most incriminated in bacterial gastroenteritis, and therefore, characteristics of its epidemiology must be continuously investigated to support possible mitigating measures. This is particularly important when evaluating representative strains of the world's leading chicken meat exporter, Brazil. We evaluated a panel of 14 virulence genes in 359 strains of *C. jejuni* isolated from chilled broiler carcasses of Brazil. The genes were classified into five virulence categories (B: biofilm/motility; SS: secretion/cytotoxicity system; CI: invasion/colonization; GB: Guillain-Barré and AE: adaptation to stress). The percentage of strains with stress adaptation genes (86.07%) indicates the potential to adapt to unfavorable environmental conditions and *hcp* gene in 97.77%, the ability to cause serious infections in humans. Genes related to GBS in 77.44% of strains are an additional concern, which must be monitored. The gene panel showed the presence of 124 virulence profiles. Individual analyzes by carcass, slaughter establishment, and municipalities where they were located showed high I.Var., of 0.82, 0.87 and 0.78, respectively. Georeferencing indicated the state A as a hotspot for virulent strains. Higher levels of isolation and multi-virulence were identified in the summer, which in Brazil is hot and humid. Proteomics was able to discriminate the strains, but due to the high heterogeneity between them, it did not allow to explain their dissemination. Together, our results showed that the studied strains are a potential danger to public health and that there is an urgent need for their surveillance and the adoption of control measures, especially in the state A.

51

Keywords: Public Health. Environmental Adaption. Multi-virulence. MALDI-TOF.

53

54

55

56

57

58 Author Summary

59 *Campylobacter jejuni* is a bacteria considered one of the main causes of food-
60 borne diseases and the consumption of undercooked chicken meat is a major
61 source of human infection. In Brazil, epidemiological studies of this pathogen are
62 still scarce, compared to countries with structured surveillance, as well as, its
63 analysis is not required by public health agencies in any group of foods intended
64 for human consumption. We investigated the epidemiology of *C. jejuni* strains
65 isolated from chilled chicken carcasses of Brazil, determining virulent and multi-
66 virulent strains, by the sample origin and its phenotypic patterns. The strains
67 showed a high potential for adaptation to the environment, being classified as
68 virulent and multi-virulent, with a seasonal pattern in warmer and humid periods
69 of the year. In the state A, the strains with the highest evolutionary level were
70 isolated, when compared with the other states in the region. We hope that this
71 study will help to better understand the potential risks that *C. jejuni* represents for
72 the population and support the surveillance agencies in tracking and adopting
73 measures to minimize the dangers that this pathogen poses to public health.

74

75

76

77

78

79

80

81

82

83

84

85

86

87 INTRODUÇÃO

88 *C. jejuni* é uma das causas mais frequentes de gastroenterite bacteriana
89 em todo o mundo, sendo o agente mais prevalente em países com sistemas de
90 vigilância estruturados [1,2]. Já em países subdesenvolvidos ou emergentes, há
91 problemas na subnotificação de infecções humanas e na identificação de
92 alimentos positivos. Estes fatos somados à multiplicidade de reservatórios e vias
93 de transmissão, distribuição geográfica e sazonal dificultam o entendimento
94 completo de sua epidemiologia [3].

95 Esse micro-organismo é considerado fastidioso, com alto potencial de
96 formar biofilmes, adquire facilmente a forma viável não cultivável em condições
97 de estresse extremo e apresenta uma diversidade de fatores de virulência. Esses
98 determinantes genéticos garantem não só a eficiência nos processos infecciosos
99 no hospedeiro humano, mas também a sobrevivência em ambientes hostis e são
100 fundamentais na caracterização das diferentes linhagens [4].

101 Alguns genes foram reconhecidos pela sua importância no gênero
102 *Campylobacter*, incluindo *flaA* e *luxS* envolvidos na formação de biofilmes,
103 *cdtABC* e *hcp* relacionados a sistemas de secreção, *cadF*, *ciaB* e *pldA*
104 relacionados à invasão e colonização, *dnaJ*, *htrA* e *cbrA* envolvidos na
105 adaptação ao estresse ambiental e *neuA* e *cstII* relacionados a indução à
106 Síndrome de Guillain-Barré [5, 6, 7, 8].

107 Diante disso, a condução de análises epidemiológicas se torna uma tarefa
108 difícil e ao mesmo tempo fundamental na adoção de medidas de intervenção
109 para seu controle e prevenção [9]. Essas análises são particularmente relevantes
110 na indústria avícola, já que o consumo de carne de frango contaminada com

111 *Campylobacter* é uma das principais fontes de infecção para humanos e o Brasil
112 é o maior exportador mundial desse alimento [10].

113 O objetivo desse estudo foi determinar o potencial genético virulento e
114 disseminação fenotípica de *C. jejuni* isoladas de carcaças de frangos de corte
115 destinados ao comércio interno e externo.

116

117 **RESULTADOS**

118

119 ***Genes e perfis de virulência***

120 Analisamos molecularmente 14 genes associados à virulência em todos
121 as 359 cepas de *C. jejuni* isoladas de de carcaças de frango. A avaliação por
122 categorias de virulência constatou que a frequência concomitante dos genes
123 ligados à adaptação ao estresse foi significativamente superior (86,07% -
124 309/359) em relação às demais categorias, e os relacionados ao sistema de
125 secreção os menos frequentes (131/359 – 36,49%) (Tabela 1).

126 A maioria significativa dos isolados (292/359 - 81,34%) apresentou pelo
127 menos oito dos 14 genes estudados ($p < 0,05$ – *Fischer test*), o que retratou o
128 elevado percentual de cepas virulentas 72,14% (229/359), das quais 47,60%
129 (109/229) foram classificadas como multivirulentas.

130 Nós encontramos um total de 124 perfis de virulência distintos, dos quais
131 cinco englobaram 40,1% (144/359) das cepas, sendo 76 cepas pertencentes a
132 um único perfil multivirulento. Esse fato determinou o baixo índice de
133 variabilidade (I.Var. = 0,35) considerando as 359 cepas.

134

135

136 **Tabela 1.** Frequência de genes de virulência em *C. jejuni* isoladas de carcaças de frangos no
 137 Brasil entre outubro de 2017 e julho de 2018.

Categorias de virulência	Gene	Frequência (%) do gene	Frequência (%) da categoria
Adaptação ao estresse	<i>cbrA</i>	346 (96,38)	309 (86,07) ^a
	<i>htrA</i>	338 (94,15)	
	<i>dnaJ</i>	326 (90,81)	
Síndrome de Guillain-Barré	<i>neuA</i>	319 (88,86)	268 (74,65) ^b
	<i>cstII</i>	278 (77,44)	
Invasão/Colonização	<i>cadF</i>	300 (83,57)	229 (63,79) ^c
	<i>ciaB</i>	295 (82,17)	
	<i>pldA</i>	262 (72,98)	
Biofilme/Motilidade	<i>luxS</i>	236 (65,74)	182 (50,70) ^d
	<i>flaA</i>	201 (55,99)	
Sistema de secreção/citotoxicidade	<i>hcp</i>	351 (97,77) [*]	131 (36,49) ^e
	<i>cdtA</i>	170 (47,35)	
	<i>cdtB</i>	151 (42,06)	
	<i>cdtC</i>	162 (45,13)	

138 Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa. * $p < 0,0001$ na análise dentro da
 139 mesma categoria.

140

141 Os perfis que incluíram genes ligados à categoria de formação de
 142 biofilmes/motilidade foram os menos identificados (60,5% - 75/124) e os
 143 associados aos sistemas de secreção (95,2% - 118/124) e à adaptação ao
 144 estresse (96,0% - 119/124) os mais prevalentes. A classificação dos perfis de
 145 acordo com as categorias de virulência permitiu a identificação de 16
 146 agrupamentos (A1 a A16), sendo o A16 identificado em 57 perfis (46,0%), que
 147 contemplam cepas virulentas, dos quais 14 deles são perfis de cepas
 148 multivirulentas (Tabela 2).

149

150 **Tabela 2.** Perfis de virulência classificados de acordo com as categorias dos genes estudados
 151 em *C. jejuni* isoladas de carcaças de frangos no Brasil entre outubro de 2017 e julho de 2018.

Categorias	Número de perfis
Biofilme (B)	75 ^c (60,5 %)
Sistema de secreção (SS)	118 ^b (95,2 %)
Invasão/Colonização (IC)	106 ^a (85,5 %)
Síndrome de Guillain-Barré (GB)	102 ^a (82,3%)
Adaptação ao estresse (AE)	119 ^b (96,0%)
Agrupamentos	Número de perfis
A1. SS	2 (1,61%)
A2. GB	1 (0,80%)

A3. B, AE	1 (0,80%)
A4. GB, AE	1 (0,80%)
A5. IC, AE	1 (0,80%)
A6. SS, AE	3 (2,41%)
A7. B, GB, AE	1 (0,80%)
A8. B, SS, IC	1 (0,80%)
A9. B, SS, GB	1 (0,80%)
A10. B, IC, AE	1 (0,80%)
A11. SS, IC, AE	2 (1,61%)
A12. SS, GB, AE	6 (4,83%)
A13. B, SS, GB, AE	2 (1,61%)
A14. B, SS, IC, AE	11 (8,87%)
A15. SS, IC, GB, AE	33 (26,61%)
A16. B, SS, IC, GB, AE (Multivirulentas)	57* (46,0%)
Total	124 (100%)

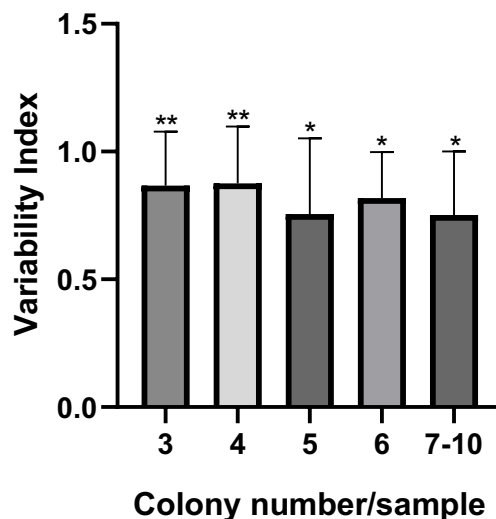
152 A: agrupamento. Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa. * diferença
 153 significativa com os demais. $p < 0,05$. GB=Síndrome de Guillain-Barré, AE= Adaptação ao
 154 estresse, IC= Invasão/colonização celular, SS= Sistema de secreção/citotoxicidade, B=
 155 Biofilme/motilidade.

156

157 **Análise dos isolados por amostra**

158 As 359 cepas utilizadas em nosso estudo foram provenientes da análise
 159 de 114 carcaças, das quais foram isoladas de uma a dez colônias distintas de *C.*
 160 *jejuni* por amostra (Md = 3). Amostras em que obtivemos isolamento de três ou
 161 mais colônias (59/114 – 51,75%) foram agrupadas de acordo com o número de
 162 isolados para determinação do índice de variabilidade (I.Var.), cujo valor
 163 identificado não diferiu entre os grupos ($p=0,4841$).

164 O elevado I.Var. médio encontrado (0,82) justificou a realização da análise
 165 individual de cada cepa em todo o estudo. O I.Var. identificado dentro de cada
 166 grupo diferiu significativamente ($p < 0,05$), e para todas as amostras esse valor foi
 167 superior a 0,75 (Figura 1).



168

169 **Figura 1.** Índice de variabilidade de *C. jejuni* por amostra de acordo com o número de
 170 colônias isoladas. A barra de erros indica o desvio padrão, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ pelo
 171 teste de Kruskal-Wallis.

172

173 ***Análise dos isolados por Estabelecimento***

174 Nosso estudo incluiu a análise de 46 estabelecimentos de abate sob
 175 fiscalização federal distribuídos em 43 municípios. Obtivemos uma variação de
 176 um a 22 isolados em cada local, e aqueles estabelecimentos que apresentaram
 177 três ou mais cepas (36/46 – 78,3%) foram utilizados para determinar o I.Var.
 178 geral e individual. Na interpretação dos índices de virulência e multivirulência
 179 todos os estabelecimentos foram considerados.

180 O I.Var. médio de todos os estabelecimentos foi de 0,87, sendo que a
 181 maioria significativa deles (28/36 - 77,78%) apresentou valores superiores a 0,7
 182 (Tabela 3).

183 A distribuição dos estabelecimentos conforme a classificação de
 184 virulência e multivirulência está descrita na Tabela 4. De maneira geral e
 185 esperada, a quantidade de cepas virulentas por estabelecimento e entre

186 estabelecimentos foi significativamente superior ao de cepas multivirulentas (*test*
 187 *T student - p<0,001*). A maioria significativa dos estabelecimentos (21/46 -
 188 45,7%) apresentaram de 70 a 100% das cepas classificadas como virulentas, e
 189 dois deles apresentou esse mesmo intervalo percentual de cepas multivirulentas,
 190 ambos localizados no estado A. Percentuais inferiores a 40% de cepas virulentas
 191 e multivirulentas foram identificados em 11/46 (23,9%) e 33/46 (71,8%)
 192 estabelecimentos, respectivamente.

193

194 **Tabela 3.** Índice de variabilidade dos perfis de virulência de *C. jejuni* isoladas de carcaças de
 195 frangos por estabelecimento de abate.

196

I.Var. dos perfis de virulência	Classificação do I.V.	Estabelecimentos (SIF) n=36	Total
1	Alta	10 (27,78%) ^{ab}	28 (77,78%) ^a
0,99-0,7	Alta	18 (50,00%) ^a	
0,69-0,5	Média	7 (19,44%) ^{bc}	8 (22,22%) ^b
<0,5	Baixa	1 (2,78%) ^c	

197 Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste exato de Fisher
 198 ($p<0,05$).

199

200

201 **Tabela 4.** Distribuição de frequência de cepas virulentas e multivirulentas por estabelecimentos.

Intervalo percentual de cepas/estabelecimento com o caráter (%)	Estabelecimentos com cepas virulentas – n (%)	Estabelecimentos com cepas multivirulentas – n (%)
100 f 70	21 (45,7) ^{a,A}	2 (4,3) ^{b,A}
70 f 40	14 (30,4) ^{a,AB}	11 (23,9) ^{a,B}
40 f 0	11 (23,9) ^{a,B}	33 (71,8) ^{b,C}
Total	46	46

202 Letras minúsculas diferentes na mesma linha e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna
 203 indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

204

205

206 **Análise dos isolados por estado**

207 As características de *C. jejuni* foram analisadas conforme seus estados
208 de origem: A, B e C.

209 O estado A apresentou o menor número de isolados (81/359 – 22,6%) e
210 de perfis (42/124 – 33,9%) em relação aos demais estados ($p < 0,05$), cujos
211 números foram similares entre eles (Tabela 5).

212

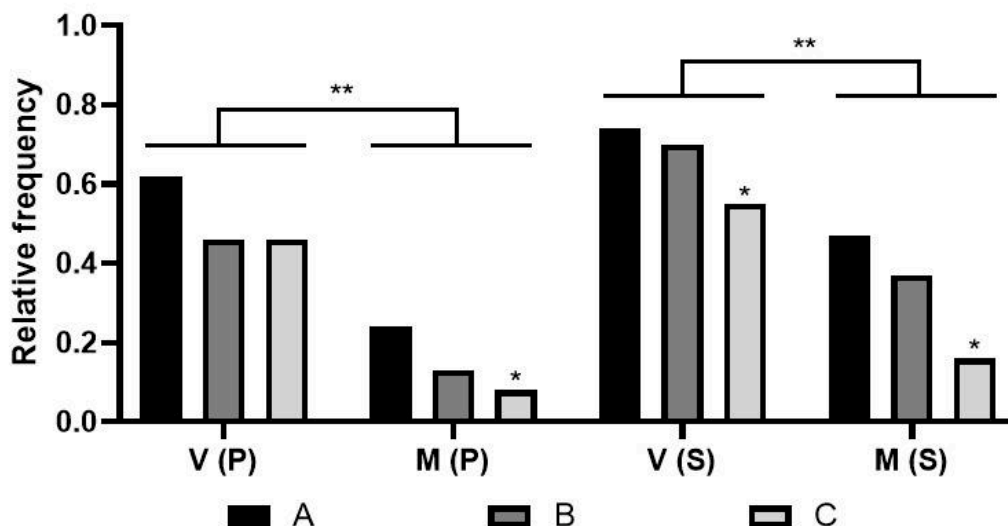
213 **Tabela 5.** Índices de variabilidade, frequências de cepas e de perfis de virulência identificados
214 em *C. jejuni* isoladas de carcaças de frango no Brasil.

	A	B	C
I.Var. (classificação)	0,53 (médio)	0,42 (baixo)	0,51 (médio)
Perfis com 1 cepa - n (%)	30 (71,4) ^{aA}	35 (64,8) ^{aA}	53 (69,7) ^{aA}
Perfis com 2-3 cepas - n (%)	10 (23,8) ^{aB}	15 (27,8) ^{aB}	16 (21,1) ^{aB}
Perfis com mais de 3 cepas - n (%)	2 (4,8) ^{aB}	4 (7,4) ^{aB}	7 (9,2) ^{aB}
Total	Cepas – n	81 ^a	128 ^b
	Perfis – n	42 ^a	54 ^b

215 Letras minúsculas diferentes na mesma linha e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna
216 indicam diferença significativa; *: diferença na virulência e multivirulência das cepas da mesma
217 coluna. **: diferença na virulência e multivirulência dos perfis da mesma coluna - ($p < 0,05$) - One
218 way Anova e Fisher test. I.Var.: índice de variabilidade. n(%): frequência e percentual da
219 característica.

220

221 Apesar de apresentar mais isolados, o estado C apresentou a menor
222 frequência relativa (*Fisher test*- $p < 0,05$) de cepas classificadas como virulentas
223 e multivirulentas em relação aos estados A e B, assim como de perfis
224 multivirulentos (Figura 2).



225

226 **Figura 2.** Frequência relativa de cepas virulentas e multivirulentas por estado. V: Virulência; M:
 227 Multivirulência; P: perfis; S: cepas; Estados: A, B e C; * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ - One way Anova e
 228 Fisher test.

229

230 A construção do gráfico de calor conduziu a identificação de zonas
 231 quentes mais evidentes no estado A, onde observamos máxima expressão de
 232 frequência relativa dos genes ligados a SGB em comparação aos demais
 233 estados. Genes ligados à formação de biofilmes foram os menos frequentes,
 234 mas predominantes em todos os estados no mês de dezembro e mais comuns
 235 no estado A. A maior concentração de cepas virulentas e multivirulentas também
 236 foi mais expressiva no estado A, especialmente nos meses de novembro e
 237 dezembro. Dessa forma, o estado A apresenta-se como o principal *hotspot* em
 238 potencial para manutenção de cepas de *C. jejuni* virulentas e multivirulentas em
 239 comparação aos demais estados. As demais categorias genéticas (SS, IC e AE)
 240 apresentaram frequência semelhante nos três estados (Figura3)

241

242

243

244

245

246

247

248

249

250

251

252

253

254

255

256

257

258

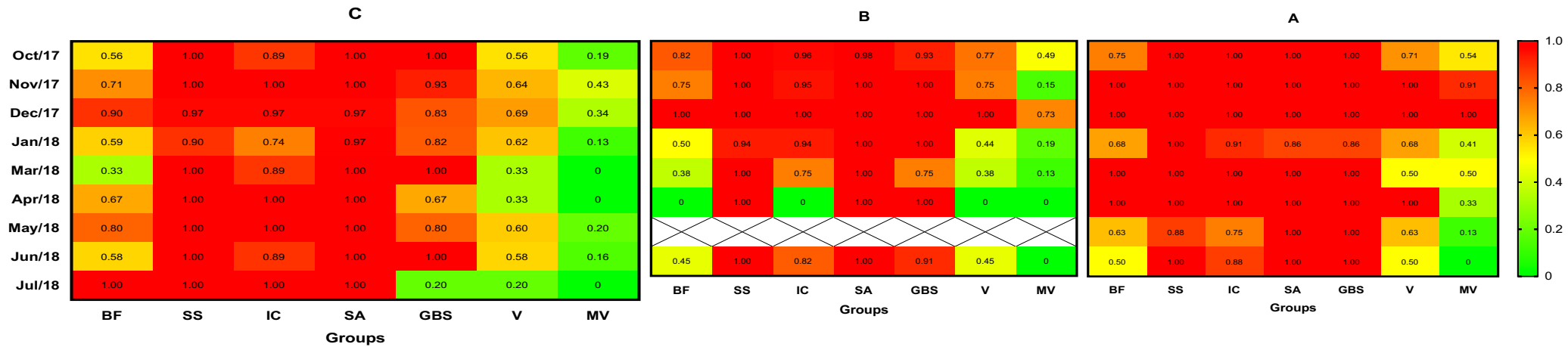


Figura 3. Gráfico de calor definido com base nas cores extremas do verde ao vermelho que indicam a frequência relativa de cada categoria de virulência estudada de acordo com o estado e os meses de isolamento de *C. jejuni*. A, B, C: estados de isolamento das cepas. BF: Biofilm formation group (frequência de um ou mais genes). SS: Secretion system (frequência de um ou mais genes). IC: Invasion/Colonization (frequência de um ou mais genes). SA: Stress adaptation (frequência de um ou mais genes). GBS: Síndrome de Guillain-Barré (frequência de um ou mais genes). V: índice de cepas virulentas. MV: índice de cepas multi-virulentas. X: ausência de isolados. (Software GraphPad Prism 8.0.1).

259 Mesmo com um número significativo de perfis que contemplam somente
260 uma cepa nos três estados, nenhum estado apresentou alto I.Var., em virtude de
261 grande número de cepas estarem agrupadas a poucos perfis (Tabela 6). No
262 estado C a variabilidade abaixo de 0,7 se deve á existência de dois perfis que
263 englobam 16 e 18 cepas. No estado B, o valor inferior está ligado a um perfil que
264 inclui 37 cepas multivirulentas e no estado A a um perfil multivirulento com 25
265 cepas.

266

267 ***Análise dos isolados por município***

268 Houve uma variação de um a 23 isolados por cidade, com mediana de
269 oito isolados. Para determinar o I.Var. e a distribuição dos perfis de virulência de
270 acordo com a classificação de V e MV foram selecionados os municípios que
271 apresentaram três ou mais isolados, que corresponderam a 79,1% (34/43) do
272 total, sendo sete no estado A, 16 no estado B e 11 no estado C.

273 O I.Var. médio identificado nos municípios foi de 0,78 e considerado
274 elevado. A quantidade significativa de cidades com I.Var. superior a 0,7 (23/34 –
275 70,6%) determinaram o alto valor médio identificado (*Fischer test* – $p < 0,05$).

276 O número de cidades/estado com cepas virulentas não oscilou de forma
277 significativa, independente do intervalo percentual de cepas virulentas. Porém,
278 uma minoria significativa das cidades (4/34 – 11,8%) apresentou 40% ou menos
279 das suas cepas virulentas. De maneira controversa, cidades que apresentaram
280 de 0-40% de suas cepas multivirulentas foram predominantes (24/34 – 70,6%)
281 em nosso estudo. Esse elevado número se deve ao fato de que 100% dos
282 municípios do estado C se enquadrarem nesse intervalo (Tabela 6).

283 **Tabela 6.** Distribuição das cidades conforme o valor percentual de cepas de *C. jejuni* virulentas
 284 e multivirulentas isoladas em municípios localizados em três estados brasileiros (A, B e C).

Intervalo percentual de cepas por cidade com o caráter	Nº de cidades / estado	Cidades com cepas virulentas n (%)	Cidades com cepas multivirulentas n (%)
100 † 70	A (7)	5 (71,4) ^a	1 (14,3) ^a
	B (16)	9 (56,2) ^a	1 (6,3) ^a
	C (11)	3 (27,3) ^a	0 ^a
	Total (34)	17 (50,0)^A	2 (5,9)^A
70 † 40	A (7)	1 (14,3) ^a	4 (57,1) ^a
	B (16)	5 (31,3) ^a	4 (25,0) ^{ab}
	C (11)	7 (63,6) ^a	0 ^b
	Total (34)	13 (38,2)^A	8 (23,5)^A
40 † 0	A (7)	1 (14,3) ^a	2 (28,6) ^a
	B (16)	2 (12,5) ^a	11 (68,8) ^{ab}
	C (11)	1 (9,1) ^a	11 (100) ^b
	Total (34)	4 (11,8)^B	24 (70,6)^B

285 ab: letras diferentes na mesma coluna indicam diferença dentro do mesmo intervalo. AB: letras
 286 diferentes na mesma coluna indicam diferença entre os intervalos ($p < 0,05$).

287

288 **Análise Sazonal**

289 O I.Var. e as características de virulência e multivirulência foram avaliadas
 290 para as 359 cepas, considerando os meses de outubro a dezembro de 2017 e
 291 janeiro e março a julho de 2018.

292 Altos I.Var. estão diretamente relacionados às baixas taxas de
 293 multivirulência pela razão de *odds* (Tabela 7). Nosso estudo mostrou que nos
 294 meses de janeiro a julho de 2018 tivemos os menores índices de multivirulência,
 295 com característica decrescente ao longo do tempo. Isso determinou a elevada
 296 variabilidade genética entre as cepas, em virtude da diversidade de perfis de
 297 virulência. Já nos meses de outubro a dezembro de 2017 houve maior equilíbrio
 298 e equivalência nesses índices (Figura 4).

299 De forma geral, os meses considerados quentes e úmidos (Out-Dez) no
 300 hemisfério Sul determinam o maior número de isolados associado a altas taxas

301 de virulência e multivirulência, que indicaram a característica sazonal de *C. jejuni*
 302 (Tabela 7).

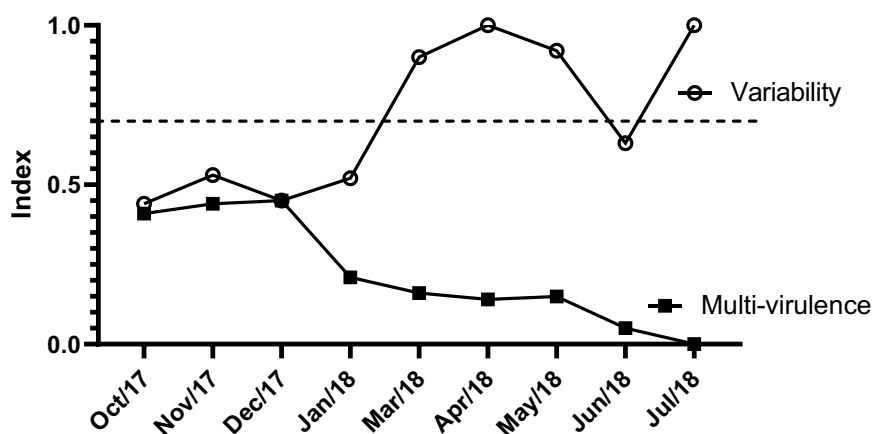
303

304 **Tabela 7.** Frequência de virulência e multivirulência de cepas e perfis por sazonalidade.

Mês/ano	Virulência – n(%)		Multivirulência – n(%)		Total		OR I.Var. - I.M. ⁻¹
	Cepas	Perfis	Cepas	Perfis	Cepas	Perfis	
Outubro/2017	73 (67,6) ^{ac,A}	26 (54,2) ^{ab,C}	44 (40,7) ^{a,B}	11 (22,9) ^{a,D}	108	48	1,16
Novembro/2017	37 (82,2) ^{ad,A}	16 (66,7) ^{a,C}	20 (44,4) ^{a,B}	6 (25,0) ^{a,D}	45	24	1,43
Dezembro/2017	37 (78,7) ^{ad,A}	13 (61,9) ^{ab,C}	21 (44,7) ^{a,B}	2 (9,5) ^{a,D}	47	21	1,0
Janeiro/2018	41 (53,2) ^{bc,A}	15 (37,5) ^{b,C}	16 (20,8) ^{bc,B}	3 (7,5) ^{a,D}	77	40	4,12
Março/2018	8 (42,1) ^{b,A}	6 (35,3) ^{ab,C}	3 (15,8) ^{bd,A}	3 (17,6) ^{a,C}	19	17	45,33
Abril/2018	4 (57,1) ^{bcd,A}	4 (57,1) ^{ab,C}	1 (14,3) ^{ad,A}	1 (14,3) ^{a,C}	7	7	∞
Mai/2018	8 (61,5) ^{bcd,A}	7 (58,3) ^{ab,C}	2 (15,4) ^{ad,B}	2 (16,7) ^{a,C}	13	12	66,0
Junho/2018	20 (52,6) ^{bc,A}	15 (62,5) ^{ab,C}	2 (5,3) ^{d,B}	2 (8,3) ^{a,D}	38	24	30,86
Julho/2018	1 (20,0) ^{b,A}	1 (20,0) ^{ab,C}	0 ^{abd,A}	0 ^{a,C}	5	5	∞

305 Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa. A B: diferença na
 306 virulência e multivirulência das cepas (linha). C D: diferença na virulência e multivirulência dos
 307 perfis (linha) ($p < 0,05$). OR: *Odds Ratio*, I.Var.: índice de variabilidade, I.M.: índice de
 308 multivirulência.

309



310

311 **Figura 4.** Índices de variabilidade e multivirulência de *C. jejuni* ao longo de tempo de isolamento.
 312 Linha tracejada (---) separa índices baixos e médios dos valores de alta variabilidade genética.

313

314

315 **Clusterização de *C. jejuni***

316 A análise de *clusters* reuniu um total de 352 cepas de *C. jejuni*. As cepas
317 que apresentaram espectros nulos foram excluídas da construção do
318 dendrograma. À representação do dendrograma (Figura S1) foram reunidas as
319 seguintes informações: i) a distribuição geográfica (estado de coleta) e ii) a
320 classificação de virulência baseada no perfil de genes de virulência identificados.
321 O dendrograma apresentou os valores de similaridade entre as amostras, sendo
322 que, as cepas mais similares entre si (635-4_C24 e 635-6_D6) no dendrograma
323 apresentaram 92% de similaridade, não havendo amostras idênticas (100% de
324 similaridade).

325 O dendrograma demonstrou a ausência de uma discriminação das cepas
326 por distribuição geográfica. Poderia ser esperada uma separação das cepas de
327 acordo com os três estados de origem, porém essa condição não foi observada
328 e, de modo geral, cepas de diferentes estados encontraram-se proximamente
329 relacionadas. Alguns grandes *clusters* de amostras por estado são, no entanto,
330 observados e destacados na sequência.

331 Sob o valor de *cutt-off* arbitrário de 70% de similaridade, observamos
332 quatro grandes *clusters* de cepas de um mesmo estado (A01, B01, C01, B02 e
333 V01). O agrupamento A01 reúne, em um mesmo ramo sete cepas do estado do
334 A (1442-1_C23 até 37956-1_E3). O *cluster* B01 reúne, em um mesmo ramo, um
335 total de 15 cepas do estado B (34205-2_F9 até 35528-6_H3), intercalados por
336 uma única cepa do estado A (34277-3_A6) e uma do estado C (42158-3_A24).
337 Um segundo *cluster*, B02, reúne um total de nove cepas também do estado B
338 (567-2_A13 até 2076-4_D10), precedidas, no mesmo ramo, por duas cepas do

339 estado C (38410-9_F14 e 41914-3_E24). Um terceiro *cluster*, C01, reúne 12
340 cepas do estado C (635-4_C24 até 665-5_E23).

341 O perfil gênico de virulência categorizado em multivirulento, virulento e
342 não definido, não mostrou *clusters* aparentes de acordo com a topologia de
343 espectros de massa do dendrograma. Embora, para a maioria das cepas, tenha
344 sido observada uma distribuição dispersa e intercalada dos perfis gênicos,
345 podemos notar alguns *clusters* concordantes com a topologia de ramos do
346 dendrograma. O maior agrupamento observado foi o V01, com um nó em 65%
347 similaridade, com 26 cepas (32569-5_H11 até 32639-10_B5), das quais 20 são
348 virulentas ou multivirulentas. Entretanto, não há aparente relação entre a
349 virulência e a distribuição geográfica das amostras neste grupo.
350 Interessantemente, para o grupo A01, todas as sete cepas do estado A são
351 virulentas ou multivirulentas.

352

353 **DISCUSSÃO**

354

355 A importância de *C. jejuni* como principal patógeno alimentar, o
356 envolvimento da carne de frango como fonte de infecção para humanos e o
357 protagonismo do Brasil como exportador desse alimento instigam ao melhor
358 conhecimento de aspectos epidemiológicos moleculares e fenotípicos destas
359 bactérias no país.

360 De maneira geral, a evolução das populações bacterianas é determinada
361 por eventos genéticos que permeiam a diversificação das características
362 moleculares. Em especial, para *Campylobacter* existe uma provável pressão de
363 seleção por características adaptativas a condições de estresse que influenciam

364 direta ou indiretamente na sua aptidão, especificamente, em espécies adaptadas
365 ao hospedeiro, mas amplamente expostas a condições ambientais hostis, como
366 é o caso de *C. jejuni* [11].

367 A prevalência significativa de cepas que apresentam de forma
368 concomitante os genes associados à adaptação ao estresse (309/359 - 86,07%)
369 (Tabela 2) sugerem a existência de linhagens aptas à sobrevivência em diversos
370 nichos. De maneira paralela, esse potencial adaptativo pode facilitar sua
371 disseminação, uma vez que há intensificação na taxa de sobrevivência sob estresse
372 térmico, osmótico e oxidativo. Especialmente para o *dnaJ*, que codifica proteínas
373 de choque térmico, particularmente importante para a sobrevivência de
374 *Campylobacter* em alimentos que são mantidos durante a comercialização sob
375 refrigeração ou congelamento, assim como durante o seu preparo, caso forem
376 mal cozidos [12].

377 A alta prevalência da presença do gene *hcp* (97,77%) ligado à categoria
378 dos sistemas de secreção, indica potencial para causar infecções mais graves
379 associadas à diarreia sanguinolenta [13], já que está envolvido no sistema de
380 secreção do tipo VI (T6SS), responsável pelo carregamento de toxinas para o
381 ambiente, células procarióticas [14] ou eucarióticas [15]. Os outros genes
382 relacionados ao sistema de secreção (*cdtABC*) apresentaram frequências
383 menores e similares (42 a 48%) entre elas em nosso estudo. De maneira geral,
384 a presença completa do complexo genético CDT indica potencial de liberação de
385 uma citotoxina funcional que contribui na virulência, na invasão e na adesão
386 celular e é essencial para a liberação da interleucina-8 (IL-8) que contribui para
387 a resposta inflamatória da mucosa hospedeira, além de favorecer a perda da
388 integridade do epitélio intestinal, das junções celulares e induzir apoptose. A

389 diferença significativa na prevalência dos genes ligados ao complexo CDT e do
390 gene *hcp* pode estar relacionada ao fato de que, apesar de serem sistemas de
391 secreção importantes na patogênese de *C. jejuni*, ambos são codificados em
392 regiões independentes do genoma, e portanto, não estão intimamente
393 relacionados [16, 17].

394 De maneira semelhante ao complexo CDT, os genes ligados à categoria
395 de invasão/colonização apresentaram prevalência concomitante inferior ao
396 esperado (63,79%) quando se compara a outros estudos realizados no Brasil
397 [18, 19]. Alguns trabalhos apontam que a limitação no potencial patogênico, em
398 especial aos processos iniciais da infecção (invasão/colonização), observada em
399 algumas linhagens de *Campylobacter* apresenta benefícios ao patógeno, pela
400 maior facilidade de escape do sistema imune aliada a uma manutenção no
401 hospedeiro a longo prazo por meio do estabelecimento de uma infecção crônica
402 [20,21].

403 Estima-se que 25 a 50% dos casos de SGB podem ser associados a
404 campilobacteriose prévia [22]. A presença dos genes *neuA* e *cstIII* demonstraram
405 elevada relação com a produção de lipolissacarídeos (LOS) da parede celular de
406 *Campylobacter* envolvidos com o desenvolvimento da síndrome [7, 23] e
407 identificados em 88,86% e 77,44% das cepas, respectivamente em nosso
408 estudo. Esses valores são alarmantes em virtude de sua superioridade em
409 relação aos achados na literatura [7, 8]. Mas, apesar da grande quantidade de
410 isolados com potencial risco de desenvolvimento de neuropatia pós-infecção, o
411 sistema imunológico do hospedeiro (imunidade humoral e celular) é o principal
412 responsável pelo desenvolvimento de SGB.

413 A prevalência conjunta dos genes relacionados à categoria de virulência
414 formação de biofilmes/motilidade foi de 182/359 (50,7%). A associação de
415 ambas as características em nosso estudo ocorreu pelo envolvimento fisiológico
416 identificado para os genes *luxS* e *flaA* em *C. jejuni* associado à complexidade do
417 processo de formação de biofilmes que pode ser reduzido em até 57% em cepas
418 que não compartilham ambos os fatores genéticos [24]. A elevada capacidade
419 de formar biofilmes em ambientes de produção é bastante evidente para *C. jejuni*
420 e envolve vários mecanismos intrínsecos e extrínsecos [7]. Mas, especialmente
421 para nossas cepas que não compartilham a categoria biofilmes/motilidade
422 (177/359 – 49,3%), a produção da biomassa pode ser significativamente
423 comprometida [24] o que pode facilitar o controle desses patógenos pelos
424 processos de higienização utilizados pela indústria.

425 Considerando os agrupamentos identificados nos 124 perfis, fica evidente
426 a significância do agrupamento A16 que contempla os perfis virulentos (57) e
427 multivirulentos (14/57) (Tabela 2). Fato esse que configura a discussão voltada
428 aos índices de virulência e multivirulência identificados sob as diversas
429 perspectivas.

430 Observamos semelhança na quantidade de estabelecimentos e
431 municípios que apresentaram mais de 70% de suas cepas classificadas como
432 virulentas (21/46 e 17/43, respectivamente), dos quais em duas
433 cidades/estabelecimentos essas cepas eram multivirulentas, valores
434 significativos em comparação ao intervalo inferior (Tabelas 4 e 6). Em uma
435 análise mais ampla, tornou claro que esses locais não incluem o estado C de
436 maneira significativa (Figura 2), mas principalmente o estado do A (Figuras 3),
437 cujas cepas apresentaram origem mais dispersa no território, mas com uma

438 convergência dos índices de virulência e multivirulência às regiões central e
439 metropolitana do estado. É provável que esse estado concentre o maior arsenal
440 de *C. jejuni* de maior nível evolutivo em comparação aos demais estados
441 envolvidos no estudo e por isso seja o principal *hotspot* de manutenção de cepas
442 virulentas, uma vez que ao longo do tempo essa espécie tende a adquirir um
443 maior número de genes de virulência [19]. Há também a menção de que a
444 inclusão de medidas e legislações de controle nos estabelecimentos fortalecem
445 uma redução dos percentuais de isolamento ao mesmo tempo em que promove
446 uma pressão de seleção de cepas mais virulentas, já que os gargalos de seleção
447 ambiental favorecem a preservação de cepas mais competitivas [25]. Este fato
448 foi também identificado no estado A, considerando o número restrito e
449 significativo de cepas isoladas em relação aos demais estados.

450 A nível temporal fica evidente que a distribuição quantitativa (Tabela 7), o
451 caráter virulento e, principalmente, multivirulento das cepas (Figura 4)
452 apresentam padrão sazonal, de maneira que nos meses mais quentes e úmidos
453 (outubro a dezembro) do ano identificamos os maiores índices. Esse
454 comportamento também foi registrado em estudo realizado em *C. jejuni* isoladas
455 de carcaças de frangos que apresentaram maior prevalência e virulência no
456 verão em comparação ao inverno [26].

457 A análise dos índices de variabilidade mostrou discrepâncias nos valores
458 encontrados na análise geral dos dados e a nível estadual (inferiores a 0,7) com
459 os valores obtidos por amostra, por estabelecimento e por município (superiores
460 a 0,7).

461 A elevada variabilidade entre cepas isoladas de uma mesma amostra
462 (I.Var. = 0,82) indica a existência de diferentes genótipos de *C. jejuni* coexistindo

463 dentro do mesmo organismo hospedeiro. De fato, esse tipo de adaptação a
464 subnichos ou nichos comuns no mesmo hospedeiro é proposto em *C. jejuni*,
465 onde até 10 genótipos diferentes já foram relatados em uma única carcaça de
466 frango [27]. Isso evidencia que diferentes linhagens, especialmente as
467 emergentes [11], com graus de complexidade e virulência distintos podem
468 coabitar de maneira comensal o mesmo hospedeiro.

469 De maneira paralela, a similaridade no I.Var. encontrado nas cepas
470 considerando os estabelecimentos e os municípios (média superior a 0,7) era
471 esperada. Isso em virtude de que em apenas três das 43 cidades investigadas
472 tivemos dois estabelecimentos diferentes presentes, para o restante o
473 quantitativo de cepas por município e por estabelecimento foi equivalente. Por
474 se tratar do mesmo estabelecimento/município na maioria dos casos, a alta
475 variabilidade pode estar relacionada à pressão ambiental que tende a selecionar
476 perfis distintos, em virtude de manejos e condutas diferentes adotadas em cada
477 estabelecimento, e de maneira geral, considerando as diferenças intrínsecas do
478 próprio processo produtivo, que envolvem etapas em diferentes graus de
479 estresse toleráveis ou não às distintas cepas [28]. Paralelamente, *C. jejuni*
480 apresenta alta plasticidade genética em virtude de seu elevado potencial de
481 realizar transferência horizontal de genes e recombinação, uma vez que a
482 bactéria é naturalmente competente para captação e transformação de DNA, o
483 que favorece a diversidade de perfis de virulência [29].

484 Paradoxalmente, a análise do I.Var. na amostragem total e em sua
485 distribuição a nível estadual mostra valores inferiores, em virtude da
486 concentração de cepas em um mesmo grupo (total ou por estado). Esses valores
487 inferiores ocorreram em virtude da existência da grande quantidade de cepas

488 agrupadas em poucos perfis classificados como virulentos e multivirulentos, que
489 representa uma tendência evolutiva em *C. jejuni* [19]. A distribuição do I.Var. ao
490 longo do tempo apresentou associação inversa em relação ao índice de
491 multivirulência (*odds ratio* > 1,0) (Tabela 7). Fato este que configura em elevados
492 I.Var. em meses com baixas taxas de cepas MV. Assim como, a ocorrência de
493 baixa variabilidade nos meses que incluem a estação do verão, que
494 apresentaram os maiores índices de cepas MV. A queda abrupta no I.Var.
495 associada a multivirulência das cepas em períodos quentes e úmidos do ano
496 condiz com os aumentos significativos registrados a nível mundial de enterites
497 causadas por *Campylobacter* associada a um surpreendente aumento na
498 gravidade dos casos [30].

499 A variabilidade dos isolados identificada em relação a distribuição
500 geográfica, estabelecimento e perfil de virulência dos mesmos, também foi
501 observada na análise de clusterização com os dados de MALDI-TOF MS. Em
502 outras palavras, não foi observada discriminação definida dos isolados por
503 região geográfica, por estabelecimento e tampouco por perfil gênico de virulência
504 na análise do dendrograma, à exceção de alguns poucos casos. A
505 heterogeneidade das cepas identificada no dendrograma está possivelmente
506 relacionada a mais de um motivo, entre eles, fatores moleculares e técnicos
507 (Figura S1).

508 As proteínas com massa entre 2 e 20 kDa são usadas na identificação
509 das bactérias por MALDI-TOF MS [31], que corresponde predominantemente às
510 proteínas ribossomais e de manutenção celular (*housekeeping*), que estão
511 presentes em abundância na célula. As proteínas citosólicas GroES, HU/Hcj e
512 RplL estão entre as proteínas biomarcadoras nas espécies no gênero

513 *Campylobacter* [32]. Embora a técnica apresente acurácia para a identificação
514 das espécies pela detecção de marcadores de espécie-específicos, apresenta
515 limitações para a discriminação de subespécies. Enquanto alguns estudos
516 relatam a discriminação entre as duas subespécies de *C. jejuni* (*C. jejuni* subsp
517 *jejuni* e *C. jejuni* subsp *doyley*) [33], em outros, são comumente identificadas
518 apenas como *C. jejuni* [32]. Em nosso estudo, não houve identificação das
519 subespécies de *C. jejuni*, que podem estar presentes entre os isolados, e
520 portanto, representar um fator de variabilidade dos resultados.

521 A variabilidade do biomarcador é outro fator a ser considerado. Em *C. coli*
522 já foi demonstrado que o biomarcador de espécie utilizado estava ausente em
523 algumas poucas linhagens testadas, porém um biomarcador com uma diferença
524 de 57 Da foi identificado nestas mesmas linhagens [32]. É possível que a
525 heterogeneidade dos isolados do presente estudo esteja relacionada com a
526 variabilidade do biomarcador. Polimorfismos de nucleotídeo único ou
527 polimorfismos de múltiplos nucleotídeos, responsáveis por mutações não-
528 sinônimas podem refletir mudanças na sequência proteica do biomarcador. Esta
529 variação intraespecífica já foi observada em *Campylobacter* [32] e poderia ser
530 útil no estudo epidemiológico e de caracterização de linhagens.

531 A caracterização de linhagens de *C. jejuni* por meio da construção de
532 dendrograma com dados de MALDI-TOF não tem se mostrado eficaz. Assim
533 como em nosso estudo, Lawton et al. [33] não conseguiram discriminar cepas de
534 *C. jejuni* por hospedeiro de isolamento (galinha, corvo e pato), nem pelo perfil
535 genético. A filogenia construída com as sequências do gene 16S ribossomal das
536 cepas e a filogenômica tampouco apresentaram topologias concordantes com o
537 dendrograma de espectros do MALDI-TOF. Portanto, os nossos resultados,

538 assim como os de Lawton et al. [33] sugerem que, até o momento, os
539 marcadores de MALDI-TOF MS não são eficientes para caracterização de
540 linhagens e estudos de associação com características particulares (região,
541 hospedeiro e virulência).

542 Considerando a complexidade da epidemiologia de *C. jejuni*, nossos
543 resultados podem contribuir com estratégias para o seu controle. O perfil gênico
544 demonstra que as cepas estudadas possuem potencial de alta adaptação às
545 situações hostis ambientais, mas por outro lado, possuem menor frequência de
546 genes ligados a formação de biofilmes, indicando que processos de higienização
547 adequados podem ser estratégicos para o seu controle. Por fim, os elevados
548 índices de virulência, especialmente no verão e no estado A, sugerem a
549 necessidade de adoção de medidas de controle convergentes a esses achados.

550

551 **METODOLOGIA**

552

553 ***Amostras***

554 Foram analisadas 359 cepas de *C. jejuni* isoladas de 114 carcaças de
555 frango refrigeradas, abatidas em estabelecimentos registrados junto ao Serviço
556 de Inspeção Federal pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
557 (MAPA). As carcaças foram analisadas no período de outubro de 2017 a julho
558 de 2018 para atender ao Programa Exploratório para a Pesquisa e Estimativa da
559 Prevalência de *Campylobacter* spp., sendo as mesmas utilizadas para a
560 verificação oficial do Programa de Controle e Monitoramento de *Salmonella* spp,
561 determinados pela IN nº 20, de 21 de outubro de 2016 [34]. As coletas das

562 carcaças foram realizadas em estabelecimentos localizados em três estado (A,
563 B e C), distribuídos em 43 municípios.

564 As cepas foram isoladas e identificadas como *C. jejuni* nos laboratórios
565 oficiais MAPA usando a metodologia proposta pela ISO 10272-1:2017 [35] e o
566 espectrômetro de massa (Maldi TOF®) para a identificação do gênero e espécie,
567 respectivamente. Informações adicionais como estabelecimento, local e data de
568 isolamento foram recebidas junto com as cepas criopreservadas e depositadas
569 no banco de culturas do Laboratório de Epidemiologia Molecular da Faculdade
570 de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (LEPIMOL-
571 FAMEV-UFU).

572

573 ***Identificação bacteriana por meio de MALDI-TOF MS***

574 As amostras foram preparadas de acordo com o protocolo de
575 transferência direta (*Direct Transfer Method*) para a placa a partir de colônia
576 isolada em três *spots* sem realimentação. Após a aplicação na placa, a amostra
577 foi coberta com 1 µL de solução de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA).
578 Cepas de referência pertencentes ao LANAGRO-RS foram utilizadas como
579 controle. A plataforma Brucker, modelo Autoflex Speed, foi utilizada para
580 identificação dos isolados. O banco de espectros foi o MALDI Biotyper RTC/OC
581 3.1. Os critérios de decisão de espécie seguiram: igual ou superior a 1,7 para
582 gênero e igual ou superior a 2,0 para gênero e espécie. O programa de controle
583 de aquisição de dados foi o Brucker, flexControl 3.4. A calibração foi realizada
584 utilizando-se o calibrante Protein Standard I, com tolerância de erro da calibração
585 inferior a 200ppm.

586

587 **Painel de virulência**

588 Após reativação e confirmação das cepas pelos testes de oxidase,
 589 catalase, motilidade e morfologia típica [35] o DNA genômico foi extraído por
 590 meio do Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega), seguindo o protocolo
 591 fornecido pelo fabricante. O DNA purificado (10 ng) foi utilizado como molde para
 592 todas as reações de PCR. As condições de PCR e iniciadores utilizados neste
 593 estudo estão descritos na Tabela 8.

594 Foram estudados 14 genes subdivididos em cinco categorias de
 595 virulência: i) formação de biofilmes – *flaA* (motilidade) e *luxS* (mecanismo
 596 *quorum-sensing*); ii) sistemas de secreção – *cdtABC* (secreção de citotoxina
 597 distensiva) e *hcp* (sistema de secreção tipo VI; iii) invasão e colonização – *cadF*
 598 (colonização intracelular), *ciaB* (invasão celular) e *pldA* (invasão/colonização);
 599 iv) adaptação ao estresse – *dnaJ* (termotolerância), *htrA* (auxílio no crescimento
 600 sob estresse) e *cbrA* (resistência ao choque osmótico); e v) indução à Síndrome
 601 de Guillain-Barré – *cstII* (SGB) e *neuA* (SGB).

602

603 **Tabela 8:** Condições da PCR, seqüências de nucleotídeos e tamanhos dos *amplicons* para
 604 identificar genes de virulência em *C. jejuni*

Categoria de virulência	Gene	Amp licon (pb)	Primer/Seqüência 5'→3'	Volume/DNA/Primer / Anelamento	Referência
Formação de biofilmes	<i>flaA</i>	1728	F-ATGGGATTTTCGTATTAACAC R-CTGTAGTAATCTTAAACATTTTG	25µL/20ng/10pmol/45 °C-1min	[36]
	<i>luxS</i>	1080	F-AGGCAAAGCTCCTGGTAAGGCCAA R-GGATCCGTATAGGTAAGTTCATTTTTGCTCC	25uL/50ng/10pmol/55 °C-1min	[37]
Sistemas de secreção	<i>cdtA</i>	420	F-CTATTACTCCTATTACCCACC R-AATTTGAACCGCTGTATTGCTC	25µL/80ng/10pmol/57 °C-1min	[38]
	<i>cdtB</i>	531	F-AGGAACTTTACCAAGAACAGCC R-GGTGGAGTATAGGTTTGTGTC		
	<i>cdtC</i>	339	F-ACTCCTACTGGAGATTTGAAAG R-CACAGCTGAAGTTGTTGTTGGC	25µL/20ng/10pmol/57 °C-30s	[39]
	<i>hcp</i>	510	F-TGGCTGAACCAGCGTTTATAAAAATTG R-TTAAGCTTTGCCCTCTCTCCA		
Invasão/Colonização	<i>cadF</i>	400	F-TTGAAGGTAATTTAGATATG R-CTAATACCTAAAGTTGAAAC	25µL/20ng/40pmol/47 °C-1min	[40]
	<i>ciaB</i>	527	F-TGCCGAGATTTTTCGAGAAATG R-TGCCCGCCTTAGAACTTACA	25uL/20ng/10pmol/45 °C-1min	
	<i>pldA</i>	385	F-AAGAGTGAGGCGAAATTCCA R-GCAAGATGGCAGGATTATCA		

Adaptação ao estresse	<i>dnaJ</i>	720	F-AAGGCTTTGGCTCATC R-CTTTTTGTTTCATCGTT	25uL/20ng/10pmol/46 °C-1min	[41]
	<i>htrA</i>	1393	F-TAATACGACTCACTATAGGGTAAGTTTAG CAAGTGCTTTATTTGC R-AAAACCATTGCGATATACCCAAACT		
	<i>cbrA</i>	1165	F-TAATACGACTCACTATAGGGTCAACTCTA TCCTTGCCATTATCTT R-GTAGATATTGCTTTTGCTTTGCTG	25µL/20ng/50°C - 1min	[42]
Indução à SGB	<i>cstII</i>	400	F-GTTATTATTGCTGGAAATGGACCAAGT R-ACATATAGACCCCTGAGGTAATTCTTT	25uL/20ng/10pmol/52 °C-1min	[8]
	<i>neuA</i>	500	F-GCTCGTGGTGGCTCAAAGGG R-ATTGCACCATTGCTCATATA		

605

606 As reações de PCR foram realizadas por meio do kit GoTaq® Green
607 Master Mix (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. Como
608 controles positivos utilizou-se as cepas de *C. jejuni* ATCC 33291, IAL 2383 e
609 NCTC 11351. Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel
610 de agarose a 1,5%, utilizando o tampão de corrida TBE 0,5x (Invitrogen) e como
611 padrão de peso molecular, o marcador de 100pb (Invitrogen).

612 Para a classificação do nível de virulência das cepas foi utilizado critério
613 adaptado da análise do índice de multirresistência antimicrobiana [43] e as cinco
614 categorias descritas na Tabela 1. Assim, as cepas foram classificadas como
615 virulentas (V) quando possuíam pelo menos um gene ligado a cada categoria e
616 multivirulentas (MV) quando apresentavam dois ou mais genes de cada uma das
617 cinco categorias.

618 A variabilidade das cepas dentro de um determinado grupo (amostra,
619 estabelecimento, município, estado) foi verificada utilizando a análise do número
620 de perfis de virulência distintos identificados. Os índices de variabilidade, de
621 virulência e de multivirulência foram determinados por meio do cálculo da
622 frequência relativa referente a cada grupo de cepas avaliado. A classificação
623 para o índice de variabilidade foi adaptada [43], sendo baixo para valores
624 menores 0,5, médio para valores entre 0,5 e 0,7 e alto para valores superiores a
625 0,7.

626 **Construção do dendrograma a partir dos espectros de massa**

627 Os espectros de massa (MSP) de todos os isolados de *C. jejuni*
628 identificados a partir do *software* MALDI Biotyper foram exportados em formato
629 de arquivo MALDI Biotyper Main Spectra File (btmsp). Os MSPs foram
630 importados no *software* BioNumerics v.7.6.3 para construção de um
631 dendrograma. Para isso, os MSPs foram comparados entre si por meio do
632 método de distância UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic*
633 *Mean*) e ranqueados por correlação de Pearson na análise de agrupamento, as
634 demais configurações usadas seguiram o padrão do *software*.

635

636 **Análise estatística**

637 A análise dos resultados do painel de virulência foi realizada com base no
638 número de cepas isoladas em cada amostra analisada, no estabelecimento de
639 origem, no local (cidade e estado) e nos aspectos sazonais para a descrição
640 percentual. Para as análises comparativas foi verificada a normalidade dos
641 dados seguido da aplicação de teste exato de Fischer ou teste *t de student* para
642 comparação de duas variáveis e ANOVA ou Kruskal-Wallis na comparação de
643 três ou mais variáveis. O programa utilizado foi o Graph Pad Prism 8.0.1 com
644 intervalo de confiança de 95%.

645

646 **Referências**

- 647 1. Center for Diseases Control and Prevention (CDC). Preliminary Incidence and
648 Trends of Infections with Pathogens Transmitted Commonly Through Food —
649 Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2016–2019 MMWR
650 Morb Mortal [Cited 2020 March 30] Available from:
651 <https://www.cdc.gov/foodnet/reports/prelim-data-intro-2019.html>
- 652 2. European food Safety Authority (EFSA). Update and review of control options
653 for *Campylobacter* in broilers at primary production, EFSA Journal. 2020 March

- 654 18 [Cited 2020 March 15]. Available from:
655 <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/6090>
- 656 3. Kaakoush NO, Castaño-Rodríguez N, Mitchell HM, Man SM. Global
657 epidemiology of *Campylobacter* infection. *Clin Microbiol Rev.* 2015; 28: 687-
658 720. <https://dx.doi.org/10.1128%2FCMR.00006-15> PMID: 26062576
- 659 4. Ungureanu VA, Stratakos AC, Gundogdu O, Stef L, Pet I, Pet E, et al. Virulence
660 of a T6SS *Campylobacter jejuni* chicken isolate from North Romania. *BMC*
661 *Research Notes.* 2019 12: 1-7. <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4201-8>
662 PMID: PMC6437841
- 663 5. Bolton DJ. *Campylobacter* virulence and survival factors. *Food microbiology.*
664 2015; 48: 99-108. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.017> PMID: 25790997
- 665 6. Serichantalergs O, Wassanarungroj P, Khemnu N, Poly F, Guerry P, Bodhidatta
666 L, et al. Distribution of genes related to Type 6 secretion system and
667 lipooligosaccharide that induced ganglioside mimicry among *Campylobacter*
668 *jejuni* isolated from human diarrhea in Thailand. *Gut Pathog.* 2020; 12:1-10.
669 <https://doi.org/10.1186/s13099-020-00357-6> PMID: PMC7146907
- 670 7. Melo RT, Mendonça EP, Monteiro GP, Siqueira MC, Pereira CB, Peres PABM,
671 et al. Intrinsic and extrinsic aspects on *Campylobacter jejuni* biofilms. *Front.*
672 *Microbiol.* 2017; 8: 1332. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01332> PMID:
673 [PMC5513903](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/300513903/)
- 674 8. Amon P, Klein D, Springer B, Jelovcan S, Sofka D, Hilbert, F. Analysis of
675 *Campylobacter jejuni* isolates of various sources for loci associated with
676 Guillain-Barré syndrome. *Eur J of Microbiol Immunol.* 2012; 2: 20-23.
677 <https://doi.org/10.1556/eujmi.2.2012.1.4> PMID: PMC3933986
- 678 9. Llarena AK, Taboada E, Rossi M. Whole-genome sequencing in epidemiology
679 of *Campylobacter jejuni* infections. *J. Clin. Microbiol.* 2017; 55:1269-1275.
680 <https://doi.org/10.1128/JCM.00017-17> PMID: 28249998
- 681 10. Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA). Relatório Anual 2020. 2020
682 May 12 [Cited 2020 May 22] Available from: [https://abpa-br.org/abpa-lanca-](https://abpa-br.org/abpa-lanca-relatorio-anual-2020/)
683 [relatorio-anual-2020/](https://abpa-br.org/abpa-lanca-relatorio-anual-2020/)
- 684 11. Costa D, Iraola G. Pathogenomics of emerging *Campylobacter* species. *Clin*
685 *Microbiol Rev.* 2019; 32: e00072-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00072-18>
686 PMID: 31270126
- 687 12. Baserisalehi M, Bahador, N. Chemotactic behavior of *Campylobacter* spp. in
688 function of different temperatures (37 C and 42 C). *Anaerobe.* 2011; 17: 459-
689 462. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.06.010> PMID: 21757020
- 690 13. Kovács JK, Cox A, Schweitzer B, Maróti G, Kovács T, Fenyvesi H, et al.
691 Virulence Traits of Inpatient *Campylobacter jejuni* Isolates, and a
692 Transcriptomic Approach to Identify Potential Genes Maintaining Intracellular

- 693 Survival. *Microorganisms*. 2020; 8: 531.
694 <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040531>
- 695 14. Schwarz S, Hood RD, Mougous JD. What is type VI secretion doing in all those
696 bugs?. *Trends Microbiol*. 2010; 18: 531-537.
697 <https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.09.001> PMID: 20961764
- 698 15. Jani AJ, Cotter PA. Type VI secretion: not just for pathogenesis anymore. *Cell*
699 *Host Microbe*. 2010; 8: 2-6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.06.012> PMID:
700 PMC2913581
- 701 16. Asakura M, Samosornsuk W, Taguchi M, Kobayashi K, Misawa N, Kusumoto
702 M, et al. Comparative analysis of cytolethal distending toxin (cdt) genes among
703 *Campylobacter jejuni*, *C. coli* and *C. fetus* strains. *Microb Pathog*. 2007; 42:
704 174-183. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2007.01.005> PMID: 17353111
- 705 17. Harrison JW, Dung TTN, Siddiqui F, Korbrisate S, Bukhari H, Tra MPV, et al.
706 Identification of possible virulence marker from *Campylobacter jejuni*
707 isolates. *Emerg infect Dis*. 2014; 20: 1026-1029.
708 <https://doi.org/10.3201/eid2006.130635> PMID: 24856088
- 709 18. Melo RT, Nalevaiko PC, Mendonça EP, Borges LW, Fonseca BB, Beletti ME, et
710 al. *Campylobacter jejuni* strains isolated from chicken meat harbour several
711 virulence factors and represent a potential risk to humans. *Food Control*. 2013;
712 33: 227-231. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.02.032>
- 713 19. Melo RT, Grazziotin AL, Júnior ECV, Prado RR, Mendonça EP, Monteiro GP, et
714 al. Evolution of *Campylobacter jejuni* of poultry origin in Brazil. *Food Microbiol*.
715 2019; 82: 489-496. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.03.009>
- 716 20. Mikonranta L, Mappes J, Laakso J, Ketola, T. Within-host evolution decreases
717 virulence in an opportunistic bacterial pathogen. *BMC Evol Biol*. 2015; 15: 165.
718 <https://doi.org/10.1186/s12862-015-0447-5> PMID: 26282271
- 719 21. Petrovska L, Tang Y, Jansen van Rensburg MJ, Cawthraw S, Nunez J,
720 Sheppard SK, et al. Genome reduction for niche association in *Campylobacter*
721 *hepaticus*, a cause of spotty liver disease in poultry. *Front Cell Infect Microbiol*.
722 2017; 11: 354. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00354> PMID: 28848714
- 723 22. Willison HJ, Jacobs BC, Van Doorn PA. Guillain-barre syndrome. *The*
724 *Lancet*, 388: 717-727. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00339-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00339-1)
- 725 23. Neal-McKinney JM, Liu KC, Jinneman KC, Wu WH, Rice, DH. Whole genome
726 sequencing and multiplex qPCR methods to identify *Campylobacter jejuni*
727 encoding *cst-II* or *cst-III* sialyltransferase. *Front Microbiol*. 2018; 9: 1-8.
728 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00408>
- 729 24. Plummer PJ. LuxS and quorum-sensing in *Campylobacter*. *Front Cellular Infect*
730 *Microbiol*. 2012; 2:1-22. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00022> PMID:
731 22919614

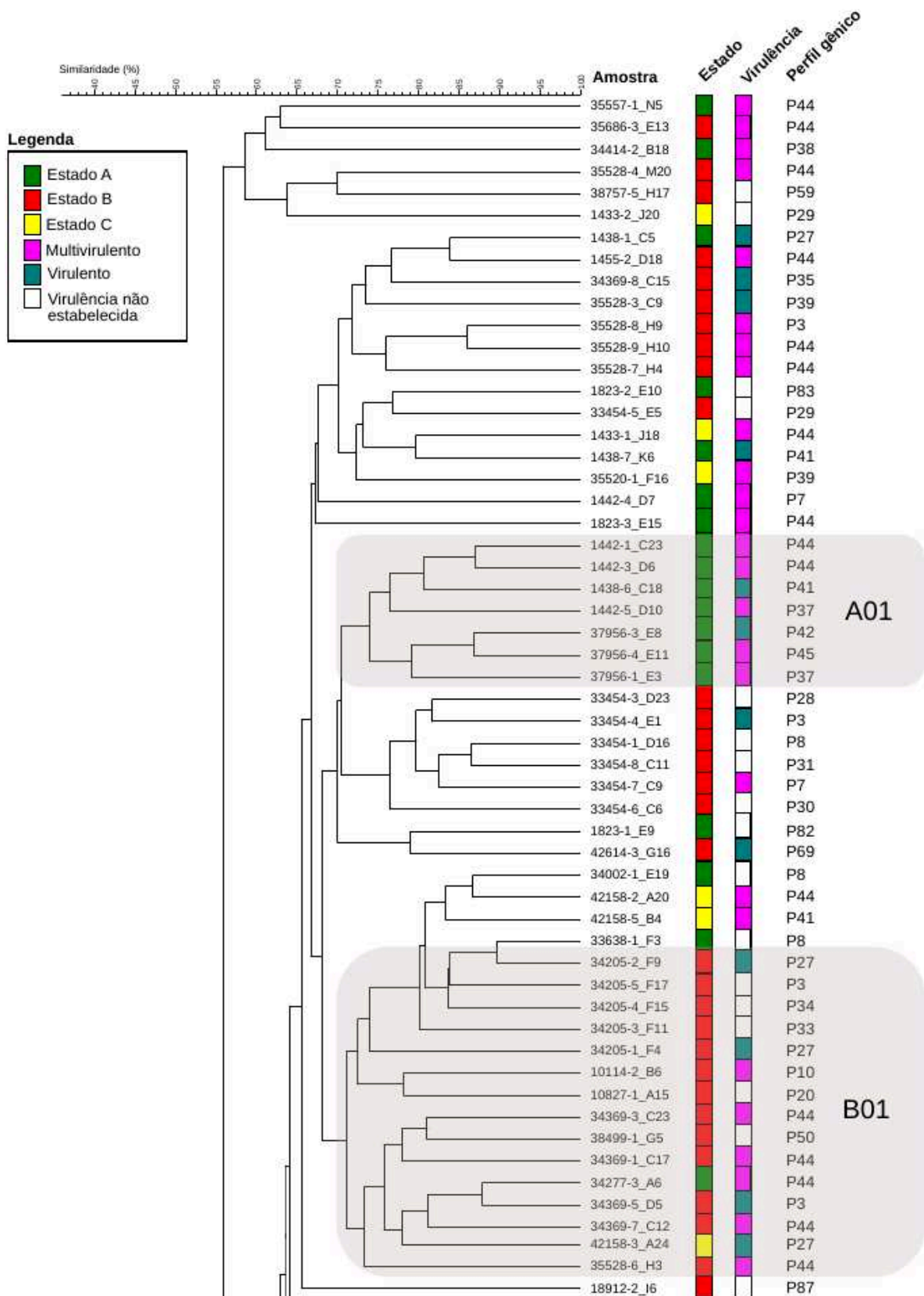
- 732 25. Aidley J, Rajopadhye S, Akinyemi NM, Lango-Scholey L, Bayliss CD.
733 Nonselective bottlenecks control the divergence and diversification of phase-
734 variable bacterial populations. *MBio*. 2017; 8:2.
735 <https://doi.org/10.1128/mBio.02311-16>
- 736 26. Kim J, Park H, Kim J, Kim JH, Jung JI, Cho S, et al. Comparative analysis of
737 aerotolerance, antibiotic resistance, and virulence gene prevalence in
738 *Campylobacter jejuni* isolates from retail raw chicken and duck meat in South
739 Korea. *Microorganisms*. 2019; 7: 1-13.
740 <https://doi.org/10.3390/microorganisms7100433> PMID: 31658662
- 741 27. Colles FM, Dingle KE, Cody AJ, Maiden MCJ. Comparison of *Campylobacter*
742 populations in wild geese with those in starlings and free-range poultry on the
743 same farm. *Appl Environ Microbiol*. 2008; 74: 3583-3590.
744 <https://dx.doi.org/10.1128%2FAEM.02491-07> PMID: 18390684
- 745 28. Kudirkienė E, Bunevičienė J, Brøndsted L, Ingmer H, Olsen JE, Malakauskas
746 M. Evidence of broiler meat contamination with post-disinfection strains of
747 *Campylobacter jejuni* from slaughterhouse. *International journal of food*
748 *microbiology*. 2011; 145: S116-S120.
749 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.024> PMID: 20647156
- 750 29. Burnham PM, Hendrixson DR. *Campylobacter jejuni*: collective components
751 promoting a successful enteric lifestyle. *Nat Rev Microbiol*. 2019; 16: 551-565.
752 <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0037-9> PMID: 29892020
- 753 30. Casey E, Fitzgerald E, Lucey B. Towards understanding clinical *Campylobacter*
754 infection and its transmission: time for a different approach?. *Br J Biomed Sci*.
755 2017; 74: 53-64. <https://doi.org/10.1080/09674845.2017.1291205> PMID:
756 28367739
- 757 31. Murray PR. What is new in clinical microbiology—microbial identification by
758 MALDI-TOF mass spectrometry: a paper from the 2011 William Beaumont
759 Hospital Symposium on molecular pathology. *J Mol Diagn*. 2012; 14: 419-423.
- 760 32. Mandrell RE, Harden LA, Bates A, Miller WG, Haddon WF, Fagerquist CK.
761 Speciation of *Campylobacter coli*, *C. jejuni*, *C. helveticus*, *C. lari*, *C. sputorum*,
762 and *C. upsaliensis* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight
763 mass spectrometry. *Appl Environ Microbiology*. 2005; 71: 6292-6307.
764 <https://dx.doi.org/10.1128%2FAEM.71.10.6292-6307.2005> PMID: 16204551
- 765 33. Lawton SJ, Weis AM, Byrne BA, Fritz H, Taff CC, Townsend AK, et al.
766 Comparative analysis of *Campylobacter* isolates from wild birds and chickens
767 using MALDI-TOF MS, biochemical testing, and DNA sequencing. *J Vet Diagn*
768 *Invest*, 2018; 30: 354-361. <https://doi.org/10.1177/1040638718762562> PMID:
769 29528812
- 770 34. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).
771 Instrução Normativa nº 20, de 21 de outubro de 2016. Brasil, 2016^a. 2016 Oct
772 21 [Cited 2020 May 10] Available from:

- 773 [http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/controle-](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/controle-depatogenos/arquivos-controle-depatogenos/SalmonellaIN202016Salmonella.pdf)
774 [depatogenos/arquivos-controle-de-](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/controle-depatogenos/arquivos-controle-depatogenos/SalmonellaIN202016Salmonella.pdf)
775 [patogenos/SalmonellaIN202016Salmonella.pdf](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/controle-depatogenos/arquivos-controle-depatogenos/SalmonellaIN202016Salmonella.pdf)
- 776 35. International Organisation for Standardisation (ISO) - Microbiology of food and
777 animal feeding stuffs – horizontal method for detection and enumeration of
778 *Campylobacter* spp. – Part 1: Detection method (ISO 10272-1:2006). 2017 Jun
779 [Cited 2020 May 05] Available from: <https://www.iso.org/standard/63228.html>
- 780 36. Hänel I, Müller J, Müller W, Schulze F. Correlation between invasion of Caco-2
781 eukaryotic cells and colonization ability in the chick gut in *Campylobacter*
782 *jejuni*. *Vet. Microbiol.* 2004; 2:75-82.
783 <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.04.004> PMID: 15172689
- 784 37. Elvers KT, Park, SF. Quorum sensing in *Campylobacter jejuni*: detection of a
785 *luxS* encoded signalling molecule. *Microbiology.* 2012; 148:1475-1481.
786 <https://doi.org/10.1099/00221287-148-5-1475> PMID: 11988522
- 787 38. Martínez I, Mateo E, Churruca E, Girbau C, Alonso R, Fernandez-Astorga A.
788 Detection of *cdtA*, *cdtB*, and *cdtC* genes in *Campylobacter jejuni* by multiplex
789 PCR. *Int. J Med Microbiol.* 2006; 296: 45-48.
790 <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2005.08.003> PMID: 16423686
- 791 39. Singh A, Nisaa K, Bhattacharyya S, Mallick A. I. Immunogenicity and protective
792 efficacy of mucosal delivery of recombinant hcp of *Campylobacter jejuni* Type
793 VI secretion system (T6SS) in chickens. *Mol Immunol.* 2019; 111:182-197.
794 <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.04.016> PMID: 31078054
- 795 40. Zheng J, Meng JH, Zhao SH, Singh R, Song WX. Adherenceto and invasion of
796 human intestinal epithelial cells by*Campylobacter jejuni*and*Campylobacter*
797 *colii*isolates from retail meat products. *J Food Prot.* 2006; 69: 768–774.
798 <https://doi.org/10.4315/0362-028x-69.4.768> PMID: 16629018
- 799 41. Datta S, Niwa H, Itoh K. Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter*
800 *jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler and
801 bovine faeces. *J Med Microbiol.* 2003; 52: 345-348.
802 <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05056-0> PMID: 12676874
- 803 42. Biswas D, Hannon SJ, Townsend HG, Potter A, Allan BJ. Genes coding for
804 virulence determinants of *Campylobacter jejuni* in human clinical and cattle
805 isolates from Alberta, Canada, and their potential role in colonization of
806 poultry. *Int Microbiol.* 2011; 14: 25-32. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.132>
807 PMID: 22015699
- 808 43. Krumperman PH. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to
809 identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Appl Environ*
810 *Microbiol.* 1983; 46: 165-170. PMID: 6351743

811

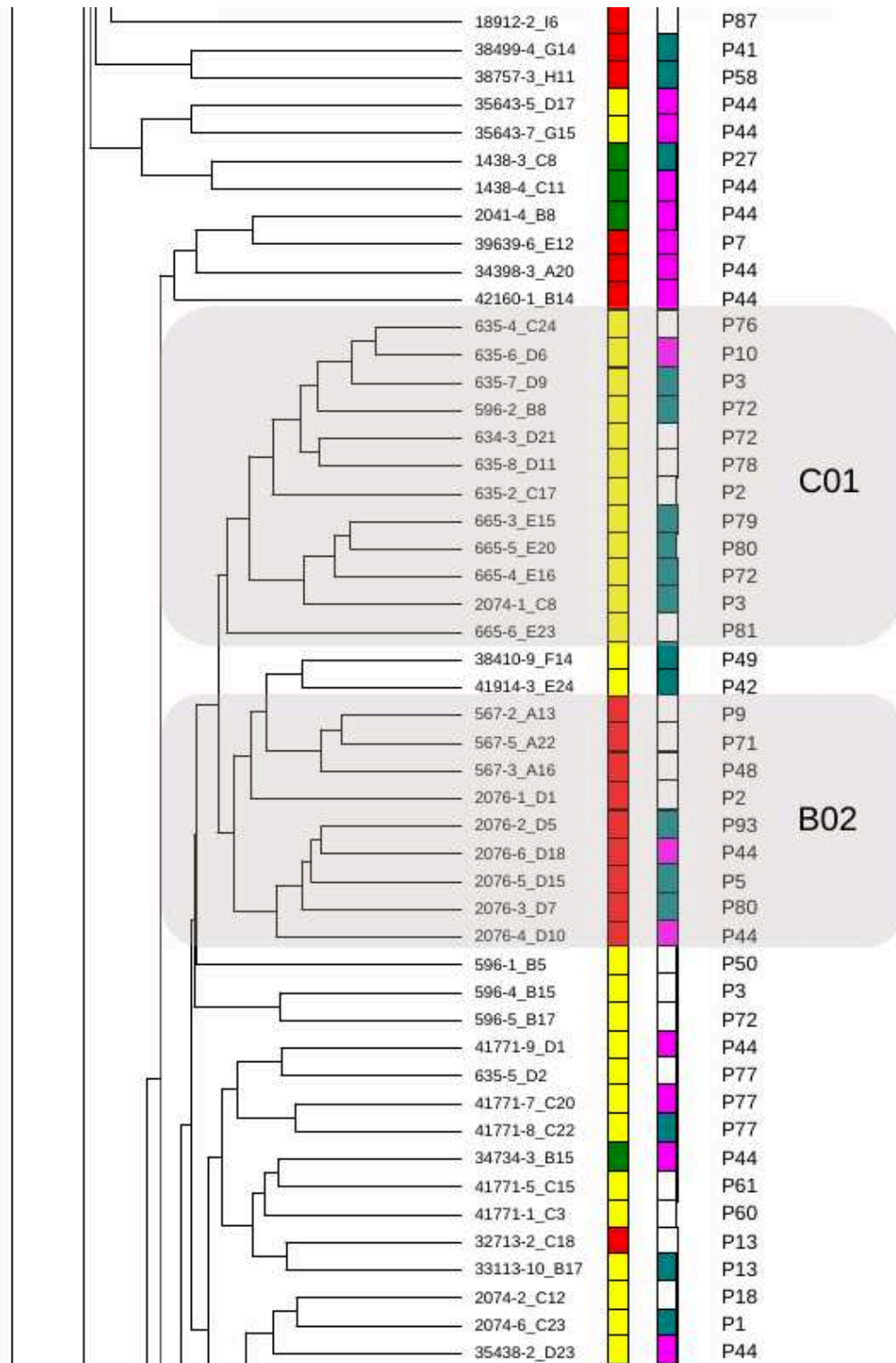
812

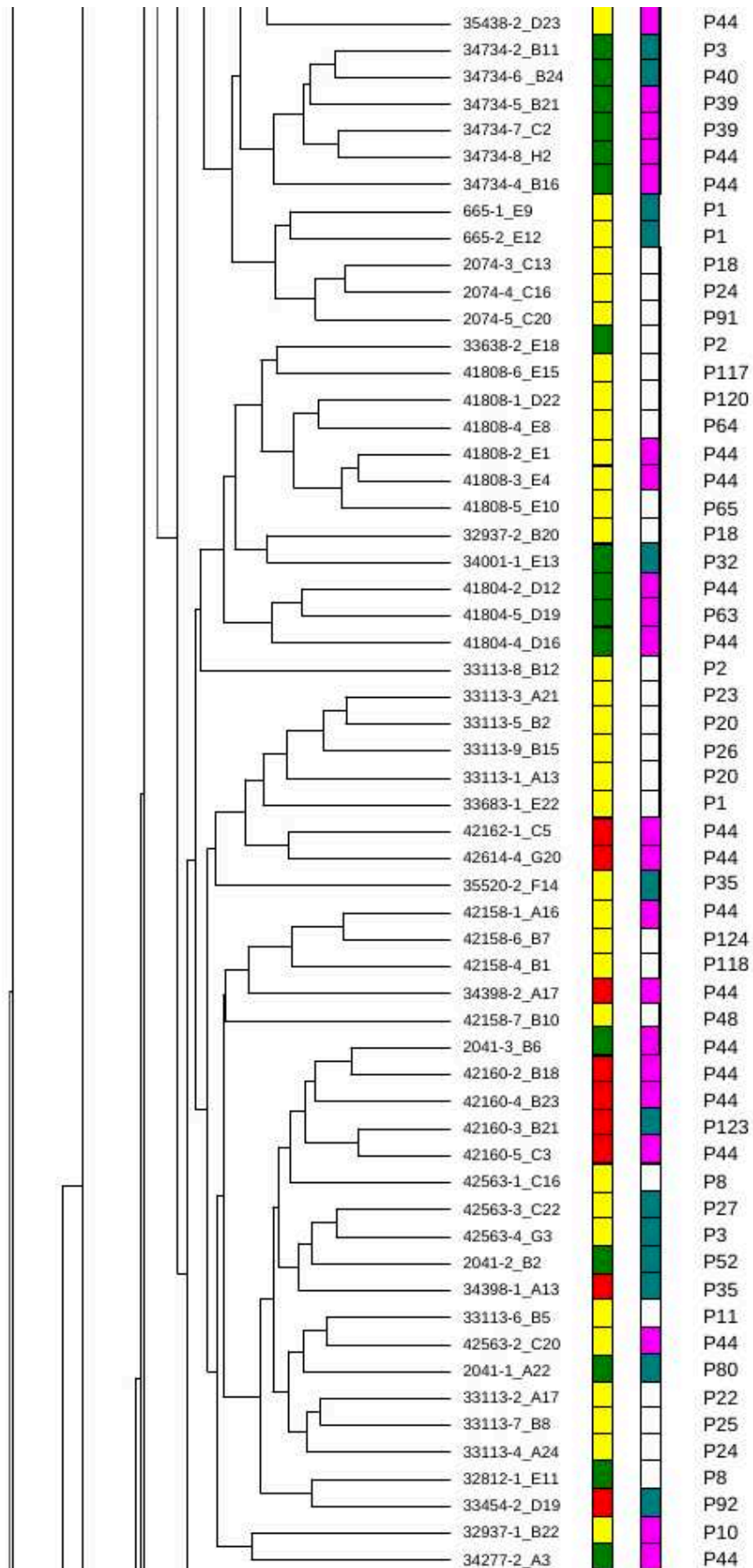
813 Informação Suplementar

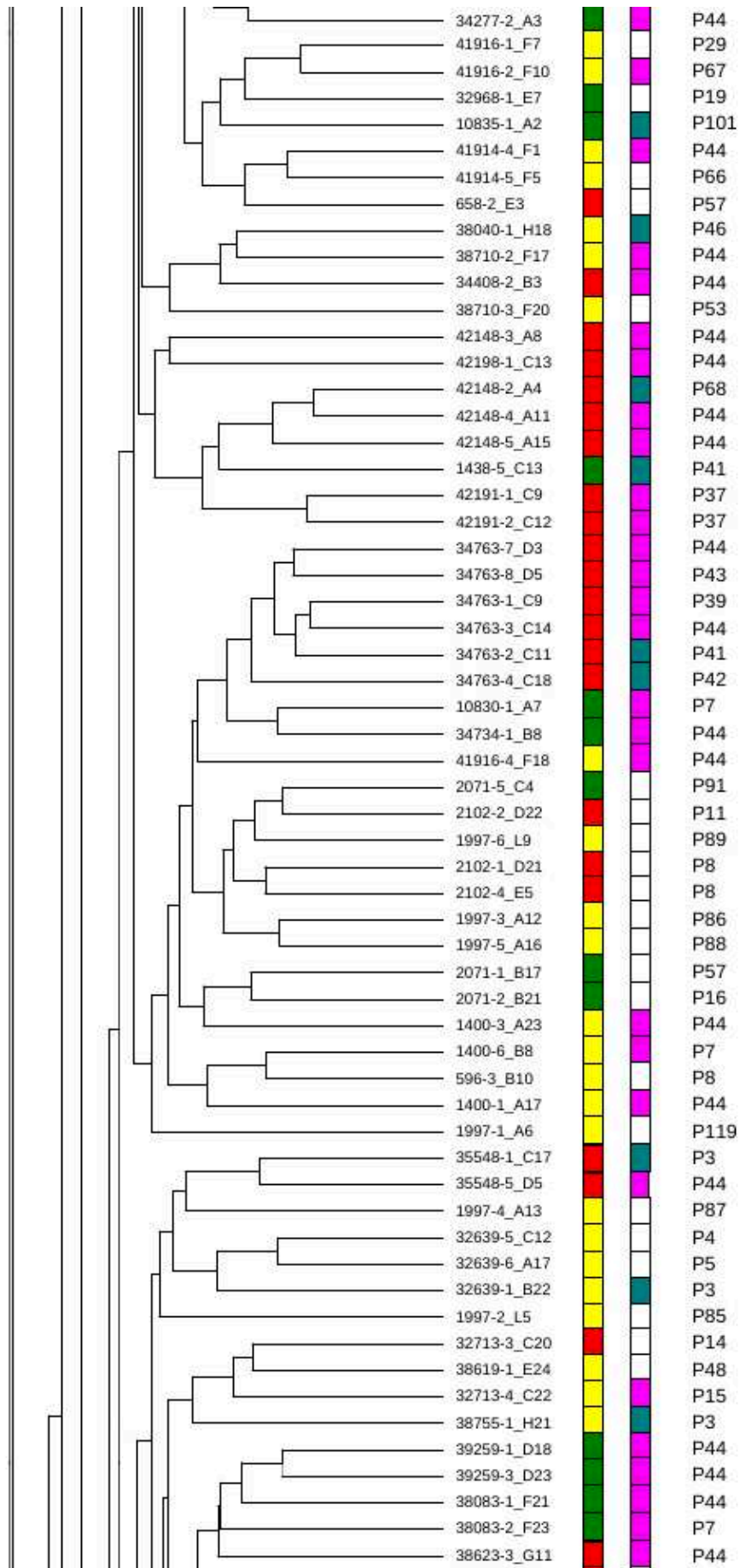


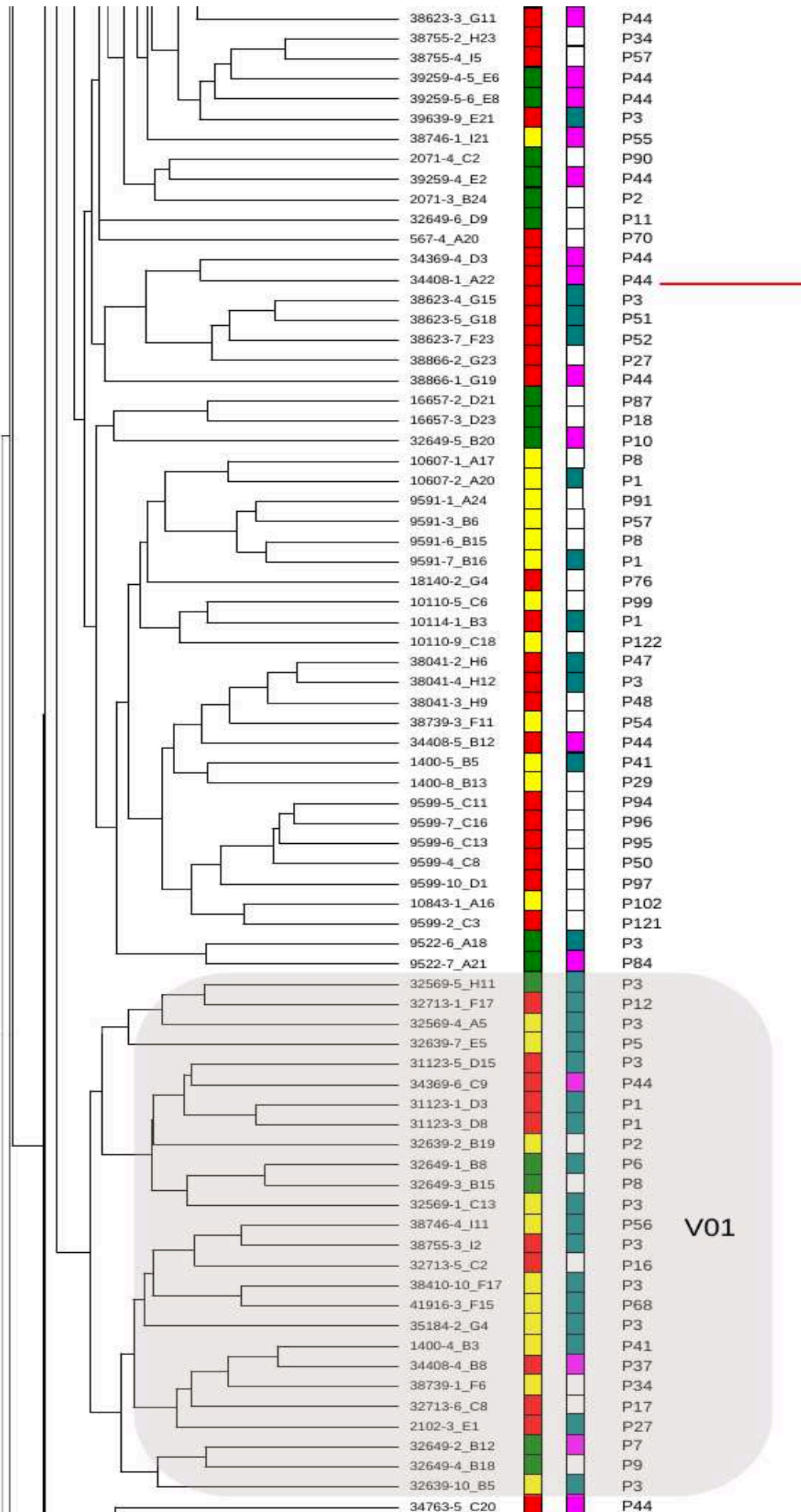
814

815









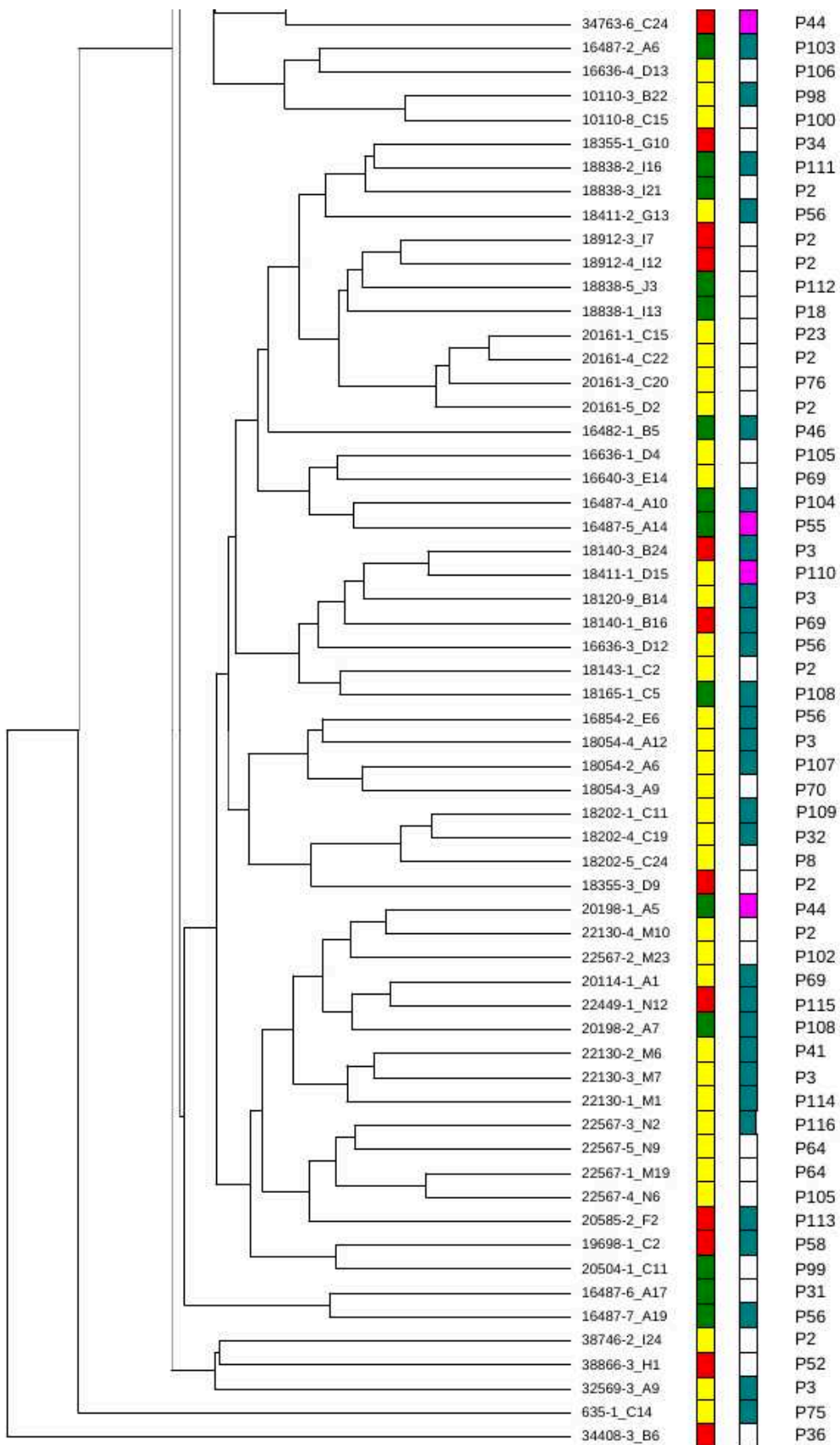


Figura S1 – Dendrograma construído de acordo com o perfil espectral (MSP) dos isolados de *Campylobacter jejuni*. O estado de origem dos isolados e o perfil gênico de virulência são

indicados por barra de cores: (a) verde, vermelho e amarelo representam os estados A, B e C respectivamente; (b) magenta, azul e branco representam os perfis multivirulento, virulento e não estabelecido, respectivamente.

REFERÊNCIAS

- ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório anual 2020**. Disponível em: <https://abpa-br.org/abpa-lanca-relatorio-anual-2020/>. Acesso em: 16/05/2019.
- ADAMS, M.R.; MOSS, M.O. **Food Microbiology: The Royal Society of Chemistry**. 2007, 3 ed. ISBN 978-0-85404-284-5. <https://doi.org/10.1039/9781847557940>
- ALMOFTI, Y. A. et al. The physiologic and phenotypic alterations due to macrolide exposure in *Campylobacter jejuni*. **International journal of food microbiology**, v. 151, n. 1, p. 52-61, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.002>
- AMON, P. et al. Analysis of *Campylobacter jejuni* isolates of various sources for loci associated with Guillain-Barré syndrome. **European Journal of Microbiology and Immunology**, v. 2, n. 1, p. 20–23, 2012. <https://doi.org/10.1556/EuJMI.2.2012.1.4>
- ANG, C. W; JACOBS, B. C.; LAMAN, J. D. The Guillain–Barré syndrome: a true case of molecular mimicry. **Trends in Immunology**, v. 25, n. 2, p. 61–66, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.it.2003.12.004>
- ANGELETTI, S. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. **Journal of Microbiological Methods**, v. 138, p. 20-29, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.09.003>
- AVISITE – Revista AviSite. **Conectividade no campo**. Disponível em: <https://www.avisite.com.br/index.php?page=revista&subpage=revistaavisite&rvpage=revistaavisiteedicoesanteriores>. Acesso em: 29/05/2020.
- BACKERT, S., BERNEGGER, S., SKÓRKO-GLONEK, J.; WESSLER, S. Extracellular HtrA serine proteases: an emerging new strategy in bacterial pathogenesis. **Cellular microbiology**, v. 20, n. 6, p. e12845, 2018. <https://doi.org/10.1111/cmi.12845>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.06.031>
- BALDVINSSON, S. B. et al. *Campylobacter jejuni* motility is required for infection of the flagellotropic bacteriophage F341. **Applied and environmental microbiology**, v. 80, n. 22, p. 7096-7106, 2014. <https://doi.org/10.1128/AEM.02057-14>
- BASERISALEHI, M.; BAHADOR, N. Chemotactic behavior of *Campylobacter* spp. in function of different temperatures (37 C and 42 C). **Anaerobe**, v. 17, n. 6, p. 459-462, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.06.010>

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. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(99\)00025-9](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(99)00025-9)

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. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2004.tb00057.x>

BESSÉDE, E. et al. Identification of *Campylobacter* species and related organisms by matrix assisted laser desorption ionization–time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 11, p. 1735–1739, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03468.x>

BISSONG, M. E.; ATEBA, C. N. Detection of virulent thermophilic *Campylobacter* species in communal chickens. **South African Journal of Science**, v. 115, n. 9, p. 1-5, 2019. <https://doi.org/10.17159/sajs.2019/4771>

BISWAS, D. et al. Genes coding for virulence determinants of *Campylobacter jejuni* in human clinical and cattle isolates from Alberta, Canada, and their potential role in colonization of poultry. **International Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 25–32, 2011. <https://10.2436/20.1501.01.132>

BLEUMINK-PLUYM, N. M. C. et al. Identification of a Functional Type VI Secretion System in *Campylobacter jejuni* Conferring Capsule Polysaccharide Sensitive Cytotoxicity. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 5, p. 1-12, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003393>

BOLTON, D.J. *Campylobacter* virulence and survival factors. **Food Microbiology**, v. 48, p. 99-108, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.017>

BORGES, K. A. et al. Detection and quantification of *Campylobacter* spp. in Brazilian poultry processing plants. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 14, n. 1, p. 109-113, 2020. <https://doi.org/10.3855/jidc.11973>

BORTOLI, W. et al. Occurrence of *Campylobacter* spp. in chilled chicken carcasses slaughtered in the west region of Santa Catarina, Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 45, p. 1-6, 2017. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.80729>

BOUWMAN, L. I.; NIEWOLD, P.; VAN PUTTEN, J. P. M. Basolateral Invasion and Trafficking of *Campylobacter jejuni* in Polarized Epithelial Cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. e54759, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054759>

BRASIL, MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), 2013. **Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria Nº 17, de 25 de Janeiro de 2013.** Disponível em: http://www.lex.com.br/legis_24122431_PORTARIA_N_17_DE_25_DE_JANEIRO_DE_2013.aspx, Acesso em: 25/05/2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Ficam estabelecidos o controle e o monitoramento de *Salmonella* spp. nos estabelecimentos avícolas comerciais de frangos e perus de corte e nos estabelecimentos de abate de frangos, galinhas, perus de corte e reprodução. **Instrução Normativa nº 20, de 21 de outubro de 2016**. Brasil, 2016^a. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/control-depatogenos/arquivos-control-de-patogenos/SalmonellaIN202016Salmonella.pdf>. Acesso 21/05/2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde/UHA/CGDT. **Dados epidemiológicos – DTA período de 2000-2011**, 2012.
BRASIL. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o **“Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos”**. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: www.anvisa.gov.br =>. Acesso em: 12 de maio de 2020.

BRASIL. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o **“Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos”**. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: www.anvisa.gov.br =>. Acesso em: 12 de maio de 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Diretoria Colegiada. **Instrução normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019, publicada no (publicada no dou nº 249, de 26 de dezembro de 2019)**. Disponível em: <http://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-60-de-23-de-dezembro-de-2019-235332356>. Acesso em: 17/05/2020.

BRONOWSKI, C.; JAMES, C.E.; WINSTANLEY, C. Role of environmental survival in transmission 378 of *Campylobacter jejuni*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 356, n. 1, p. 8–19, 2014. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12488>

BURNHAM, P.M.; HENDRIXSON, D.R. *Campylobacter jejuni*: collective components promoting a successful enteric life style. **Nature Reviews microbiology**, v.16, p. 551–565, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0037-9>

CAMPANA, R.; BAFFONE, W. Intracellular Survival and Translocation Ability of Human and Avian *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Strains. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2020. https://doi.org/10.1007/5584_2020_531

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Campylobacter**. 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/campylobacter/faq.html>. Acesso em: 14/05/2020.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Division of Foodborne, Waterborne, and Environmental Diseases (DFWED)**. 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/campylobacter/symptoms.html>. Acesso em: 14/05/2020.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Information for health professionals**. 2019 Disponível em: <https://www.cdc.gov/campylobacter/technical.html>. Acesso em: 14/05/2020.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Preliminary Incidence and Trends of Infections with Pathogens Transmitted Commonly Through Food — Foodborne Diseases Active Surveillance Network**, 10 U.S. Sites, 2015–2018. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. CDC. 2019.

CHANG, C.; MILLER, J. F. *Campylobacter jejuni* colonization of mice with limited enteric flora. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 9, p. 5261-5271, 2006. <https://doi.org/10.1128/IAI.01094-05>

CHEFTEL, J. C. Emerging risks related to food technology. In: M. Hefnawy , **Advances in food protection. NATO science for peace and security series A: Chemistry and biology**. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 2011, p. 223–254. https://doi.org/10.1007/978-94-007-1100-6_13

CHRISTENSEN, J. E.; PACHECO, S. A.; KONKEL, M. E. Identification of a *Campylobacter jejuni*-secreted protein required for maximal invasion of host cells. **Molecular Microbiology**, v. 73, n. 4, p. 650–662, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06797.x>

CLAUSEN, T.; KAISER, M.; HUBER, R.; EHRMANN, M. HTRA proteases: regulated proteolysis in protein quality control. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 12, n. 3, p. 152-162, 2011. <https://doi.org/10.1038/nrm3065>

CORRY, J. E. L.; ATABAY, H. I. Poultry as a source of *Campylobacter* and related organisms. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n.S6, p. 96S-114S, 2006. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01358.x>

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. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2009.07.002>

DATTA, S.; NIWA, H.; ITOH, K. Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler and bovine faeces. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 345–348, 2003. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05056-0>

DAY, C. J. et al. A direct-sensing galactose chemoreceptor recently evolved in invasive strains of *Campylobacter jejuni*. **Nature communications**, v. 7, n. 13206, 2016. <https://doi.org/10.1038/ncomms13206>

DAY, C. J., Variation of chemosensory receptor content of *Campylobacter jejuni* strains and modulation of receptor gene expression under different in vivo and in vitro growth conditions. **BMC Microbiology**, v. 12, n. 128, p. 1-10, 2012. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-128>

DE KEERSMAECKER, S. C. et al. Chemical synthesis of (S)-4, 5-dihydroxy-2, 3-pentanedione, a bacterial signal molecule precursor, and validation of its activity in *Salmonella typhimurium*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 20, p.19563-19568, 2005. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412660200>

DE OLIVEIRA, M. G. et al. Presence of genes associated with adhesion, invasion, and toxin production in *Campylobacter jejuni* isolates and effect of temperature on their expression. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 65, n. 4, p. 253-260, 2019. <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0539>

DEL MAR LLEÒ, M. et al. Inhibition of the resuscitation from the viable but non culturable state in *Enterococcus faecalis*. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 9, p. 2313-2320, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01345.x>

DEMARCO, M.L.; FORD, B.A. Beyond Identification: Emerging and Future Uses for MALDI-TOF Mass Spectrometry in the Clinical Microbiology Laboratory. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 33, n. 1, p. 611-628, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2013.03.013>

DONNISON, A.M.; AND C.M; ROSS. Enciclopedia Meat Sciences In: **Thermotolerant Campylobacter**. Jamestown Road, London, UK, 2014. 2 ed. p. 382-388. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02026.x>

DUARTE, A. et al. Resveratrol inclusion complexes: Antibacterial and anti-biofilm activity against *Campylobacter* spp. and *Arcobacter butzleri*. **Food Research International**, v. 77, p. 244–250, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.047>

EC – EUROPEAN COMMISSION. **Commission Regulation 2017/1495 of 23 August 2017 amending Regulation (EC) No 2073/2005 as regards Campylobacter in broiler carcasses (Text with EEA relevance)**. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2017/1495/oj>. Acesso em: 14/05/2020.

EFSA - EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY / EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. **The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017**. 2018. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/5500>. Acesso em: 15/04/2020.

EFSA - EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY / EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. **Update and review of control options for Campylobacter in broilers at primary production**, 2019. Disponível em: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2020.6090>. Acesso em: 14/05/2020.

EFSA - EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. **EFSA Analysis of the baseline survey on the prevalence of Campylobacter in broiler batches and of Campylobacter and Salmonella on broiler carcasses in the EU, 2008**. Part A: *Campylobacter* and *Salmonella* prevalence estimates. 2010.

Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1503>. Acesso em: 15/05/2020.

EFSA – EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. **EFSA Journal**, v. 17, n.12, p. 276, 2019. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5077>

EMAMI, K. et al. Characterization of bacteria in Ballast water using MALDI-TOF mass spectrometry. **Plos One**, v. 7, n. 6, p. 1-14, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038515>

EPPS, S. et al. Foodborne *Campylobacter*: Infections, Metabolism, Pathogenesis and Reservoirs. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, n. 12, p. 6292–6304, 2011. <https://doi.org/10.3390/ijerph10126292>

FAÏS, T. et al. Impact of CDT Toxin on Human Diseases. **Toxins**, v. 8, n. 7, p. 220, 2016. <https://doi.org/10.3390/toxins8070220>

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **An introduction to monitoring, control and surveillance systems for capture fisheries**. FAO. 1999.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Guidelines For The Control of *Campylobacter* and *Salmonella* in chicken meat - FAO**. 2009. Disponível em: <http://origin.who.int/foodsafety/publications/mra19/en/>. Acesso em: 15/05/2020.

FERNÁNDEZ, H.; PÉREZ-PÉREZ G. *Campylobacter*: fluoroquinolone resistance in Latin-American countries. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 48, n. 3, p. 255-259, 2016. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2016000300002>

FLANAGAN, R. C. et al. Examination of *Campylobacter jejuni* Putative Adhesins 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. <https://doi.org/10.1128/IAI.01266-08>

FONSECA, B. B. et al. *Campylobacter jejuni* in commercial eggs. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 76-79, 2014. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000100011>

FOX, J. G. et al. Gastroenteritis in NF- B-Deficient Mice Is Produced with Wild-Type *Campylobacter jejuni* but Not with C. jejuni Lacking Cytolethal Distending Toxin despite Persistent Colonization with Both Strains. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 2, p. 1116–1125, 2004. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.2.1116-1125.2004>

FRAZÃO, M. R.; MEDEIROS, M. I. C.; DA SILVA DUQUE, S.; FALCÃO, J. P. Pathogenic potential and genotypic diversity of *Campylobacter jejuni*: a neglected food-borne pathogen in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 350-359, 2017. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000424>

FSA – Food Standards Agency. **Ad Hoc Group on Campylobacter Third Report on Campylobacter**. 2019. Disponível em:

https://acmsf.food.gov.uk/sites/default/files/acmsf_campy_sept_2019.pdf.
Acesso em: 17/05/2020.

GAHAMANYI, N. et al. Prevalence, Risk Factors, and Antimicrobial Resistance Profiles of Thermophilic *Campylobacter* Species in Humans and Animals in Sub-Saharan Africa: A Systematic Review. **International Journal of Microbiology**, v. 2020, p. 12, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/2092478>

GARCIA-SANCHEZ, L. et al. Biofilm formation, virulence and antimicrobial resistance of different *Campylobacter jejuni* isolates from a poultry slaughterhouse. **Food Microbiology**, v. 83, p. 193-199, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.05.016>

GARÉNAUX, A. et al. Survival of *Campylobacter jejuni* strains from different origins under oxidative stress conditions: effect of temperature. **Current Microbiology**, v. 56, p. 293–297, 2008. <https://doi.org/10.1007/s00284-007-9082-8>

GHORBANALIZADGAN, M.; BAKHSHI, B.; NAJAR-PEERAYEH, S. Heterogeneity of cytolethal distending toxin sequence types of *Campylobacter jejuni* and correlation to invasion/cytotoxicity potential: The first molecular survey from Iran. **Microbial Pathogenesis**, v. 114, p. 213–218, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.11.035>

GOMES, C. N. et al. High survival rates of *Campylobacter coli* under different stress conditions suggest that more rigorous food control measures might be needed in Brazil. **Food Microbiology**, v. 73, p. 327-333, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.02.014>

GOODFELLOW, J. A.; WILLISON, H. J. Guillain–Barré syndrome: a century of progress. *Nature Reviews Neurology*, v. 12, n.12, p. 723–731, 2016. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2016.172>

GRANT, K.A et al. Molecular characterization of *pldA*, the structural gene for a phospholipase A from *Campylobacter coli*, and its contribution to cell-associated hemolysis. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 4, p. 1172-1180, 1997. <https://doi.org/10.1128/IAI.65.4.1172-1180.1997>

GRINNAGE-PULLEY, T.; MU, Y.; DAI, L.; ZHANG, Q. Dual Repression of the Multidrug Efflux Pump CmeABC by CosR and CmeR in *Campylobacter jejuni*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 1097, p. 1-7, 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01097>

HABIB, I.; UYTENDAELE, M.; DE ZUTTER, L. Evaluation of ISO 10272:2006 standard versus alternative enrichment and plating combinations for enumeration and detection of *Campylobacter* in chicken meat. **Food Microbiology**, v. 28, v. 6, p. 1117-1123, 2011. <https://doi.org/10.1590/1516-635x1801023-028>

- HABIB, I.; UYTENDAELE, M.; DE ZUTTER, L. Survival of poultry-derived *Campylobacter jejuni* of multilocus sequence type clonal complexes 21 and 45 under freeze, chill, oxidative, acid and heat stresses. **Food Microbiology**, v. 27; n. 6, p. 829–834, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.04.009>
- HAIKO, J.; SAVOLAINEN, L.E.; HILLA, R.; PATARI-SAMPO, A. Identification of Urinary Tract Pathogens After 3-hours Urine Culture by MALDI-TOF Mass Spectrometry. **Journal of Microbiological Methods**, v. 129, p. 81-84, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.08.006>
- HAMIDIAN, M. et al. Prevalence of putative virulence markers in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from hospitalized children, raw chicken, and raw beef in Tehran, Iran. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 57, n. 2, 143–148, 2011. <https://doi.org/10.1139/W10-089>
- HARRISON, J. W. et al. Identification of Possible Virulence Marker from *Campylobacter jejuni* Isolates. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 6, p. 1026–1029, 2014. <https://doi.org/10.3201/eid2006.130635>
- HENDRIXSON, D. R.; DIRITA, V. J. Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in commensal colonization of the chick gastrointestinal tract. **Molecular microbiology**, v. 52, n. 2, p. 471-484, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.03988.x>
- HERMANS, D. et al. Colonization factors of *Campylobacter jejuni* in the chicken gut. **Veterinary Research**, v. 42, n. 82 p. 1-14, 2011. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-82>
- 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. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0676>
- HOEPERS, P.G.; MEDINA, G.; ROSSI, D.A.; FERNANDEZ, H. About *Campylobacter* spp.. In: Fonseca B., Fernandez H., Rossi D. (eds) **Campylobacter spp. and Related Organisms in Poultry**. Springer, Cham, 2016. https://doi.org/10.1007/978-3-319-29907-5_1
- HORNEF, M. W.; WICK, M. J.; RHEN, M.; NORMARK, S. Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. **Nature Immunology**, v. 3, n. 11, p. 1033–1040, 2002. <https://doi.org/10.1038/ni1102-1033>
- HUANG, J. et al. *Campylobacter* spp. in chicken-slaughtering operations: A risk assessment of human campylobacteriosis in East China. **Food Control**, v. 86, p. 249-256, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.11.026>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.11.003>
- HUMPHREY, T.; O'BRIEN, S.; MADSEN, M. Campylobacters as zoonotic pathogens: a food production perspective. **International Journal of Food**

Microbiology, v. 117, p. 237-257, 2007.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.01.006>

HUSSAIN, M. A.; DAWSON, C. O. Economic Impact of Food Safety Outbreaks on Food Businesses. **Foods**, v. 2, n. 4, p. 585–589, 2013.
<https://doi.org/10.3390/foods2040585>

IDELEVICH, E.A.; SPARBIER, K.; KOSTRZEWA, M.; BECKER, K. Rapid detection of antibiotic resistance by MALDI-TOF mass spectrometry using a novel direct-on-target microdroplet growth assay. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 24, n. 7, p. 738-743, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.10.016>

IGWARAN, A.; I. OKOH, A. Campylobacteriosis Agents in Meat Carcasses Collected from Two District Municipalities in the Eastern Cape Province. **Foods**, v. 9, n. 2, p. 1-18, 2020. <https://doi.org/10.3390/foods9020203>

IOVINE, N. M. Resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni*. *Virulence*, v. 4, p. 3, p. 230-240, 2013. <https://doi.org/10.4161/viru.23753>

ISO - International Organisation for Standardisation - 2006a **Microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for detection and enumeration of Campylobacter spp. – Part 1: Detection method (ISO 10272-1:2006)**. Disponível em: <https://www.iso.org/standard/37091.html>. Acesso em: 17/05/2020.

ISO - International Organisation for Standardisation - 2006b. **Microbiology of the food chain – horizontal method for detection and enumeration of Campylobacter spp. – Part 2: Colony-count technique (ISO/TS 10272-2:2006)**. Disponível em: <https://www.iso.org/standard/63228.html>. Acesso em: 17/05/2020.

ISRAR, M. Z. et al. Matrix-assisted laser desorption ionisation (MALDI) mass spectrometry (MS): basics and clinical applications. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 58, n. 6, p. 883-896, 2020. <https://doi.org/10.1515/cclm-2019-0868>

JADHAV, S.R. et al. Detection of Foodborne Pathogens Using Proteomics and Metabolomics-Based Approaches. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 3132, p. 1-13, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03132>

JUNG, H. C. et al. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial-cells in response to bacterial invasion. **Journal of Clinical Investigation**, v. 95, n. 1, p. 55-65, 1995.
<https://doi.org/10.1172/JCI117676>

KAAKOUSH, N.O; CASTAÑO-RODRÍGUEZ, N.; MITCHELL, H.M.; MAN, S.M. Global epidemiology of Campylobacter infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n.3, p. 687-720, 2015. <https://doi.org/10.1128/CMR.00006-15>

- KAPITEIN, N. et al. ClpV recycles VipA/VipB tubules and prevents non-productive tubule formation to ensure efficient type VI protein secretion. **Molecular Microbiology**, v. 87, n. 5, p. 1013–1028, 2013. <https://doi.org/10.1111/mmi.12147>
- KAROLSKI, B. et al. MALDI-Biotyper as a tool to identify polymer producer bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 153, p. 127-132, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.09.016>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01904.x>
- KIRK, M.; FORD, L.; GLASS, K.; HALL, G. Foodborne illness, Australia, circa 2000 and circa 2010. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 11, p. 1857-1864, 2014. <https://doi.org/10.3201/eid2011.131315>
- KLANČNIK, A. et al. Anti-adhesion activity of phytochemicals to prevent *Campylobacter jejuni* biofilm formation on abiotic surfaces. **Phytochemistry Reviews**, p.1-30, 2020. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02747.x>
- KLEEREBEZEM, M.; QUADRI, L. E.; KUIPERS, O. P.; DE VOS, W. M. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. **Molecular microbiology**, v. 24, n. 5, p. 895-904, 1997. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.4251782.x>
- KOLÍNSKÁ, R.; DŘEVÍNEK, M.; JAKUBŮ, V.; ŽEMLIČKOVÁ, H. Species Identification of *Campylobacter jejuni* ssp. *jejuni* and *C. coli* by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry and PCR. **Folia Microbiologica**, v. 53, n. 5, p. 403–409, 2008. <https://doi.org/10.1007/s12223-008-0061-7>
- 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. <https://doi.org/10.1128/IAI.66.8.3666-3672.1998>
- KONKEL, M. E. et al. Identification and molecular cloning of a gene encoding a fibronectin-binding protein (CadF) from *Campylobacter jejuni*. **Molecular Microbiology**, v. 24, n. 5, p. 953–963, 1997. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.4031771.x>
- KONKEL, M. E.; KIM, B. J.; RIVERA-AMILL, V.; GARVIS, S. G. Bacterial secreted proteins are required for the internalization of *Campylobacter jejuni* into cultured mammalian cells. **Molecular Microbiology**, v. 32, n. 4, p. 691–701, 1999. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01376.x>
- KOUTSOUMANIS, K. et al. Update and review of control options for *Campylobacter* in broilers at primary production. **EFSA Journal**. v. 18, n. 4, p. 89, 2020. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6090>

KOVÁCS, J. K. et al. Virulence Traits of Inpatient *Campylobacter jejuni* Isolates, and a Transcriptomic Approach to Identify Potential Genes Maintaining Intracellular Survival. **Microorganisms**, v. 8, n. 4, p. 531, 2020. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040531>

LAWTON, S. J. et al. Comparative analysis of *Campylobacter* isolates from wild birds and chickens using MALDI-TOF MS, biochemical testing, and DNA sequencing. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 30, n. 3, p. 354-361, 2018. <https://doi.org/10.1177/1040638718762562>

LERTPIRIYAPONG, K. ET al. *Campylobacter jejuni* Type VI Secretion System: Roles in Adaptation to Deoxycholic Acid, Host Cell Adherence, Invasion, and In Vivo Colonization. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. 1-15, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042842>

LERTSETHTAKARN, P.; OTTEMANN, K. M.; HENDRIXSON, D. R. Motility and chemotaxis in *Campylobacter* and *Helicobacter*. **Annual review of microbiology**, v. 65, p. 389–410, 2011. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102908>

LEYGONIE, C.; BRITZ; T. J.; HOFFMAN L. C. Impact of freezing and thawing on the quality of meat: Review. **Meat Science**, v. 91, n. 2, p. 93-98, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.01.013>

LIANG, L.; CONNERTON, I. F. FlhF (T368A) modulates motility in the bacteriophage carrier state of *Campylobacter jejuni*. **Molecular microbiology**, v. 110, n. 4, p. 616-633, 2018. <https://doi.org/10.1111/mmi.14120>

LIÉBANA-MARTOS, C. Indications, Interpretation of Results, Advantages, Disadvantages, and Limitations of MALDI-TOF. **The Use of Mass Spectrometry Technology (MALDI-TOF) in Clinical Microbiology**, p. 75–86, 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814451-0.00005-8>

LIGOWSKA, M. 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, p. S111-S115, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.027>

LIPINSKA, B.; FAYET, O.; BAIRD, L.; GEORGOPOULOS, C. Identification, characterization, and mapping of the *Escherichia coli htrA* gene, whose product is essential for bacterial growth only at elevated temperatures. **Journal of bacteriology**, v. 171, n. 3, p. 1574-1584, 1989. <https://doi.org/10.1128/JB.171.3.1574-1584.1989>

LIU, D., GUPTA, N. **Handbook of Foodborne Diseases**. 1 ed. 2018. Disponível em: <https://www.taylorfrancis.com/books/9781315230917>. Acesso em: 10/05/2020.

LPSN - LIST OF PROKARYOTIC NAMES WITH STANDING IN NOMENCLATURE. **Campylobacter**, 2020. Disponível em: <https://lpsn.dsmz.de/search?word=Campylobacter>. Acesso em: 14/05/2020.

MANDRELL, R. E. ET al. Speciation of *Campylobacter coli*, *C. jejuni*, *C. helveticus*, *C. lari*, *C. sputorum*, and *C. upsaliensis* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 10, p. 6292–6307, 2005. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.10.6292-6307.2005>

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. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(02\)02323-5](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(02)02323-5)

MEDINA, G. et al. Mechanisms associated with phagocytosis of *Arcobacter butzleri* by *Acanthamoeba castellanii*. **Parasitology Research**, v. 113, p.1933–1942, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3842-8>

MELO, R. T. et al. *Campylobacter jejuni* strains isolated from chicken meat harbour several virulence factors and represent a potential risk to humans. **Food Control**, v. 33, n.1, p. 227–231, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.02.032>

MELO, R. T. et al. Intrinsic and Extrinsic Aspects on *Campylobacter jejuni* Biofilms. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p.1332, 2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01332>

MELO, R. T. et al. Evolution of *Campylobacter jejuni* of poultry origin in Brazil. **Food Microbiology**, v. 82, p. 489-496, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.03.009>

MEUNIER, M. et al. Promising new vaccine candidates against *Campylobacter* in broilers. **PLOS ONE**, v. 12, n. 11, p. 1-14, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188472>

MONTGOMERY, M. P. et al. Multidrug-Resistant *Campylobacter jejuni* Outbreak Linked to Puppy Exposure - United States, 2016-2018. **CDC - Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 67, n.37, p.1032–1035, 2018. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6737a3>

MUHANDIRAMLAGE, G. K.; MCWHORTER, A. R.; CHOUSALKAR, K. K. Chlorine Induces Physiological and Morphological Changes on Chicken Meat *Campylobacter* Isolates. **Frontiers in microbiology**, v. 11, n. 503, p. 1-12, 2020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00503>

MUKHERJEE, P. et al. *Campylobacter jejuni* in Hospitalized Patients with Diarrhea, Kolkata, India. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, p. 1155-1156, 2013. <https://doi.org/10.3201/eid1907.121278>

MURPHY, C.; CARROLL, C.; JORDAN, K.N. The effect of different media on the survival and induction of stress responses by *Campylobacter jejuni*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 62, n. 2, p. 161-166, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.02.005>

MURPHY, H.; COGAN, T.; HUMPHREY, T. Direction of neutrophil movements by *Campylobacter*-infected intestinal epithelium. **Microbes and Infection**, v. 13, n. 1, p. 42-48, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.09.007>

NCBI - NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION.
Campylobacter Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/13728>.
Acesso em: 03/06/2020.

O CRÓINÍN, T.; BACKERT, S. Host epithelial cell invasion by *Campylobacter jejuni*: trigger or zipper mechanism?. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, n. 25, p. 1 – 13, 2012. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00025>

OIE - WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. **Manual de la OIE sobre animales terrestres. Capítulo 2.9.3. Campylobacter jejuni y Campylobacter coli. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE).**
Disponível em: http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.09.03.%20Campilobacter%20jejuni.pdf. Acesso em: 15/05/2020.

OLIVER, J.D. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 34, n. 4, p. 415-425, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00200.x>

OMORODION, N.J.P.; ODU, N.N. Occurrence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp in Conventional Chicken Meat purchased from some retailer outlets in Rivers State, Nigeria. **Report and Opinion**, v. 8, n. 4, p. 79-83, 2016. <https://10.7537/marsroj08041608>

PAAUWA, A.; JONKER, D.; ROESELERS, G.; HENGA, J.M. Rapid and reliable discrimination between Shigella species and Escherichia coli using MALDI-TOF mass spectrometry. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 305, n. 4-5, p. 446–452, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2015.04.001>

PARK, S. F. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, p.177–188, 2004. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00678-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00678-X)

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. <https://doi.org/10.1038/35001088>

PARKINSON, J.S.; HAZELBAUER, G. L.; FALKE, J. J. Signaling and sensory adaptation in *Escherichia coli* chemoreceptors: 2015 update. **Trends in microbiology**, v. 23, n. 5, p. 257-266, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.03.003>

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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07455.x>

PAUKER, V.I. et al. Improved Discrimination of *Bacillus Anthracis* From Closely Related Species in the *Bacillus Cereus* Sensu Lato Group Based on Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 5, p. e01900-17, 2018.

<https://doi.org/10.1128/JCM.01900-17>

PIGLOWSKI, M. Food hazards on the European Union market: The data analysis of the Rapid Alert System for Food and Feed. **Food Science & Nutrition**, v. 8, p.1603-1627, 2020. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1448>

PISOSCHI, A.M.; POP, A.; GEORGESCU, C.; TURCU S, V.; OLAH, N.K.; MATHE, E. An overview of natural antimicrobialsrole in food. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 143, p. 922–935, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.095>

PLUMMER, P. LuxS and quorum-sensing in *Campylobacter*. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, n. 22, p. 1-9, 2012.

<https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00022>

PORTER, S. L.; WADHAMS, G. H.; ARMITAGE, J. P. Signal processing in complex chemotaxis pathways. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 153-165, 2011. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2505>

PROIETTI, P. et al. Beta-lactam resistance in *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* chicken isolates and the association between blaOXA-61 gene expression and the action of β -lactamase inhibitors. **Veterinary Microbiology**, v. 241, p. 1-5, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.108553>

PUBMLST - PUBLIC DATABASES FOR MOLECULAR TYPING.

Campylobacter sequence typing. Disponível em:

<https://pubmlst.org/campylobacter/>. Acesso em: 05/06/2020.

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. <https://doi.org/10.1021/bi0477384>

RAJORIA, S. et al. Elucidation of protein biomarkers for verification of selected biological warfare agents using tandem mass spectrometry. **Scientific Reports**, v. 10, n. 2205, p. 1-12, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59156-3>

RASFF – FOOD AND FEED SAFETY ALERTS. **RASFF Portal**. 2020.

Disponível em: [https://webgate.ec.europa.eu/rasff-](https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=SearchForm&cleanSearch=1)

[window/portal/?event=SearchForm&cleanSearch=1](https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=SearchForm&cleanSearch=1). Acesso em: 24/05/2020.

RODRIGUES, R. C. et al. Description of *Campylobacter jejuni* Bf, an atypical aero-tolerant strain. **Gut Pathogens**, v. 7, n. 30, p. 1-12, 2015.

<https://doi.org/10.1186/s13099-015-0077-x>

RUELLE, V. et al. Rapid identification of environmental bacterial strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry.

Rapid Communications in Mass Spectrometry, v. 18, n. 18, p. 2013-2019, 2004. <https://doi.org/10.1002/rcm.1584>

RUSSELL, A. B. et al. Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells. **Nature**, v. 475, n. 7356, p. 343–347, 2011. <https://doi.org/10.1038/nature10244>

SAHIN, O. et al. *Campylobacter* in Poultry: ecology and potential interventions. **Avian Diseases**, v. 59, p. 185–200, 2015. <https://doi.org/10.1637/11072-032315-Review>

SAHIN, O.; MORISHITA, T. Y.; ZHANG, Q. *Campylobacter* colonization in poultry: sources of infection and modes of transmission. **Animal Health Research Reviews**, v. 3, n. 2, p. 95, 2002. <https://doi.org/10.1079/AHRR200244>

SANA, T. G.; LUGO, K. A.; MONACK, D. M. T6SS: The bacterial “fight club” in the host gut. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 6, p. 1-5, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006325>

SCHMIDT, A. M. et al. Immunopathological properties of the *Campylobacter jejuni* flagellins and the adhesin CadF as assessed in a clinical murine infection model. **Gut pathogens**, v. 11, n. 1, p.24, 2019. <https://doi.org/10.1186/s13099-019-0306-9>

SERICHANTALERGS, O. et al. Distribution of genes related to Type 6 secretion system and lipooligosaccharide that induced ganglioside mimicry among *Campylobacter jejuni* isolated from human diarrhea in Thailand. **Gut Pathogens**, v. 12, n. 1, p. 1-10 , 2020. <https://doi.org/10.1186/s13099-020-00357-6>

SEUYLEMEZIAN, A. et al. Development of a Custom MALDI-TOF MS Database for Species-Level Identification of Bacterial Isolates Collected From Spacecraft and Associated Surfaces. **Frontiers in Microbiology**, v. 18, n. 9, p. 1-8, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00780>

SHAPIRO, J. A. Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. **Annual review of microbiology**, v. 52, n. 1, p. 81-104, 1998. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.52.1.81>

SIERRA-ARGUELLO, Y. M. et al. Fluoroquinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* isolated from broiler slaughterhouses in southern Brazil. **Avian Pathology**, v. 45, n. 1, p. 66-72, 2016. <https://doi.org/10.1080/03079457.2015.1120272>

SIGMA-ALDRICH - Sigma-Aldrich Corporation. **Oligonucleotide Quality Control by Mass Spectrometry**. 2020. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/custom-dna-oligos-qc-analysis-by-mass-spectrometry.html>. Acesso em: 20/04/2020.

SILVA, D.T. et al. Ocorrência de *Campylobacter* em carne de frango, fezes de frango e humanas e pesquisa dos genes cdt. **Arquivo Brasileiro de Medicina**

Veterinária e Zootecnia, v. 66, n. 1, p. 297-304, 2014.
<https://doi.org/10.1590/S0102-09352014000100040>

SILVA, J. et al. *Campylobacter* spp. as a Foodborne Pathogen: A Review. **Frontiers in microbiology**, v. 2, n. 200, p. 1-12, 2011.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00200>

SILVA, W.C. et al. *Campylobacter*: an overview of cases, occurrence in food, contamination sources, and antimicrobial resistance in Brazil. **Food Reviews International**, v. 34, p. 364–389, 2018.
<https://doi.org/10.1080/87559129.2017.1298125>

SILVERMAN, J. M. et al. Structure and Regulation of the Type VI Secretion System. **Annual Review of Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 453–472, 2012.
<https://doi.org/10.1146/annurev-micro-121809-151619>

SIMA, F. et al. A Novel Natural Antimicrobial Can Reduce the in vitro and in vivo Pathogenicity of T6SS Positive *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Chicken Isolates. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1-32, 2018.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02139>

SIUZDAK, G. An introduction to mass spectrometry ionization: an excerpt from The Expanding Role of Mass Spectrometry in Biotechnology, 2nd ed.; MCC Press: San Diego, 2005. **Journal of the Association for Laboratory Automation**, v. 9, n. 2, p. 50-53, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.jala.2004.01.004>

SIUZDAK, G. **The expanding role of mass spectrometry in biotechnology**. 2ed. San Diego. MCC Press, p. 257 2006. ISBN-13: 978-0974245126

SKÓRKO-GLONEK, J. et al. HtrA heat shock protease interacts with phospholipid membranes and undergoes conformational changes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 14, p. 8974-8982, 1997.
<https://doi.org/10.1074/jbc.272.14.8974>

STAHL, M. et al. L-Fucose utilization provides *Campylobacter jejuni* with a competitive advantage. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 17, p.7194–7199, 2011. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014125108>

STAHL, M.; VALLANCE, B.A. Insights into *Campylobacter jejuni* colonization of the mammalian intestinal tract using a novel mouse model of infection. **Gut Microbes**, v. 6, p. 143-148, 2015. <https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1016691>

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

SUTTISUNHAKUL, V. et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the identification of *Burkholderia pseudomallei* from Asia and Australia and differentiation between *Burkholderia* species. **PLoS ONE** v. 12, n. 4, p. e0175294, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175294>

SUZUKI, H.; YAMAMOTO, S. *Campylobacter* contamination in retail poultry meats and by-products in the world: a literature survey. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 71, n. 3, p. 255–261. <https://doi.org/10.1292/jvms.71.255>

TABOADA, E. N. et al. Comparative genomic analysis of *Campylobacter jejuni* associated with Guillain-Barré and Miller Fisher syndromes: neuropathogenic and enteritis-associated isolates can share high levels of genomic similarity. **BMC Genomics**, v. 8, n.359, p. 1-11, 2007. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-359>

TALUKDAR, P. K. et al. Molecular Dissection of the *Campylobacter jejuni* CadF and FlpA Virulence Proteins in Binding to Host Cell Fibronectin. **Microorganisms**, v. 8, n. 3, p. 1-28, 2020. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030389>

TAM, C. C. et al. Incidence of Guillain-Barré Syndrome among Patients with *Campylobacter* Infection: A General Practice Research Database Study. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 194, n.1, p. 95–97, 2006. <https://doi.org/10.1086/504294>

USDA – UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Production and Value 2018 Summary (May 2019) 3 USDA, National Agricultural Statistics Service**. USDA. 2019.

VALERO, A. et al. Risk Factors Influencing Microbial Contamination in Food Service Centers. **Significance, Prevention and Control of Food Related Diseases**, v. 2, p. 27-58, 2016. <https://doi.org/10.5772/63029>

VAN ASSELT, E. D. et al. Selection of critical factors for identifying emerging food safety risks in dynamic food production chains. **Food Control**, v. 21, n. 6, p. 919–926, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.12.010>

VANDER SPIEGEL, M.; VAN DER FELLS-KLERX, H. J.; MARVIN, H. J. P. Effects of climate change on food safety hazards in the dairy production chain. **Food Research International**, v. 46, n. 1, p. 201–208, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.12.011>

VAN VLIET, A. H. M.; KETLEY, J. M. Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n. S6, p. 45S–56S, 2001. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01353.x>

VETCHAPITAK, T.; MISAWA, N. Current Status of *Campylobacter* Food Poisoning in Japan. **Food Safety**, v. 7, n. 3, p. 61-73, 2019. <https://doi.org/10.14252/foodsafetyfscj.D-19-00001>

VILLANUEVA, M.P.; MEDINA, G.; FERNÁNDEZ H. *Arcobacter butzleri* survives within throfozoites of *Acanthamoeba castellanii*. **Revista Argentina de Microbiología**. v. 48, p. 105-109, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.12.003>

WALENCKA, M.; MATUSIAK, A.; CHMIELA, M. The role of *Campylobacter jejuni* infection in the development of guillain-barré syndrome. *Postępy Mikrobiologii - Advancements of Microbiology*, v. 57, n. 3, p. 260-269, 2018.

WANG, M. et al. Signaling Molecules of Quorum Sensing in Bacteria. *Reviews in Biotechnology e Biochemistry*, v. 1, p. 002. RBB-002.000002, 2020.

WATSON, J.T & SPARKMAN, O.D. 2007. **Introduction to mass spectrometry: instrumentation, applications and strategies for data interpretation**. Wiley: England, p. 860.

WEI, R. et al. Effect of freezing on electrical properties and quality of thawed chicken breast meat. *Asian-Australasian Journal os Animal Sciencies*, v 30, n. 4, p. 569-575, 2017. <https://doi.org/10.5713/ajas.16.0435>

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Campylobacter**. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/campylobacter>. Acesso em 15/05/2020.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The global view of campylobacteriosis: report of an expert consultation, Utrecht, Netherlands, 9-July 11, 2012**. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/80751>. Acesso em: 15/04/2020.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group**. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165_eng.pdf?sequence=1. Acesso em: 15/05/2020.

WIECZOREK, K.; WOŁKOWICZ, T.; OSEK, J. flaA-SVR Based Genetic Diversity of Multiresistant *Campylobacter jejuni* Isolated From Chickens and Humans. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, n. 1176, p. 1-9, 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01176>

WIJDICKS, E. F. M.; KLEIN, C. J. Guillain-Barré Syndrome. *Mayo Clinic Proceedings*, v. 92, n. 3, p. 467–479, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2016.12.002>

WILLIAMSON, Y.M. et al. Differentiation of *Streptococcus pneumoniae* Conjunctivitis Outbreak Isolates by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, n. 19, p. 5891-5897, 2008. <https://doi.org/10.1128/AEM.00791-08>

WILLISON, H. J.; JACOBS, B. C.; VAN DOORN, P. A. Guillain-Barré syndrome. *Lancet*, v. 388, p. 717–727, 2016. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00339-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00339-1)

WINZER, K. et al. LuxS: its role in central metabolism and the in vitro synthesis of 4-hydroxy-5-methyl-3 (2H)-furanone. *Microbiology*, v. 148, n. 4, p. 909-922, 2002. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-4-909>

WURFEL, S. F. R. et al. Genetic diversity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from poultry meat products sold on the retail market in Southern Brazil. **Poultry Science**, v. 98, n. 2, p. 932-939, 2019. <https://doi.org/10.3382/ps/pey365>

XU, F. et al. Identification and Characterization of a New Ferric Enterobactin Receptor, CfrB, in *Campylobacter*. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 17, p. 4425–4435, 2010. <https://doi.org/10.1128/JB.00478-10>

YANG, Y.; LIN, Y.; QIAO, L. Direct MALDI-TOF MS Identification of bacterial mixtures. **Analytical Chemistry**, v. 90, p. 10400-10408, 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b02258>

YOUNG, K. T.; DAVIS, L. M.; DIRITA, V. J. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 9, p. 665–679, 2007. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1718>

YUKI, N.; KOGA, M. Bacterial infections in Guillain-Barré and Fisher syndromes. **Current Opinion in Neurology**, v.19, n. 5, p. 451–457, 2006. <https://doi.org/10.1097/01.wco.0000245367.36576.e9>

ZACH, L.; DOYLE, M. E.; BIER, V.; CZUPRYNSKI, C. H. Systems and governance in food import safety: A US perspective. **Food Control**, V. 27, N. 1, p. 153–162, 2012. <https://doi.org/10.1111/lamp.12104>

ZHANG, Q.; SAHIN, O. Diseases of Poultry In: *Campylobacteriosis*. Wiley-Blackwell - Wiley Online Library, 2020. cap.17, p. 754-769. <https://doi.org/10.1002/9781119371199.ch17>

ZHAO, S. et al. Whole-Genome Sequencing Analysis Accurately Predicts Antimicrobial Resistance Phenotypes in *Campylobacter* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 2, p. 459–466, 2015. <https://doi.org/10.1128/AEM.02873-15>

ZHONG, X. et al. *Campylobacter jejuni* Biofilm Formation Under Aerobic Conditions and Inhibition by ZnO Nanoparticles. **Frontiers in microbiology**, v. 11, n. 207, p. 1-6, 2020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00207>

ANEXOS

Normas do periódico (PLOS Pathogens) - Capítulo 2

Submission Guidelines

PLOS Pathogens publishes original research that clearly demonstrates novelty, importance to its particular field, biological significance, and conclusions that are justified by the study.

Our aim is to make the editorial process rigorous and consistent, and to offer the best possible support to our authors throughout this process. Authors are encouraged to decide how best to present their ideas, results, and conclusions. The writing style should be concise and accessible. Editors may make suggestions for how to achieve this, as well as suggestions for cuts or additions that could be made to the article to strengthen the argument.

Related information for authors

- [Submission system](#)
- [Journal scope and publication criteria](#)
- [Getting started guide](#)
- [Guidelines for other article types](#)
- [Guidelines for revisions](#)
- [Publication fees](#)
- [Style and Format](#)

File format	<p>Manuscript files can be in the following formats: DOC, DOCX, RTF or PDF. Microsoft Word documents should not be locked or protected.</p> <p>LaTeX manuscripts must be submitted as PDFs. Read the LaTeX guidelines.</p>
Length	<p>Manuscripts can be any length. There are no restrictions on word count, number of figures, or amount of supporting information.</p> <p>We encourage you to present and discuss your findings concisely.</p>
Font	<p>Use a standard font size and any standard font, except for the font named "Symbol". To add symbols to the manuscript, use the Insert → Symbol function in your word processor or paste in the appropriate Unicode character.</p>
Headings	<p>Limit manuscript sections and sub-sections to 3 heading levels. Make sure heading levels are clearly indicated in the manuscript text.</p>
Layout and spacing	<p>Manuscript text should be double-spaced.</p> <p>Do not format text in multiple columns.</p>
Page and line numbers	<p>Include page numbers and line numbers in the manuscript file. Use continuous line numbers (do not restart the numbering on each page).</p>
Footnotes	<p>Footnotes are not permitted. If your manuscript contains footnotes, move the information into the main text or the reference list, depending on the content.</p>
Language	<p>Manuscripts must be submitted in English.</p> <p>You may submit translations of the manuscript or abstract as supporting information. Read the supporting information guidelines.</p>
Abbreviations	<p>Define abbreviations upon first appearance in the text.</p> <p>Do not use non-standard abbreviations unless they appear at least three times in the text.</p> <p>Keep abbreviations to a minimum.</p>
Reference style	<p>PLOS uses "Vancouver" style, as outlined in the ICMJE sample references.</p> <p>See reference formatting examples and additional instructions below.</p>
Equations	<p>We recommend using MathType for display and inline equations, as it will provide the most reliable outcome. If this is not possible, Equation Editor or Microsoft's Insert→Equation function is acceptable.</p> <p>Avoid using MathType, Equation Editor, or the Insert→Equation function to insert single variables (e.g., "$a^2 + b^2 = c^2$"), Greek or other symbols (e.g., β, Δ, or ' [prime]), or mathematical operators (e.g., \times, \geq, or \pm) in running text. Wherever possible, insert single symbols as normal text with the correct Unicode (hex) values.</p> <p>Do not use MathType, Equation Editor, or the Insert→Equation function for only a portion of an equation. Rather, ensure that the entire equation is included. Equations should not contain a mix of different equation tools. Avoid "hybrid" inline or display equations, in which part is text and part is MathType, or part is MathType and part is Equation Editor.</p>

Nomenclature Use correct and established nomenclature wherever possible.	
Units of measurement	Use SI units. If you do not use these exclusively, provide the SI value in parentheses after each value. Read more about SI units.
Drugs	Provide the Recommended International Non-Proprietary Name (rINN).
Species names	Write in italics (e.g., <i>Homo sapiens</i>). Write out in full the genus and species, both in the title of the manuscript and at the first mention of an organism in a paper. After first mention, the first letter of the genus name followed by the full species name may be used (e.g., <i>H. sapiens</i>).
Genes, mutations, genotypes, and alleles	Write in italics. Use the recommended name by consulting the appropriate genetic nomenclature database (e.g., HUGO for human genes). It is sometimes advisable to indicate the synonyms for the gene the first time it appears in the text. Gene prefixes such as those used for oncogenes or cellular localization should be shown in roman typeface (e.g., v-fes, c-MYC).
Allergens	The systematic allergen nomenclature of the World Health Organization/International Union of Immunological Societies (WHO/IUIS) Allergen Nomenclature Sub-committee should be used for manuscripts that include the description or use of allergenic proteins. For manuscripts describing new allergens, the systematic name of the allergen should be approved by the WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee prior to manuscript publication. Examples of the systematic allergen nomenclature can be found at the WHO/IUIS Allergen Nomenclature site .

Copyediting manuscripts

Prior to submission, authors who believe their manuscripts would benefit from in-depth professional copyediting are encouraged to use language-editing and copyediting services. Obtaining this service is the responsibility of the author and should be done before initial submission. These services can be found on the web using search terms like “scientific editing service” or “manuscript editing service”.

Note that if your manuscript is accepted, PLOS will not perform a detailed copyediting step. Therefore, please carefully review your manuscript, paying special attention to spelling, punctuation, and grammar, as well as scientific content.

Manuscript Organization

Most manuscripts should be organized as follows. Instructions for each element appear below.

- Title
- Authors
- Affiliations
- Abstract
- Author Summary
- Introduction
- Results
- Discussion

- Materials and Methods
- Acknowledgments
- References
- Supporting information captions

Uniformity in format facilitates the experience of readers and users of the journal. To provide flexibility, however, authors are also able to include the Materials and Methods section before the Results section or before the Discussion section. Please also note that the Results and Discussion can be combined into one Results/Discussion section.

Other elements

- In your initial submission, figure captions should be grouped together at the end of the manuscript. Upon editorial acceptance, figure files should be uploaded separately from the manuscript, and figure captions should be inserted in read order, after the first paragraph in which the figure is cited. [Read more information about our figure requirements.](#)
- Tables are inserted immediately after the first paragraph in which they are cited.
- Supporting information files are uploaded separately.



Please refer to our downloadable sample files to ensure that your submission meets our formatting requirements:

- [Download sample title, author list, and affiliations page \(PDF\)](#)
- [Download sample manuscript body \(PDF\)](#)

Viewing Figures and Supporting Information in the compiled submission PDF

The compiled submission PDF includes low-resolution preview images of the figures after the reference list. The function of these previews is to allow you to download the entire submission as quickly as possible. Click the link at the top of each preview page to download a high-resolution version of each figure. Links to download Supporting Information files are also available after the reference list.

Parts of a Submission

Title

Include a full title and a short title for the manuscript.

Title	Length	Guidelines	Examples
Full title	200 characters	Specific, descriptive, concise, and comprehensible to readers outside the field	Impact of cigarette smoke exposure on innate immunity: A <i>Caenorhabditis elegans</i> model Solar drinking water disinfection (SODIS) to reduce childhood diarrhoea in rural Bolivia: A cluster-randomized, controlled trial
Short title	70 characters	State the topic of the study	Cigarette smoke exposure and innate immunity SODIS and childhood diarrhoea

Titles should be written in sentence case (only the first word of the text, proper nouns, and genus names are capitalized). Avoid specialist abbreviations if possible. For clinical trials, systematic reviews, or meta-analyses, the subtitle should include the study design.

Author list

Authorship requirements

All authors must meet the criteria for authorship as outlined in the [authorship policy](#). Those who contributed to the work but do not meet the criteria for authorship can be mentioned in the Acknowledgments. [Read more about Acknowledgments.](#)

The corresponding author must provide an ORCID iD at the time of submission by entering it in the user profile in the submission system. [Read more about ORCID.](#)

Author names and affiliations

Enter author names on the title page of the manuscript and in the online submission system.

On the title page, write author names in the following order:

- First name (or initials, if used)
- Middle name (or initials, if used)
- Last name (surname, family name)

Each author on the list must have an affiliation. The affiliation includes department, university, or organizational affiliation and its location, including city, state/province (if applicable), and country. Authors have the option to include a current address in addition to the address of their affiliation at the time of the study. The current address should be listed in the byline and clearly labeled "current address." At a minimum, the address must include the author's current institution, city, and country.

If an author has multiple affiliations, enter all affiliations on the title page only. In the submission system, enter only the preferred or primary affiliation. Author affiliations will be listed in the typeset PDF article in the same order that authors are listed in the submission.

Author names will be published exactly as they appear in the manuscript file. Please double-check the information carefully to make sure it is correct.

Corresponding author

The submitting author is automatically designated as the corresponding author in the submission system. The corresponding author is the primary contact for the journal office and the only author able to view or change the manuscript while it is under editorial consideration.

The corresponding author role may be transferred to another coauthor. However, note that transferring the corresponding author role also transfers access to the manuscript. (To designate a new corresponding author while the manuscript is still under consideration, watch the video tutorial below.)

Only one corresponding author can be designated in the submission system, but this does not restrict the number of corresponding authors that may be listed on the article in the event of publication. Whoever is designated as a corresponding author on the title page of the manuscript file will be listed as such upon publication. Include an email address for each corresponding author listed on the title page of the manuscript.



How to select a new corresponding author in Editorial Manager

Consortia and group authorship

If a manuscript is submitted on behalf of a consortium or group, include its name in the manuscript byline. Do not add it to the author list in the submission system. You may include the full list of members in the Acknowledgments or in a supporting information file.

PubMed only indexes individual consortium or group author members listed in the article byline. If included, these individuals must qualify for authorship according to our [criteria](#).

[Read the group authorship policy.](#)

Author contributions

Provide at minimum one contribution for each author in the submission system. Use the CRediT taxonomy to describe each contribution. [Read the policy and the full list of roles.](#)

Contributions will be published with the final article, and they should accurately reflect contributions to the work. The submitting author is responsible for completing this information at submission, and we expect that all authors will have reviewed, discussed, and agreed to their individual contributions ahead of this time.

Cover letter

Upload a cover letter as a separate file in the online system.

The cover letter should address the following questions:

- Why is this manuscript suitable for publication in *PLOS Pathogens*?
- Why will your study inspire the other members of your field, and how will it drive research forward?

You may recommend a suitable Associate Editor to handle your submission; however, the editors reserve the right to contact an alternative—either from the board or a guest editor.

The cover letter will be available to the editors and to any external peer reviewers, so please send anything confidential directly to the journal office.

Title page

The title, authors, and affiliations should all be included on a title page as the first page of the manuscript file.



[Download our sample title, author list, and affiliations page \(PDF\)](#)

Abstract

The Abstract comes after the title page in the manuscript file. The abstract text is also entered in a separate field in the submission system.

The Abstract of the paper should be succinct; it must not exceed 300 words. Authors should mention the techniques used without going into methodological detail and should summarize the most important results.

While the Abstract is conceptually divided into three sections (Background, Methodology/Principal Findings, and Conclusions/Significance), do not apply these distinct headings to the Abstract within the article file.

Do not include any citations. Avoid specialist abbreviations.

Author Summary

We ask that all authors of research articles include a 150–200 word non-technical summary of the work as part of the manuscript to immediately follow the abstract. This text is subject to editorial change, should be written in the first-person voice, and should be distinct from the scientific abstract.

Aim to highlight where your work fits within a broader context; present the significance or possible implications of your work simply and objectively; and avoid the use of acronyms and complex terminology wherever possible. The goal is to make your findings accessible to a wide audience that includes both scientists and non-scientists.

Authors may benefit from consulting with a science writer or press officer to ensure they effectively communicate their findings to a general audience.

Example Author Summary

[Mosquitoes Inoculate High Doses of West Nile Virus as They Probe and Feed on Live Hosts](#)

Introduction

The Introduction should put the focus of the manuscript into a broader context. As you compose the Introduction, think of readers who are not experts in this field. Include a brief review of the key literature. If there are relevant controversies or disagreements in the field, they should be mentioned so that a non-expert reader can delve into these issues further. The Introduction should conclude with a brief statement of the overall aim of the experiments and a comment about whether that aim was achieved.

Results

The Results section should provide details of all of the experiments that are required to support the conclusions of the paper. There is no specific word limit for this section, but details of experiments that are peripheral to the main thrust of the article and that detract from the focus of the article should not be included. The section may be divided into subsections, each with a concise subheading. The section should be written in the past tense.

PLOS journals require authors to make all data underlying the findings described in their manuscript fully available without restriction, with rare exception. When submitting a manuscript online, authors must provide a [Data Availability Statement](#) describing compliance with PLOS's policy.

Large data sets, including raw data, may be deposited in an appropriate public repository. [See our list of recommended repositories.](#)

For smaller data sets and certain data types, authors may provide their data within [supporting information files](#) accompanying the manuscript. Authors should take care to maximize the accessibility and reusability of the data by selecting a file format from which data can be efficiently extracted (for example, spreadsheets or flat files should be provided rather than PDFs when providing tabulated data).

For more information on how best to provide data, read our [policy on data availability](#). PLOS does not accept references to “data not shown.”

Discussion

The Discussion should spell out the major conclusions of the work along with some explanation or speculation on the significance of these conclusions. How do the conclusions affect the existing assumptions and models in the field? How can future research build on these observations? What are the key experiments that must be done?

The Discussion should be concise and tightly argued.

The Results and Discussion may be combined into one section, if desired.

Materials and Methods

The Materials and Methods should provide enough detail for reproduction of the findings. Submit detailed protocols for newer or less established methods. Well-established protocols may simply be referenced.

Details of algorithms and protocol documents for clinical trials, observational studies, and other non-laboratory investigations may be uploaded as supporting information. These are not included in the typeset manuscript, but are downloadable and fully searchable from the HTML version of the article. [Read the supporting information guidelines](#) for formatting instructions.

We recommend and encourage you to deposit laboratory protocols in [protocols.io](#), where protocols can be assigned their own persistent digital object identifiers (DOIs).

To include a link to a protocol in your article:

1. Describe your step-by-step protocol on [protocols.io](#)
2. Select Get DOI to issue your protocol a persistent digital object identifier (DOI)
3. Include the DOI link in the Methods section of your manuscript using the following format provided by [protocols.io](#): `http://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.[PROTOCOL DOI]`

At this stage, your protocol is only visible to those with the link. This allows editors and reviewers to consult your protocol when evaluating the manuscript. You can make your protocols public at any time by selecting Publish on the [protocols.io](#) site. Any referenced protocol(s) will automatically be made public when your article is published.

Consult our [reporting guidelines](#), and include an ethics statement in the Materials and Methods section when reporting results from [human subjects research](#) and [animal research](#).

Acknowledgments

Those who contributed to the work but do not meet our authorship criteria should be listed in the Acknowledgments with a description of the contribution.

Authors are responsible for ensuring that anyone named in the Acknowledgments agrees to be named.

PLOS journals publicly acknowledge the indispensable efforts of our editors and reviewers on an annual basis. To ensure equitable recognition and avoid any appearance of partiality, do not include editors or peer reviewers—named or unnamed—in the Acknowledgments.

Do not include funding sources in the Acknowledgments or anywhere else in the manuscript file. Funding information should only be entered in the financial disclosure section of the submission system.

References

Any and all available works can be cited in the reference list. Acceptable sources include:

- Published or accepted manuscripts
- Manuscripts on preprint servers, providing the manuscript has a citable DOI or arXiv URL.

Do not cite the following sources in the reference list:

- Unavailable and unpublished work, including manuscripts that have been submitted but not yet accepted (e.g., “unpublished work,” “data not shown”). Instead, include those data as supplementary material or deposit the data in a publicly available database.
- Personal communications (these should be supported by a letter from the relevant authors but not included in the reference list)

References are listed at the end of the manuscript and numbered in the order that they appear in the text. In the text, cite the reference number in square brackets (e.g., “We used the techniques developed by our colleagues [19] to analyze the data”). PLOS uses the numbered citation (citation-sequence) method and first six authors, et al.

Do not include citations in abstracts.

Make sure the parts of the manuscript are in the correct order before ordering the citations.

Formatting references

Because all references will be linked electronically as much as possible to the papers they cite, proper formatting of the references is crucial.

PLOS uses the reference style outlined by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), also referred to as the “Vancouver” style. Example formats are listed below. Additional examples are in the [ICMJE sample references](#).

A reference management tool, EndNote, offers a current [style file](#) that can assist you with the formatting of your references. If you have problems with any reference management program, please contact the source company's technical support.

Journal name abbreviations should be those found in the [National Center for Biotechnology Information \(NCBI\) databases](#).

Source	Format
Published articles	<p>Hou WR, Hou YL, Wu GF, Song Y, Su XL, Sun B, et al. cDNA, genomic sequence cloning and overexpression of ribosomal protein gene L9 (rpL9) of the giant panda (<i>Ailuropoda melanoleuca</i>). <i>Genet Mol Res.</i> 2011;10: 1576-1588.</p> <p>Devaraju P, Gulati R, Antony PT, Mithun CB, Negi VS. Susceptibility to SLE in South Indian Tamils may be influenced by genetic selection pressure on TLR2 and TLR9 genes. <i>Mol Immunol.</i> 2014 Nov 22. pii: S0161-5890(14)00313-7. doi: 10.1016/j.molimm.2014.11.005.</p> <p>Note: A DOI number for the full-text article is acceptable as an alternative to or in addition to traditional volume and page numbers. When providing a DOI, adhere to the format in the example above with both the label and full DOI included at the end of the reference (doi: 10.1016/j.molimm.2014.11.005). Do not provide a shortened DOI or the URL.</p>
Accepted, unpublished articles	Same as published articles, but substitute “Forthcoming” for page numbers or DOI.
Online articles	Huynen MMTE, Martens P, Hilderlink HBM. The health impacts of globalisation: a conceptual framework. <i>Global Health.</i> 2005;1: 14. Available from: http://www.globalizationandhealth.com/content/1/1/14
Books	Bates B. <i>Bargaining for life: A social history of tuberculosis.</i> 1st ed. Philadelphia: University of Pennsylvania Press; 1992.
Book chapters	Hansen B. New York City epidemics and history for the public. In: Harden VA, Risse GB, editors. <i>AIDS and the historian.</i> Bethesda: National Institutes of Health; 1991. pp. 21-28.
Deposited articles (preprint s, e-prints, or arXiv)	<p>Krick T, Shub DA, Verstraete N, Ferreiro DU, Alonso LG, Shub M, et al. Amino acid metabolism conflicts with protein diversity. arXiv:1403.3301v1 [Preprint]. 2014 [cited 2014 March 17]. Available from: https://128.84.21.199/abs/1403.3301v1</p> <p>Kording KP, Mensh B. Ten simple rules for structuring papers. <i>BioRxiv</i> [Preprint]. 2016 bioRxiv 088278 [posted 2016 Nov 28; revised 2016 Dec 14; revised 2016 Dec 15; cited 2017 Feb 9]: [12 p.]. Available from: https://www.biorxiv.org/content/10.1101/088278v5 doi: 10.1101/088278</p>
Published media (print or online newspapers and magazine articles)	Fountain H. For Already Vulnerable Penguins, Study Finds Climate Change Is Another Danger. <i>The New York Times.</i> 2014 Jan 29 [Cited 2014 March 17]. Available from: http://www.nytimes.com/2014/01/30/science/earth/climate-change-taking-toll-on-penguins-study-finds.html
New media (blogs, web sites, or other written works)	Allen L. Announcing PLOS Blogs. 2010 Sep 1 [cited 17 March 2014]. In: <i>PLOS Blogs</i> [Internet]. San Francisco: PLOS 2006 - . [about 2 screens]. Available from: http://blogs.plos.org/plos/2010/09/announcing-plos-blogs/ .
Masters' theses or doctoral dissertations	Wells A. Exploring the development of the independent, electronic, scholarly journal. M.Sc. Thesis, The University of Sheffield. 1999. Available from: http://cumincad.scix.net/cgi-bin/works/Show?2e09

Source	Format
Databases and repositories (Figshare, arXiv)	Roberts SB. QPX Genome Browser Feature Tracks; 2013 [cited 2013 Oct 5]. Database: figshare [Internet]. Available from: http://figshare.com/articles/QPX_Genome_Browser_Feature_Tracks/701214
Multimedia (videos, movies, or TV shows)	Hitchcock A, producer and director. Rear Window [Film]; 1954. Los Angeles: MGM.

Supporting information

Authors can submit essential supporting files and multimedia files along with their manuscripts. All supporting information will be subject to peer review. All file types can be submitted, but files must be smaller than 20 MB in size.

Authors may use almost any description as the item name for a supporting information file as long as it contains an "S" and number. For example, "S1 Appendix" and "S2 Appendix," "S1 Table" and "S2 Table," and so forth.

Supporting information files are published exactly as provided, and are not copyedited.

Supporting information captions

List supporting information captions at the end of the manuscript file. Do not submit captions in a separate file.

The file number and name are required in a caption, and we highly recommend including a one-line title as well. You may also include a legend in your caption, but it is not required.

Example caption

S1 Text. Title is strongly recommended. Legend is optional.

In-text citations

We recommend that you cite supporting information in the manuscript text, but this is not a requirement. If you cite supporting information in the text, citations do not need to be in numerical order.

Read the [supporting information guidelines](#) for more details about submitting supporting information and multimedia files.

Figures and Tables

Figure files

You can include figures in the main manuscript file at initial submission. If the manuscript reaches the revise stage, prepare and submit each figure as an individual file.

Cite figures in ascending numeric order at first appearance in the manuscript file.

For detailed instructions, [read the guidelines for figures](#).

Figure Captions

If you are submitting a new or revised manuscript, place captions in a group at the end of the manuscript file.

After editorial acceptance, insert captions in read order in the manuscript text, immediately following the paragraph where the figure is first cited. Don't include captions as part of the figure files themselves or submit them in a separate document.

At a minimum, include the following in your figure captions:

- A figure label with Arabic numerals, and "Figure" abbreviated to "Fig" (e.g. Fig 1, Fig 2, Fig 3, etc). Match the label of your figure with the name of the file uploaded at submission (e.g. a figure citation of "Fig 1" must refer to a figure file named "Fig1.tif").
- A concise, descriptive title

The caption may also include a legend as needed.

For detailed instructions, [read the guidelines for figures](#).

Tables

Cite tables in ascending numeric order upon first appearance in the manuscript file.

Place each table in your manuscript file directly after the paragraph in which it is first cited (read order). Do not submit your tables in separate files.

Tables require a label (e.g., "Table 1") and brief descriptive title to be placed above the table. Place legends, footnotes, and other text below the table.

[Read the guidelines for tables](#).

Data reporting

All data and related metadata underlying the findings reported in a submitted manuscript should be deposited in an appropriate public repository, unless already provided as part of the submitted article.

[Read our policy on data availability](#).

Repositories may be either subject-specific (where these exist) and accept specific types of structured data, or generalist repositories that accept multiple data types. We recommend that authors select repositories appropriate to their field. Repositories may be subject-specific (e.g., GenBank for sequences and PDB for structures), general, or institutional, as long as DOIs or accession numbers are provided and the data are at least as open as CC BY. Authors are encouraged to select repositories that meet accepted criteria as trustworthy digital repositories, such as criteria of the Centre for Research Libraries or Data Seal of Approval. Large, international databases are more likely to persist than small, local ones.

[See our list of recommended repositories](#).

To support data sharing and author compliance of the PLOS data policy, we have integrated our submission process with a select set of data repositories. The list is neither representative nor exhaustive of the suitable repositories available to authors. Current repository integration partners include [Dryad](#) and [FlowRepository](#). Please contact data@plos.org to make recommendations for further partnerships.

Instructions for PLOS submissions with data deposited in an integration partner repository:

- Deposit data in the integrated repository of choice.
- Once deposition is final and complete, the repository will provide you with a dataset DOI (provisional) and private URL for reviewers to gain access to the data.
- Enter the given data DOI into the full Data Availability Statement, which is requested in the Additional Information section of the PLOS submission form. Then provide the URL passcode in the Attach Files section.

If you have any questions, please [email us](#).

Accession numbers

All appropriate data sets, images, and information should be deposited in an appropriate public repository. [See our list of recommended repositories](#).

Accession numbers (and version numbers, if appropriate) should be provided in the Data Availability Statement. Accession numbers or a citation to the DOI should also be provided when the data set is mentioned within the manuscript.

In some cases authors may not be able to obtain accession numbers of DOIs until the manuscript is accepted; in these cases, the authors must provide these numbers at acceptance. In all other cases, these numbers must be provided at full submission.

Identifiers

As much as possible, please provide accession numbers or identifiers for all entities such as genes, proteins, mutants, diseases, etc., for which there is an entry in a public database, for example:

- [Ensembl](#)
- [Entrez Gene](#)
- [FlyBase](#)
- [InterPro](#)
- [Mouse Genome Database \(MGD\)](#)
- [Online Mendelian Inheritance in Man \(OMIM\)](#)
- [PubChem](#)

Identifiers should be provided in parentheses after the entity on first use.

Small and macromolecule crystal data

Manuscripts reporting new and unpublished three-dimensional structures must include sufficient supporting data and detailed descriptions of the methodologies used to allow the reproduction and validation of the structures. All novel structures must have been deposited in a community endorsed database prior to submission (please see our list of [recommended repositories](#)).

Small molecule single crystal data

Authors reporting X-Ray crystallographic structures of small organic, metal-organic, and inorganic molecules must deposit their data with the Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC), the Inorganic Crystal Structure Database (ICSD), or similar community databases providing a recognized validation functionality. Authors are also required to include the relevant structure reference numbers within the main text (e.g. the CCDC ID number), as well as the crystallographic information files (.cif format) as Supplementary Information, along with the checkCIF validation reports that can be obtained via the International Union of Crystallography (IUCr).

Macromolecular structures

Authors reporting novel macromolecular structures must have deposited their data prior to submission with the Worldwide Protein Data Bank (wwPDB), the Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB), the Electron Microscopy Data Bank (EMDB), or other community databases providing a recognized validation functionality. Authors must include the structure reference numbers within the main text and submit as Supplementary Information the official validation reports from these databases.

Striking image

You can upload a visually striking image alongside your submission, which we may use to showcase your article through PLOS' online channels. The Editors-in-Chief choose the monthly issue image from the striking images submitted with articles scheduled for publication.

Submission Criteria

- Choose an image that represents the article in a striking and eye-catching way.
- It can be derived from a figure or supporting information file from the paper, and it may be a cropped portion of an image or the entire image.
- Alternatively, you can create or source an image, as long as it adheres to our CC BY license.
- High resolution: between 300-600 dpi
- Single panel
- Ideally avoid added details like text, scale bars, and arrows.

How to Submit

1. Submit your striking image to the submission system using the file type "Striking Image".
2. Upload a separate file with corresponding caption.

If no striking image is uploaded, a member of the journal team will choose an appropriate image, which may be a figure from the submission or a separately sourced CC BY image.

Striking images should not contain potentially identifying images of people. [Read our policy on identifying information.](#)

The [PLOS licenses and copyright policy](#) also applies to striking images.

Additional Information Requested at Submission

Financial Disclosure Statement

This information should describe sources of funding that have supported the work. If your manuscript is published, your statement will appear in the Funding section of the article.

Include your statement in the Financial Disclosure section of the initial submission form.

The statement should include:

- Specific grant numbers
- Initials of authors who received each award
- URLs to sponsors' websites

Also state whether any sponsors or funders (other than the named authors) played any role in:

- Study design
- Data collection and analysis

- Decision to publish
- Preparation of the manuscript

If they had no role in the research, include this sentence: "The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript."

If the study was unfunded, include this sentence as the Financial Disclosure statement: "The author(s) received no specific funding for this work."

[Read our policy on disclosure of funding sources.](#)

Competing interests

The corresponding author is asked at submission to declare, on behalf of all authors, whether there are any financial, personal, or professional interests that could be construed to have influenced the work.

Any relevant competing interests of authors must be available to editors and reviewers during the review process and will be stated in published articles.

[Read our policy on competing interests.](#)

Related manuscripts

When submitting a manuscript, all authors are asked to indicate that they do not have a related or duplicate manuscript under consideration (or accepted) for publication elsewhere. If related work has been or will be submitted elsewhere or is in press elsewhere, then a copy must be uploaded with the article submitted to PLOS. Reviewers will be asked to comment on the overlap between related submissions.

[Read our policies on related manuscripts.](#)

Preprints

PLOS encourages authors to post preprints as a way to accelerate the dissemination of research and supports authors who wish to share their work early and receive feedback before formal peer review. Deposition of manuscripts with preprint servers does not impact consideration of the manuscript at any PLOS journal.

Authors posting on bioRxiv may submit directly to PLOS journals through bioRxiv's [direct transfer to journal service](#).

Authors submitting manuscripts in the life science to *PLOS Pathogens* may opt-in to post their work on bioRxiv during the *PLOS Pathogens* initial submission process.

[Read more about preprints.](#)

[Learn how to post a preprint to bioRxiv during *PLOS Pathogens* initial submission.](#)

Reviewer and editor suggestions

We ask authors to suggest suitable editors and at least four potential reviewers when submitting their manuscript. Bear in mind any potential competing interests when making these suggestions. It is not appropriate to suggest recent collaborators or other researchers at your institution. See our [policy on competing interests](#) for more information.

Opposed reviewers

Authors may choose to request that an individual is excluded from the review process and not involved in their manuscript. When making these suggestions, please provide specific reasons why each person should not review your submission in each "Reason" box. The editorial team will respect these requests so long as this does not interfere with the objective and thorough assessment of the submission.

Other Article Types

If you are submitting content other than a research article, [read the guidelines for other article types](#).