

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

ANA BEATRIZ GARCEZ BUIATTE

**VIRULÊNCIA, RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS E DISTRIBUIÇÃO
ESPACIAL E SAZONAL DE *Campylobacter coli* ISOLADAS DE CARÇAÇAS DE
FRANGOS NO BRASIL**

UBERLÂNDIA

2021

ANA BEATRIZ GARCEZ BUIATTE

**VIRULÊNCIA, RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS E DISTRIBUIÇÃO
ESPACIAL E SAZONAL DE *Campylobacter coli* ISOLADAS DE CARÇAÇAS DE
FRANGOS 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

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Roberta Torres de Melo

UBERLÂNDIA

2021

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

B932 Buiatte, Ana Beatriz Garcez, 1992-
2021 Virulência, resistência aos antimicrobianos e
distribuição espacial e sazonal de *Campylobacter coli*
isoladas de carcaças de frangos no Brasil [recurso
eletrônico] / Ana Beatriz Garcez Buiatte. - 2021.

Orientadora: Daise Aparecida Rossi.
Coorientadora: Roberta Torres Melo.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de
Uberlândia, Pós-graduação em Ciências Veterinárias.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2021.547>
Inclui bibliografia.

1. Veterinária. I. Rossi, Daise Aparecida, 1963-,
(Orient.). II. Melo, Roberta Torres, 1987-, (Coorient.).
III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação
em Ciências Veterinárias. IV. Título.

CDU: 619

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091

ANA BEATRIZ GARCEZ BUIATTE

**VIRULÊNCIA, RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS E DISTRIBUIÇÃO
ESPACIAL E SAZONAL DE *Campylobacter coli* ISOLADAS DE CARÇAÇAS DE
FRANGOS 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.

Uberlândia, 30 de setembro de 2021.

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

Prof. Dr. Heriberto Fernández Jaramillo – IMC/UACH

Dra. Dália dos Prazeres Rodrigues – IOC/FIOCRUZ



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 PPGCVET/ 011/2021				
Data:	30 de setembro de 2021	Hora de início:	14:04	Hora de encerramento:	14:54
Matrícula do Discente:	11912MEV001				
Nome do Discente:	ANA BEATRIZ GARCEZ BUIATTE				
Título do Trabalho:	Virulência, resistência aos antimicrobianos e distribuição espacial e sazonal de <i>Campylobacter coli</i> isoladas de carcaças de frangos no Brasil				
Área de concentração:	Saúde Animal				
Linha de pesquisa:	Investigação Etiológica				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Epidemiologia de Zoonoses				

Reuniu-se por Videoconferência (meio eletrônico), da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, assim composta: Professores Doutores: **Heriberto Fernandez Jaramillo - Universidad Austral de Chile; Dália dos Prazeres Rodrigues - Instituto Oswaldo Cruz; Daise Aparecida Rossi** orientador(a) da) candidata.

Iniciando os trabalhos a presidente da mesa, Dra. Daise Aparecida Rossi, apresentou a Comissão Examinadora e o candidata, 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(a).

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 30/09/2021, às 16:00, 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 30/09/2021, às 17:44, 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 **DALIA DOS PRAZERES RODRIGUES, Usuário Externo**, em 30/09/2021, às 19:13, 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 **3065076** e o código CRC **4FDE149C**.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

ANA BEATRIZ GARCEZ BUIATTE – Nascida em Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, no dia 1 de setembro de 1992, filha de Cláudio Divino Buiatte e Ivone Garcez Buiatte. Médica veterinária, graduada pela Universidade Presidente Antônio Carlos de Uberlândia. Em 2016, iniciou a residência em Medicina Veterinária Preventiva, na Universidade Federal de Uberlândia. No ano de 2019 adquiriu o título de especialista em Controle de Qualidade em Processos Alimentícios pelo Instituto Federal do Triângulo Mineiro. Também em 2019 ingressou no mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias na Universidade Federal de Uberlândia, área de concentração Investigação Etiológica, na qual foi bolsista pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Tem experiência nas áreas de microbiologia, diagnóstico de doenças bacterianas, zoonoses transmitidas por alimentos e segurança alimentar.

AGRADECIMENTOS

Eu quero agradecer, primeiramente, aos meus pais Ivone e Cláudio, e meus irmãos, Claudio e Mariana, por segurarem a minha mão e estarem ao meu lado nesses últimos anos. Nós sabemos tudo o que passamos, as perdas, os momentos difíceis, e tenho certeza que se não tivesse o apoio de vocês, não conseguiria manter meus passos nessa caminhada. Amo muito vocês.

Também gostaria de agradecer à Dra. Daise, minha orientadora e mentora, que muito me apoiou neste período. Agradeço pela sua disponibilidade em ouvir, sua paciência e sua empatia. Pelo apoio as ideias que foram surgindo, por sempre dar uma chance ao que propomos, e também por toda a ajuda na concepção do texto final, apontando caminhos. E da mesma maneira, quero agradecer à Dra. Roberta, que como co-orientadora esteve presente me auxiliando na aplicação do experimento, com a análise de dados, e no artigo, me dando ideias e direcionamento. Muito obrigada a vocês duas, são pesquisadoras que me inspiram.

Eu não teria conseguido nem entrar no mestrado se não fossem meus amigos que me acompanham desde que entrei na UFU, na época da residência, Dayane, Laís, Polly, Thais, Lígia, Caroline, Andreia, e as mais recentes, Melissa e Gabriela, Gabriela R., Fernanda, Vinícius... Tenho só lembranças boas dos momentos que vivemos, e agradeço demais o apoio de vocês quando eu estava precisando desabafar, de algum conselho.

Quero deixar um agradecimento aos meus amigos do LEPIMOL/LABIO, Guilherme, Fernanda, Clara e Phelipe, que me ajudaram sanando dúvidas ou mesmo nas etapas dos experimentos. Com certeza vocês contribuíram muito para a construção deste trabalho. Ao Phelipe, um agradecimento especial por além de parceiro de pesquisa, ser um grande amigo e conselheiro, que sempre se mostra disponível quando eu preciso. Conte sempre comigo, amigo.

Não poderia esquecer meus amigos de Uberaba, que têm aguentado minha ansiedade nesta reta final, e me dado momentos de apoio, trabalho e diversão. Obrigada Bruno, Gustavo, Rhuan, Douglas, Andrezza, Nathalia e Lucia.

Agradeço também ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, pelo fornecimento das cepas para nosso estudo, e suporte nas dúvidas que foram surgindo. Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias pela oportunidade de realizar o curso de mestrado, e pela Capes pelo financiamento desta etapa tão importante.

Agradeço ao Dr. Heriberto e à Dra. Dália, por aceitarem compor esta banca de defesa. Obrigada por se disponibilizarem a ler, corrigir e agregar valor ao nosso trabalho.

Muito obrigada a todos.

RESUMO

Campylobacter é um dos quatro patógenos mais isolados de doenças diarreicas de origem alimentar no mundo, e *C. coli* é a segunda espécie mais relacionada a campilobacteriose humana. O patógeno é frequentemente isolado de carcaças de frango. O Brasil é o maior exportador de carne de frango no mundo, o que coloca o país em posição de destaque, e torna a caracterização de *C. coli* nos abatedouros do país, de suma importância para estabelecimento de medidas de controle. A dissertação foi dividida em dois capítulos, e o primeiro capítulo traz um levantamento bibliográfico para contextualizar o leitor acerca do assunto, que será abordado no capítulo posterior. O segundo capítulo traz um estudo epidemiológico de 83 cepas de *C. coli* isoladas de carcaças de frangos abatidas em estabelecimentos sob Inspeção Federal em três estados brasileiros. As cepas foram isoladas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, através da metodologia ISO 10272:2017, e posteriormente, foram discriminadas por espécie utilizando espectrometria de massa (MALDI-TOF). No Laboratório de Epidemiologia Molecular da Universidade Federal de Uberlândia, os isolados foram submetidos a PCR convencional para determinar a presença de 14 genes relacionados à virulência, que foram divididos em cinco categorias: formação de biofilme (*flaA*, *luxS*), sistema de secreção (*cdtABC*, *hcp*), invasão e colonização (*cadF*, *ciaB*, *pldA*), adaptação a estresse (*dnaJ*, *htrA*, *cbrA*), e indução a Síndrome de Guillain-Barré (*neuA*, *cstII*). Foram construídos perfis de virulência e determinados os índices de variabilidade, virulência e multivirulência. As cepas foram submetidas ao teste de concentração inibitória mínima para avaliar a sensibilidade fenotípica a ciprofloxacina e eritromicina. No fim, foi gerado um dendrograma dos isolados a partir dos espectros gerados no MALDI-TOF, visando avaliar a disseminação das cepas. Os isolados de *C. coli* demonstraram elevado potencial virulento, e especialização em invasão e colonização. Os isolados apresentaram 89,2% (74/83) de resistência a ciprofloxacina e 55,4% (46/83) a eritromicina. Foi observada diversidade genética disseminada no estado I, e os estados II e III apresentaram especificidade local. Nossos resultados sugerem elevado potencial virulento, resistência aos antimicrobianos preconizados no tratamento de campilobacteriose, indícios de contaminação cruzada e manutenção de genótipos virulentos, enfatizando e a necessidade de adoção de medidas de controle em abatedouros brasileiros.

Palavras-chave: Campilobacteriose. Invasão. MALDI TOF. Resistência. Sistema de Secreção.

ABSTRACT

Campylobacter is one of the four most isolated foodborne diarrheal disease pathogens in the world, and *C. coli* is the second most closely related species to human campylobacteriosis. The pathogen is often isolated from chicken carcasses. Brazil is the largest exporter of chicken meat in the world, which places the country in a prominent position, and makes the characterization of *C. coli* in the country's slaughterhouses extremely important for the establishment of control measures. The dissertation was divided into two chapters, and the first chapter brings a bibliographical research to contextualize the reader about the subject, which will be addressed in the later chapter. The second chapter presents an epidemiological study of 83 strains of *C. coli* isolated from chicken carcasses slaughtered in establishments under Federal Inspection in three Brazilian states. The strains were isolated by the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply, through the ISO 10272:2017 methodology, and later, they were discriminated by species through mass spectrometry (MALDI-TOF). At the Molecular Epidemiology Laboratory of the Federal University of Uberlândia, the isolates were subjected to conventional PCR for 14 genes related to virulence, which were divided into five categories: biofilm formation (*flaA*, *luxS*), secretion system (*cdtABC*, *hcp*), invasion and colonization (*cadF*, *ciaB*, *pldA*), stress adaptation (*dnaJ*, *htrA*, *cbrA*), and Guillain-Barré syndrome induction (*neuA*, *cstII*). With the results, through the virulence profiles, indices of variability, virulence and multivirulence were determined. The strains were also submitted to the minimum inhibitory concentration test, to assess the phenotypic sensitivity to ciprofloxacin and erythromycin. In the end, a dendrogram of the isolates was generated from the spectra generated in the MALDI-TOF, in order to assess the distribution of the strains. *C. coli* isolates showed high virulence and specialization in invasion and colonization. The isolates showed 89.2% (76/83) resistance to ciprofloxacin and 55.4% (46/83) to erythromycin. Widespread genetic diversity was observed in state I, and states II and III showed local specificity. Our results suggest high virulence potential, resistance to the recommended antimicrobials in the treatment of campylobacteriosis, evidence of cross contamination and maintenance of virulent genotypes, emphasizing the need to adopt control measures in Brazilian slaughterhouses.

Keywords: Campylobacteriosis. Invasion. MALDI TOF. Resistance. Secretion System.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1.	Frequência de genes de virulência em <i>C. coli</i> isoladas em carcaças de frango abatidos no Brasil entre outubro de 2017 e julho de 2018	47
Tabela 2.	Perfis de virulência classificados de acordo com a categoria de genes estudados em <i>C. coli</i> isoladas de carcaças de frangos no Brasil entre outubro de 2017 a julho de 2018	47
Tabela 3.	Índices de variabilidade dos perfis de virulência de <i>C. coli</i> isoladas de carcaças de frangos por estabelecimento de abate	49
Tabela 4.	Índices de variabilidade, frequências de cepas e de perfis de virulência identificados em <i>C. coli</i> isoladas de carcaças de frangos no Brasil	49
Tabela 5.	Índice de variabilidade dos perfis de virulência de <i>C. coli</i> isoladas de carcaças de frangos por cidade	50
Tabela 6.	Resistência aos antimicrobianos de <i>C. coli</i> isoladas de carcaças de frango no Brasil entre outubro de 2017 e julho de 2018	52
Tabela 7.	Condições da PCR, sequências de nucleotídeos e tamanhos dos amplicons para identificação de genes de virulência em <i>C. coli</i>	59

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figura 1.	Índice de variabilidade de <i>C. coli</i> por amostra de acordo com o número de colônias isoladas	48
Figura 2.	Relação de índice de variabilidade e índice de virulência por estado	50
Figura 3.	Índices de variabilidade e virulência de <i>C. coli</i> ao longo do tempo de isolamento	51
Figura 4.	Gráfico de calor representando a frequência relativa de cada agrupamento de virulência (um ou mais genes) em cepas de <i>C. coli</i> isoladas de carcaças de frango no Brasil	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAC – acetiltransferases

AAD – adeniltransferases

AE – Adaptação ao estresse

AI – autoindutor

APH – fosfotransferases

APPCC – Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle

BF – Formação de Biofilme

BPF – Boas Práticas de Fabricação

CDC – *Center for Disease Control and Prevention*

CDT – Toxina de Distensão Citoletal

CE – *Commission European*

CFA – *CampyFood Agar Method*

EFSA – *European Food Safety Authority*

HCCA - ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

IAL – Instituto Adolfo Lutz

IC – Invasão Colonização

ISO – *International Organization for Standardization*

I. Var. – Índice de Variabilidade

LEPIMOL - Laboratório de Epidemiologia Molecular

LOS – Lipoligossacarídeos

MALDI - Ionização por dessorção a laser assistida por matriz

MAPA – Ministério da Pecuária e Abastecimento

mCCDA - *Modified Charcoal-Cefoperazone-Deoxycholate Agar*

MV – Multivirulência

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

PNSA – Plano Nacional de Sanidade Avícola

PUBMLST – *Public database for molecular typing and microbial genome diversity*

RPP – proteína de proteção ribossômica

SB – Indução à Síndrome de Guillain-Baré

SGB – Síndrome de Guillain-Barré

SIF – Sistema de Inspeção Federal

SMF – Síndrome de Miller Fischer

SR – Síndrome de Reiter

SS – Sistema de Secreção

T3SS – Sistema de secreção tipo 3

T6SS – Sistema de secreção tipo 6

TLR5 – receptor Toll-like 5

TOF - Time-of-Flight

V – Virulência

VNC – Viável não cultivável

WHO – *World Health Organization*

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	15
1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral	19
2.2 Objetivos específicos	19
3 REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1 Histórico e caracterização de <i>Campylobacter</i>	20
3.2 Características de <i>C. coli</i>	22
3.3 Fontes de contaminação de <i>C. coli</i>	23
3.4 <i>Campylobacter</i> e a cadeia de frango brasileira	24
3.4.1 Medidas de prevenção	28
3.5 Epidemiologia	32
3.6 Manifestações clínicas e complicações	34
3.7 Diagnóstico	36
3.8 Virulência e mecanismos de adaptação	38
3.9 Tratamento e resistência aos antibióticos	42
CAPÍTULO 2 – ARTIGO: Virulência, resistência aos antimicrobianos e disseminação fenotípica de <i>Campylobacter coli</i> isolados de carcaças de frangos no Brasil	47
REFERÊNCIAS	74
ANEXO 1 – Normas da revista Pathogens	93

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

Campylobacter é o agente etiológico mais frequente da gastroenterite alimentar bacteriana (WHO, 2020) e Kirk e colaboradores (2015) indicam esse patógeno como responsável por 160 milhões de casos de gastroenterite de origem alimentar no mundo. A infecção é amplamente estudada e caracterizada em países desenvolvidos, com alta prevalência (EFSA, 2019a), já em países subdesenvolvidos, estima-se que seja uma importante causa de alta morbidade e mortalidade, porém sem dados divulgados por órgãos oficiais, devido à provável subnotificação (SHEPPARD; MAIDEN, 2015).

C. jejuni é responsável por cerca de 80% a 85% dos casos de campilobacteriose humana e *C. coli* relacionada a 10% a 15% (MOORE et al., 2005) e dados europeus atribuem aproximadamente 83% e 11% dos casos para *C. jejuni* e *C. coli* (EFSA, 2019b). Embora a prevalência de *C. coli* em infecções humanas seja inferior à de *C. jejuni*, as espécies dividem grande parte do seu genoma (DINGLE et al., 2005), e são capazes de realizar transferência de material genético e modular seu genoma para melhor adaptação (SHEPPARD; MAIDEN, 2015; VIDAL et al., 2016; MELO et al., 2019b; GOLZ et al., 2020). Isto torna ambas as espécies particularmente importantes, pois podem compartilhar genes que facilitem sua sobrevivência nos diversos ambientes ou relacionados à virulência e resistência aos antimicrobianos.

C. coli faz parte da microbiota intestinal de diversos animais domésticos e silvestres (MAN, 2011), e a transmissão da doença aos humanos ocorre por via oral, sendo os produtos cárneos crus ou malcozidos os mais frequentemente incriminados (CDC, 2020). Embora seja isolada de diversos animais e ambientes (FITZGERALD, 2015; RODRIGUES et al., 2015; SZCZEPANSKA et al., 2017; COSTA; IRAOLA, 2019), alta prevalência de *C. coli* é observada em suínos (MILAN et al., 2017; ROSNER et al., 2017). Ainda assim, estudos têm evidenciado a carne de frango como uma importante fonte de *C. coli* (VINUEZA-BURGOS et al., 2017; WIECZOREK; BOCIAN; OSEK, 2020; ZBRUN et al., 2020; HARRISON et al., 2021; HULL et al., 2021). A alta prevalência do patógeno nestes animais foi relacionada à intensificação de produção (KARESH et al., 2012; ROSSLER et al., 2019; ZBRUN et al., 2020).

C. coli é uma espécie termotolerante, que tem como características crescimento ótimo entre 30°C e 47°C e pH entre 5,8 e 8,0, necessitando de condições de microaerofilia para seu crescimento, sensíveis à dessecação (ROVIRA et al., 2004; GUNTHER; CHEN, 2009; SILVA et al., 2011; KAAKOUSH et al., 2015). As exigências para sobrevivência dos isolados termotolerantes foram relacionadas com os picos de incidências de campilobacteriose, que ocorrem nas estações quentes e úmidas (JORE et al., 2010; ASMAI et al., 2020). Porém, este patógeno pode desenvolver mecanismos de adaptação ao ambiente, pois tem sido descritas cepas de *C. coli* capazes de se multiplicar em situações estressantes, como em baixas temperaturas, níveis muito baixos de pH, e ainda na presença de oxigênio (O'KARNE; CONNERTON, 2017; GOMES et al., 2018; KARKI et al., 2019).

Alguns fatores de virulência importantes na colonização humana por *Campylobacter* spp. estão relacionados com a motilidade, quimiotaxia, adesão, invasão, produção de toxinas, evasão do sistema imune e capacidade de formar biofilmes (FERNANDES et al., 2010; GARCÍA-SANCHEZ et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2019). Vários genes que possibilitam a colonização do hospedeiro, e que permitem a sobrevivência fora do hospedeiro foram descritos, e estudos têm demonstrado que um elevado número de *C. coli* também apresenta potencial virulento (DASTI et al., 2010; GUK et al., 2021; CHOI et al., 2021).

A campilobacteriose humana ocorre após a ingestão de pequena quantidade de células bacterianas, e tem o período de incubação entre um e dez dias (SKARP; HÄNNINEM; RAUTELIN, 2016; CONNERTON; CONNERTO, 2017; CDC, 2020). As pessoas acometidas desenvolvem sintomas gastrintestinais como diarreia, dor abdominal, febre, náusea e vômitos, e não é possível diferenciar a doença causada por *C. jejuni* de *C. coli* baseando-se apenas nos sintomas (ALLOS, 2001; CDC, 2020).

C. coli já foi isolada em surtos, e há relatos de pacientes que desenvolveram complicações intestinais e extra intestinais, tais como peritonite bacteriana espontânea e infecção em prótese articular (SUAREZ et al., 2019; CLARCK; MURRAY, 2020; DAN; PARIZADE, 2020; WANG, 2020). Outras complicações também foram associadas às infecções por *C. jejuni*, tais como Síndrome de Reiter, Síndrome de Miller Fischer e Síndrome de Guillain-Barré (KAAKOUSH et al., 2015; CONNERTON; CONNERTON, 2017), porém, o papel de *C. coli* nestas enfermidades ainda não foi elucidado (CULEBRO et al., 2018).

A campilobacteriose é uma doença autolimitante, mas em casos mais severos, é necessário o uso da antibioticoterapia (MOORE et al., 2005). O tratamento medicamentoso, quando recomendado, é baseado no uso de macrolídeos ou fluorquinolonas (BLASER; ENGBERG, 2008; LOPES-CHAVARRIAS et al., 2021). Aumento nos níveis de resistência de *Campylobacter* a estes medicamentos vem sendo observado, e é associado em vários documentos, ao uso indiscriminado de antimicrobianos na pecuária (VAN BOECKEL et al., 2015; EFSA, 2019b; NEOGI et al., 2020; MOUFTAH et al., 2021). Este fato aumenta o risco de difusão de cepas resistentes e multirresistentes por meio da cadeia produtiva (MOURKAS et al., 2019).

As cepas de *C. coli* tendem a apresentar maior resistência aos antimicrobianos quando comparadas a *C. jejuni* (EFSA, 2019b). As espécies de *Campylobacter* apresentam diversos mecanismos de resistência aos antimicrobianos de várias classes farmacológicas, e diante da capacidade de transferência de genes entre as espécies, a persistência de micro-organismos resistentes no processamento de alimentos pode ser um grave problema de saúde pública (HULL et al., 2021).

O Brasil é o terceiro maior produtor e maior exportador de carne de frango do mundo (ABPA, 2021). Diante da capacidade de produção, é evidente que o país mantenha este protagonismo a nível mundial, visto que projeções apontam um aumento do consumo de carne de frango no mundo nos próximos anos (OECD/FAO, 2020). Apesar do destaque, é recente a preocupação com a produção desses alimentos seguros quanto a presença ou níveis de *Campylobacter* (BRASIL, 2013), o que provavelmente, contribuiu para a subnotificação da sua presença em produtos cárneos. Embora alguns estudos tenham caracterizado cepas isoladas no Brasil (GOMES et al., 2018; MELO et al., 2021; ROSSI et al., 2021), estudos de cepas de *C. coli* ainda são limitados.

A avaliação do potencial virulento, resistência aos antimicrobianos e epidemiologia de *C. coli* isoladas de carne de frango no Brasil é importante, considerando a alta produção deste alimento para o mercado interno e externo. Caracterizar o potencial virulento e a resistência aos antimicrobianos de cepas isoladas no país auxiliará na escolha e aplicação de medidas preventivas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Objetiva-se com este estudo, determinar o potencial virulento gênico e a resistência fenotípica a antimicrobianos em cepas de *C. coli* isoladas de carcaças de frangos em abatedouros brasileiros sob Inspeção Federal.

2.2 Objetivos específicos

Determinar nas cepas de *C. coli*:

- a prevalência de genes relacionados a virulência: *cdtABC*, *hcp*, *cbrA*, *htrA*, *dnaJ*, *flaA*, *pldA*, *ciaB*, *cadF* e *luxS*;
- a prevalência de genes relacionados com o desenvolvimento de Síndrome de Guillain-Barré: *cstII* e *neuA*;
- os perfis de virulência e multivirulência a partir dos dados genotípicos;
- a relação entre perfis de virulência encontrados por estados, cidades, e estabelecimentos;
- a sazonalidade dos perfis de virulência;
- a resistência aos antimicrobianos eritromicina e ciprofloxacina;
- a correlação entre perfis de virulência e resistência encontrados;
- a disseminação dos perfis de virulência e resistência por meio de um dendrograma baseado na análise proteômica.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Histórico e caracterização de *Campylobacter*

Campylobacter foi reconhecida pela primeira vez por Theodor Escherich em 1886, ao encontrar o patógeno em fezes de crianças (ESCHERICH, 1886), mas foi apenas em 1913 que a primeira cultura pura foi obtida por McFaydean e Stockman, isolada do útero de uma ovelha, que a denominou como "víbrio" (KIST, 1985). Em 1919 foi utilizado o nome *Vibrio foetus* para micro-organismos isolados de aborto em bovinos, e posteriormente foram descritos *V. jejuni* e *V. coli*, isolado de bovinos e suínos (THEOBALD et al., 1920; JONES, 1931; DOYLE, 1944).

O gênero *Campylobacter* foi criado em 1960, caracterizando vibrios microaerófilos diferentes de *Vibrio cholerae*, e posteriormente, Verón e Chaterlain (1937) classificaram as espécies descritas anteriormente como *C. fetus*, *C. jejuni* e *C. coli*.

Campylobacter está entre os quatro patógenos mais incriminados como causadores de doenças diarreicas, sendo a causa bacteriana mais comum de gastroenterite humana no mundo (WHO, 2020). É uma bactéria ubiqüitária no ambiente, considerada parte da microbiota do trato gastrintestinal e reprodutivo de numerosos animais domésticos e silvestres, já tendo sido isolado inclusive, de animais marinhos (MAN, 2011; WHILEY et al., 2013; SHEPPARD; MAIDEN, 2015). As espécies termofílicas *C. jejuni* e *C. coli* são responsáveis pela maioria dos casos de campilobacteriose humana, sendo *C. coli* a segunda espécie mais incriminada como causadora da doença (MOORE, et al., 2005; EFSA, 2019b).

A transmissão para o ser humano ocorre por via oral, e os alimentos mais incriminados na infecção por *Campylobacter* são produtos cárneos crus ou malcozidos, em especial a carne de frango, mas leite não pasteurizado, água, e vegetais contaminados também são relatados (NEIMANN et al., 2003; CDC, 2020). O contato com fezes de cães e gatos já foi relacionado como fonte de infecção (RODRIGUES et al., 2015; MONTGOMERY et al., 2018).

Pertencente à família *Campylobacteraceae*, o gênero *Campylobacter* engloba 41 espécies e 16 subespécies (LPSN, 2020). São bacilos curvos, já apontados como semelhantes a "asa de gaivota", Gram-negativos, com aproximadamente 0,2-0,4µm

x 0,5-5µm, não formadores de esporos, e a maioria das espécies são móveis pela presença de um flagelo polar em uma ou ambas as extremidades (VANDAMME et al., 2005; MAN, 2011). As espécies de *Campylobacter* têm baixo % GC (guanidina-citosina) em seu genoma, e o conteúdo médio para a maioria das espécies varia de 28% a 40% (PRUITT; TATUSOVA; MAGLOTT, 2007).

Campylobacter cresce sob condições microaerofílicas (85% N₂, 3-5% CO₂ e 5%-10% O₂) (KAAKOUSH et al., 2015). As espécies *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* e *C. upsaliensis* são conhecidas como termotolerantes, pois crescem melhor a 42°C, com faixa de temperatura de crescimento entre 30°C a 47°C (ROVIRA et al., 2004). São inativados com um tempo de redução decimal (valor D) de menos de um minuto quando a temperatura atinge 57°C ou mais. O congelamento a temperatura de -15°C após três dias provoca a inativação, embora não elimine o patógeno (SILVA et al., 2011).

A faixa de pH ideal para seu crescimento é entre 5,8 e 8,0 e é inativada em pH menor que 4,9 (GUNTHER; CHEN, 2009). São sensíveis também a atividade de água menor que 0,987 e concentrações de cloreto de sódio maiores que 2% (SILVA et al., 2011).

Em culturas envelhecidas, a bactéria pode retrair seu citoplasma, assumindo uma forma cocóide, o que a leva a um estado conhecido como viável não cultivável (VNC) (ROLLINS; COLWELL, 1986). Nesta forma, o patógeno consegue crescer em condições estressantes como em situações de deficiência de nutrientes, temperaturas adversas, tensão de oxigênio, pH, mudança de osmolaridade e alta pressão, reduzindo sua atividade metabólica.

As espécies de *Campylobacter* termotolerantes não são hemolíticas e são catalase e oxidase positivas (LEVIN, 2007). Não fermentam carboidratos, e dependem principalmente do metabolismo de aminoácidos e intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico para energia. A diferenciação das espécies *C. jejuni* e *C. coli* é realizada com base na hidrólise de hipurato, pois apenas o *C. jejuni* possui a enzima hipuricase (DEBRUYNE et al., 2008).

3.2 Características de *C. coli*

O primeiro isolamento de *C. coli* foi realizado em fezes de suínos que apresentavam diarreia, sendo este o animal considerado como hospedeiro para a espécie (DOYLE, 1948; MILAN et al., 2017). Ainda assim, *C. coli* já foi isolada de várias espécies animais, apresentando alta prevalência em frangos (ROSSLER et al., 2019). De acordo com Dearlove e colaboradores (2016), cepas de *C. jejuni* e *C. coli* que infectam humanos são adaptadas a um estilo de vida generalista, o que dificulta a atribuição de uma fonte principal.

Ainda que bem caracterizada com relação a seus requerimentos para sobrevivência, a espécie *C. coli* apresenta alguns mecanismos de adaptação que permitem a sua sobrevivência sob condições adversas, viabilizando a contaminação de alimentos e infecção humana. A capacidade de crescimento e multiplicação de *C. coli* sob diferentes situações estressantes foi avaliada por Gomes e colaboradores (2018). Alguns isolados apresentaram a capacidade de crescimento a 4°C, viabilidade em meio com 7,5% de NaCl por até duas horas, e ainda, viabilidade em pH 4,5 por duas horas. Apesar do caráter microaerófilo de *C. coli*, alguns estudos demonstraram a existência de cepas aerotolerantes (viáveis após 12 horas em ambientes aeróbios) e hiperaerotolerantes (viáveis após 24 horas em ambientes aeróbios) (O'KANE; CONNERTON, 2017; KARKI et al., 2019).

Diversos pesquisadores relataram sequências de genomas de *Campylobacter* em bancos de dados públicos. No *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) foram depositados 1053 genomas de *C. coli*, onde 40 são completos (NCBI, 2020). O genoma de referência para análises genéticas é da cepa *C. coli* ASM975637v1, que possui o tamanho de 1,74 Mb, e conteúdo % GC (guanidina citosina) de 31,3%. Os genomas completos depositados no NCBI têm tamanho médio de 1,78 Mb (entre 1,66 e 2,13) e GC médio de 31,26% (entre 30,54 e 31,50).

É possível diferenciar na árvore filogenética de *C. coli* três *clades* diferentes: *clade 1*, *clade 2* e *clade 3* (SHEPPARD et al., 2013). A espécie tem dois complexos clonais definidos pela técnica de *Multi-Locus Sequence Typing* (MLST), que são o complexo clonal ST-828, responsável por 70% dos isolados genotipados submetidos ao PubMLST, e o complexo clonal ST-1150, responsável por apenas 2% dos isolados identificados (SHEPPARD et al., 2010). Esses dois complexos clonais, os

quais constituem a maioria dos isolados de amostras clínicas e animais tipificados, estão incluídos apenas no *clade* 1 (SHEPPARD et al., 2013).

Campylobacter tem uma ampla diversidade genética, devido à frequente recombinação de DNA inter e intra-espécies (VIDAL et al., 2016). A transferência horizontal de genes pode introduzir um grande número de polimorfismos simultaneamente, gerando novos fenótipos como rapidez e facilitar a disseminação de genes ligados a virulência e resistência (SHEPPARD; MAIDEN, 2015).

Altos níveis de transferência horizontal de genes foram observados entre *C. jejuni* e *C. coli*. Embora estas espécies sejam 12% divergentes em nível de nucleotídeos, em estudo de Sheppard e colaboradores (2013), até 23% do genoma de *C. coli* do *clade* 1 teve sua origem relacionada a *C. jejuni*, revelando a ocorrência de introgressão. Este evento aumentou a diversidade genética no genoma de *C. coli*. Segundo os autores, uma possível explicação para isto, é a oportunidade para a troca gênica associada à co-colonização de hospedeiros animais pelas duas espécies.

Diante da ausência de *C. coli* do *clade* 2 e do *clade* 3 em infecções humanas, estudos têm sido desenvolvidos para uma melhor compreensão destes isolados. Johansson e colaboradores (2019) avaliaram cepas de *C. coli* isoladas de água em um modelo de infecção *in vitro* em células humanas, e observaram que as cepas do *clade* 3 apresentaram forte efeito citotóxico em cultivo celular. Ao avaliar cepas dos *clades* 2 e 3 isolados de amostras de água na Suécia, Nilsson e colaboradores (2018) identificaram que *C. coli* do *clade* 2 apresentaram genoma significativamente maior que *C. coli* do *clade* 3, com a presença de vários genes relacionados ao metabolismo. A caracterização dos *clades* 2 e 3 ainda é pouco conhecida, e mais estudos devem ser realizados para uma melhor compreensão da epidemiologia destas cepas.

3.3 Fontes de contaminação de *C. coli*

A transmissão de *Campylobacter* ocorre por via fecal oral, onde os alimentos são contaminados pelo patógeno. Os principais alimentos apontados como fonte de infecção são os de origem animal, como produtos cárneos crus ou malcozidos e leite não pasteurizado, além de água não tratada (CDC, 2020).

As fontes de infecção são caracterizadas ao nível da população, e a análise genética por meio do MLST ajuda a atribuir fontes de infecção clínica explorando diferenças na frequência de cepas de *Campylobacter* que vivem em diferentes reservatórios animais e ambientais (MCCARTHY et al., 2007).

C. coli já foi isolada do trato gastrointestinal de uma grande variedade de animais, incluindo animais domésticos como perus, patos, frangos, bovinos, ovinos, caprinos, suínos, cães, gatos, aves silvestres e primatas não humanos (FITZGERALD, 2015; RODRIGUES et al., 2015; COSTA; IRAOLA, 2019). As espécies termotolerantes expressam diferentes genes de virulência que permitem a colonização seletiva de cada hospedeiro (BANG et al., 2003). O patógeno já foi identificado também em lagos e rios (SZCZEPANSKA et al., 2017).

A espécie é frequentemente isolada de suínos (MILAN et al., 2017). Em trabalhos em que foram realizadas metanálises a nível mundial, as maiores prevalências de *C. coli* foram observadas em suínos e frangos (ROSSLER et al., 2019; ZBRUN et al., 2020). Uma justificativa para este fato é a intensificação da produção, mais observada nessas espécies (KARESH et al., 2012).

A contaminação de água por *C. coli* é bem documentada. Em estudo realizado na Holanda, 66,0% (230/348) das amostras de água analisadas foram positivas para *Campylobacter*, e destas, 74,0% (304/411) foram identificadas como *C. coli* (MULDER et al., 2020). A principal fonte atribuída à contaminação foi associada a aves silvestres, seguida de frangos, e nenhuma correlação foi feita com suínos. Em regiões de alta produção de frango, foi observada uma correlação maior da contaminação por *C. coli* com esta fonte, reafirmando que as aves são importantes na disseminação da doença.

3.4 *Campylobacter* e a cadeia de frango brasileira

A carne de frango é uma fonte de proteína, vitaminas e minerais de alta qualidade, muitas vezes escolhida por consumidores por seu menor preço, sabor agradável, e ainda, menor tempo requerido para preparo (SILVA et al., 2011). É a mais consumida no mundo, e projeções apontam que no ano de 2029, o consumo será de aproximadamente 144.874 milhões de toneladas (OECD/FAO, 2020).

O Brasil é um país privilegiado para produção de alimentos, pois a oferta de grãos e o clima favorecem esta atividade. Segundo o relatório da Associação

Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2021), o país é o terceiro maior produtor de carne de frangos do mundo, e em 2020, produziu 13.845 milhões de toneladas deste alimento, ficando atrás apenas da China e dos Estados Unidos. Deste volume, 31% da produção foi destinada à exportação, colocando o país como o maior exportador do mundo. A região Sul foi responsável por 64,43% dos abates e 79,93% da exportação de carne de frango.

Diante da importância do Brasil para o fornecimento de carne de frango para diversos países, a entrega de produtos que não representem risco à saúde dos consumidores é imprescindível. Monitorando a tendência brasileira, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu no ano de 1994, o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), por meio da Portaria nº 193/1994, com o objetivo de prevenir e controlar as enfermidades de interesse em avicultura e saúde pública, definiu ações que possibilitassem a certificação sanitária do plantel avícola nacional e favorecessem a elaboração de produtos avícolas inócuos para o mercado interno e externo (BRASIL, 1994).

A Portaria SDA nº 17/2013 criada pelo MAPA com suporte da Comissão Científica Consultiva em Microbiologia de Produtos de Origem Animal possuiu como objetivo de aumentar a segurança alimentar. Segundo ela, a carne de frango exportada para a Europa deve estar de acordo com as normas dos Regulamentos da União Europeia (BRASIL, 2013).

Em 2017, a Comissão Europeia publicou o Regulamento (CE) 1495/2017, que estabeleceu critérios para controle de *Campylobacter*, onde o padrão limite foi de 1000 UFC/g do alimento (EC, 2017). Assim, o MAPA publicou, em 2017, o memorando nº 218/2017/CRISC/CGPE/DIPOA/MAPA/DAS/MAPA, o qual propôs a pesquisa e quantificação de *Campylobacter* em carcaças de aves em estabelecimentos sob Inspeção Federal (SIF) nos estados da região Sul do Brasil, com a finalidade de realizar um estudo exploratório para gerenciamento do risco da presença deste patógeno.

A cadeia produtiva de frango é composta por vários estágios que englobam a produção primária nas propriedades rurais, transporte ao abatedouro, o abate e processamento dos produtos cárneos, a venda e o preparo e consumo nas residências e restaurantes. A colonização dos frangos por *Campylobacter* pode ocorrer ao longo de toda a produção, e a prevalência do agente nas fazendas reflete

na presença do patógeno nas carcaças dos animais e outros alimentos derivados desta (SKARP; HÄNNINEM; RAUTELIN, 2016).

Em granjas avícolas, as espécies de *Campylobacter* podem ser isoladas e disseminadas por animais silvestres e domésticos, moscas, pessoas, solo, fontes de água, poeira, veículos, superfícies de utensílios e instalações (NYLEN et al., 2002; BULL et al., 2006; SILVA et al., 2011; ELLIS-IVERSEN et al., 2012; MUGHINI-GRAS et al., 2016). Besouros, lesmas e moscas podem transportar *Campylobacter* como vetores mecânicos (SKOV et al., 2004; SPROSTON et al., 2010).

A influência da cama e da ração utilizadas nos aviários na epidemiologia da doença foi avaliado por Zhang e colaboradores (2016), que demonstraram que a cama com excesso de umidade influencia na sobrevivência e disseminação de *C. jejuni*. Apesar de *Campylobacter* ser sensível à dessecação (BULL et al., 2006), a ração pode funcionar como fonte de contaminação das aves. Alves e colaboradores (2016) demonstraram que *C. jejuni* pode sobreviver e multiplicar em rações iniciais e finais por até cinco dias. A hipótese levantada pelos autores é que isto acontece devido a ração ser rica em peptídeos e aminoácidos, que são nutrientes essenciais para a sobrevivência do patógeno.

A colonização dos frangos por *Campylobacter* é associada à transmissão horizontal na fazenda (CARRILLO et al., 2004). A transmissão vertical é rara, mas já foi demonstrada por Rossi e colaboradores (2012), que administraram *C. coli* por via intraesofágica em galinhas reprodutoras e identificaram, a partir de análise molecular, o patógeno em embriões.

A transmissão no aviário ocorre rapidamente após a colonização de um animal, sendo os locais primários de colonização o intestino delgado e ceco (CARRILLO et al., 2004). Um lote geralmente é identificado como positivo após duas semanas da colonização (SKARP; HÄNNINEM; RAUTELIN, 2016). O material fecal de frangos já colonizados representa uma fonte de contaminação para o ambiente e água, já que *Campylobacter* pode sobreviver em fezes de frangos por até seis dias (AHMED; SCHULZ; HARTUNG, 2013). O lote pode ser colonizado por uma ou várias cepas simultaneamente, dependendo do nível da biossegurança da propriedade (JORGENSEN et al., 2011).

Alguns fatores foram relacionados com a positividade por *Campylobacter* em lotes de frangos nas propriedades rurais. Entre eles, se destacam temperaturas elevadas, a idade de aves no abate (maior que 36 dias), o estado de saúde do lote e

um maior número de aviários nas propriedades (LAWES et al., 2012; AGUNOS et al., 2014; HIGHAM et al., 2018).

O sistema de produção também afeta a prevalência de *Campylobacter* nas propriedades. Segundo Hendrixson e DiRita (2004), criações orgânicas são mais propensas a colonização por este patógeno. Isto ocorre, provavelmente, pela exposição dos animais a diferentes fontes da bactéria no ambiente. A prevalência de *Campylobacter* termotolerantes em criações orgânicas é três vezes maior quando comparada a criação convencional (ROSENQUIST et al., 2013).

O transporte até o abatedouro é um período crítico, pois aumenta o estresse dos animais, reduzindo a imunidade e fazendo com que as aves aumentem a eliminação de *Campylobacter* (WHYTE et al., 2001). Fatores estressantes como a prática do jejum antes do transporte e a lotação de gaiolas, podem levar a mudanças no ambiente intestinal, o que pode favorecer o crescimento de algumas populações de organismos em detrimento de outras (ROSSLER et al., 2019). Quando defecam durante o transporte, os animais contaminam suas penas e as caixas, o que aumenta a disseminação do patógeno (RIDLEY et al., 2011; KEENER et al., 2004).

Em um estudo realizado por Melo e colaboradores (2019a) em suínos, foi observado um aumento no número de animais que excretavam *Campylobacter* em fezes coletadas no abatedouro, quando comparadas com amostras coletadas na fazenda.

O abate das aves é um ponto de risco para a contaminação das carcaças. Durante o processamento no abatedouro, os estágios de remoção das penas, sangramento, evisceração, lavagem e resfriamento são considerados críticos no processo (SELIWIORSTOW et al., 2016). O trato intestinal de galinhas, em especial ceco e cólon, pode abrigar um grande número de *Campylobacter*, e caso seja rompido durante o processamento, o conteúdo pode contaminar a pele e a carcaça (BERRANG et al., 2001).

Vários alimentos são comercializados ao fim do processamento nas indústrias, tais como carcaças inteiras frescas ou congeladas, cortes e porções. O risco de contaminação diverge em cada um deles, pois geralmente porções que incluem pele contêm contagens de *Campylobacter* maiores quando comparadas com cortes sem pele (BIOHAZ, 2011). Mesmo sob condições de armazenamento em temperatura refrigerada a 4°C, a bactéria é capaz de persistir na carcaça (SIMMONS; GIBBS, 1979).

A transferência de *C. jejuni* e *C. coli* da carne de frango contaminada para tesouras, facas e tábuas durante o processamento foi demonstrada por Sarjit e Dykes (2017). O patógeno foi capaz de sobreviver após enxague com água e secagem com pano de prato, o que demonstra que os perigos de disseminação e infecção humana ocorre em restaurantes e residências.

3.4.1 Medidas de prevenção

Devido à alta plasticidade e capacidade de adaptação de *Campylobacter* em diferentes condições ambientais, e sua alta variabilidade genética, várias abordagens são necessárias para o controle deste patógeno (GARCÍA-SANCHEZ et al., 2018).

A redução da contaminação na fazenda é importante, pois é a porta de entrada do agente em um lote. A primeira linha de intervenções é a melhoria de biossegurança, para impedir a transmissão para dentro dos aviários (SKARP; HÄNNINEM; RAUTELIN, 2016). Medidas de biossegurança nos aviários, incluindo o controle do acesso de pessoas, o uso de barreiras para pássaros, insetos e outros animais, a cloração da água, limpeza e desinfecção nos intervalos entre lotes e instalação de barreiras sanitárias nas entradas são recomendadas para a prevenção de *Campylobacter* na produção primária (BIOHAZ, 2011; BAHRNDORFF et al., 2013; SORO et al., 2020).

Durante o intervalo de alojamento entre lotes, as instalações devem ser higienizadas para retirar materiais contaminados, e diferentes biocidas estão disponíveis comercialmente. Battersby e colaboradores (2017) avaliaram o uso de desinfetantes isolados e combinados para eliminação de *Campylobacter* no ambiente. A nebulização térmica com combinações de peroximonossulfato de potássio, ácido sulfâmico e cloreto de sódio (5%), glutaraldeído e quarternário de amônio (0,3%) se mostraram eficazes na descontaminação do ambiente (BATTERSBY et al., 2017).

A transmissão de *Campylobacter* entre lotes a partir de um aviário contaminado foi relacionada a má higienização dos bebedouros, intervalo de tempo entre lotes insuficiente, falta de conhecimento de servidores, uso de métodos de limpeza inadequados e resistência aos desinfetantes (AGUNOS et al., 2014). Medidas de biossegurança em fazendas demonstraram a capacidade de reduzir a

probabilidade de colonização das aves por *Campylobacter* entre em 53% e 86% (GEORGIEV; BEAUVAIS; GUITIAN, 2016).

Adicionalmente, a práticas higiênicas, a saúde e o bem-estar animal também foram associados à colonização por *Campylobacter*, pois a redução do estresse nas aves promove a redução do risco de infecção (ALPIGIANI et al., 2017; IANNETTI et al., 2020).

Com relação ao transporte dos animais, Facciolà e colaboradores (2017) ressaltaram que medidas como redução no tempo de transporte, submissão dos animais a um jejum antes do transporte, além de adequada limpeza e desinfecção de gaiolas podem reduzir o risco de transmissão.

Estratégias para reduzir a colonização em aves com base na administração de produtos diretamente nos animais vêm sendo estudadas nos últimos anos, e envolvem uso de aditivos naturais e sintéticos, bacteriocinas, bacteriófagos, probióticos e vacinação.

Ácidos orgânicos podem ser administrados em água de bebida e ração de frangos para reduzir e controlar a colonização de *Campylobacter*, pois tem potencial de reduzir o pH intestinal, aumentar a imunidade e prevenir a ligação entre *Campylobacter* e receptores de células epiteliais por exclusão competitiva (MORTADA et al., 2020; LU et al., 2020).

Alguns estudos foram desenvolvidos para controle da colonização de *Campylobacter* em frangos, com o uso de compostos naturais e sintéticos, administração de tirosina férrica, ácido beta resorcílico e ácidos graxos de cadeia curta. Os resultados foram positivos e capazes de reduzir as contagens de *Campylobacter*, sem interferir na qualidade da carne (CHEMALY et al., 2015; WAGLE et al., 2017; SKOUFOS et al., 2019).

As bacteriocinas são compostos bacterianos sintetizados por determinadas bactérias com efeitos bactericidas ou bacteriostáticos em outras, promovendo a destruição de outras espécies sem causar danos no hospedeiro (SVETICH; STERN, 2010; SORO et al., 2020). A bacteriocina de *Lactobacillus salivarius* foi relatada como capaz de reduzir as contagens intestinais de *C. jejuni* em frangos de corte (STERN et al., 2006). Soro e colaboradores (2020) salientam que embora possam representar uma boa alternativa, o risco de resistência de *Campylobacter* a bacteriocinas existe e deve ser melhor avaliada.

Os bacteriófagos são vírus parasitas que podem ser utilizados para atingir e matar patógenos bacterianos específicos sem danificar a microbiota local, e também têm sido estudados para o biocontrole de *Campylobacter* (SORO et al., 2020). Vários autores têm estudado a aplicação de bacteriófagos via ração ou água para reduzir *Campylobacter* em frangos, e obtiveram resultados positivos na redução dos níveis de *C. jejuni*, utilizando um ou mais bacteriófagos (LOC-CARRILLO et al., 2005; WAGENAAR et al., 2005; EL-SHIBINY et al., 2009). Porém, segundo Kogut e colaboradores (2018), *Campylobacter* pode desenvolver resistência ou adquirir genes de virulência devido à incorporação destes vírus na microbiota do frango.

Foi demonstrado que os números de *Campylobacter* geralmente retornam ao nível anterior pré-tratamento após dois ou quatro dias de administração de bacteriófagos, o que pode ser explicado pela resistência a terapia fágica, fazendo desta uma estratégia a curto prazo (HERMANS et al., 2011; FEDEREGHI, 2017). O uso de bacteriófagos imediatamente antes do abate e o uso de coquetel com vários fagos foram sugeridos para um melhor controle (HERMANS et al., 2011; FISCHER et al., 2013).

Probióticos são micro-organismos que podem melhorar as interações imunológicas e digestão de nutrientes no trato gastrintestinal (SMIALEK; BURCHARDT; KONCICKI, 2018). Probióticos podem ser alternativas para inibir a colonização por *Campylobacter* de maneira preventiva ou curativa, e alguns estudos apoiam o uso de cepas isoladas ou em misturas comerciais com resultados positivos (GHAREEB et al., 2012; NISHIYAMA et al., 2014; ARSI et al., 2015; SAINT CYR et al., 2017). A adição de probióticos na ração ou água de bebida de frangos pode prevenir ou reduzir a colonização, particularmente em pintinhos cujo sistema imunológico não está bem desenvolvido (KOGUT, 2018).

Apesar de esforços para desenvolvimento de vacinas, ainda não há nenhuma opção comercialmente disponível (GRAHAM; JOCHUM; MELLATA, 2020). A dificuldade de distinção entre cepas vacinais e cepas patogênicas quando utilizadas vacinas vivas administradas por via oral inviabilizam seu uso. Assim, foi sugerido o uso de outras espécies bacterianas geneticamente modificadas para expressar antígenos de *Campylobacter* conservados (LAYTON et al., 2011; NOTHAFT et al., 2017), porém, uma limitação a esta estratégia é que a antigenicidade é bastante variável entre as cepas, tornando a identificação de um alvo conservado difícil.

As intervenções nos abatedouros também são alvo de estudo na prevenção de *Campylobacter*. A adesão ao Programa de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) durante o processamento podem reduzir ou até mesmo prevenir a contaminação por *Campylobacter* (ALLOS, 2001). A segregação de lotes positivos e negativos no abatedouro pode diminuir a contaminação cruzada (SILVA et al., 2011).

O uso de métodos físicos e químicos foi estudado para redução de contagens de *Campylobacter* nas carcaças. A escaldagem em água quente em temperaturas entre 60°C e 85°C demonstraram reduções de 1,3 a 2 log UFC/g nas contagens nas carcaças (YANG; LI; JOHNSON, 2001; WHYTE; MCGILL; COLLINS, 2003). O uso do vapor em temperaturas de 90°C por 24 segundos e 100°C por 5 segundos, também foi capaz de reduzir as contagens (WHYTE et al., 2003; CHAINE, 2013), porém, este tratamento causa mudanças na cor e textura nas carcaças, o que pode levar a rejeição do consumidor.

O resfriamento a ar e a imersão em água gelada são métodos utilizados em abatedouros para reduzir a temperatura das aves e diminuir as contagens bacterianas (SORO et al., 2020). Ao comparar a eficácia dos dois métodos na redução de contagens de *Campylobacter*, Huezo e colaboradores (2007) concluíram que possuem eficiência similar.

O uso de aditivos químicos na água pode melhorar a eficiência do resfriamento danificando as células bacterianas e prevenindo contaminação cruzada (NAGEL et al., 2013). Já foi testada a imersão em água com ácido peracético, cloro e nitrogênio líquido com resultados favoráveis (CHEN et al., 2014; BURFOOT et al., 2016).

O uso do congelamento rápido e lento também foi testado na redução das contagens de *Campylobacter* em carcaças. O congelamento lento foi mais eficaz, porém, os cristais de gelo podem afetar as propriedades de qualidade da carne (GEORGSSON et al., 2006; BOYSEN; ROSENQUIST, 2009).

O uso de substâncias antimicrobianas na carne, tais como ácido láctico, ácido cáprico, fosfato trissódico, arginato láurico e ácido tartárico, foram avaliados e os resultados mostraram redução entre 1 e 3,8 log UFC/g de *Campylobacter* em carne de frango (BIRK et al., 2010; RAJKOVI C et al., 2010; CHAINE et al., 2013; KOOLMAN et al., 2014; NAIR et al., 2014). Porém, há preocupação de que estes tratamentos possam afetar os atributos sensoriais, causando alterações inaceitáveis

para o consumidor. Além disso, essa tecnologia não foi aprovada em diversos países (BIOHAZ, 2011).

Embalagens com atmosfera modificada representam uma alternativa viável na redução das contagens de *Campylobacter*, (BOYSEN et al., 2009). A eficácia pode ser elevada a partir da combinação desta tecnologia com refrigeração e substâncias antimicrobianas (GONZÁLEZ; HÄNNINEN, 2011; PISKERNIK et al., 2011).

No varejo, carnes pré-embaladas temperadas são estratégias que reduzem o risco de contaminação durante o manuseio (GONZÁLEZ; HÄNNINEN, 2011). Práticas como limpeza rigorosa de utensílios e temperatura de refrigeração adequadas podem limitar a contaminação cruzada e, portanto, reduzir a presença de *Campylobacter* em cortes de frango (GARCÍA-SANCHEZ et al., 2018).

Os riscos para o consumidor podem ser reduzidos ao evitar contaminação cruzada de alimentos prontos para o consumo pelo uso de tábuas, facas e mãos durante o preparo, bem como o aquecimento dos alimentos antes do consumo em temperaturas que destruam o patógeno (SKARP; HÄNNINEM; RAUTELIN, 2016).

3.5 Epidemiologia

Campylobacter foi responsável por 160 milhões de casos de gastroenterite de origem alimentar por ano no mundo (KIRK et al., 2015). De acordo com o CDC, são diagnosticados aproximadamente 20 casos de campilobacteriose por 100.000 habitantes nos Estados Unidos, com estimativa de 1,5 milhões de pessoas infectadas por ano (CDC, 2020). Já na União Europeia, em 2018, foram reportados, 246.571 casos de campilobacteriose a EFSA (2019a) e na Austrália, foram notificados 130,5 casos por 100.000 habitantes em 2018 (WALLACE et al., 2020).

Estima-se que a infecção por este patógeno seja uma das principais causas de morbidade e mortalidade em países de baixa e média renda; porém, os casos de infecção nesses locais são subnotificados, principalmente porque a confirmação da doença pelo método de cultivo ainda é desafiador (SHEPPARD; MAIDEN, 2015).

Em uma metanálise realizada em nível mundial, a prevalência de *Campylobacter* spp em produtos de origem animal foi de 29,5% (ZBRUN et al., 2020). A América do Norte, África e Europa mostraram as maiores prevalências e o continente asiático mostrou menor prevalência. Ainda, segundo o mesmo estudo, 9,7% dos isolados foram idênticas como *C. coli*.

Com relação a espécie animal, *C. coli* foi mais prevalente em frangos (14,1%), e a carne deste animal foi apontada como a principal fonte de *Campylobacter* spp (43% a 52,3%). Carne de frango é considerada a principal fonte de campilobacteriose humana, seguida por carne e leite de bovinos, e fontes ambientais (RAVEL et al., 2017; ROSNER et al., 2017; AN et al., 2018; THEPAULT et al., 2018). O consumo de carne de porco é apontado como causador de campilobacteriose por *C. coli* em humanos (ROSNER et al., 2017). Mesmo que a prevalência de *C. coli* em suínos seja alta, alguns estudos encontraram uma baixa associação dos isolados suínos a isolados humanos (ROSNER et al., 2017; HARRISON et al., 2021).

A principal espécie envolvida em casos de campilobacteriose é *C. jejuni*, responsável por 80-85% dos casos, seguida por *C. coli*, que responde por 10-15% dos casos (MOORE et al., 2005; EFSA, 2019b). Porém, dados de 2017, apontam que 24,1% dos casos de campilobacteriose confirmados na União Europeia foram causados por *C. coli* (EFSA, 2019b). Da mesma maneira, no Equador, *C. coli* (68,7% - 167/243) foi mais prevalente que *C. jejuni* (12,4% - 30/243) em amostras de cecos de frangos positivos para *Campylobacter* spp. (VINUEZA-BURGOS et al., 2017).

Ainda que *C. jejuni* seja mais prevalente do que *C. coli* como causa da campilobacteriose humana, é importante ressaltar que as duas espécies são intimamente relacionadas, e compartilham aproximadamente 86,5% de homologia gênica em sequência de nucleotídeos (DINGLE et al., 2005). Um alto nível de transferência interespecie de material genético entre *C. jejuni* e *C. coli* já foi demonstrado, e as espécies podem modular seu genoma para melhor adaptação às mudanças ambientais (SHEPPARD et al., 2008; MELO et al., 2019b; GOLZ et al., 2020).

Com relação à sazonalidade de casos e/ou surtos, picos de incidência de campilobacteriose foram relacionados às estações quentes e úmidas (JORE et al., 2010; ASMAI et al., 2020). Já em relação à contaminação ambiental, em especial aquático, Strakova e colaboradores (2021) pesquisaram a presença de *C. coli* em águas superficiais e águas residuais na República Tcheca por um ano, e encontraram maior prevalência deste patógeno durante a estação do outono (setembro a dezembro). Outros estudos apresentaram o mesmo resultado (NYGÅRD et al., 2004; MULDER et al., 2020). Uma hipótese é que as cepas isoladas de águas residuais poderiam ser provenientes da excreção da população

humana, principalmente durante o verão, período em que a campilobacteriose é mais prevalente; já as águas superficiais poderiam ser contaminadas por animais silvestres e dejetos das propriedades rurais.

3.6 Manifestações clínicas e complicações

O aparato virulento do patógeno e a susceptibilidade do hospedeiro são fatores determinante para a ocorrência da campilobacteriose humana. No desenvolvimento da campilobacteriose, o período de incubação é de dois a cinco dias, variando de um a dez dias (SKARP; HÄNNINEM; RAUTELIN, 2016; CDC, 2020). Antes da fase aguda, no período de incubação, cerca de 30% dos pacientes podem apresentar uma fase prodrômica, com febre, mialgia, tonturas e dores de cabeça (JANSSEN et al., 2008). A presença desta fase antes dos sintomas gastrintestinais foi associada a uma doença mais grave (BLASER; ENGBERG, 2008).

Na fase aguda há predominância de sintomas gastrintestinais, que são indistinguíveis entre *C. jejuni* e *C. coli*, e os mais comuns são diarreia com muco ou sangue, dor abdominal, febre, náusea e mais raramente vômitos (ALLOS, 2001; CDC, 2020). A presença de sangue nas fezes é resultado da invasão do epitélio intestinal, que leva a lesões inflamatórias e dano à mucosa. A dor abdominal é uma característica marcante, e ela pode se tornar intensa, sendo o motivo mais frequente de admissão de pacientes infectados nos hospitais (BLASER; ENGBERG, 2008). A duração dos sintomas é de geralmente entre três e sete dias (SKARP; HÄNNINEM; RAUTELIN, 2016; WHO, 2020).

Embora possa ocorrer em pacientes de qualquer idade, os sinais clínicos podem variar em determinadas faixas etárias. Neonatos infectados geralmente apresentam diarreia sanguinolenta, sem episódios de febre, e crianças podem sofrer desidratação e convulsão (MOORE et al., 2005; FITZGERALD, 2015). Idosos, imunodeprimidos, ou pacientes com doenças como diabetes, cirrose, câncer e infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), possuem risco elevado de desenvolver uma infecção mais grave (MOORE et al., 2005).

Após três a quatro dias de sintomas clínicos, o quadro diarreico começa a diminuir, mas ainda assim, a dor abdominal pode persistir (BLASER; ENGBERG, 2008). A doença é autolimitante, sendo necessário apenas repouso e hidratação na maioria dos casos; porém a terapia antimicrobiana pode ser recomendada nos casos mais graves. A recuperação ocorre dentro de uma semana, e os pacientes que não se submeteram ao tratamento com antimicrobianos podem excretar fezes contaminadas por aproximadamente três semanas (SALLAM, 2007).

Algumas complicações no trato gastrointestinal foram relacionadas a campilobacteriose. Dentre elas, foram relatadas doença periodontal, doenças esofágicas, colecistite e câncer de colon (KAAKOUSH et al., 2015). A infecção também foi relacionada a síndrome do intestino irritável pós infecção, caracterizada por uma dor abdominal recorrente pós infecção, e doença inflamatória intestinal, descrita como inflamação do cólon e intestino delgado (CONNERTON; CONNERTON, 2017).

Alguns casos mais graves de campilobacteriose causada por *C. coli* se destacam. Uma cepa multirresistente causou um surto de gastroenterite em motoristas de taxi na China, e os pacientes apresentaram febre, diarreia, dor abdominal, vômito e dor de cabeça (LI et al., 2020). Outro episódio de campilobacteriose com complicações foi associada a *C. coli*, onde uma paciente desenvolveu megacólon tóxico e levou a múltipla falência de órgãos (CLARCK; MURRAY, 2020). Já uma cepa multirresistente causou enterocolite persistente em um paciente com agramaglobulinemia ligada ao cromossomo X (DAN; PARIZADE, 2020).

Manifestações extra-intestinais também têm sido relacionadas a episódios de campilobacteriose, e já foram descritos casos de bacteremia, sepse, meningite, celulite e aborto espontâneo (MAN, 2011; KAAKOUSH et al., 2015). Bactérias do gênero *Campylobacter* são invasivas e capazes de translocar e atingir o fluxo sanguíneo, levando a quadro de septicemia (FITZGERALD, 2015). Um caso de peritonite bacteriana espontânea por *C. coli* foi recentemente descrito em um paciente com cirrose e diabetes (WANG et al., 2020). Em outro caso, um paciente que relatou diarreia após o consumo de carne de frango malcozida, apresentou infecção em prótese articular do quadril, e *C. coli* foi apontado como o agente infeccioso causador (SUAREZ et al., 2019)

Outras complicações pós-infecção já foram relacionadas a infecção por *C. jejuni*, como Síndrome de Reiter (SR), Síndrome de Miller Fischer (SMF) e Síndrome de Guillain Barré (SGB) (KAAKOUSH et al., 2015; CONNERTON; CONNERTON, 2017). A SR ou artrite reativa é caracterizada por sintomas que incluem inflamação das articulações maiores, por uma resposta auto-imune, a qual já foi relacionada a infecção (CONNERTON; CONNERTON, 2017). Na SMF são observadas ataxia e oftalmoplegia pela fraqueza dos músculos oculares (MOORE et al., 2005; CONNERTON; CONNERTON, 2017).

A SGB é uma desordem autoimune do sistema nervoso periférico que afeta nervos motores, sensoriais e autonômicos, que levam a fraqueza muscular e paralisia ascendente. O desenvolvimento desta síndrome também já foi associado a infecção por *C. jejuni* (MOORE et al., 2005). Segundo o CDC (2020), cerca de 1 em cada 1000 casos de campilobacteriose levam a SGB, e até 40% dos casos de SGB nos Estados Unidos são desencadeados por este patógeno. Em estudo de Walter e colaboradores (2020) foi encontrada uma incidência de 21,5 casos de SGB para 100.000 casos de *Campylobacter*, indicando que ao menos 5% dos casos de SGB podem ser atribuídos a infecção.

3.7 Diagnóstico

Diante das exigências para sobrevivência de *Campylobacter* termotolerante, o seu diagnóstico através de técnicas de isolamento representa um desafio. O primeiro passo para o isolamento deste patógeno foi a elaboração do meio Skirrow, composto por peptonas, sangue de cavalo e antibióticos; estes ingredientes se tornaram a base para a maioria dos meios de isolamento de *Campylobacter* (SKIRROW, 1977).

Nos dias atuais, diferentes meios de enriquecimento (Bolton, Preston) e de isolamento (Skirrow, *Modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar* - mCCDA, *CampyFood Agar Method* - CFA) estão disponíveis para recuperação de *Campylobacter* de diferentes amostras. Os meios de enriquecimento são recomendados quando há baixo número de *Campylobacter* na amostra (OIE, 2008). O mCCDA representa um diferencial, pois trata-se de um meio sem base sanguínea (CORRY et al., 1995).

Com base nos diversos meios disponíveis, algumas metodologias foram propostas objetivando padronizar as técnicas de isolamento e contagem de *Campylobacter*, e hoje, a ISO 10272 (ISO, 2017) é indicada para laboratórios que trabalham com estes patógenos. Por este documento, é possível investigar o patógeno de acordo com diversos testes, como catalase, motilidade e oxidase.

Diferentes técnicas têm sido utilizadas na identificação de *Campylobacter*, e uma delas é a espectrometria de massas. Por esta técnica, uma amostra é ionizada através do bombardeamento de elétron, e as moléculas ionizadas são separadas de acordo com a razão massa pela carga (m/z) ao passarem por um campo elétrico ou magnético (WATSON; SPARKMAN, 2007). Ao passar por este campo, íons que possuem a mesma razão m/z sofrem o mesmo tipo de alteração na velocidade, pela influência do campo. Assim, os íons são detectados por um mecanismo que identifica as partículas carregadas, amplificam o sinal e geram correntes elétricas, que são processadas por softwares específicos que transformam o sinal elétrico em espectro de massas.

A fonte de ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI), permite dessorção de peptídeos e proteínas a partir de diversas células, inclusive bacteriana (RUELLE et al., 2004), e consegue analisar moléculas de massas elevadas, misturas complexas com elevada sensibilidade mesmo em pequena quantidade de amostras (SIUZDAK, 2006). O analisador Time-of-Flight (TOF) parte do princípio do tempo de voo pelo campo de comprimento conhecido, onde moléculas leves chegam primeiro ao detector de sinal, quando comparadas a moléculas mais pesadas (WATSON; SPARKMAN, 2007).

A técnica de MALDI-TOF tem contribuído na microbiologia, em especial, na microbiologia de alimentos, pois possibilita identificação de espécies bacterianas através da comparação dos espectros de massas obtidos com espectros de espécies de referência (JADHAV et al., 2018). Para o gênero *Campylobacter*, Mandrell e colaboradores (2015) padronizaram a técnica para identificação de seis espécies (*C. coli*, *C. jejuni*, *C. helveticus*, *C. lari*, *C. sputorum* e *C. upsaliensis*), determinando as proteínas biomarcadoras. Em comparação com métodos convencionais, o MALDI-TOF apresentou, na identificação de espécies do gênero

Campylobacter, acurácia similar a PCR e superior aos métodos fenotípicos (BESSEDE et al., 2010; LAWTON et al., 2018).

Porém, ao utilizar dados proteômicos óbitos através de análise MALDI-TOF para construir um dendrograma em cepas de *C. jejuni*, Lawton e colaboradores (2018) notaram que o dendrograma não concordou com a árvore construída a partir da análise filogenética com dados obtidos de sequenciamento genômico total. Este fato foi correlacionado pelos autores a diferença entre os métodos, pois através do MALDI-TOF foi realizada uma análise de proteínas (ribossomais principalmente), e o sequenciamento analisou sequências e fragmentos de DNA.

3.8 Virulência e mecanismos de adaptação

Para que *Campylobacter* desenvolva uma infecção e cause doença, é necessário que seja capaz de sobreviver aos estresses fisiológicos gerados nos ambientes. Este patógeno exibe uma ampla variedade de genes, o que auxiliam na adaptação a diferentes ambientes e também na infecção do hospedeiro (DASTI et al., 2010; GARCÍA-SANCHEZ et al., 2018).

Vários fatores de virulência estão envolvidos na patogênese da campilobacteriose. A colonização do hospedeiro requer motilidade, quimiotaxia, adesão, invasão e produção de determinadas toxinas para a invasão, causar doença e evadir do sistema imune (GARCÍA-SANCHEZ et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2019). A aquisição de ferro, o mecanismo de *quorum sensing*, a defesa ao estresse térmico, e a capacidade de formar biofilmes também são considerados fatores de virulência importantes para o gênero (FERNANDES et al., 2010).

Embora o mecanismo exato da infecção de humanos ainda não seja totalmente conhecido, Konkel e colaboradores (2001) descreveram três etapas básicas. Inicialmente ocorre a colonização do intestino, em especial as criptas da mucosa intestinal. Depois, a adesão a proteínas do epitélio do hospedeiro é realizada, seguida da invasão das células intestinais e translocação da bactéria. Assim, *Campylobacter* se multiplica na mucosa intestinal, e em seguida, libera toxinas que causam necrose das vilosidades intestinais, o que leva a perda de função e aberturas de barreiras de proteção e junções celulares, induzindo a inflamação, liberação de eletrólitos ao lúmen intestinal, e posterior diarreia.

A motilidade e quimiotaxia são essenciais para que *Campylobacter* colonize células do hospedeiro e desenvolva a doença. *C. coli* é móvel por um ou dois flagelos polares, que junto ao formato helicoidal, produz um movimento de saca-rolhas, que confere a habilidade do patógeno de penetrar na camada mucosa (GUERRY, 2007; CONNERTON; CONNERTON, 2017). O flagelo atua na motilidade, quimiotaxia, adesão, secreção de proteínas relacionadas à virulência, autoaglutinação, formação de biofilme e evasão do sistema imune (GUERRY, 2007).

Os flagelos polares são compostos por corpo basal, gancho e filamento. O filamento é composto por duas flagelinas homólogas de 59 kDA, codificadas pelos genes *flaA* e *flaB*. A flagelina de *Campylobacter* é diferente de outras bactérias, pois não contém sítios de reconhecimento TLR5, que dificultam o reconhecimento da célula bacteriana pelo hospedeiro (ANDERSEN-NISSEN et al., 2005).

A quimiotaxia é o processo pelo qual o movimento de um organismo é motivado pelo estímulo químico de atração ou repulsão a ele (KRELING et al., 2020). *Campylobacter*, por meio da quimiotaxia, detecta e migra em direção a ambientes ricos em nutrientes; as mucinas e glicoproteínas são quimioatraentes para este patógeno (CONNERTON; CONNERTON, 2017). O sistema quimiotático de *Campylobacter* está ligado ao flagelo, e sem a capacidade de quimiotaxia controlada, a bactéria seria eliminada pelos movimentos peristálticos do hospedeiro (KOROLIK, 2019).

Após ultrapassar a camada de muco, *Campylobacter* necessita se aderir ao epitélio intestinal do hospedeiro para posterior colonização. O patógeno possui adesinas que podem influenciar ou mediar a adesão bacteriana a diferentes estruturas celulares em diferentes hospedeiros (RUBINCHIK et al., 2012). Uma importante e conhecida adesina é a CadF (proteína de adesão a fibronectina – 37 kDA), codificada pelo gene *cadF*, localizada na membrana externa, que se liga ao seu ligante fibronectina das células epiteliais. A fibronectina é uma glicoproteína presente na membrana basal e lâmina própria do epitélio intestinal (MONTEVILLE; YOON; KONKEL, 2003).

Após adesão, a bactéria invade as células do hospedeiro, principalmente por endocitose (BISWAS et al., 2011; FONSECA, 2011). Na etapa de invasão, o flagelo é importante, pois secreta as proteínas pelo sistema de secreção tipo 3 (T3SS) (KONKEL et al., 2004). Algumas dessas proteínas são a Cia (CiaB, CiaC, Cial), que auxiliam na invasão, colonização e na sobrevivência intracelular (EUCKER;

KONKEL, 2012). O gene *ciaB* codifica a proteína CiaB (73kDa), ligada a destruição dos microtúbulos da célula hospedeira.

No processo de invasão, o gene *pldA* codifica uma proteína envolvida na síntese de fosfolipases de membrana externa, que possui propriedades hemolíticas, de forma que a ausência da expressão deste gene promove redução na atividade hemolítica e capacidade de colonização do intestino (MATOBA et al., 2002).

Campylobacter apresenta uma toxina conhecida como toxina distensora citoletal (CDT), a qual tem atividade DNase, induzindo a danos ao DNA. Ela é codificada por três genes *cdtA*, *cdtB*, e *cdtC*, e para que produza sua ação citotóxica, os três genes necessitam ser expressos. O componente ativo da toxina é o *cdtB*, e *cdtA* e *cdtC* medeiam a ligação e internalização na célula hospedeira (ABUOUN et al., 2005). Dentro da célula, *cdtB* potencializa o bloqueio do ciclo celular, impedindo a divisão mitótica e induzindo uma distensão citoplasmática que leva a morte celular por apoptose (DASTI et al., 2010).

O sistema de secreção tipo 6 (T6SS) funciona como micro injeções transportadoras de moléculas para células vizinhas ou mesmo células eucarióticas, permitindo a alteração da célula durante a patogênese e contribuindo para infecções sistêmicas (RUSSEL et al., 2011). T6SS em *Campylobacter* causa a lise de células vermelhas dependente do contato (BLEUMINK-PLUYM et al., 2013). O gene *hcp* é um indicador da presença de T6SS, e codifica a proteína co-reguladora da hemolisina (Hcp) (SIMA et al., 2018).

Quando submetidos ao estresse térmico, *Campylobacter* induz a síntese de um grupo de proteínas, cuja taxa de síntese varia com a temperatura, aumentando sua expressão quando a temperatura é elevada, e reprimindo sua expressão quando expostas ao frio (BEALES, 2004). O gene *dnaJ* codifica uma proteína que permite que a bactéria cresça em temperaturas superiores a 40 °C (KONKEL et al., 1998).

Campylobacter desenvolveu mecanismos para manter sua viabilidade mesmo em condições adversas que enfrenta no organismo do hospedeiro, meio ambiente e alimentos. Por ser microaerofílico (KAAKOUSH et al., 2015), condições atmosféricas desfavoráveis podem causar deformação de proteínas necessárias para sua sobrevivência; assim, algumas proteínas codificadas pelos genes *htrA* e *cbrA* atuam como proteases, e realizam a remoção de proteínas deformadas (LIPINSKA et al., 1989; SKORKO-GLONEK et al., 1997; CLAUSEN et al., 2011). As proteínas codificadas pelo gene *htrA* também são liberadas no ambiente extracelular, e

auxiliam outras bactérias durante a migração, pois clivam a proteína de junção da célula hospedeira E-caderina, possibilitando a transmigração entre células epiteliais vizinhas (BACKERT et al., 2018).

O biofilme é uma resposta contra o estresse ambiental, visando a sobrevivência bacteriana (MURPHY; CARROLL; JORDAN, 2006). Os biofilmes são formados pela adesão de células bacterianas às superfícies vivas ou inertes, formando comunidades bacterianas envoltas por matriz polimérica composta por polissacarídeos, proteínas e ácidos nucléicos. Esta matriz promove a proteção da comunidade, dificultando o acesso de biocidas, concentrando nutrientes e prevenindo a desidratação (DONLAN; COSTERTON, 2002). *Campylobacter* é capaz de formar biofilmes em diversas estruturas de diferentes materiais como plástico, ferro, vidro, entre outras (GUNTHER; CHEN, 2009; TEH; LEE; DYKES, 2014).

O mecanismo de *quorum sensing* diz respeito a um mecanismo de comunicação bacteriana intracelular, que influencia em uma variedade de processos, como motilidade, formação de biofilme, produção de toxinas, sistema de secreção, expressão gênica e colonização (PLUMMER, 2012). O sinal é mediado por autoindutores (AI), e em *Campylobacter*, a comunicação ocorre com atuação do AI-1 (autoindutor acil-hemoserina) em níveis altos no citoplasma bacteriano. O AI-1 se liga com o ativador de transcrição celular *luxS* que codifica a luciferase, necessária na produção de S-adenosilmetionina (SAM), importante na síntese de poliaminas e vitaminas bacterianas, além da metilação do DNA (BASSLER, 1999; PARVEEN; CORNELL, 2011). O gene *luxS* também atua na síntese de AI-2 (autoindutor S-ribosil-homocisteinase), o qual estimula o crescimento bacteriano e reconhece a entrada de populações mistas no biofilme (WINZER et al., 2002; RAJAN et al., 2005).

Campylobacter consegue crescer sob condições ambientais desfavoráveis, incluindo a falta de nutrientes, temperaturas adversas, tensão de oxigênio, pH, mudança de osmolaridade, além de condições de alta pressão, quando na forma viável não cultivável (VNC) (BLASER; ENGBERG, 2008). Neste estado, o patógeno entra em um estado de atividade metabólica mínima, reduz seu tamanho e muda para a forma cocóide, e após um período de “ressuscitação”, a capacidade de cultivo e a infectividade é restaurada.

O ferro é um elemento importante para a maioria das bactérias. Ao contrário de outras bactérias, *Campylobacter* não consegue captar este elemento por meio de

sideróforos próprios, por não ser capaz de produzi-los. Assim, o patógeno desenvolveu a capacidade de utilizar sideróforos exógenos, produzidos pelo microbioma intestinal do hospedeiro (CONNERTON; CONNERTON, 2017).

Outro fator de virulência utilizado por *Campylobacter* é o mimetismo de glicano, estratégia utilizada para evitar que o patógeno seja detectado pelo sistema imune inato do hospedeiro (CRESS et al., 2014). O mimetismo molecular entre lipooligosacarídeos (LOS) de *C. jejuni* e gangliosídeos dos hospedeiros pode levar ao desenvolvimento da Síndrome de Guillain Barré (SGB), uma neuropatia progressiva aguda autoimune (TAM et al., 2006).

Para expressar LOS semelhante aos gangliosídeos, *C. jejuni* sintetiza ácido citidina-5'-monofosfo-N-acetilneuramínico (CMP-Neu5Ac) a partir de uridina-5'-diosfato-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc), por ações consecutivas de uma N-acetilglucosamina-6-fostato 2-epimerase (neuC), uma sintase de ácido siálico (NeuB) e uma sintase CMP-Neu5Ac (NeuA) (LEWIS et al., 2009). Posteriormente, CMP-Neu5Ac é transferido para uma das sialiltransferases associadas a LOS, CstII ou CstIII (CHENG et al., 2008). Deste modo, os genes *neuA* e *cstIII*, são marcadores importantes para a virulência associada a SGB. Embora estudos tenham demonstrado que *C. coli* possui maquinaria para mimetizar gangliosídeos do hospedeiro, o envolvimento dessa espécie na ocorrência da SGB ainda está sendo investigada (CULEBRO et al., 2018; HULL et al., 2021).

Campylobacter também é capaz de controlar a transcrição de genes de acordo com o ambiente. Em trabalho realizado por Melo e colaboradores (2019b), foi observado que conforme as condições de crescimento oferecidas pelo ambiente são alteradas, *C. jejuni* e *C. coli* foram capazes de modular seu transcriptoma, alterando a transcrição de genes para sobreviver a situações estressantes e ser capaz de expressar seu potencial genético.

3.9 Tratamento e resistência aos antibióticos

Em casos de enterocolite por *Campylobacter* não complicada, o tratamento medicamentoso não é recomendado, sendo indicados o repouso e reposição hidroeletrólítica. Porém, a terapia antimicrobiana é necessária em pessoas imunocomprometidas, idosos, gestantes, em casos de enterite prolongada e doença

mais grave (GARCÍA-SANCHEZ et al., 2018; GHARBI et al., 2021). As drogas recomendadas, em primeiro lugar, macrolídeos (eritromicina), e em segundo lugar, fluorquinolonas (ciprofloxacina), mas ocasionalmente, outras classes vêm sendo recomendadas, como tetraciclina e aminoglicosídeos (BLASER; ENGBERG, 2008; LUANGTONGKUM et al., 2009; PERNICA et al., 2016; LOPES-CHAVARRIAS et al., 2021).

Segundo a European Food Safety Authority (EFSA), vários isolados clínicos de *Campylobacter* foram identificados como resistentes a fluorquinolonas, tetraciclina, macrolídeos, aminoglicosídeos e betalactâmicos (EFSA, 2019b), o que reduz as opções disponíveis para tratamento. Este problema tem sido atribuído ao uso indiscriminado de antimicrobianos na pecuária de forma preventiva, terapêutica ou mesmo como promotor de crescimento (VAN BOECKEL et al., 2015).

Com a difusão de bactérias resistentes a numerosas classes de antimicrobianos, *Campylobacter* multirresistentes têm sido disseminadas da cadeia de produção à população (MOURKAS et al., 2019). As espécies de *Campylobacter* possuem mecanismos genéticos para transformação e conjugação, o que indica que se genes relacionados à resistência forem adquiridos, estas características podem ser rapidamente transmitidas entre as linhagens (ALFREDSON; KOROLIK, 2007).

A ocorrência de cepas de *Campylobacter* multirresistentes isoladas de animais e humanos são amplamente divulgadas (NEOGI et al., 2020; KARAMA et al., 2020; ZHANG et al., 2020; MOUFTAH et al., 2021). Ainda que os níveis de resistência aos principais antimicrobianos sejam elevados para *C. coli* e *C. jejuni*, cepas de *C. coli* apresentam maiores índices de resistência quando comparados a *C. jejuni* (EFSA, 2019b). A Organização Mundial da Saúde mantém este patógeno em sua lista de prioridade global com relação a resistência aos antibióticos (WHO, 2017).

Alguns mecanismos de resistência aos antimicrobianos são conhecidos em *Campylobacter*. Geneticamente, os elementos envolvidos nos mecanismos de resistência podem ser cromossômicos ou carregados por plasmídeos, e ainda, envolver a modificação do alvo do antibiótico; alteração do acesso do antibiótico ao seu local alvo; extrusão do antibiótico por meio de bombas de efluxo e inativação/modificação do antibiótico (IOVINE, 2013; WIECZOREK; OSEK, 2013; KHAN et al., 2019).

Os macrolídeos são drogas com espectro contra microrganismos gram positivos e gram negativos, e a eritromicina é primeira droga de escolha no tratamento de campilobacteriose (LOPEZ; CHAVARRIAS et al., 2021). Os macrolídeos atuam ligando-se reversivelmente a subunidade 50S dos ribossomos bacterianos no sítio P, inibindo a síntese de proteínas. A resistência a eritromicina em isolados humanos e de frangos de *C. coli* têm se mostrado variável (6,4% a 90%) (MOURKAS et al., 2019; WIECZOREK; BOCIAN; OSEK, 2020; LOPEZ; CHAVARRIAS et al., 2021). No Brasil, o MAPA proibiu o uso de macrolídeos na medicina veterinária (BRASIL, 2012), o que justifica um menor índice de resistência quando comparado a ciprofloxacina. Os principais mecanismos de resistência aos macrolídeos incluem a modificação do alvo do antibiótico, alteração da permeabilidade de membrana, e bomba de efluxo (IOVINE, 2013; KHAN et al., 2019). A resistência aos macrolídeos é conferida, principalmente, devido a mutações pontuais no domínio V do gene 23S rRNA, na posição 2074 e 2075 (*C. jejuni*) e 2058 e 2059 (*C. coli*) (BOLLINGER; KATHARIOU, 2017). Outro mecanismo de resistência aos macrolídeos, é pela metilação do rRNA, codificada pelo gene *erm(B)*, o qual pode ser transferido horizontalmente (QIN et al., 2014; FLORES-CUADRADO et al., 2016).

A classe das fluorquinolonas representa uma variedade de antibióticos que tem efeito contra diversos patógenos (KHAN et al., 2019). Alguns exemplos de fluorquinolonas são enrofloxacin e ciprofloxacina. As fluorquinolonas, atuam em duas enzimas da maquinaria de replicação bacteriana, a topoisomerase IV e a DNA girase, as quais participam na transcrição, reparo da replicação e recombinação do DNA bacteriano (KHAN et al., 2019). Elevados índices de resistência de *C. coli* a ciprofloxacina (93% a 100%), a droga de segunda escolha no tratamento de campilobacteriose humana, tem sido demonstrada em isolados humanos e de frangos (MOURKAS et al., 2019; WIECZOREK; BOCIAN; OSEK, 2020). Esta resistência tem sido atribuída ao uso de antimicrobianos na medicina veterinária (VAN BOECKEL et al., 2015), especialmente como promotores de crescimento, o que foi banido em 2009 pelo MAPA (BRASIL, 2009).

A resistência às fluorquinolonas em *Campylobacter* ocorre devido a mutações pontuais que ocorrem por meio da substituição de aminoácidos na região de determinação de resistência da quinolona na DNA girase A (GyrA) (IOVINE, 2013; WIECZOREK; OSEK, 2013; TANG et al., 2017). Várias mutações diferentes e únicas

no GyrA foram relatadas em *Campylobacter*, e a mais comumente observada é a C257T, que leva a substituição do Thr86Ile na DNA girase, causando alto nível de resistência às fluorquinolonas (KHAN et al., 2019). A resistência as fluorquinolonas também pode ocorrer pela redução na permeabilidade da membrana externa e extrusão das drogas. A bomba de efluxo CmeABC é o principal mecanismo que funciona em coordenação com as mutações GyrA, e leva a resistência aos antibióticos. A bomba de efluxo CmeABC é codificada por um operon dos genes *cmeC*, *cmeB* e *cmeA* (GE et al., 2013; TANG et al., 2017). Esses três genes codificam um canal de proteína de membrana externa, um transportador de droga de membrana interna e uma proteína de fusão periplasmática, respectivamente (IOVINE, 2013; WIECZOREK; OSEK, 2013).

As tetraciclinas agem a partir da ligação a subunidade ribossômica 30S no sítio A, dificultando a ligação de tRNA, inibindo síntese proteica (KHAN et al., 2019). Elevados índices de resistência a tetraciclinas têm sido demonstrado em isolados de *C. coli* de frangos e humanos (75,5% a 100%) (MOURKAS et al., 2019; WIECZOREK; BOCIAN; OSEK, 2020; LOPEZ; CHAVARRIAS et al., 2021). A resistência às tetraciclinas ocorre a partir de bomba de efluxo, proteção ribossômica e modificação química pela ausência do oxigênio (IOVINE, 2013). Outro mecanismo desenvolvido contra as tetraciclinas está relacionado com o gene *tet(O)*, que codifica proteína de proteção ribossômica (RPP). A RPP se liga a um sítio ribossomal A na bactéria, se vinculando a ela, e impedindo a ligação de tetraciclinas (ALFREDSON; KOROLIK, 2007; IOVINE, 2013). 95 lopez 100 anim mourksa 75,3 KingaWieczorek

Os aminoglicosídeos são inibidores de síntese proteica em várias bactérias gram positivas e gram negativas, e os membros mais comuns desta classe de antimicrobianos são neomicina, amicacina, tobramicina, gentamicina, estreptomicina e canamicina (KHAN et al., 2019). Estes medicamentos atuam a partir da ligação à fração 30S dos ribossomos, causando a inibição da síntese de proteínas, ou produzindo proteínas defeituosas. Resistência a estreptomicina tem se mostrado variável, entre isolados humanos e animais de *C. coli* (27,1% a 90,1%) (MOURKAS et al., 2019; WIECZOREK; BOCIAN; OSEK, 2020; LOPEZ; CHAVARRIAS et al., 2021). O principal mecanismo de resistência aos aminoglicosídeos é pela expressão de enzimas modificadoras dos aminoglicosídeos, geralmente mediadas por plasmídeos (IOVINE, 2013; GARNEAU-TSODIKOVA; LABBY, 2016). Estas enzimas

podem ser divididas em fosfotransferases (APH), adeniltransferases (AAD) e acetiltransferases (AAC) (GARNEAU-TSODIKOVA; LABBY, 2016).

Os principais membros do grupo dos betalactâmicos são as penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbepenêmicos (KHAN et al., 2019). Os betalactâmicos atuam na ligação à parede bacteriana inativando a expressão de proteínas responsáveis pela síntese da parede celular, levando o patógeno a morte por lise osmótica. A resistência aos betalactâmicos é encadeada pela inativação dos antimicrobianos pela enzima beta lactamase, alteração nas porinas da membrana externa que reduz a absorção de drogas, e bomba de efluxo (ALFREDSON; KOROLIK, 2007; IOVINE, 2013; KHAN et al., 2019).

CAPÍTULO 2 – ARTIGO: Virulência, resistência aos antimicrobianos e disseminação fenotípica de *Campylobacter coli* isolados de carcaças de frangos no Brasil

Artigo a ser submetido para publicação no periódico

Pathogens

Fator de Impacto: 3.492

Article

Virulência, resistência aos antimicrobianos e disseminação fenotípica de *Campylobacter coli* isolados de carcaças de frangos no Brasil

Ana Beatriz Garcez Buiatte^{1*}, Roberta Torres de Melo¹, Phelipe Augusto Borba Martins Peres¹, Clara Mariano Bastos¹, Ana Laura Grazziotin¹, Daise Aparecida Rossi¹

Citation: Lastname, F.; Lastname, F.; Lastname, F. Title. *Pathogens* 2021, 10, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor:
FirstnameLastname

Received: date
Accepted: date
Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

¹ Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, - MG CEP 38400-902, Brasil; anabgbuiatte@hotmail.com (A. B. G. B.); Robertamelo@hotmail.com (R. T. d M.); lipe-peres@hotmail.com (P. A. B. M. P.); clara_mari.b@hotmail.com (C. M. B.); analaugrazziotin@gmail.com (A. L. G.); daise.rossi@ufu.br (D. A. R.)

* Correspondência: anabgbuiatte@hotmail.com, Tel: (+55)343257-4866

Resumo: *C. coli* é a segunda espécie de *Campylobacter* mais incriminada em casos de campilobacteriose humana, frequentemente isolada de carne de frango. O Brasil maior exportador de carne de frangos no mundo, o que torna a caracterização de isolados brasileiros crucial para estabelecimento de medidas de controle. Foram testados por PCR convencional, 83 cepas de *C. coli* isoladas de carcaças de frangos em três estados no Brasil, para 14 genes de virulência classificados em cinco categorias: formação de biofilme (*flA*, *luxS*), sistema de secreção (*ctdABC*, *hcp*), invasão e colonização (*cadF*, *ciaB*, *pldA*), adaptação ao estresse (*cbrA*, *htrA*, *dnaJ*) e Síndrome de Guillain-Barré (*neuA*, *cstIII*). Foi realizado o teste de microdiluição em caldo para testar a sensibilidade a ciprofloxacina e eritromicina. A similaridade proteômica entre os isolados foi estabelecida através de um dendograma utilizando dados obtidos do MALDI-TOF. O perfil gênico demonstrou alto potencial de invasão e colonização. As cepas apresentaram 89,2% de resistência a ciprofloxacina e 55,4% a eritromicina. O estado I demonstrou diversidade genética disseminada, os estados II e III apresentaram especificidade local. Nossos resultados sugerem elevada virulência e resistência, indícios de contaminação cruzada e manutenção de genótipos virulentos, enfatizando a necessidade de medidas de controle em abatedouros brasileiros.

Palavras-chave: campilobacteriose; invasão; Sistema de secreção; Síndrome de Guillain-Barré; MALDI-TOF.

1. Introdução

Campylobacter é o gênero bacteriano mais envolvido na gastroenterite humana causada pela ingestão de alimentos, representando assim, um significativo problema de saúde pública [1], e dentre as espécies envolvidas, *C. coli* é responsável por até 15% dos casos [2,3]. A campilobacteriose humana é associada principalmente à ingestão de alimentos de origem animal contaminados crus ou mal cozidos, em especial a carne de frango [4,5].

C. coli já foi isolada em diversos animais e ambientes [5,6,7]. Para que ocorra a infecção do hospedeiro, a espécie necessita expressar fatores de virulência como motilidade, quimiotaxia, adesão, invasão, produção de toxinas e mecanismos de evasão do sistema imune [8,9]. Já os mecanismos para sobrevivência a diferentes condições ambientais estressantes são importantes para a persistência do micro-organismo [10]. Dentre os genes envolvidos na virulência do gênero pode-se destacar: invasão e colonização (*cadF*, *ciaB*, *pldA*), sistema de secreção (*cdtABC*, *hcp*), adaptação ao estresse (*dnaJ*, *htrA*, *cbrA*), formação de biofilmes (*flaA*, *luxS*) e indução a Síndrome de Guillain-Barré (*cstII*, *neuA*) [11-18].

Os pacientes acometidos por campilobacteriose apresentam quadros de diarreia, dor abdominal, febre, náusea e vômitos [4], e não é possível diferenciar a infecção por *C. coli* da infecção por *C. jejuni* pelos sintomas clínicos [19]. A recuperação clínica ocorre geralmente em uma semana [20], porém, parte dos infectados por *C. coli* evoluem para quadros mais graves, com complicações intestinais e extra-intestinais após a infecção [21-24].

Em casos mais graves de campilobacteriose, o tratamento com antimicrobianos é indicado, e as drogas de escolha são os macrolídeos e as fluorquinolonas [25]. Entretanto, há um aumento preocupante no número de cepas resistentes a estas classes de antimicrobianos, especialmente na espécie *C. coli*, provavelmente, pela pressão de seleção exercida pelo uso excessivo de antibióticos na produção [26-27].

C. coli e *C. jejuni* são capazes de co-colonizar seus hospedeiros. As espécies dividem grande parte do seu genoma [28], e são capazes de realizar trocas gênicas para se beneficiar durante a infecção e persistir no ambiente, o que pode gerar um grave problema de saúde pública [29,30].

O Brasil é o país que mais exporta carne de frangos no mundo [31] e é grande o consumo interno, mas mesmo diante do grande volume de produção, entre 2000 e 2019, apenas oito surtos foram atribuídos a *Campylobacter* no país [32]. Assim, acredita-se que a campilobacteriose seja subnotificada. Também nas indústrias, apenas recentemente, no ano de 2017, foi realizado o monitoramento e quantificação de *Campylobacter* termotolerante em carcaças de frangos abatidos em estabelecimentos sob Inspeção Federal para a avaliação de risco (Memorando N° 218/2017/CRISC/CGPE/DIPOA/MAPA/DAS/MAPA). Embora existam pesquisas sobre *C. jejuni* no país [33-35], a caracterização de cepas de *C. coli* ainda é limitada.

Assim, objetivou-se determinar o perfil virulento, resistência a eritromicina (macrolídeo) e ciprofloxacina (fluorquinolona), a distribuição espacial e sazonal, e ainda, avaliar a disseminação por meio da análise proteômica de cepas de *C. coli* isoladas de carcaças de frango em abatedouros brasileiros habilitados para comercialização nos mercados interno e externo.

2. Resultados

2.1 Genes e perfis de virulência

A avaliação individual da frequência de cada um dos 14 genes, permitiu inferir que em cada categoria de virulência, ao menos um gene foi altamente frequente (>83%). Quanto a frequência concomitante dos genes de cada categoria, observamos que houve maior ocorrência ($p < 0,05$) do agrupamento de genes ligados a formação de biofilme e

motilidade e dos relacionados à Síndrome de Guillain-Barré quando comparados às demais categorias (Tabela 1).

Tabela 1. Frequência de genes de virulência em *C. coli* isoladas em carcaças de frango abatidos no Brasil entre outubro de 2017 e julho de 2018.

Categoria de virulência	Gene	Frequência (%) do gene	Frequência (%) do agrupamento
Adaptação ao estresse	<i>cbrA</i>	8 (9,6)	3 (3,6) ^a
	<i>htrA</i>	71 (85,5)	
	<i>dnaJ</i>	10 (12,0)	
Síndrome de Guillain-Barre	<i>neuA</i>	14 (16,9)	13 (15,7) ^b
	<i>cstII</i>	75 (90,4)	
Invasão/Colonização	<i>cadF</i>	82 (98,8)	9 (10,8) ^{ab}
	<i>ciaB</i>	80 (96,4)	
	<i>pldA</i>	10 (12,0)	
Biofilme/Motilidade	<i>luxS</i>	11 (13,3)	11 (13,3) ^b
	<i>flaA</i>	69 (83,1)	
Sistema de secreção/citotoxicidade	<i>Hcp</i>	80 (96,4)	3 (3,6) ^a
	<i>cdtA</i>	3 (3,6)	
	<i>cdtB</i>	3 (3,6)	
	<i>cdtC</i>	3 (3,6)	

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (*Teste de Fischer* $p < 0,05$).

A maioria dos isolados (75/83 – 90,4%) apresentou ao menos sete dos 14 genes estudados, sendo que o grupo de cepas que apresentou 6/14 genes estudados foi o mais comum (41/83 – 49,4%) (*Teste de Fischer* $p < 0,0001$).

A distribuição dos genes investigados entre as cepas permitiu identificar 30 perfis de virulência distintos (Tabela 2), os quais determinaram o I. Var. de 0,36, considerado baixo [36]. Essa baixa variabilidade esteve relacionada a um perfil que foi identificado em 41% das cepas (34/83) (*flaA*, *cadF*, *ciaB*, *cstIII*, *htrA*, *hcp* – Tabela suplementar I). Apesar disso, o número de perfis compostos por apenas uma cepa (22/30 – 73,3%) foi significativamente superior aos demais (8/30 – 26,7%) ($p=0,0007$ – *Teste de Fischer* – Tabela S1).

Tabela 2. Perfis de virulência classificados de acordo com a categoria de genes estudados em *C. coli* isoladas de carcaças de frangos no Brasil entre outubro de 2017 a julho de 2018.

Categorias	Número de perfis (%)
Biofilme (B)	19 (63,3) ^a
Sistema de secreção (SS)	27 (90,0) ^{bcd}
Invasão/Colonização (IC)	30 (100,0) ^b
Síndrome de Guillain-Barré (GB)	24 (80,0) ^{ac}
Adaptação ao estresse (AE)	20 (66,6) ^{ad}
Agrupamentos	Número de perfis
A1. IC	2
A2. SS, IC	1
A3. B, IC	1
A4. SS, IC, GB	1
A5. B, SS, IC	1

A6. SS, IC, AE	2
A7. B, SS, IC, GB	4
A8. SS, IC, AE, GB	5
A9. B, SS, IC, GB, AE (Virulentos)	13*
Total	30
Multi-virulentos	2

A: agrupamento. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (*Teste de Fischer* $p < 0,05$) * diferença significativa com os demais.

A Tabela 2 deixa evidente o potencial quase unânime das cepas de *C. coli* nos processos de invasão, colonização (IC) e de sistemas de secreção (SS) ($p < 0,05$) em detrimento às demais categorias, uma vez que foram identificados 30/30 (100%) e 27/30 (90%) perfis referentes a essas habilidades, respectivamente. De maneira complementar, a investigação dos perfis de acordo com as categorias que os inclui permitiu identificar nove agrupamentos, que demonstraram a maior prevalência ($p < 0,05$) de A9, com 43,3% (13/30) dos perfis classificados como virulentos. O número de cepas multivirulentas foi significativamente menor em comparação ao número de cepas virulentas em todas as análises.

2.2 Análise das cepas isoladas por amostra

As 83 cepas de *C. coli* estudadas foram provenientes da análise de 24 carcaças, das quais foram isoladas entre uma e oito colônias por amostra, com média equivalente a 3,46. Amostras que tiveram três ou mais colônias isoladas (12/24 – 50%) foram utilizadas na verificação do índice de variabilidade (I. Var.) dos perfis de virulência dentro da mesma amostra, equivalente a 0,6 na análise geral.

O I. Var. foi superior a 0,75 (alto) dentro de cada amostra com três ou mais colônias isoladas, o que justificou a realização de todas as análises individualmente para cada cepa. Ao agrupar as amostras por número de isolados (Figura 1), observamos apenas uma amostra com oito cepas que apresentaram 25% de variabilidade, os demais grupos apresentaram variabilidade igual ou superior a 50%.

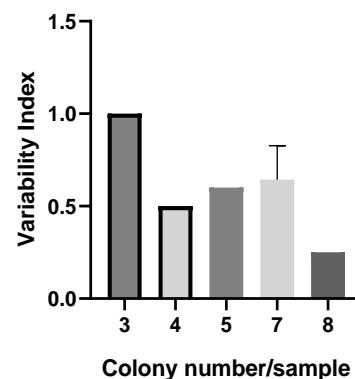


Figura 1. Índice de variabilidade de cepas de *C. coli* isoladas por amostra de acordo com o número de colônias isoladas. A barra de erros indica o desvio padrão, identificado somente nas amostras com sete isolados.

2.3 Análise das cepas isoladas por estabelecimento

Observou-se uma variação de um a 15 isolados nos 17 estabelecimentos de abate, com média de 4,9 isolados por estabelecimento.

Os estabelecimentos que apresentaram três ou mais isolados (10/17 – 58,8%) foram utilizadas para determinar a variabilidade percentual e o I. Var., e incluíram 70/83 cepas. Foi observada uma variabilidade mediana de 50% nos perfis de virulência entre cepas pertencentes ao mesmo estabelecimento.

Ao analisar o índice de variabilidade no perfil de virulência observamos que 90% (28/36) dos estabelecimentos apresentaram variabilidade inferior a 0,7 nos perfis e apenas 1 estabelecimento (10%) apresentou I. Var. igual a 1 (Tabela 3). A maior parte dos estabelecimentos (10/17 – 58,8%) apresentaram de 70 a 100% das cepas classificadas como virulentas.

Tabela 3. Índices de variabilidade dos perfis de virulência de *C. coli* isoladas de carcaças de frangos por estabelecimento de abate

I.Var. dos perfis de virulência	Classificação do I.Var.	Número de estabelecimentos (N=10)	Total (%)
1	Alta	1	1 (10,0) ^a
1	Alta	0	
0,69-0,5	Média	6	9 (90,0) ^b
<0,5	Baixa	3	

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (*Teste exato de Fisher* – $p < 0,05$). I.V.: Índice de variabilidade.

2.4 Análise das cepas isoladas em relação ao Estado

A distribuição dos perfis de virulência, índice de variabilidade e frequência das cepas de *C. coli* nos três estados brasileiros (I, II e III) estão na Tabela 4.

Tabela 4. Índices de variabilidade, frequências de cepas e de perfis de virulência identificados em *C. coli* isoladas de carcaças de frangos no Brasil

I.Var.		Estados		
		I	II	III
		0,48 (baixo)	0,38 (baixo)	0,57 (médio)
Perfis com 1 cepa - n (%)		9 (75,0) ^{aA}	9 (75,0) ^{aA}	8 (61,5) ^{aA}
Perfis com 2-3 cepas - n (%)		2 (16,7) ^{aB}	2 (16,7) ^{aB}	3 (23,1) ^{aAC}
Perfis com mais de 3 cepas - n (%)		1 (8,3) ^{aB}	1 (8,3) ^{aB}	2 (15,4) ^{aBC}
Virulência	Cepas - n (%)	18 (72,0) ^{a*}	25 (78,1) ^{a*}	16 (61,5) ^{a*}
	Perfis - n (%)	7 (58,3) ^{a**}	5 (41,7) ^{a**}	6 (46,1) ^{a**}
Multivirulência	Cepas - n (%)	0 ^{a*}	1 (3,1) ^{a*}	1 (3,8) ^{a*}
	Perfis - n (%)	0 ^{a**}	1 (8,3) ^{a**}	1 (7,7) ^{a**}
Total	Cepas - n	25 ^a	32 ^a	26 ^a
	Perfis - n	12 ^a	12 ^a	13 ^a

ab: letras diferentes na mesma linha indicam diferença dentro do mesmo intervalo. AB: letras diferentes na mesma coluna indicam diferença dentro do mesmo intervalo. - *: diferença na virulência e multivirulência das cepas da mesma coluna. **: diferença na virulência e multivirulência

dos perfis da mesma coluna - (*Oneway Anova e Fisher test. $p < 0,05$*) I. Var. - índice de variabilidade. n (%): frequência e percentual da característica.

A quantidade de isolados e perfis de virulência e multivirulência identificados nos três estados não diferiu ($p > 0,05$). Embora a quantidade de cepas por estado também não tenha apresentado diferença ($p > 0,05$), o número de perfis com apenas uma cepa foi maior ($p < 0,05$) que aqueles que agruparam duas ou mais cepas, nos estados I, II e III.

Os I. Var., considerando os genes estudados, não foram altos em nenhum dos estados. Os baixos índices de variabilidade encontrados em I e II se devem a dois perfis que englobaram 10 e 18 cepas, respectivamente. O estado do III apresentou o maior I. Var. (0,57) e o menor percentual de virulência em relação aos demais. De maneira geral, a menor variabilidade esteve relacionada à presença de cepas mais virulentas a nível local (Figura 2).

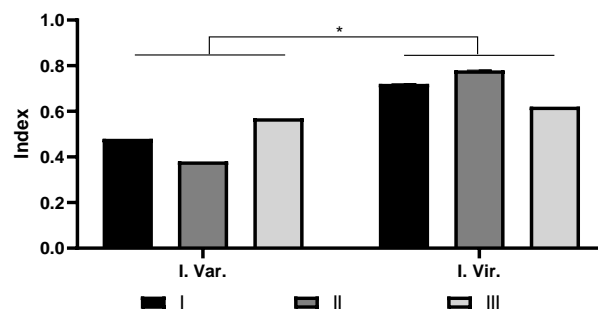


Figura 2. Relação de índice de variabilidade e índice de virulência por estado. I.Var.: Índice de Variabilidade; I.Vir.: Índice de Virulência; (*Unpaired teste T - * $p = 0,03$*)

2.5 Análise das cepas isoladas em relação às cidades

Dentre os 16 municípios onde as cepas de *C. coli* foram isoladas, foram selecionados para análise aqueles que tiveram três ou mais isolados, que corresponderam a 68,8% do total (11/16). Destes municípios, quatro pertenciam ao estado I, quatro ao estado II e três ao estado III. Houve uma variação de um a 15 isolados por cidade, com mediana igual a quatro.

Detectamos média variabilidade (61,3%) nos perfis de virulência entre cepas pertencentes à mesma cidade, sendo que as cidades do estado I apresentaram I. Var. médio de 0,65, as cidades do estado II, 0,62 e as cidades do estado III, 0,55. Não houve diferença no número de cidades com baixa, média ou alta variabilidade, mas observamos que as cidades com baixa variabilidade apresentaram cepas com os cinco mecanismos de virulência estudados (Tabela 5).

Tabela 5. Índice de variabilidade dos perfis de virulência de *C. coli* isoladas de carcaças de frangos por cidade

I.Var dos perfis de virulência	Classificação do I.Var	Número de cidades (N=11)
1-0,7	Alta	3 (27,3%) ^a
0,69-0,5	Média	5 (45,4%) ^a
<0,5	Baixa	3 (27,3%) ^a

I.Var.: Índice de variabilidade. Letras iguais na mesma coluna indicam ausência de diferença significativa (*Teste exato de Fisher $p > 0,05$*).

Não houve diferença no número de cepas virulentas por cidade nos três estados, mas a maioria das cidades (10/16 – 62,5%) apresentou mais

de 70% das cepas classificadas como virulentas e uma minoria significativa (2/16 – 11,8%) ($p < 0,05$ – Fischer test) tiveram 40% ou menos cepas isoladas classificadas como virulentas.

2.6 Análise das cepas isoladas em relação ao tempo

A característica sazonal das cepas de *C. coli* isoladas em relação aos perfis de virulência e I. Var. foi determinada nos meses de outubro a dezembro de 2017 e janeiro, abril, maio e junho de 2018. Para esse ensaio todas as cepas foram consideradas, uma vez que tivemos um número maior que três cepas isoladas em cada período.

O índice de variabilidade foi inversamente proporcional ao potencial virulento (*Unpaired T Test*, $p = 0,013$), indicando que a menor variabilidade está novamente relacionada à presença de cepas mais virulentas também a nível temporal (Figura 3).

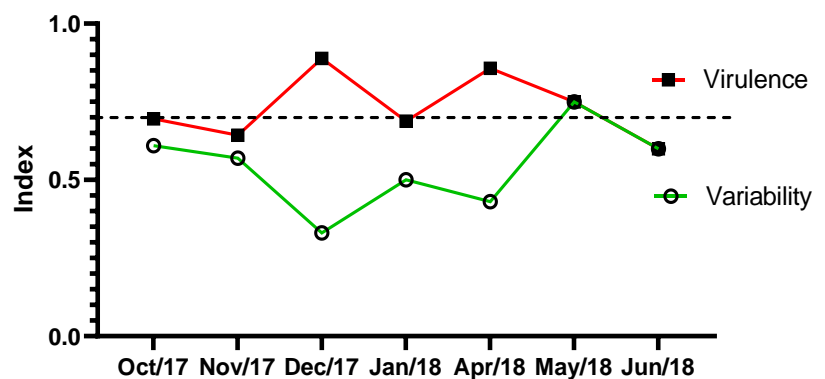


Figura 3. Índices de variabilidade e virulência de *C. coli* ao longo do tempo de isolamento. Linha tracejada (---) separa índices baixos e médios dos valores de alta variabilidade genética.

Não houve diferença no número e percentual de cepas virulentas e multivirulentas de *C. coli* ao longo dos meses avaliados. A quantidade de perfis de virulência e multivirulência não diferiu no mês de novembro ($p < 0,05$ – teste de Fischer).

O gráfico de calor (Figura 4) demonstra a frequência relativa de cada agrupamento de virulência ao longo dos meses de isolamento.

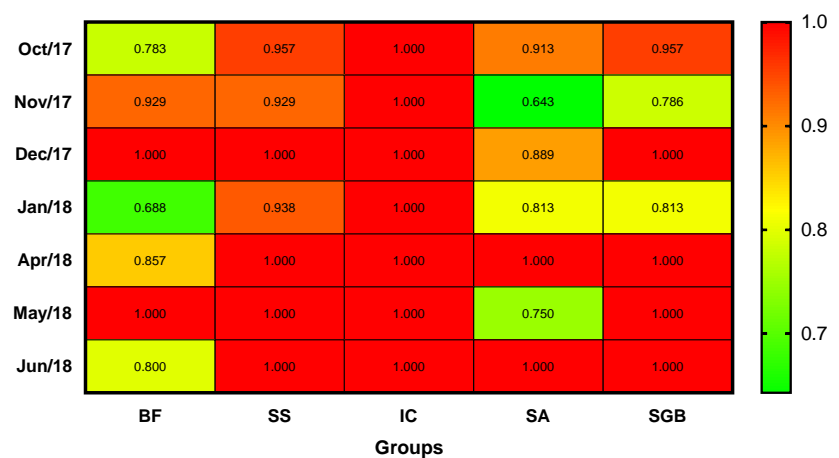


Figura 4. Gráfico de calor representando a frequência relativa de cada agrupamento de virulência (um ou mais genes) em cepas de *C. coli* isoladas de carcaças de frango no Brasil. BF: Formação de Biofilme. SS:

Sistema de Secreção. IC: Invasão/Colonização. SA: Adaptação ao estresse. SGB: Síndrome de Guillain-Barré.

Os genes ligados à formação de biofilmes e adaptação ao estresse foram os menos frequentes e os agrupamentos que envolviam a presença de pelo menos um gene ligado ao sistema de secreção e invasão e colonização se mantiveram conservados em todos os períodos. Os meses de dezembro e abril foram os que mais garantiram a conservação de todos grupos de virulência.

2.7 Análise das cepas isoladas em relação à resistência antimicrobiana

Observamos que houve mais resistência à ciprofloxacina (74/83) quando comparada à eritromicina (46/83) ($p < 0,0001$, Fisher test) nos isolados de *C. coli*. Apesar disso, o estado II apresentou valores iguais estatisticamente ($p = 0,40$) de resistência para ambos os antimicrobianos testados (Tabela 6).

Tabela 6. Resistência aos antimicrobianos de *C. coli* isoladas de carcaças de frango no Brasil entre outubro de 2017 e julho de 2018

Antimicrobianos	I	II	III	Total
Cip	23 (92,0) ^{a,A}	25 (78,1) ^{a,A}	26 (100,0) ^{a,A}	74 (89,2) ^{a,A}
Eri	12 (45,0) ^{b,A}	21 (65,6) ^{a,A}	13 (50,0) ^{b,A}	46 (55,4) ^{b,A}
Total	25	32	26	83
Perfis de resistência	I	II	III	Total
Perfil 1: Cip	11 (44,0) ^{a,A}	4 (12,5) ^{a,B}	13 (50,0) ^{a,A}	28 (33,7) ^{a,A}
Perfil 2: Cip, Eri	12 (48,0) ^{a,A}	21 (65,6) ^{b,A}	13 (50,0) ^{a,A}	46 (55,4) ^{b,A}
Perfil 3: Sensíveis	2 (8,0) ^{a,A}	7 (21,9) ^{a,A}	0 (0,0) ^{b,A}	9 (10,8) ^{c,A}
Total	25	32	26	83

abc: letras diferentes na mesma coluna indicam diferença entre os intervalos. AB: letras diferentes na mesma linha indicam diferença entre os intervalos. – (Teste exato de Fischer $p < 0,05$). Cip – ciprofloxacina; Eri: eritromicina.

Dos três perfis de resistência identificados, o perfil 2 (resistente a ciprofloxacina e eritromicina) foi o mais frequente e o perfil 3 (sensíveis), o de menor ocorrência ($p < 0,01$).

Cada estado apresentou um padrão de distribuição dos perfis de resistência específico. No estado I todos os perfis foram identificados numa frequência igual estatisticamente. No estado II, o perfil 1 foi menos identificado em relação ao total ($p = 0,04$) e o perfil 2 apresentou uma ocorrência significativamente maior. Já no estado III, nenhuma cepa foi sensível concomitantemente aos antimicrobianos testados.

As cepas sensíveis se concentraram apenas em dois estabelecimentos localizados nos estados I e II, e foram isoladas nos meses de dezembro (7) e abril (2). Nestes meses também foram identificados os maiores índices de virulência (Figura 4).

2.8 Clusterização de *C. coli*

O dendrograma das 83 cepas de *C. coli* foi correlacionado às informações de distribuição geográfica (estado), perfis de virulência e

resistência aos antimicrobianos (Figura S1). Não identificamos a presença de clones e a similaridade das cepas foi $\leq 93\%$.

A clusterização foi determinada pelo *cutt-off* de 85%, o que permitiu identificar a elevada diversidade das cepas, com 14 clusters compostos por 34 cepas e 49 perfis distintos. A exceção dos clusters 5 e 8, todos os demais foram discriminados conforme a amostra de origem e, conseqüentemente, sua localização geográfica, demonstrando a especificidade de cada estado.

O estado I apresentou 16/25 (64%) cepas compondo 16/49 perfis distintos no dendrograma. Além disso, só foram discriminados dois *clusters* (6 e 11) específicos desse estado (cinco cepas) e outros dois (5 e 8) que continham cepas pertencentes ao estado II. Esses fatos deixam evidente a maior heterogeneidade das cepas pertencentes ao estado I e a disseminação de duas linhagens (*clusters* 5 e 8) no estado II. As demais características estudadas, virulência e resistência antimicrobiana, foram idênticas nas cepas que contemplam o *cluster* 11.

Já nos estados II e III, observamos que 19/32 (59%) e 13/26 (50%) cepas pertenciam a perfis distintos, respectivamente. Para ambos os estados, identificamos cinco *clusters* exclusivos em cada um (1-2-4-7-10 e 3-9-12-13-14), contemplando 11 e 13 cepas, respectivamente. Destes, os *clusters* 4 e 10 do estado II e 9, 13 e 14 do estado III apresentaram cepas com características fenotípicas e genotípicas iguais nos parâmetros avaliados em nosso estudo.

3. Discussão

Detectamos a presença de *C. coli* em 16,4% (24/146) das carcaças positivas para *Campylobacter* spp., e em 37,5% (9/24) delas identificou-se co-habitação de *C. jejuni*. No Brasil, a prevalência de *C. coli* em carcaças de frangos varia entre 12,5% e 25,7% [37,38], mas, a nível mundial, elevadas prevalências da espécie em carcaças frangos foram relatadas recentemente nos Estados Unidos (60,0% - 162/270), e Europa (31,2% - 732/2367) superando *C. jejuni* [39,40]. Estudos no Brasil [41] e no Irã [42] relataram a coinfeção de *C. coli* e *C. jejuni* em pacientes pediátricos com sintomas clínicos, possivelmente associados a co-colonização das espécies. Isso chama a atenção para o risco de transferência horizontal de genes interespecie, que pode fornecer ao patógeno a capacidade de adaptação a diferentes hospedeiros e ambientes e de virulência [29,43].

Sabe-se que *C. coli* apresenta potencial de virulência inferior a *C. jejuni* [40,44,45], mas nosso estudo demonstrou, nas 83 cepas analisadas, que ao menos um gene de cada categoria avaliada foi altamente frequente (83% - 69/83), o que gerou um elevado percentual de perfis classificados como virulentos ou multivirulentos (43,3% - 13/30). A partir desses achados, a avaliação das frequências de todos os genes envolvidos nas categorias de virulência demonstrou a especialização dos isolados em predispor a SGB, e a formação de biofilme.

A predisposição para o desenvolvimento da síndrome de Guillain-Barré (SGB) é associada à expressão concomitante dos genes *neuA* e *cstII*, considerando o mimetismo molecular entre lipoligossacarídeos (LOS) de *Campylobacter* e gangliosídeos dos hospedeiros [46]. Este agrupamento foi o mais frequente entre os nossos isolados (15,7% - 13/83), com 16,9% (14/83) e 90,4% (75/83) das cepas apresentando individualmente os genes *neuA* e *cstII*, respectivamente. Diferente de nossos achados, a presença do *locus* relacionada a estes genes foi detectada em apenas 0,9% (3/343) de isolados de *C. coli* de frangos e carcaças [40]. O envolvimento de *C.*

coli na ocorrência da SGB não é totalmente esclarecido, devido a limitação de relatos na literatura [47,48]. Apesar disso, estes dados são preocupantes, considerando as possibilidades de recombinação gênica, já que pesquisas demonstraram que *C. coli* possui maquinaria molecular essencial para expressar LOS sililado, e que o locus LOS de *C. coli* pode ser afetado por introgressão com *C. jejuni* [40,49].

Dos 30 perfis de virulência identificados, 19 (63,3%) apresentaram um ou mais genes associados à formação de biofilme e motilidade, e o agrupamento foi o segundo mais frequente (13,3% - 11/83). A formação de biofilme é uma estratégia empregada por bactérias para garantir sua sobrevivência em ambientes hostis [50]. O gene *flaA*, relacionado a adesão a superfícies bióticas e abióticas [51-53], foi identificado em 83,1% (69/83) das nossas cepas. Prevalências de *flaA* de 100% foram encontradas em estudos realizados com *C. coli* de origem ambiental, humana e de carne de frango no Brasil (50/50) [33], e também em isolados da cadeia produtiva de frango, desde a fazenda ao abatedouro na Argentina (126/126) [44]. Apesar disso, observamos baixa ocorrência do gene *luxS* (13% - 11/83) que reduz em até 57% a capacidade de formação de biofilmes, considerando sua função primordial no mecanismo de *quorum sensing*[54].

A maior ocorrência dos agrupamentos de genes ligados a biofilme e motilidade, assim como o relacionado a SGB podem ilustrar uma provável especialização de *C. coli* nestas características. Estes achados foram inesperados, pois, embora a ocorrência de genes destas categorias tenha sido previamente apontada nesta espécie [33], poucas evidências sugerem *C. coli* como relevante formador de biofilmes ou possível causador da SGB [47,48,55]. Vale destacar que para ambas as características existem limitações entre o potencial de virulência e a real expressão da função gênica. Sabe-se que a capacidade de produzir biofilmes está associada a importantes fatores extrínsecos, como condições ambientais e nutricionais em que a bactéria é exposta e são decisivos na expressão do comportamento [56]. Quanto à capacidade de desenvolver a SGB, além do potencial do patógeno em mimetizar gangliosídeos, também é fundamental o envolvimento da resposta do sistema imune do hospedeiro na expressão dessa doença [46].

Ao menos um dos genes ligados a invasão e colonização estiveram presentes em 100% (30/30) dos perfis de virulência gerados. Ainda assim, a frequência de cepas com todos os três genes do agrupamento foi baixa (10,8% - 9/83). Individualmente, os genes *cadF*, *ciaB* e *pldA* foram identificados em 98,8% (82/83), 96,4% (80/83) e 10,8% (9/83) das cepas de *C. coli*, respectivamente.

Em estudo de isolados de *C. coli* de humanos e animais, assim como carcaças de frangos, Gomes e colaboradores [33] encontraram elevada frequência dos genes *cadF* (100% - 50/50), baixa ocorrência de *pldA* (16% - 8/50) e não encontraram *ciaB* (0% - 0/50). Apesar desses genes apresentarem envolvimento essencial nos processos de invasão e colonização, a presença conjunta parece ser independente, isso possivelmente relacionado a localização independente dos genes no genoma do patógeno [57-59]. Vale destacar o elevado potencial de nossas cepas, assim como encontrado na literatura, nos processos de adesão e internalização em células intestinais, codificados por *cadF* [60,61]. Contrariamente aos achados da literatura, o gene *ciaB* foi altamente frequente em nosso estudo, o que indica elevado potencial na destruição dos microtúbulos da célula hospedeira, auxiliando a invasão

e sobrevivência intracelular bacteriana [62]. A frequência semelhante de *cadF* e *ciaB*, encontrada em nosso estudo, é potencializadora do processo de invasão, pois a adesão a fibronectina codificada por *cadF* é necessária para a injeção de proteínas *cia* no citosol da célula hospedeira [63]. A baixa ocorrência de *pldA* indica que *C. coli* apresenta uma capacidade restrita no processo colonização e de apoptose da célula hospedeira, uma vez que esse gene codifica uma proteína que sintetiza fosfolípases lipolíticas que causam ruptura da célula hospedeira [57,64].

A frequência do agrupamento de sistema de secreção / citotoxicidade foi baixa (3,6% - 3/83), porém, dentre os perfis identificados, 90% (27/30) apresentaram ao menos um gene ligado a esta categoria. Isto ocorreu porque, apesar da frequência de isolados que apresentaram os genes *cdtABC* ser baixa (3,6% - 3/83), o gene *hcp* foi identificado em um grande número de cepas (96,4% - 80/83). Os genes *cdtABC* e *hcp* são codificados por regiões independentes do genoma bacteriano [65,66], o que justifica a diferença encontrada.

Uma menor frequência (56,1% - 32/57) do gene *hcp* foi encontrada por Corcionivoschi e colaboradores [67] em isolados de *C. coli* de carne de frango no Reino Unido. O gene *hcp* é associado ao sistema de secreção tipo 6 (T6SS), que permite ao patógeno liberar toxinas no ambiente externo e outras células [68], além de ser associado a infecções mais graves e diarreia sanguinolenta [69,70]. Desta maneira, os resultados sugerem que os nossos isolados de *C. coli* são citotóxicos, o que já foi demonstrado em estudo *in vitro*, porém, as consequências da presença deste gene *in vivo* para *C. coli* ainda não estão completamente esclarecidas [67]. Já os genes do complexo CDT codificam a toxina distensora citoletal (CDT) [71], e estudos tem demonstrado que a prevalência desse gene é altamente variável entre cepas de *C. coli*, com 100% (12/12) de positividade para os três genes em estudo com isolados humanos no Chile [45] a resultados semelhantes ao de nossa investigação no Brasil em cepas isoladas de humanos e animais, com frequência de *cdtA* de 2%(1/50), *cdtB* de 26% (13/50) e *cdtC* de 4%(2/50) [33]. A presença dos três genes foi identificada em nossas cepas positivas e é necessária para produção da toxina [72], e estudos comprovaram que cepas mutantes para um dos genes têm a citotoxicidade reduzida [73-75].

A ocorrência quase unânime de pelo menos 1 gene relacionado aos agrupamentos invasão e colonização (IC – 100%) e sistema de secreção (SS – 90%) em *C. coli* evidencia a capacidade destas cepas de invadirem células do hospedeiro e causarem infecções graves [61,76] independente da época do ano (Figura 4). Ohadi e colaboradores [77] evidenciaram uma correlação positiva entre genes relacionados a aderência, invasão e citotoxicidade, que leva ao aumento da capacidade de *Campylobacter* spp. colonizar e causar danos a células intestinais, indicando que o arsenal genético destas cepas trabalha em conjunto na infecção do hospedeiro.

A adaptação ao estresse é uma estratégia importante para a manutenção bacteriana no meio ambiente e no hospedeiro, e pode ser associada aos genes *dnaJ*, *cbrA* e *htrA* [78-83]. A frequência da categoria de genes adaptados ao estresse foi baixa (3,6% - 3/83), e 66,6% dos perfis (20/30) apresentaram algum gene desta categoria. Individualmente, os genes *dnaJ*, *cbrA* e *htrA* foram identificados em 12% (10/83), 9,6% (8/83) e 85,5% (71/83) dos isolados, respectivamente.

A baixa prevalência do gene *dnaJ* em nosso estudo, foi similar a determinada por Gomes e colaboradores [33] em amostras humanas e animais (20% - 10/50) no Brasil, mas a ocorrência de 100% foi citada

recentemente em isolados humanos (12/12) no Chile [45]. Considerando que durante o processamento, preparo e armazenamento, os alimentos são submetidos a diferentes temperaturas [82], a presença e expressão desse gene pode ser crucial para a permanência de *C. coli* no ambiente. Da mesma forma, a baixa frequência do gene *cbrA* sugere que as cepas avaliadas apresentam uma menor resistência ao choque osmótico [81]. Por outro lado, a elevada ocorrência de *htrA* (71/83 - 85,5%), auxilia na correção das proteínas deformadas oriundas de processos de estresse por choque térmico presença de oxigênio, representando uma vantagem na sobrevivência no ambiente [84]. É possível que a maior frequência desse gene esteja relacionada a amplitude de funções de *htrA*, que inclui não somente a tolerância ao estresse, mas também o auxílio das proteínas codificadas por esse gene no processo de transmigração bacteriana entre células epiteliais vizinhas, evidenciando maior essencialidade na sua manutenção em *C. coli* [85].

Diante destes achados, o potencial virulento das cepas estudadas fica ainda mais evidente quando identificamos o agrupamento mais prevalente (A9) (Tabela 3), que incluiu 13 perfis classificados como virulentos, sendo dois deles multivirulentos. Paralelamente, identificamos que pelo menos um gene de virulência de cada uma das cinco categorias foi identificado em mais de 83% das cepas. As características de virulência destas cepas nos ajudam a compreender a emergência de campilobacteriose por *C. coli* descrita recentemente [22,86].

O número de cepas virulentas foi expressivamente maior que o número de cepas multivirulentas em todas as análises realizadas. Esse achado era esperado uma vez que a maioria (49,5%) das cepas de *C. coli* apresentaram 6/14 genes estudados e as multivirulentas apresentam um maior arsenal de genes presentes. Vale ressaltar que a maior diversidade de genes de virulência é descrita para a espécie *C. jejuni*, o que determina sua maior relação a casos de campilobacteriose humana [3,40,44,45].

Quanto à variabilidade das cepas, observamos valores superiores (>0,75) nas análises por amostra, o que indica que, em um mesmo hospedeiro, foi possível encontrar diversas linhagens de *C. coli*. Este fato pode ser explicado pela capacidade de *Campylobacter* de se adaptar a diferentes nichos, e ao fato de linhagens distintas poderem coabitar no mesmo hospedeiro [29,87]. Em nosso estudo, além de diferentes linhagens de *C. coli* serem encontradas em uma mesma amostra, a colonização com *C. jejuni* foi observada em 37,5% (9/24) das amostras.

A nível local, considerando as análises específicas em estabelecimentos, por cidades e nos estados, observamos variabilidades média e baixa, que puderam ser relacionadas à presença de cepas mais virulentas (Figura 2), de modo que a maior parte dos estabelecimentos (10/17) e cidades (10/16) apresentaram mais de 70% dos isolados classificados como virulentos. Os baixos I. Var. se devem a perfis que englobam um grande número de cepas, com um maior quantitativo de genes de virulência, o que foi considerado uma tendência evolutiva em *C. jejuni* [38], e pode estar ocorrendo também com *C. coli*. Segundo Aidley e colaboradores [88], populações de *Campylobacter* estão sujeitas a gargalos de seleção que podem influenciar um determinado *loci* genômico e contribuir com o surgimento de cepas mais competitivas (virulentas).

O I. Var. foi inversamente proporcional ao potencial virulento na análise temporal (Figura 3), e picos de virulência foram observados nos meses de dezembro e abril. A maior virulência detectada no mês de dezembro (verão), assim como a equivalência de cepas virulentas e multivirulentas no mês de novembro (primavera), podem ser relacionadas ao comportamento sazonal de *Campylobacter*, onde picos de incidência deste patógeno foram correlacionados com estações quentes e úmidas na Europa e África [89,90]. Porém, o elevado potencial virulento de cepas em abril (outono) evidencia a manutenção da característica em diferentes estações do ano. No Brasil, apenas oito surtos foram atribuídos a *Campylobacter* spp. entre os anos 2000 e 2019, e ocorreram em diferentes meses do ano (janeiro, março, abril, maio, setembro) [32], o que demonstra não haver ao certo uma relação de sazonalidade no país, provavelmente por se tratar de um país com clima predominantemente quente e úmido.

Curiosamente, nos meses de dezembro e abril, foram isoladas cepas de *C. coli* classificadas como sensíveis (perfil 3). Assim como em nosso estudo, em trabalho realizado por Lapiere e colaboradores [91], uma elevada prevalência de genes de virulência foi associada à ocorrência de cepas de *C. coli* mais susceptíveis aos antimicrobianos. Este achado evidencia a capacidade desta espécie de modular seu transcriptoma ou sua expressão gênica em favor dos desafios do ambiente [38]. Provavelmente, estas cepas deixaram de transcrever genes de resistência aos antimicrobianos (avaliados fenotipicamente), por uma necessidade de priorizar a manutenção das cepas com genes relacionados a virulência.

As taxas de resistência para ciprofloxacina (89,2% - 74/83) e à eritromicina (55,4% - 46/83), foram similares a achados recentes em cepas de *C. coli* isoladas de carcaças de frangos, que também demonstraram a tendência a altos índices de resistência a ciprofloxacina, (94%-100%), e grandes variações na resistência à eritromicina, (0%-90%) [25,92,93]. A menor resistência a eritromicina pode ser relacionada à proibição do uso deste medicamento como promotor de crescimento na medicina veterinária no Brasil, desde 2012 [94].

A elevada resistência de *C. coli* às fluorquinolonas foi correlacionada ao uso indiscriminado desta classe na medicina veterinária, e em especial, na avicultura, tanto em tratamentos quanto como promotor de crescimento [26,27]. O uso de fluorquinolonas como promotores de crescimento foi banido em 2009 [95], porém, esta droga ainda é utilizada de forma terapêutica em diversos países [96], o que tem gerado consequências relacionadas a altos índices resistência de *C. coli*.

A alta prevalência de cepas de resistentes aos dois antimicrobianos (perfil 2) (46/83 - 55,4%), principalmente no estado II (21/32 - 65,6%), é preocupante e demonstra pouca opção de tratamento para infecções graves por *C. coli*, visto que a eritromicina é a droga de primeira escolha e a ciprofloxacina, de segunda escolha para o tratamento campilobacteriose humana [25]. Este achado pode estar relacionado à maior frequência de uso destes medicamentos no tratamento de enfermidades aviárias no estado II, causando uma seleção de cepas mais resistentes, aumentando o risco de difusão de cepas resistentes através da cadeia de produção [92].

Evidências apontam que *C. coli* carrega mais combinações de genes de resistência aos antimicrobianos simultaneamente do que *C. jejuni* [25,40,92]. Porém, a coexistência com *C. jejuni*, encontrada em nosso

trabalho, sob pressão no mesmo ambiente na industrial alimentar oferece uma oportunidade para trocas genéticas, e altos níveis de troca genômica interespecie podem alterar as tendências de resistência, representando um risco para a saúde pública [40].

Essa elevada plasticidade genética identificada em *Campylobacter*, justifica também a ocorrência de 22/30 (73,3%) perfis de virulência que envolviam apenas uma cepa, assim como a heterogeneidade de linhagens de *C. coli* discriminadas na análise do dendrograma, especialmente para o estado I (Figura S1). O gênero *Campylobacter* apresenta alto potencial de realizar recombinação e transferência horizontal de genes, pois este patógeno é competente na captação e transformação de segmentos de DNA, ou mesmo genes, o que favorece a diversidade dos perfis de virulência [97].

A disseminação de perfis observada nos estados I e II (*clusters* 5 e 8) evidencia a propagação de linhagens entre estes estados, e pode ser relacionado a proximidade dos dois estados e dificuldade no atendimento de normas de higiene e biossegurança, o que permite a difusão destes isolados [98].

A clusterização permitiu observar uma especificidade de linhagens, especialmente nos estados II e III, realçada pelos *clusters* exclusivos (4 e 10 no estado II, e 9, 13, e 14 no estado III) que mantiveram características fenotípicas e genotípicas iguais. De uma maneira geral, estes *clusters* separaram cepas de um mesmo estabelecimento, e a manutenção das características de virulência e resistência dentro de um mesmo *cluster* demonstra que as medidas de controle estabelecidas promovem a seleção de cepas mais virulentas [88] ou resistentes, dependendo do desafio apresentado naquele estabelecimento. Estes achados também sugerem a ocorrência de contaminação cruzada em alguma etapa do processo de produção, o que promoveu linhagens semelhantes em diferentes carcaças no mesmo estabelecimento [38]. As etapas de pré resfriamento da carcaça (*chiller*), depenagem, evisceração e envase, são considerados pontos críticos na transmissão de isolados entre as carcaças [99,100]. Assim, nosso estudo sugere que especialmente nos estados II e III, medidas de controle mais rigorosas devem ser empregadas para minimizar a contaminação cruzada.

Diante da complexidade epidemiológica de *C. coli*, nossos resultados podem contribuir com estratégias para controle. O perfil gênico demonstra elevado potencial em processos relacionados à invasão e estabelecimento de processo infeccioso no hospedeiro, com uma menor capacidade de se adaptar e manter viável no ambiente abiótico e sob condições de estresse. A resistência às drogas de escolha no tratamento evidencia a necessidade de implantação de estratégias que reduzam o uso na produção avícola. Apesar das linhagens apresentarem elevada diversidade genética disseminada, existe especificidade local que registra a ocorrência de contaminação cruzada e manutenção de genótipos virulentos.

4. Materiais e Métodos

4.1 Amostras

A análise foi feita a partir de 83 cepas de *C. coli* isoladas de 24 carcaças de frango refrigeradas, abatidas em estabelecimentos sob fiscalização do Serviço de Inspeção Federal do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). As amostras foram coletadas entre

outubro de 2017 e julho de 2018, para atender ao Programa Exploratório para Pesquisa e Estimativa de Prevalência de *Campylobacter* spp., que realizou análise em amostras representativas de carcaças de frango produzidas no Brasil (Memorando nº 218/2017/CRISC/CGPE/DIPOA/MAPA/DAS/MAPA). Nesse programa 601 cepas foram identificadas como do gênero *Campylobacter* e a espécie *C. coli* representou 14,98% do total.

Os 17 estabelecimentos onde as amostras de *C. coli* foram coletadas estão localizadas em 16 municípios de três estados (I, II e III). O isolamento das cepas, assim como a identificação, foram realizados pelo MAPA, conforme a metodologia ISO 10272-1:2017 [101], e espectrometria de massa (Maldi TOF®). As amostras foram preparadas de acordo com o protocolo de transferência direta (Direct TransferMethod) para a placa a partir de colônia isolada em três spots sem realimentação. Posteriormente a aplicação na placa, as amostras foram cobertas com 1µL de solução de ácido-ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) e utilizadas como controle cepas de referência pertencentes ao LANAGRO-RS. Para a análise utilizou-se o banco de espectros MALDI Biotyper RTC/OC 3.1, e os critérios de decisão de espécie igual ou superior a 1,7 para gênero e igual ou superior 2,0 para gênero e espécie. Foi utilizado o programa de controle de aquisição de dados Brucker, flexControl 3.4, e a calibração realizada com o calibrante Protein Standard I, com tolerância de erro de calibração inferior a 200 ppm.

As cepas foram recebidas em cultura pura, devidamente identificadas quanto à espécie e dados de local e data de isolamento e ficaram depositadas na bacterioteca do Laboratório de Epidemiologia Molecular (LEPIMOL) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (FAMEV/UFU) até o momento da análise.

4.2 Painel de virulência

As cepas foram reativadas em ágar *Campylobacter*Blood-FreeSelectiveMedium (Modified CCDA-Preston) (Oxoid®), e posteriormente avaliadas quanto a morfologia, testes de motilidade, oxidase e catalase [101]. O DNA genômico foi extraído utilizando-se o WizarGenomic DNA Purification Kit (Promega), conforme protocolo do fabricante. O DNA foi quantificado por Nanodrop, e utilizado como molde para as reações de PCR.

Os isolados de *C. coli* foram testadas para 14 genes de virulência, que foram subdivididos em cinco categorias: I – de formação de biofilme (genes *flaA* para motilidade e *luxS* para mecanismo de *quorum-sensing*), II – sistema de secreção (*cdtABC* para secreção de citotoxina distensiva e *hcp* para sistema de secreção tipo VI), III – invasão e colonização (*cadF* para colonização intracelular, *ciaB* para invasão celular e *pldA* para invasão e colonização), IV – adaptação ao estresse (*dnaJ* para termotolerância, *htrA* que auxilia o crescimento sob condições estressantes e *cbrA* para resistência ao choque osmótico), e V – genes de indução a síndrome de Guillain-Barré (*cstII* e *neuA*). Os iniciadores e condições para reação estão descritos na tabela 7.

Tabela 7. Condições da PCR, seqüências de nucleotídeos e tamanhos dos amplicons para identificação de genes de virulência em *C. coli*

Categoria	Gene	Pb	Primer (5'>3')	Volume/ DNA/ Primer/ Anelamento	Referência		
Formação de biofilmes	<i>flaA</i>	1728	F-ATGGGATTTTCGTATTAACAC R- CTGTAGTAATCTTAAAACATTT TG F-	25µL/20ng/10 pmol/45°C- 1min	[12]		
	<i>luxS</i>	1080	AGGCAAAGCTCCTGGTAAGGC CAA R-GGATCCGTATAGGTAAGTTC ATTTTIGCTCC F-	25uL/50ng/10 pmol/55°C- 1min	[17]		
Sistema de secreção	<i>cdtA</i>	420	CTATTACTCCTATTACCCACC R- AATTGAACCGCTGATTGCTC F-	25µL/80ng/10 pmol/57°C- 1min	[13]		
	<i>cdtB</i>	531	AGGAACTTTACCAAGAACAGC C R- GGTGGAGTATAGGTTGTGTC F-				
	<i>cdtC</i>	339	ACTCCTACTGGAGATTGAAAG R- CACAGCTGAAGTTGTTGTTGGC F-				
	<i>Hcp</i>	510	TGGCTGAACCAGCGTTTATAAA AATTG R-TTAAGCTTGCCCTCTCTCCA				
Invasão e colonização	<i>cadF</i>	400	F-TTGAAGGTAATTTAGATATG R-CTAATACCTAAAGTTGAAAC	25µl/20ng/40p mol/47°C- 1min	[14]		
	<i>ciaB</i>	527	F-TGCGAGATTTTCGAGAATG R-TGCCCGCCTTAGAACTTACA	25uL/20ng/10 pmol/45°C- 1min			
	<i>pldA</i>	385	F-AAGAGTGAGGCGAAATTCCA R-GCAAGATGGCAGGATTATCA				
Adaptação ao estresse	<i>dnaJ</i>	720	F-AAGGCTTTGGCTCATC R-CTTTTIGTTCATCGTT F-	25uL/20ng/10 pmol/46°C- 1min	[11]		
	<i>htrA</i>	1393	TAATACGACTCACTATAGGGTA AGTTTAGCAAGTGCTTTATTG C R- AAAACCATTGCGATATACCCA AACT F-				
	<i>cbrA</i>	1165	TAATACGACTCACTATAGGGTC A ACTCTATCCTTGCCATTATCTT R- GTAGATATTGCTTTTGGTTTGC TG F-			25µL/20ng/50 °C -1min	[15]
	<i>cstII</i>	400	GTTATTATTGCTGAAATGGAC CA AGT R- ACATATAGACCCCTGAGGTAAT T CTTT F-			25uL/20ng/10 pmol/52°C- 1min	[16]
Indução de SGC	<i>neuA</i>	500	F-GCTCGTGGTGGCTCAAAGGG R-ATTGCACCATGCTCATATA				

Foi utilizado o kit GoTaq® Green Master Mix (Promega) para as reações de PCR, conforme as instruções do fabricante. A cepa de *C. jejuni*

IAL 2383 foi utilizada como controle positivo. Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão de corrida TBE 0,5x (Invitrogen). O marcador de 100pb (Invitrogen) foi usado como padrão de peso molecular.

As cepas foram consideradas virulentas quando possuíam ao menos um gene de cada categoria descrita, e multivirulentas quando possuíam dois ou mais genes de cada categoria; este critério foi adaptado da análise de índices de resistência aos antimicrobianos [36].

Foi estabelecida a variabilidade das cepas dentro dos grupos, com base na análise de número de perfis de virulência distintos identificados. Os índices de variabilidade, de virulência e multivirulência foram estabelecidos pela frequência relativa de cada grupo de cepas avaliadas. A variabilidade foi considerada baixa para valores inferiores a 0,5, média para valores entre 0,5 e 0,7, e altos para valores superiores a 0,7, de forma adaptada ao estabelecido por Krumperman [36].

4.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBT)

Foi determinada a CIM das 83 cepas de *C. coli* para os antimicrobianos eritromicina e ciprofloxacina utilizando o método da microdiluição em caldo. As concentrações testadas foram de 0,125 a 32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para ambos os antimicrobianos. Foram utilizados os seguintes pontos de corte de resistência para *C. coli*: eritromicina >8 e ciprofloxacina >0,5, de acordo com as diretrizes e recomendações do EUCAST [102].

Para a determinação da CIM de *C. coli* foi utilizado o caldo Muller Hinton - MH (Oxoid®) previamente ajustado com 20-25mg de Ca^{2+}/L , 10-12,5 mg de Mg^{2+}/L e 5% de sangue desfibrinado de carneiro. Resumidamente, em placas de microdiluição de 96 poços foram adicionados 180 μL de caldo MH (Oxoid®) contendo as diferentes concentrações previamente estabelecidas dos antimicrobianos alvo. A suspensão bacteriana foi preparada em NaCl 0,9% estéril até turvação correspondente a escala 0,5 de McFarland e 20 μL desta suspensão foi transferida para os poços [103].

As microplacas foram incubadas a 42°C durante 24 horas em condição de microaerofilia (Probac®) e, após, foi realizada a leitura visual. Foi definida como a CIM a menor concentração do antibiótico na qual não for observado crescimento visível da bactéria, pela ausência de turvação e hemólise do meio.

Posteriormente, foi realizado a CBM, onde o conteúdo de cada poço da placa do CIM foi semeado em Agar CCDA, seguido da incubação em condições já descritas. A CBT foi determinada pela menor concentração em que não houve crescimento.

Em todas as determinações foram utilizados controle negativo composto do meio sem adição de bactérias e a cepa de *C. jejuni* IAL 2383 como controle positivo.

4.4 Análise estatística

A avaliação estatística do painel de virulência foi realizada apoiada no número de cepas isoladas em cada amostra, estabelecimento de origem, cidade, estado e aspectos sazonais. Para comparação, a normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk, e foi aplicado o teste exato de Fischer ou teste t de student para comparação de duas variáveis. Para três ou mais variáveis, foi utilizado ANOVA

outeste de Kruskal-Wallis. Os cálculos foram realizados com o auxílio do software GraphPrism 8.0.1 com intervalo de confiança de 95%.

4.5 Clusterização

A similaridade proteômica foi determinada com o software BioNumerics 7.6. Para determinar a similaridade entre os isolados, os picos dos espectros foram alinhados, e os picos com diferença em relação a massa-carga <250 ppm foram considerados idênticos [104].

Materiais Suplementares: Tabela S1. Perfis de virulência de *C. coli* isoladas de carcaças de frango no Brasil entre Outubro de 2017 e Julho de 2018. Figura S1. Dendograma de *C. coli* isoladas de carcaças de frango no Brasil entre Outubro de 2017 e Julho de 2018.

Contribuição dos autores: Conceitualização, A. B. G. B.; P. P. B. M. e D. A. R.; metodologia, A. B. G. B.; P. P. B. M., e R. T. M.; software, R. T. M. e A. L. G.; validação e análise formal, R. T. M.; investigação, A. B. G. B., P. P. B. M. and C. M. B.; escrita – preparo do manuscrito original, A. B. G. B.; escrita – revisão e edição, R. T. M. and D. A. R.; supervisão, administração do projeto e aquisição de financiamento D. A. R. Todos os autores leram e concordaram com a versão de publicação do mauscrito.

Financiamento: Esta pesquisa foi financiada por Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior–Brasil (CAPES).

Declaração do Conselho de Revisão Institucional: Não aplicável.

Declaração de Consentimento: Não aplicável.

Declaração de disponibilidade de dados: Os dados estão no artigo e no material suplementar.

Agradecimentos: Ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) por fornecer as cepas de *C. coli* identificadas.

Conflitos de Interesse: Os autores declaram que a pesquisa foi conduzida sem relações que poderiam construir um conflito de interesses.

Referências

1. World Health Organization - WHO. *Campylobacter*. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/campylobacter>. Acesso em: 15 dez 2020.
2. MOORE, J. E. et al. *Campylobacter*. *Vet Res*, v. 36, n.3, p.351-382, 2005.
3. EFSA-ECDC. The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017. *EFSA J*, 2019, 17, e05598. doi: 10.2903/j.efsa.2019.5598
4. Center of Disease Control and Prevention - CDC. *Campylobacter* (Campylobacteriosis). 2020. Disponível em: <https://www.cdc.gov/campylobacter/technical.html>. Acesso em 15 dez 2020.
5. Zbrun, M. V.; Rossler, E.; Romero-Scharpen, A.; Soto, L. P.; Berisvil, A.; Zimmermann, J. A.; Fusari, M. L.; Signorini, M. L.; Frizzo, L.S. Worldwide meta-analysis of the prevalence of *Campylobacter* in animal food products. *Res in Vet Sci*, 2020, 132, 69-77. doi: 10.1016/j.rvsc.2020.05.017
6. Fitzgerald, C. *Campylobacter*. *Clin Lab Med*, 2015, 35 (2), 289-298. doi: 10.1016/j.cl.2015.03.001
7. Costa, D.; Iraola, G. Pathogenomics of emerging *Campylobacter* species. *Clin Microbiol Rev*, 2019, 32(4), e00072-18. doi: 10.1128/CMR.00072-18.
8. García-Sánchez, L.; Melero, B.; Rovira, J. *Campylobacter* in the food chain. In: *Advances in food and nutrition research*. Ed: Rodriguez-Lázaro, D. Academic Press, 86, 215-252, 2018. doi: 10.1016/bs.afnr.2018.04.005.
9. Oliveira, M. G.; Rizzi, C.; Galli, V.; Lopes, G. V.; Haubert, L.; Dellagostin, O. A.; Silva, W. P. Presence of genes associated with adhesion, invasion, and toxin production in *Campylobacter jejuni* isolates and effect of temperature on their expression. *Can J Microbiol*, 2019, 65(4), 253-260. doi: 10.1139/cjm-2018-0539
10. Fernandes, M.; Mena, C.; Silva, J.; Teixeira, P. Study of cytolethal distending toxin (cdt) in *Campylobacter coli* using a multiplex chain reaction assay its distribution among clinical and food strains. *Foodborne Pathog Dis*, 2010, 7(1), 103-106. doi: 10.1089/fpd.2009.0326

11. 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. *J Med Microbiol*, 2003, 52(4), 345–348. doi: 10.1099/jmm.0.05056-0
12. Hänel, I.; Müller, J.; Müller, W.; Schulze, F. Correlation between invasion of Caco-2 eukaryotic cells and colonization ability in the chick gut in *Campylobacter jejuni*. *Vet. Microbiol*, 2004, 2, 75-82. doi: 10.1016/j.vetmic.2004.04.004
13. Martínez, I.; Mateo, E.; Churrua, E.; Girbau, C.; Alonso, R.; Fernandez-Astorga, A. Detection of *cdtA*, *cdtB*, and *cdtC* genes in *Campylobacter jejuni* by multiplex PCR. *Int J Med Microbiol*, 2006, 296, 45-48. doi: 10.1016/j.ijmm.2005.08.003
14. Zheng, J.; Meng, J. H.; Zhao, S. H.; Singh, R.; Song, W. X. Adherence to and invasion of human intestinal epithelial cells by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from retail meat products. *J Food Prot*, 2006, 69, 768–774. doi: 10.4315/0362-028x-69.4.768
15. Biswas, D.; Hannon, S. J.; Townsend, H. G.; Potter, A.; Allan, B. J. 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. *Int Microbiol*, 2011, 14, 25-32. doi : 10.2436/20.1501.01.132807
16. Amon, P.; Klein, D.; Springer, B.; Jelovcan, S.; Sofka, D.; Hilbert, F. Analysis of *Campylobacter jejuni* isolates of various sources for loci associated with Guillain-Barré syndrome. *Eu J Microbiol Immunol*, 2012, 2(1), 20–23. doi: 10.1556/EuJMI.2.2012.1.4
17. Elvers, K. T.; Park, S. F. Quorum sensing in *Campylobacter jejuni*: detection of a luxS encoded signalling molecule. *Microbiol*, 2012, 148, 1475-1481. doi: 10.1099/00221287-148-5-1475
18. Singh, A.; Nisaa, K.; Bhattacharyya, S. Mallick, A. I. Immunogenicity and protective efficacy of mucosal delivery of recombinant hcp of *Campylobacter jejuni* Type VI secretion system (T6SS) in chickens. *Mol Immunol*, 2019, 111, 182-197. doi: 10.1016/j.molimm.2019.04.016
19. Allos, B. M. *Campylobacter jejuni* infections: update on emerging issues and trends. *Clin Infect Dis*, 2001, 32, 1201–1206. doi: 10.1086/319760
20. Sallam, K. I. Prevalence of *Campylobacter* in chicken and chicken by-products retailed in Sapporo area, Hokkaido, Japan. *Food Control*, 2007, 18(9), 1113-1120. doi: 10.1016/j.foodcont.2006.07.005
21. Suarez, A.; Parsons, C.; Parsons, E.; Gowe, I.; Vickery, S. Diarrheal illness and prosthetic joint infection caused by *Campylobacter coli* following consumption of undercooked chicken wings. *ID Cases*, 2019, 18, e00644m. doi: 10.1016/j.idcr.2019.e00644
22. Clarck, C. L. T.; Murray, E. V. *Campylobacter colitis* leads to toxic megacolon and multiple organ failure. *BMJ Case Rep*, 2020, 22(3), e233373. doi: 10.1136/bcr-2019-233373
23. Dan, M.; Parizade, M. Chronic high-level multidrug-resistant *Campylobacter coli* enterocolitis in an agammaglobulinemia patient: oral gentamicin efficacy. *Med Mal Infect*, 2020, 50(6), 525-527. doi: 10.1016/j.medmal.2020.04.013
24. Wang, Y.; Zhang, M.; Deng, F.; Shen, Z.; Wu, C.; Zhang, J.; Zhang, Q.; Shen, J. Emergence of multidrug-resistant *Campylobacter* species isolates with a horizontally acquired rRNA methylase. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58, 5405–5412. doi: 10.1128/AAC.03039-14
25. LOPEZ-CHAVARRIAS, V. et al. Monitoring of Antimicrobial Resistance to Aminoglycosides and Macrolides in *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* From Healthy Livestock in Spain (2002-2018). *Front Microbiol*, v. 2, n. 12, 689262, 2021. doi: 10.3389/fmicb.2021.689262
26. Van Boeckel, T. P.; Brower, C.; Gilbert, M.; Grenfell, B. T.; Levin, S. A.; Robinson, T. P.; Teillant, A.; Laxminarayan, R. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc Natl Acad Sci*, 2015, 112(18), 5649–54. doi: 10.1073/pnas.1503141112
27. Mouftah, S. F.; Cobo-Díaz, J. F.; Álvarez-Ordóñez, A.; Elserafy, M.; Saif, N. A.; Sadat, A.; El-Shibiny, A.; Elhadidy, M. High-throughput sequencing reveals genetic determinants associated with antibiotic resistance in *Campylobacter* spp. from farm-to-fork. *PLoS One*, 2021, 16(6), e0256797. doi: 10.1371/journal.pone.0253797
28. Sheppard, S. K.; Didelot, X.; Jolley, K. A.; Darling, A. E.; Pascoe, B.; Meric, G.; Kelly, D. J.; Cody, A.; Colles, F. M.; Strachan, N. J.; Ogden, I. D.; Forbes, K.; French, N. P.; Carter, P.; Miller, W. G.; McCarthy, N. D.; Owen, R.; Litrup, E.; Egholm, M.; Affourtit, J. P.; Bentley, S. D.; Parkhill, J.; Maiden, M. C. J.; Falush, D. Progressive genome-wide introgression in agricultural *Campylobacter coli*. *Mol Ecol*, 2013, 22(4), 1051-1064. doi: 10.1111/mec.12162
29. Sheppard, S.K.; Maiden, M.C.J. The evolution of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Cold Spring Harb Perspect Bio*, 2015, 17, a018119. doi: 10.1101/cshperspect.a018119
30. Vidal, A. B.; Colles, F. M.; Rodgers, J. D.; McCarthy, N. D.; Davies, R. H.; Maiden, M. C. J.; Clifton-Hadley, F. A. Genetic diversity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from conventional broiler flocks and the impacts of sampling strategy and laboratory method. *Appl Environ Microbiol*, 2016, 82, 2347-2355. doi: 10.1128/AEM.03693-15
31. Associação Brasileira de Proteína Animal - ABPA. Relatório Anual 2021. Disponível em: <http://abpa-br.org/mercados/#relatorios>. Acesso em: 01 de julho de 2021.

32. BRASIL. Ministério da Saúde. Doenças Transmitidas por Alimentos. Banco de dados 2000 a 2019. 2020. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/images/xls/2020/May/11/Dados-Surtos-DTA-2000-a-2019.xls>. Acesso em: 01 jul 2021.
33. Gomes, C. N.; Passaglia, J.; Vilela, F. P.; Pereira da Silva, F. M. H. S.; Duque, S. S.; Falcão, J. P. High survival rates of *Campylobacter coli* under different stress conditions suggest that more rigorous food control measures might be needed in Brazil. *Food Microbiol*, 2018, 73, 327-333. doi: 10.1016/j.fm.2018.02.014
34. Melo, R. T.; Dumont, C. F.; Braz, R. F.; Monteiro, G. P.; Takeuchi, M. G.; Lourenzatto, E. C. A.; Santos, J. P.; Rossi, D. A. Genotypical relationship between human and poultry strains of *Campylobacter jejuni*. *Curr Microbiol*, 2021, 78(8), 2980-2988. doi: 10.1007/s00284-021-02553-2
35. Rossi, D. A.; Dumont, C. F.; Santos, A. C. S.; Vaz, M. E. L.; Prado, R. R.; Monteiro, G. P.; Melo, C. B. S.; Stamoulis, V. J.; Santos, J. P.; Melo, R. T. Antibiotic resistance in the alternative lifestyle of *Campylobacter jejuni*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11, 535757. doi: 10.3389/fcimb.2021.535757
36. Krumperman, P. H. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Appl Environ Microbiol*, 1983, 46, 165-170. doi: 10.1128/aem.46.1.165-170.1983
37. Würfel, S. F. R.; Silva, W. P.; Oliveira, M. G.; Kleinubing, N. R.; Lopes, G. V.; Gandra, E. A.; Dellagostin, O. A. Genetic diversity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from poultry meat products sold on the retail market in Southern Brazil. *Poult Sci*, 2019, 98(2), 932-939. doi: 10.3382/ps/pey365
38. Melo, R. T.; Mendonça, E. P.; Valadares Junior, E. C.; Monteiro, G. P.; Peres, P. A. B. M.; Rossi, D. A. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* originated from chicken carcasses modulate their transcriptome to translate virulence genes in human cells. *Pesq Vet Bras*, 2019, 39(8). doi: 10.1590/1678-5150-PVB-6031
39. Wiczorek, K.; Bocian, L.; Osek, J. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolated from carcasses of chickens slaughtered in Poland – a retrospective study. *Food Control*, 2020, 112, 107159. doi: 10.1016/j.foodcont.2020.107159
40. Hull, D. M.; Harrell, E.; van Vliet, A. H. M.; Correa, M.; Thakur, S. Antimicrobial resistance and interspecies gene transfer in *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* isolated from food animals, poultry processing, and retail meat in North Carolina, 2018–2019. *PLoS ONE*, 2021, 16(2), e0246571. doi: 10.1371/journal.pone.0246571
41. Quetz, J. S.; Lima, I. F. N.; Havt, A.; Carvalho, E. B.; Lima, N. L.; Soares, A. M.; Mota, R. M. S.; Guerrant, R. L.; Lima, A. A. M. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in children from communities in Northeastern Brazil: molecular detection and relation to nutritional status. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2010, 67(3), 220–227. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2010.02.025
42. Abbasi, E.; Ghaznavi-Rad, E. A Report of Two Clinical Coinfections with *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Infantile Dysentery. *Arch Pediat Infect Dis*, 2019, 7 (2); e80116. doi: 10.5812/pedinf.80116
43. Golz, J. C.; Epping, L.; Knuver, M. T.; Borowiak, M.; Hartkopf, F.; Deneke, C.; Malorny, B.; Semmler, T.; Stingl, K. Whole genome sequencing reveals extended natural transformation in *Campylobacter* impacting diagnostics and the pathogens adaptive potential. *Scientific Reports*, 2020, 10(3686), 1. doi: 10.1038/s41598-020-60320-y
44. Rossler, E.; Olivero, C.; Soto, L. P.; Frizzo, L. S.; Zimmermann, J.; Rosmini, M. R.; Sequeira, G. J.; Signorini, M. L.; Zbrun, M. V. Prevalence, genotypic diversity and detection of virulence genes in thermotolerant *Campylobacter* at different stages of the poultry meat supply chain. *Int J Food Microbiol*, 2020, 326, 108641. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108641
45. Bravo, V.; Katz, A.; Porte, L.; Weitzel, T.; Varela, C.; Gonzalez-Escalona, N.; Blondel, C. J. Genomic analysis of the diversity, antimicrobial resistance and virulence potential of clinical *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains from Chile. *PLoS Negl Trop Dis*, 2021, 15(2), e0009207. doi: 10.1371/journal.pntd.0009207
46. Tam, C. C.; Rodrigues, L. C.; Petersen, I.; Islam, A.; Hayward, A.; O'Brien, S. J. Incidence of Guillain-Barré Syndrome among patients with *Campylobacter* infection: A general practice research database study. *J Infect Dis*, 2006, 194(1), 95-97. doi: 10.1086/504294
47. Bersudsky, M.; Rosenberg, P.; Rudensky, B.; Wirguin, I. Lipopolysaccharides of a *Campylobacter coli* isolate from a patient with Guillain-Barré syndrome display ganglioside mimicry. *Neuromuscul Disord*, 2000, 10, 182–186. doi: 10.1016/s0960-8966(99)00106-6
48. Van Belkum, A.; Jacobs, B.; Van Beek, E.; Louwen, R.; Van Rijs, W.; Debruyne, L.; Gilbert, M.; Li, J.; Jansz, A.; Mégraud, F.; Endtz, H. Can *Campylobacter coli* induce Guillain-Barré syndrome? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2009, 28, 557–560. doi: 10.1007/s10096-008-0661-9
49. Culebro, A.; Machado, M. P.; Carriço, J. A.; Rossi, M. Origin, evolution, and distribution of the molecular machinery for biosynthesis of sialylated lipooligosaccharide structures in *Campylobacter coli*. *Scientific Reports*, 2018, 8, 3028. doi: 10.1038/s41598-018-21438-2
50. Murphy, C.; Carroll, C.; Jordan, N. Environmental survival mechanisms of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. *J Appl Microbiol*, 2006, 100(4), 623-632. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.02903.x

51. Sulaeman, S.; Hernould, M.; Schaumann, A.; Coquet, L.; Bolla, J. M.; Dé, E.; Tresse, O. Enhanced adhesion of *Campylobacter jejuni* to abiotic surfaces is mediated by membrane proteins in oxygen-enriched conditions. *PLoS ONE*, 2012, 7(9), e46402. doi: 10.1371/journal.pone.0046402
52. Schmidt, A. M.; Escher, U.; Mousavi, S.; Tegtmeyer, N.; Boehm, M.; Backert, S.; Bereswill, S.; Heimesaat, M. M. Immunopathological properties of the *Campylobacter jejuni* flagellins and the adhesin CadF as assessed in a clinical murine infection model. *Gut Pathog*, 2019, 11(1), 24. doi: 10.1186/s13099-019-0306-9
53. Klancnik, A.; Simunovic, K.; Sternisa, M.; Ramic, D.; Mozina, S. S.; Bucar, F. Anti-adhesion activity of phytochemicals to prevent *Campylobacter jejuni* biofilm formation on abiotic surfaces. *Phytochem Reviews*, 2020, 20, 55-84. doi: 10.1111/j.1472-765X.2009.02747.x
54. Plummer, P. LuxS and quorum-sensing in *Campylobacter*. *Front Cell Infec Microbiol*, 2012, 2(22), 1-9. doi: 10.3389/fcimb.2012.00022
55. Kim, S. H.; Park, C.; Lee, E. J.; Bang, W. S.; Kim, Y. J.; Kim, J. S. Biofilm formation of *Campylobacter* strains isolated from raw chickens and its reduction with DNase I treatment. *Food Control*, 2017, 71, 94-100. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.06.038
56. Melo R. T. ; Mendonça, E. P.; Monteiro, G. P.; Siqueira, M. C.; Pereira, C. B.; Peres, P. A. B. M.; Fernandez, H.; Rossi, D. A. Intrinsic and extrinsic aspects on *Campylobacter jejuni* biofilms. *Front Microbiol*, 2017, 8, 1332. doi: 10.3389/fmicb.2017.01332
57. Grant, K. A. ; Belandia, I. U.; Dekker, N.; Richardson, P. T.; Park, S. F. Molecular characterization of pldA, the structural gene for a phospholipase A from *Campylobacter coli*, and its contribution to cell-associated hemolysis. *Infect Immun*, 1997, 65(4), 1172-1180. doi: 10.1128/iai.65.4.1172-1180.1997.
58. Konkel, M. E.; Garvis, S. G.; Tipton, S. L.; Anderson Jr, D. E.; Cieplak Jr, W. Identification and molecular cloning of a gene encoding fibronectin-binding protein (CadF) from *Campylobacter jejuni*. *Mol Microbiol*, 1997, 24, 953-963. doi: 10.1046/j.1365-2958.1997.4031771.x
59. Rivera-Amill, V. ; Kim, B. J.; Seshu, J.; Konkel, M. E. Secretion of the virulence associated *Campylobacter jejuni* requires a stimulatory signal. *The J of Infect Dis*, 2001, 183(11), 1607-1616. doi: 10.1086/320704
60. Monteville, M.; Yoon J. E.; Konkel, M. E. Maximal adherence and invasion of INT 407 cells by *Campylobacter jejuni* requires the CadF outer-membrane protein and microfilament reorganization. *Microbiol*, 2003, 149, 153-165. doi: 10.1099/mic.0.25820-0
61. Ramires, T.; de Oliveira, M. G.; Kleinubing, N. R.; Rauber Wurfel, S.; de, F.; Mata, M. M.; Iglesias, M. A.; Lopes, G. V.; Dellagostin, O. A.; Silva, W. P. Genetic diversity, antimicrobial resistance, and virulence genes of thermophilic *Campylobacter* isolated from broiler production chain. *Braz J Microbiol*, 2020, 51, 2021–2032. doi: 10.1007/s42770-020-00314-0
62. Eucker, T.; Konkel, M. E. The cooperative action of bacterial fibronectin-binding proteins and secreted proteins promote maximal *Campylobacter jejuni* invasion of host cells by stimulating membrane ruffling. *Cell Microbiol*, 2012, 14(2), 225-238. doi: 10.1111/j.1462-5822.2011.01714.x.
63. Young, K. T.; Davis, L. M.; DiRita, V. J. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nat Ver Microbiol*, 2007, 5, 665-679. doi : 10.1038/nrmicro1718
64. Ziprin, R. L.; Young, C. R.; Byrd, J. A.; Stanker, L. H.; Hume, M. E.; Gray, S. A.; Kim, B. J.; Konkel, M. E. Role of *Campylobacter jejuni* potential virulence genes in cecal colonization. *Avian Dis*, 2001, 45, 549-557.
65. Asakura, M.; Samosornsuk, W.; Taguchi, M.; Kobayashi, K.; Misawa, N.; Kusumoto, M.; Nishimura, K.; Matsuhisa, A.; Yamasaki, S. Comparative analysis of cytolethal distending toxin (cdt) genes among *Campylobacter jejuni*, *C. coli* and *C. fetus* strains. *Microb Pathog*, 2007, 42, 174-183. doi: 10.1016/j.micpath.2007.01.005
66. Harrison, J. W.; Dung, T. T. N.; Siddiqui, F.; Korbrisate, S.; Bukhari, H. ; Tra, M. P. V. ; Hoang, N. V. M.; Carrique-Mas, J.; Bryant, J.; Campbell, J. I.; Studholme, D. J.; Wren, B. W.; Baker, S.; Titball, R. W.; Champion, O. L. Identification of possible virulence marker from *Campylobacter jejuni* isolates. *Emerg infect Dis*, 2014; 20, 1026-1029. doi: 10.3201/eid2006.130635 PMID: 24856088
67. Corcionivoschi, N.; Gundogdu, O.; Moran, L.; Kelly, C.; Scates, P.; Stef, L.; Cean, A. Wren, B.; Dorrell, N.; Madden, R. H. Virulence characteristics of hcp + *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from retail chicken. *Gut Pathogens*, 2015, 7, 20. doi: 10.1186/s13099-015-0067-z
68. Russel, A. B.; Hood, R. D.; Bui, N. K.; LeRoux, M.; Vollmer, W.; Mougous, J. D. et al. Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cell. *Nature*, 2011, 475(7356), 343-347. doi: 10.1038/nature10244
69. Bleumink-Pluym, N. M.; van Alphen, L. B.; Bouwman, L. I.; Wösten, M. M. S. M.; van Putten, J. P. M. Identification of a Functional Type VI Secretion System in *Campylobacter jejuni* Conferring Capsule Polysaccharide Sensitive Cytotoxicity. *PLoS Pathogens*, 2013, 9(5), 1-12. doi : 10.1371/journal.ppat.1003393
70. Sima, F.; Stratakos, A. C.; Ward, P.; Linton, M.; Kelly, C.; Pinkerton, L.; Stef, L.; Gundogdu, O.; Lazar, V.; Corcionivoschi, N. A Novel Natural Antimicrobial Can Reduce the in vitro and in vivo Pathogenicity of T6SS Positive *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Chicken Isolates. *Front Microbiol*, 2018, 9, 1-32. doi: 10.3389/fmicb.2018.02139

71. Abuoun, M.; Manning, G.; Cawthraw, S. A.; Ridley, A.; Ahmed, I. H.; Wassenaar, T. M.; Newell, D. G. Cytolethal distending toxin (CDT)-negative *Campylobacter jejuni* strains and anti-CDT neutralizing antibodies are induced during human infection but not during colonization in chickens. *Infect Immun*, 2005, 73, 3053-3062. doi: 10.1128/IAI.73.5.3053-3062.2005
72. Lara-Terejo, M.; Galán, J. E. CdtA, CdtB and CdtC from a tripartite complex that is required for cytolethal distending toxin activity. *Infect Immun*, 2001, 69, 4368-4365. doi: 10.1128/IAI.69.7.4358-4365.2001
73. Yamasaki, S.; Asakura, M.; Tsukamoto, T.; Faruque, S. M.; Deb, R.; Ramamurthy, T. Cytolethal distending toxin (cdt): genetic diversity, structure and role in diarrheal disease. *Toxin Rev*, 2006, 25, 61-88. doi: 10.1080/15569540500320938
74. Pokkunuri, V.; Pimentel, M.; Morales, W.; Jee, S.-R.; Alpern, J.; Weitsman, S.; Marsh, Z.; Low, K.; Hwang, L.; Khoshini, R.; Barlow, G. M.; Wang, H.; Chang, C. Role of cytolethal distending toxin in altered stool form and bowel phenotypes in a rat model of post-infectious irritable bowel syndrome. *J Neurogastroenterol Motil*, 2012, 18, 434-442. doi: 10.5056/jnm.2012.18.4.434
75. Wysok, B.; Wojtacka, J.; Kivisto, R. Pathogenicity of *Campylobacter* strains of poultry and human origin from Poland. *Intern. J. Food Microbiol*, 2020, 334, 108830. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108830
76. De Ceuleneer, M.; Vanhoucke, M.; Beyaert R. Role of the bacterial type VI secretion system in the modulation of mammalian host cell immunity. *Curr Med Chem*, 2015, 22(14), 1734-1744. doi: 10.2174/0929867322666150417123744
77. Ohadi, E.; Bakhshi, B.; Talebi, M.; Irajian, G. A genomic concept in cellular interaction of clinical *Campylobacter* spp. with human epithelial colorectal adenocarcinoma cells. *Infect Genet Evol*, 2020, 86, 104596. doi: 10.1016/j.meegid.2020
78. Konkel, M. E.; Kim, B. J.; Klena, J. D.; Young, C. R.; Ziprin, R. Characterization of the thermal stress response of *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun*, 1998, 66(8), 3666-3672. doi: 10.1128/IAI.66.8.3666-3672.1998
79. 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. *J Bacteriol*, 1989, 171(3), 1574-1584. doi: 10.1128/JB.171.3.1574-1584.1989
80. Skórko-Glonek, J.; Lipinska, B.; Krzewski, K.; Zolse, G.; Bertoli, E.; Tanfani, F. HtrA heat shock protease interacts with phospholipid membranes and undergoes conformational changes. *J Biol Chem*, 1997, 272(4), 8974-8982. doi: 10.1074/jbc.272.14.8974
81. Raphael, B. H.; Pereira, S.; Flom, G. A.; Zhang, Q.; Ketley, J. M.; Konkel, M. E. The *Campylobacter jejuni* Response Regulator, CbrR, Modulates Sodium Deoxycholate Resistance and Chicken Colonization. *J Bacteriol*, 2005, 187(11), 3662-3670. doi: 10.1128/JB.187.11.3662-3670.2005
82. Baserisalehi M.; Bahador, N. Chemotactic behavior of *Campylobacter* spp. in function of different temperatures (37 C and 42 C). *Anaerobe*, 2011, 17, 459- 689. doi: 10.1016/j.anaerobe.2011.06.010
83. Clausen, T.; Kaiser, M.; Huber, R.; Ehrmann, M. HTRA proteases: regulated proteolysis in protein quality control. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 12(3), 152-162. doi: 10.1038/nrm3065
84. Brondsted, L.; Andersen, M. T.; Parker, M.; Jorgensen, K.; Ingmer, H. The Htra protease of *Campylobacter jejuni* is required to heat and oxygen tolerance and for optimal interaction with human epithelial cells. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71, 3205-3212. doi: 10.1128/AEM.71.6.3205-3212.2005
85. Boehm, M.; Simson, D.; Escher, U.; Schmidt, A. M.; Bereswill, S.; Tegtmeyer, N.; Backert, S.; Heimesaat, M. M. Function of Serine Protease HtrA in the Lifecycle of the Foodborne Pathogen *Campylobacter jejuni*. *Eur J Microbiol Immunol*, 2018, 8(3), 70-77. doi: 10.1556/1886.2018.00011
86. Li, Y.; Gu, Y.; Lv, J.; Liang, H.; Zhang, J.; Zhang, S.; He, M.; Wang, Y.; Ma, H.; French, N.; Zhang, J.; Zhang, M. Laboratory study on the gastroenteritis outbreak caused by a multidrug-resistant *Campylobacter coli* in China. *Foodborne Pathog Dis*, 2020, 17(3), 187-193. doi: 10.1089/fpd.2019.2681
87. Asakura, H.; Sakata, J.; Nakamura, H.; Yamamoto, S.; Murakami, S. Phylogenetic Diversity and Antimicrobial Resistance of *Campylobacter coli* from Humans and Animals in Japan. *Microbes Environ*, 2019 34(2), 146-154. doi: 10.1264/jsme2.ME18115
88. Aidley, J.; Rajopadhye, S.; Akinyemi, N. M.; Lango-Scholey, L.; Bayliss, C. D. Nonselective bottlenecks control the divergence and diversification of phase variable bacterial populations. *MBio*. 2017, 8(2), 735. doi: 10.1128/mBio.02311-16
89. Jore, S.; Viljugrein, H.; Brun, E.; Heier, B. T.; Borck, B.; Ethelberg, S.; Hakkinen, M.; Kuusi, M.; Reiersen, J.; Hansson, I.; Olsson Engvall, E.; Lofdahl, M.; Wagenaar, J. A.; van Pelt, W.; Hofshagen, M. Trends in *Campylobacter* incidence in broilers and humans in six European countries, 1997-2007. *Prev Vet Med*, 2010, 93(1) 33-40. doi: 10.1016/j.prevetmed.2009.09.015
90. Asmai, R.; Karraouan, B.; Es-Soucratti, K.; En-Nassiri, H.; Bouchrif, B.; Karib, H.; Triqui, R. Prevalence and antibiotic resistance of *Campylobacter coli* isolated from broiler farms in the Marrakesh Safi region, Morocco. *Vet World*, 2020, 13(9) 1892-1897. doi: 10.14202/vetworld.2020.1892-1897
91. Lapierre, L.; Gatica, M. A.; Riquelme, V.; Vergara, C.; Yañez, J. M.; Martín, B. S.; Sáenz, L.; Vidal, M.; Martínez, M. C.; Araya, P.; Flores, R.; Duery, O.; Vidal, R. Characterization of antimicrobial susceptibility

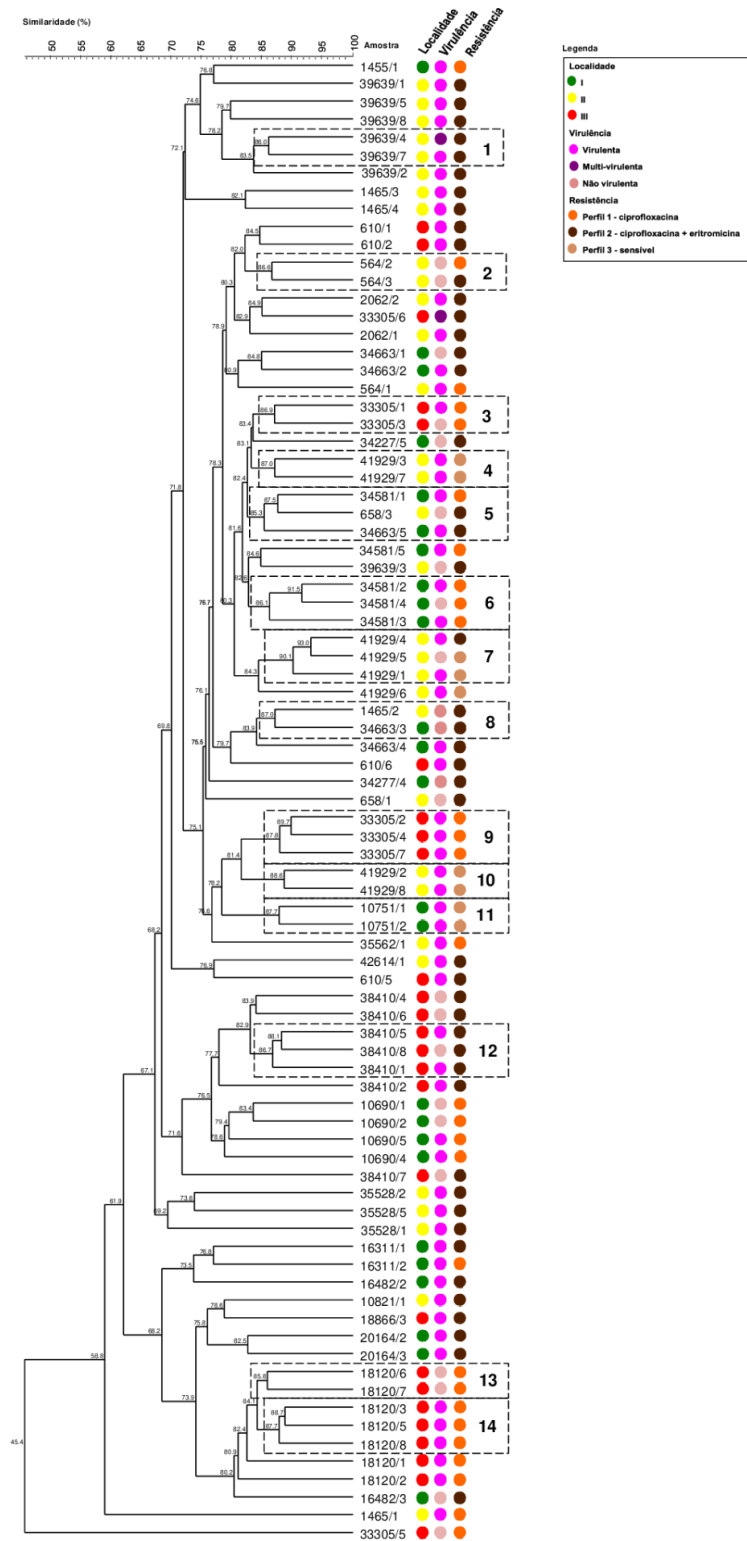
- and its association with virulence genes related to adherence, invasion and cytotoxicity in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from animals, meat, and humans. *Microb Drug Resist*, 2016, 0. doi: 10.1089/mdr.2015.0055
92. Mourkas, E.; Florez-Cuadrado, D.; Pascoe, B.; Calland, J. K.; Bayliss, S. C.; Mageiros, L.; Méric, G.; Hitchings, M. D.; Quesada, A.; Porrero, C.; Ugarte-Ruiz, M.; Gutiérrez-Fernández, J.; Domínguez, L.; Sheppard, S. K. Gene pool transmission of multidrug resistance among *Campylobacter* from livestock, sewage and human disease. *Environ Microbiol*, 2019, 21(12), 4597–613. doi: 10.1111/1462-2920.14760
 93. Gahamanyi, N.; Song, D-G.; Yoon, K-Y.; Mboera, L. E. G.; Matee, M. I.; Mutangana, D.; Amachawadi, R. G.; Komba, E. V. G.; Pan, C-H. Antimicrobial Resistance Profiles, Virulence Genes, and Genetic Diversity of Thermophilic *Campylobacter* Species Isolated From a Layer Poultry Farm in Korea. *Front Microbiol*, 2021, 12, 622275. doi: 10.3389/fmicb.2021.622275
 94. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 14, de 17 de maio de 2012. Proíbe em todo o território nacional a importação, fabricação e o uso das substâncias antimicrobianas espiramicina e eritromicina com finalidade de aditivo zootécnico melhorador de desempenho na alimentação animal. DOU, 19/05/2012.
 95. BRASIL. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 26, de 9 de julho de 2009. Aprova o Regulamento Técnico para fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de antimicrobianos de uso veterinário. DOU, 10/07/2009.
 96. World Health Organization - WHO. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. WHO Media Cent, 2017. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>. Acesso em 20 jan 2021.
 97. Woodcock, D. J.; Krusche, P.; Strachan, N. J. C.; Forbes, K. J.; Cohan, F. M.; Méric, G.; Sheppard, S. K. Genomic plasticity and rapid host switching can promote the evolution of generalism: a case study in the zoonotic pathogen *Campylobacter*. *Scientific Reports*, 2017, 7, 9650. doi: 10.1038/s41598-017-09483-9
 98. Petersen, L.; Wedderkopp, A. Evidence that certain clones of *Campylobacter jejuni* persist during successive broiler flocks rotations. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(6), 2739-2745. doi: 10.1128/AEM.67.6.2739-2745.2001
 99. Huang, J.; Zang, X.; Zhai, W.; Guan, C.; Lei, T.; Jiao, X. *Campylobacter* spp. in chicken-slaughtering operations: a risk assessment of human campylobacteriosis in East China. *Food Control*, 2018, 86, 249-256. doi: 10.1016/j.foodcont.2017.11.026
 100. Zhao, G.; Huang, X.; Zhao, J.; Liu, N.; Li, Y.; Wang, L.; Gao, Y.; Wang, J.; Qu, Z.; Liu, J.; Wang, J. Risk prevention and control points through quantitative evaluation of *Campylobacter* in a large broiler slaughterhouse. *Frontiers in Vet Sci*, 2020, 7, 172. doi: 10.3389/fvets.2020.00172
 101. International Organisation for Standardisation – ISO. Microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. – Part 1: Detection method (ISO 10272-1:2006). 2017 Jun [Cited 2020 Dez 05] Available from: <https://www.iso.org/standard/63228.html>
 102. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST. Reading guide for broth microdilution. Version 3.0. EUCAST, 2021.
 103. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST. Breakpoints table for interpretation of MICs and zones diameters. Version 11.0. EUCAST, 2021.
 104. Lawton, S. J.; Weis, A. M.; Byrne, B. A.; Fritz, H.; Taff, C. C.; Townsend, A. K.; Weimer, B. C.; Mete, A.; Wheeler, S.; Boyce, W. M. Comparative analysis of *Campylobacter* isolates from wild birds and chickens using MALDI-TOF MS, biochemical testing, and DNA sequencing. *J Vet Diagn Invest*, 2018, 30(3), 354-361. doi:10.1177/1040638718762562

Tabela S1. Perfis de virulência de *C. coli* isoladas de carcaças de frango no Brasil entre Outubro de 2017 e Julho de 2018

	Perfis	Nº de cepas (%) (N=83)	Estado	Mês	Ano
PERFIL 1	<i>cadF</i>	1 (1,2)	III	NOV	2017
PERFIL 2	<i>cadF, ciaB</i>	1 (1,2)	II	JAN	2018
PERFIL 3	<i>cadF, ciaB, cstII, cbrA, htrA, hcp</i>	1 (1,2)	I	OUT	2017
PERFIL 4	<i>cadF, ciaB, cstII, htrA, hcp</i>	6 (7,2)	I, III	OUT, ABR, JUN	2017, 2018
PERFIL 5	<i>cadF, ciaB, hcp</i>	1 (1,2)	II	JAN	2018
PERFIL 6	<i>cadF, ciaB, htrA, hcp</i>	1 (1,2)	II	JAN	2018
PERFIL 7	<i>cadF, cstII, htrA, hcp</i>	1 (1,2)	III	JUN	2018
PERFIL 8	<i>cadF, neuA, ciaB, cstII, cbrA, htrA, hcp</i>	1 (1,2)	III	OUT	2017
PERFIL 9	<i>cadF, neuA, ciaB, cstII, hcp</i>	1 (1,2)	II	JAN	2018
PERFIL 10	<i>cadF, neuA, ciaB, cstII, htrA, hcp</i>	1 (1,2)	III	OUT	2017
PERFIL 11	<i>cdtA, cdtB, cdtC, luxS, pldA, flaA, dnaJ, cadF, ciaB, cstII, cbrA, htrA, hcp</i>	1 (1,2)	I	MAI	2018
PERFIL 12	<i>cdtA, cdtB, cdtC, luxS, pldA, flaA, dnaJ, cadF, neuA, ciaB, cstII, cbrA, htrA, hcp</i>	1 (1,2)	III	OUT	2017
PERFIL 13	<i>cdtA, cdtB, cdtC, luxS, pldA, flaA, neuA, ciaB, cstII, cbrA, htrA, hcp</i>	1 (1,2)	II	NOV	2017
PERFIL 14	<i>dnaJ, cadF, ciaB, cstII, htrA, hcp</i>	1 (1,2)	II	JAN	2018
PERFIL 15	<i>flaA, cadF, ciaB</i>	1 (1,2)	I	OUT	2017
PERFIL 16	<i>flaA, cadF, ciaB, cstII, cbrA, htrA, hcp</i>	1 (1,2)	III	OUT	2017
PERFIL 17	<i>flaA, cadF, ciaB, cstII, hcp</i>	2 (2,4)	II, III	OUT, NOV	2017
PERFIL 18	<i>flaA, cadF, ciaB, cstII, htrA, hcp</i>	34 (41)*	I, II, III	OUT, NOV, DEZ, JAN, ABR, MAI, JUN	2017, 2018
PERFIL 19	<i>flaA, cadF, ciaB, hcp</i>	2 (2,4)	III	NOV	2017
PERFIL 20	<i>flaA, cadF, cstII, hcp</i>	1 (1,2)	I	MAI	2018
PERFIL 21	<i>flaA, cadF, neuA, ciaB, cstII, htrA, hcp</i>	6 (7,2)	I, II, III	OUT, DEZ, JAN, JUN	2017, 2018
PERFIL 22	<i>flaA, cadF, neuA, ciaB, htrA, hcp</i>	1 (1,2)	I	JUN	2018
PERFIL 23	<i>flaA, dnaJ, cadF, ciaB, cstII, htrA, hcp</i>	6 (7,2)	I, II, III	OUT, ABR, JUN	2017, 2018
PERFIL 24	<i>luxS, flaA, cadF, ciaB, cstII, hcp</i>	1 (1,2)	II	NOV	2017
PERFIL 25	<i>luxS, flaA, cadF, ciaB, cstII, htrA, hcp</i>	2 (2,4)	II	NOV, JAN	2017, 2018
PERFIL 26	<i>luxS, pldA, flaA, cadF, ciaB, cstII, htrA, hcp</i>	3 (3,6)	I	OUT	2017
PERFIL 27	<i>luxS, pldA, flaA, cadF, neuA, ciaB, cstII, cbrA, htrA, hcp</i>	1 (1,2)	III	NOV	2017

PERFIL 28	<i>luxS, pldA, flaA, dnaJ, cadF, neuA, ciaB, cstII, cbrA, htrA, hcp</i>	1 (1,2)	II	OUT	2017
PERFIL 29	<i>pldA, flaA, cadF, ciaB, cstII, hcp</i>	1 (1,2)	I	OUT	2017
PERFIL 30	<i>pldA, flaA, cadF, ciaB, cstII, htrA, hcp</i>	1 (1,2)	I	OUT	2017

Figura S1. Dendograma de *C. coli* isoladas de carcaças de frango no Brasil entre Outubro de 2017 e Julho de 2018.



REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL – ABPA. Relatório Anual 2021. Disponível em: <http://abpa-br.org/mercados/#relatorios>. Acesso em: 01 de julho de 2021.

ABUOUN, M. et al. Cytolethal distending toxin (CDT)-negative *Campylobacter jejuni* strains and anti-CDT neutralizing antibodies are induced during human infection but not during colonization in chickens. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 3053-3062, 2005. doi: 10.1128/IAI.73.5.3053-3062.2005

AGUNOS, A. et al. A systematic review characterizing on-farm sources of *Campylobacter* spp. for broiler chickens. **PLoS ONE**, v.9, e104905, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0104905

AHMED, M. F.; SCHULZ, J.; HARTUNG, J. Survival of *Campylobacter jejuni* in naturally and artificially contaminated laying hen feces. **Poultry Science**, v. 92, p.364–369, 2013. doi:10.3382/ps.2012-02496

ALFREDSON, D. A.; KOROLIK, V. Antibiotic resistance and resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 277, p. 123-132, 2007. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00935.x.

ALLOS, B. M. *Campylobacter jejuni* infections: update on emerging issues and trends. **Clinical Infectious Disease**, v. 32, p. 1201–1206, 2001. doi: 10.1086/319760

ALPIGIANI, I. et al. Associations between animal welfare indicators and *Campylobacter* spp. in broiler chickens under commercial settings: A case study. **Preventive Veterinary Medicine**, v.147, p. 186–193, 2017. doi: 10.1016/j.prevetmed.2017.09.005

ALVES, M. B. R. et al. Feed can be a source of *Campylobacter jejuni* infection in broilers. **British Poultry Science**, v. 58, p. 46-49, 2016. doi: 10.1080/00071668.2016.1258691

AN, J. U. et al. Dairy cattle, a potential reservoir of human campylobacteriosis: epidemiological and molecular characterization of *Campylobacter jejuni* from cattle farms. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 3136, 2018. doi: 10.3389/fmicb.2018.03136

ANDERSEN-NISSEN, E. et al. Evasion of Toll-like receptor by flagellated bacteria. **PNAS**, v. 102, n. 26, p. 9247-9252, 2005. doi: 10.1073/pnas.0502040102

ARSI, K. et al. Intraoecal inoculation, an effective screening method for determining the efficacy of probiotic bacterial isolates against *Campylobacter* colonization in broiler chickens. **Journal of Food Protection**, v. 78, n. 1, p. 209–213, 2015. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-14-326

- ASMAI, R. et al. Prevalence and antibiotic resistance of *Campylobacter coli* isolated from broiler farms in the Marrakesh Safi region, Morocco. **Vet World**, v. 13, n. 9, p. 1892-1897, 2020. doi: 10.14202/vetworld.2020.1892-1897
- BACKERT, S. et al. Extracellular HtrA serine proteases: an emerging new strategy on bacterial pathogenesis. **Cellular Microbiology**, v. 21, n. 6, p. e12845-, 2018. doi: 10.1111/cmi.12845.
- BAHRNDORFF, S. et al. Foodborne disease prevention and broiler chickens with reduced *Campylobacter* infection. **Emerging Infectious Disease**, v.19, p. 425–430, 2013. doi:10.3201/eid1903.111593.
- BANG, D. D. et al. PCR detection of seven virulence and toxigenes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from Danish pigs and cattle and cytolethal distending toxin production of the isolates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 1003–1014, 2003. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.01926.x
- BATTERSBY, T. et al. Evaluating and improving terminal hygiene practices on broiler farms to prevent *Campylobacter* cross-contamination between flocks. **Food Microbiology**, v. 64, p. 1–6, 2017. doi: 10.1016/j.fm.2016.11.018.
- 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. doi:10.1111/j.1541-4337.2004.tb00057.x
- BERRANG, M.E. et al. Broiler carcass contamination with *Campylobacter* from feces during defeathering. **Journal of Food Protection**, v. 64, p. 2063–2066, 2001. doi: 10.4315/0362-028x-64.12.2063
- 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. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03468.x
- BIOHAZ - EFSA Panel on Biological Hazards. Scientific Opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. **EFSA Journal**, v.9, n.4, 2011. doi: 10.2903/j.efsa.2011.2105
- BIRK, T. et al. Effect of organic acids and marination ingredients on the survival of *Campylobacter jejuni* on meat. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 2, p. 258–265, 2010. doi: 10.4315/0362-028X-73.2.258
- 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, p. 25-32, 2011. doi: 10.2436/20.1501.01.132.
- BLASER, M. J.; ENGBERG, J. Clinical aspects of *Campylobacter jejuni* and

Campylobacter coli infections. In: NACHAMKIN, I.; SZYMANSKI, C. M.; BLASER, M. J. (ed). *Campylobacter*. ASM Press, Washington, 2008. p. 99-121.

BLEUMINK-PLUYIM, N. M. et al. Identification of a functional type VI secretion system in *Campylobacter jejuni* conferring capsule polysaccharide sensitive cytotoxicity. **Plos Pathogens**, v. 9, n. 5, e1003393, 2013. doi: 10.1371/journal.ppat.1003393

BOLLINGER, H.; KATHARIOU, S. The current state of macrolides resistance in *Campylobacter* spp.: Trends and impacts of resistance mechanism. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 12, e00416–e00417, 2017. doi: 10.1128/AEM.00416-17.

BOYSEN, L.; ROSENQUIST, H. Reduction of thermotolerant *Campylobacter* species on broiler carcasses following physical decontamination at slaughter. **Journal of Food Protection**, v. 72, n.3, p. 497–502, 2009. doi: 10.4315/0362-028x-72.3.497

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 17, de 25 de janeiro de 2013. Cria, junto ao Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - DIPOA/SDA/MAPA, a Comissão Científica Consultiva em Microbiologia de Produtos de Origem Animal, 2013. DOU, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria Ministerial nº 193, de 19 de Setembro de 1994. Institui o Programa Nacional de Sanidade Avícola no âmbito da DSA e cria o Comitê Consultivo do Programa de Sanidade Avícola. DOU, 1994.

BULL, S. A. et al. Sources of *Campylobacter* spp. colonizing housed broiler flocks during rearing. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 1, p. 645–652, 2006. doi: 10.1128/aem.72.1.645-652.2006

BURFOOT, D. et al. Effect of rapid surface cooling on *Campylobacter* numbers on poultry carcasses. **Food Control**, v. 70, p. 293–301, 2016. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.05.041

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. *Campylobacter* (Campylobacteriosis). 2020. Disponível em: <https://www.cdc.gov/campylobacter/technical.html>. Acesso em 15 dez 2020.

CHAINED, A. et al. Effect of steam and lactic acid treatments on the survival of *Salmonella* Enteritidis and *Campylobacter jejuni* inoculated on chicken skin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 162, n. 3, 2013, p. 276-28. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.01.012

CHEMALY, M. et al. Efficacy of feed additives against *Campylobacter* in live broilers during the entire rearing period. **Poultry Science**, v. 95, n. 2, p. 298–305, 2015. doi: 10.3382/ps/pev303

CHEN, X. et al. Efficacy of various antimicrobials on reduction of *Salmonella* and *Campylobacter* and quality attributes of ground chicken obtained from poultry parts treated in a postchill decontamination tank. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 11, p. 1882–1888, 2014. doi: 10.4315/0362-028x.jfp-14-114

CHENG, J. et al. Multifunctionality of *Campylobacter jejuni* sialyltransferase CstII: characterization of GD3/GT3 oligosaccharide synthase, GD3 oligosaccharide sialidase, and trans-sialidase activities. **Glycobiology**, v. 18, p. 686–697, 2008. doi: 10.1093/glycob/cwn047

CHOI, J. H. et al. Antimicrobial resistance profiles and macrolide resistance mechanisms of *Campylobacter coli* isolated from pigs and chickens. **Microorganisms**, v. 9, n. 5, 1077, 2021. doi: 10.3390/microorganisms9051077

CLARCK, C. L. T.; MURRAY, E. V. *Campylobacter* colitis leads to toxic megacolon and multiple organ failure. **BMJ Case Reports**, v. 22, n. 3, e233373, 2020. doi: 10.1136/bcr-2019-233373

CLAUSEN, T. et al. HTRA proteases: regulated proteolysis in protein quality control. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 12, n. 3, p. 152-162, 2011. doi: 10.1038/nrm3065

CONNERTON, I. F.; CONNERTON, P. L. *Campylobacter* Foodborne Disease. In: DODD, C. E. R.; ALDSWORTH, T.; STEIN, R. A. et al. Foodborne disease. 3 ed. Elsevier, 2017. p. 209-221

CORRY, J. E. L. et al. Culture media for the isolation of campylobacters. **International Journal of Food Microbiology**, v. 26, n. 1, p. 43–76, 1995. doi:10.1016/0168-1605(95)00044-k

COSTA, D.; IRAOLA, G. Pathogenomics of emerging *Campylobacter* species. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 4, e00072-18, 2019. doi: 10.1128/CMR.00072-18.

CRESS, B. F. et al. Masquerading microbial pathogens: capsular polysaccharides mimic host-tissue molecules. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 38, p. 660–697, 2014. doi: 10.1111/1574-6976.12056

CULEBRO, A. et al. Origin, evolution, and distribution of the molecular machinery for biosynthesis of sialyated lipooligosaccharide structures in *Campylobacter coli*. **Scientific Reports**, v. 8, p. 3128, 2018. doi:10.1038/s41598-018-21438-2

DAN, M.; PARIZADE, M. Chronic high-level multidrug-resistant *Campylobacter coli* enterocolitis in an agammaglobulinemia patient: oral gentamicin efficacy. **Medicine et Maladies Infectieuses.**, v. 50, n. 6, 525-527, 2020. doi: 10.1016/j.medmal.2020.04.013

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. doi: 10.1016/j.ijmm.2009.07.002

DEARLOVE, B. et al. Rapid host switching in generalist *Campylobacter* strains erodes the signal for tracing human infections. **Isme Journal**, v. 10, n. 3, p. 721-729, 2016. doi: 10.1038/ismej.2015.149

DEBRUYNE, L.; GEVERS, D.; VANDAMME, P. Taxonomy of the family Campylobacteraceae. In: *Campylobacter*. 3 ed. ASM, 2008.

DINGLE, K. E. et al. Sequence typing and comparison of population biology of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 340-347, 2005. doi: 10.1128/JCM.43.1.340-347.2005.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 167-193, 2002. doi: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002

DOYLE, L. P. A. *Vibrio* associated with swine dysentery. **American Journal of Veterinary Research**, n. 5, p. 3-5, 1944.

DOYLE, L.P. The etiology of swine dysentery. **American Journal of Veterinary Research**, v. 9, p. 50–51, 1948.

EUROPEAN COMMISSION - EC. 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 set 2020.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY -EFSA. The European union one health 2018 Zoonoses Report. **EFSA Journal**, v. 17, 5926, 2019a. doi: 10.2903/j.efsa.2019.5926

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY -EFSA. The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017. **EFSA Journal**, v.17, e05598, 2019b. doi: 10.2903/j.efsa.2019.5598

ELLIS-IVERSEN, J. et al. Persistent environmental reservoirs on farms as risk factors for *Campylobacter* in commercial poultry. **Epidemiology and Infection**, v.140, n.916–924, 2012. doi:10.1017/S095026881100118X

EL-SHIBINY, A. et al. Application of a group II *Campylobacter* bacteriophage to reduce strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* colonizing broiler chickens. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 4, p. 733–740, 2009. doi: 10.4315/0362-028X-72.4.733

ESCHERICH, T. Beitragezurkenntniss der darmbacterien. III. Ueber das vorkommen von vibrionenimdarmcanal und stuhlgangen der sauglinge. **Münchener Med Wochenschrift**, v. 33, p. 815-817, 1886.

EUCKER, T. P.; KONKEL, M. E. The cooperative action of bacterial fibronectin in binding proteins and secreted proteins promote maximal *Campylobacter jejuni* invasion of host cells by stimulating membrane ruffling. **Cellular Microbiology**, v. 14, p. 226–238, 2012. doi: 10.1111/j.1462-5822.2011.01714.x.

FACCIOLÀ, A. et al. *Campylobacter*: from microbiology to prevention. **Journal of Preventive Medicine Hygiene**, v. 58, n. 2, p. E79-E92, 2017.

FERNANDES, M. et al. Study of cytolethal distending toxin (cdt) in *Campylobacter coli* using a multiplex chain reaction assay its distribution among clinical and food strains. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 1, p. 103-106, 2010. doi: 10.1089/fpd.2009.0326.

FISCHER, S. et al. Impact of a single phage and a phage cocktail application in broilers on reduction of *Campylobacter jejuni* and development of resistance. **PLoS One**, v. 8, e78543, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0078543.

FITZGERALD, C. *Campylobacter*. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 35, n. 2, p. 289-298, 2015. doi:10.1016/j.cll.2015.03.001

FLORES-CUADRADO, D. et al. Description of an erm(B)-carrying *Campylobacter coli* isolate in Europe. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 3, 841-843, 2016. doi: 10.1093/jac/dkv383.

FONSECA, B. B. et al. Transfer, viability and colonisation of *Campylobacter jejuni* in the chicken vitellus and embryos. **British Poultry Science**, v. 52, n. 3, p. 279-286, 2011. doi: 10.1080/00071668.2011.577056

GARCÍA-SANCHEZ, L.; MELERO, B.; ROVIRA, J. *Campylobacter* in the food chain. In: RODRIGUEZ-LÁZARO, D. (ed). *Advances in food and nutrition research*, Academic Press, v. 86, p. 215-252, 2018. doi: <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2018.04.005>.

GARNEAU-TSODIKOVA, S.; LABBY, K. J. Mechanism of resistance to aminoglycoside antibiotics: Overview and perspective. **Medchemcomm**, v.7 n.1, p. 11–27, 2016. doi: 10.1039/C5MD00344J

GEORGIEV, M.; BEAUVAIS, W.; GUITIAN, J. Effect of enhanced biosecurity and selected on-farm factors on *Campylobacter* colonization of chicken broilers. **Epidemiology & Infection**, v. 145, n. 3, p. 553–567, 2016. doi: 10.1017/S095026881600251X

GEORGSSON, F. et al. The influence of freezing and duration of storage on *Campylobacter* and indicator bacteria in broiler carcasses. **Food Microbiology**, v. 23, n. 7, p. 677–683, 2006. doi: 10.1016/j.fm.2005.10.003

GHARBI, M. et al. Distribution of virulence and antibiotic resistance genes in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from broiler chickens in Tunisia. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, S. 1684-1182, n. 21, 00140-7, 2021. doi: 10.1016/j.jmii.2021.07.001

- GHAREEB, K. et al. Evaluating the efficacy of an avian-specific probiotic to reduce the colonization of *Campylobacter jejuni* in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 91, p. 1825–1832, 2012. doi:10.3382/ps.2012-02168
- GOLZ, J. C. et al. Whole genome sequencing reveals extended natural transformation in *Campylobacter* impacting diagnostics and the pathogens adaptive potential. **Scientific Reports**, v. 10, 3686, 2020. doi: 10.1038/s41598-020-60320-y
- 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. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.02.014>
- GONZÁLEZ, M.; HÄNNINEN, M. L. Reduction of *Campylobacter jejuni* counts on chicken meat treated with different seasonings. **Food Control**, v.22, p.1785-1789, 2011. doi: 10.1016/j.foodcont.2011.04.018
- GRAHAM, A. J.; JOCHUM, J.; MELLATA, M. Live bacterial prophylactics in modern poultry. **Frontiers in Veterinary Science**, v.7, 592312, 2020. doi: 10.3389/fvets.2020.592312
- GUERRY, P; *Campylobacter* flagella: not just for motility. **Trends in Microbiology**, v. 15, n. 10, p. 456-461, 2007. doi: 10.1016/j.tim.2007.09.006
- GUK, J. H.; et al. Hyper-aerotolerant *Campylobacter coli* from swine may pose a potential threat to public health based on its quinolone resistance, virulence potential, and genetic relatedness. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 703993, 2021. doi: doi: 10.3389/fmicb.2021.703993.
- GUNTHER, N. W.; CHEN, C. Y. The biofilm forming potential of bacterial species of the genus *Campylobacter*. **Food Microbiology**, v.26, p.44-51, 2009. doi: 10.1016/j.fm.2008.07.012.
- HARRISON, L. et al. Core genome MLST for source attribution of *Campylobacter coli*. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 703890, 2021. doi: 10.3389/fmicb.2021.703890
- HENDRIXSON, D. R.; DIRITA, V. J. Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in commensal colonization of the chick gastrointestinal tract. **Molecular Microbiology**, v. 52, p. 471–484, 2004. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.03988.x
- HERMANS, D. et al. *Campylobacter* control in poultry by current intervention measures ineffective: urgent need for intensified fundamental research. **Veterinary Microbiology**, v. 152, p. 219–228, 2011. doi:10.1016/j.vetmic.2011.03.010.
- HIGHAM, L. E. et al. Effects of financial incentives and cessation of thinning on prevalence of *Campylobacter*: a longitudinal monitoring study on commercial broiler farms in the UK. **Veterinary Record**, v. 183, n.19, p.595, 2018. doi: 10.1136/vr.10482.

HUEZO, R. et al. Effect of dry air or immersion chilling on recovery of bacteria from broiler carcasses. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 8, p. 1829–1834, 2007. doi: 10.4315/0362-028X-70.8.1829

IANNETTI, L. et al. Animal welfare and microbiological safety of poultry meat: Impact of different at-farm animal welfare levels on at-slaughterhouse *Campylobacter* and *Salmonella* contamination. **Food Control**, v. 109, p. 106921, 2020. doi: 10.1016/j.foodcont.2019.106921

INTERNATIONAL ORGANISATION FOR STANDARDISATION – ISO. Microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. – Part 1: Detection method (ISO 10272-1:2006). 2017
Disponível em: <https://www.iso.org/standard/63228.html>. Acesso em 20 jan 2021.

IOVINE, N. M. Resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni*. **Virulence**, 4, 230–240, 2013. doi: 10.4161/viru.23753.

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. doi: 10.3389/fmicb.2018.03132

JANSSEN, R. et al. Host-pathogen interactions in *Campylobacter* infections: the host perspective. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 3, p. 505-518, 2008.

JOHANSSON, C. et al. *Campylobacter coli* clade 3 isolates induce rapid cell death in vitro. **Applied Environmental Microbiology**, v. 85, n. 5, e02993-18, 2019. doi: 10.1128/AEM.02993-18

JONES, F. Vibrios (*Vibrio jejuni*, n. sp) associated with intestinal disorders of cows and calves. **The Journal of Experimental Medicine**, n. 53, p. 853-854, 1931.

JORE, S. et al. Trends in *Campylobacter* incidence in broilers and humans in six European countries, 1997-2007. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 93, n. 1, p. 33-40, 2010. doi: 10.1016/j.prevetmed.2009.09.015.

KAAKOUSH, N. O. et al. Global epidemiology of *Campylobacter* infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 38, p. 687–720, 2015. doi: 10.1128/CMR.00006-15

KARAMA, M. et al. Occurrence and antimicrobial resistance profiles of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter upsaliensis* in beef cattle on cow-calf operations in South Africa. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 17, n. 7, p. 440-446, 2020. doi: 10.1089/fpd.2019.2703

KARESH, W. B. et al. Ecology of zoonoses: Natural and unnatural histories. **The Lancet**, v. 380, n. 9857, p. 1936–1945, 2012. doi: 10.1016/s0140-6736(12)61678-x

KARKI, A. et al. *Campylobacter coli* from retail liver and meat products is more aerotolerant than *Campylobacter jejuni*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2951, 2019. doi: 10.3389/fmicb.2018.02951

KEENER, K. M. et al. Comprehensive review of *Campylobacter* and poultry processing. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 3, n. 2, p. 105–116, 2004. doi: 10.1111/j.1541-4337.2004.tb00060.x

KHAN, J. A. et al. Antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni*: mechanism, status, and public health significance. In: AHMAD, I.; AHMAD, S.; RUMBAUGH, K. P. (eds). Antibacterial drug discovery to combat MDR: Natural compounds, nanotechnology and novel synthetic sources. Springer, ISBN 978-981-13-9871-1, 680 p. doi: 10.1007/978-981-13-9871-1 2019

KIRK, M. D. et al. World Health Organization estimates of the global and regional disease burden of 22 foodborne bacterial, protozoal, and viral diseases, 2010 : a data synthesis. **Plos Medicine**, v.12, p. 1-21, 2015. doi : 10.1371/journal.pmed.1001921

KIST, M. The historical background of *Campylobacter* infection: new aspects. In: PEARSON, A. D. Proceedings of the 3rd International Workshop on *Campylobacter Infections*. Ottawa, 1985. London: Public Health Laboratory Service, 1985. p. 23-27.

KOGUT, M. H. The effect of microbiome modulation on the intestinal health of poultry. **Animal Feed Science and Technology**, v. 250, p. 32–40, 2018. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2018.10.008

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. doi: 10.1128/IAI.66.8.3666-3672.1998.

KONKEL, M. E. et al. The pathogenesis of *Campylobacter jejuni*-mediated enteritis. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 55-71, 2001.

KONKEL, M. E. et al. Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is dependent on a functional flagellar export apparatus. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 11, p. 3296-3303, 2004. doi: 10.1128/JB.186.11.3296-3303.2004

KOOLMAN, L. et al. Use of chemical treatments applied alone and in combination to reduce *Campylobacter* on raw poultry. **Food Control**, v. 46, p. 299–303, 2014. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.05.041

KOROLIK, V. The role of chemotaxis during *Campylobacter jejuni* colonization and pathogenesis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 47, p. 32-37, 2019. doi: 10.1016/j.mib.2018.11.001.

KRELING, V. et al. *Campylobacter* sp.: Pathogenicity factors and prevention methods - new molecular targets for innovative antivirulence drugs? **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 104, n. 24, p. 10409-10436, 2020. doi: 10.1007/s00253-020-10974-5

LAWES, J. R. et al. Investigation of prevalence and risk factors for *Campylobacter* in broiler flocks at slaughter: results from a UK survey. **Epidemiology and Infection**, v.140, p.1725-1737, 2012. doi: 10.1017/S0950268812000982.

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. doi: 10.1177/1040638718762562

LAYTON, S. L. et al. Evaluation of *Salmonella*-vectored *Campylobacter* peptide epitopes for reduction of *Campylobacter jejuni* in broiler chickens. **Clinic, Vaccine and Immunology**, v. 18, p. 449-454, 2011. doi: 10.1128/CVI.00379-10

LEVIN, R. *Campylobacter jejuni*: A Review of its Characteristics, Pathogenicity, Ecology, Distribution, Subspecies Characterization and Molecular Methods of Detection. **Food Biotechnology**, v. 21, n. 4, p. 271-347, 2007. doi: 10.1080/08905430701536565

LEWIS, A. L. et al. Innovations in host and microbial sialic acid biosynthesis revealed by phylogenomic prediction of nonulosonic acid structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, p. 13552-13557, 2009. doi: 10.1073/pnas.0902431106

LI, Y. et al. Laboratory study on the gastroenteritis outbreak caused by a multidrug-resistant *Campylobacter coli* in China. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 17, n. 3, p. 187-193, 2020. doi: 10.1089/fpd.2019.2681

LIPINSKA, B. et al. 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. doi: 10.1128/jb.171.3.1574-1584.1989.

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

LU, T. et al. On farm interventions to minimise *Campylobacter* spp. contamination in chicken. **Brazilian Poultry Science**, v. 62, p. 53-67, 2020. doi: 10.1080/00071668.2020.1813253

LUANGTONGKUM, T. et al. Antibiotic resistance in *Campylobacter*: emergence, transmission and persistence. **Future Microbiology**, v.4, n. 2, p.189-200, 2009. doi: 10.2217/17460913.4.2.189.

MAN, S. M. The clinical importance of emerging *Campylobacter* species. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 8, n.12, p. 669-685, 2011. doi: 10.1038/nrgastro.2011.191.

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. doi: 10.1128/AEM.71.10.6292-6307.2005

MATOBA, Y.; KATSUBE, Y.; SUGIYAMA, M. The Crystal structure of prokaryotic phospholipase A2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 22, p. 20059-20069, 2002. doi: 10.1074/jbc.M200263200.

MCCARTHY, N. D. et al. Host-associated genetic import in *Campylobacter jejuni*. **Emergent Infectious Disease**, v. 13, p. 267–272, 2007. doi: 10.3201/eid1302.060620.

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

MELO, R. T. et al. Genotypical relationship between human and poultry strains of *Campylobacter jejuni*. **Current Microbiology**, v. 78, n. 8, 2980-2988, 2021. doi: 10.1007/s00284-021-02553-2.

MELO, R. T. et al. *Campylobacter* spp isolates of swine feces submitted to transport stress: species and antimicrobial resistance. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 41, e086519, 2019a. doi: 10.29374/2527-2179.bjvm086519

MELO, R. T. et al. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* originated from chicken carcasses modulate their transcriptome to translate virulence genes in human cell. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 39, n. 8, p. 692-599, 2019b. doi: 10.1590/1678-5150-PVB-6031

MILAN, C. et al. *Campylobacter coli* no fluxograma de abate de suínos e pesquisa dos genes cdt. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 45, p. 1481, 2017. doi: 10.22456/1679-9216.80490

MONTEVILLE, M.; YOON, J. E.; KONKEL, M. E. Maximal adherence and invasion of INT 407 cells by *Campylobacter jejuni* requires the CadF outer-membrane protein and microfilament reorganization. **Microbiology**, v. 149, p. 153-165, 2003. doi: 10.1099/mic.0.25820-0.

MONTGOMERY, M. P. et al. Multidrug-Resistant *Campylobacter jejuni* outbreak linked to puppy exposure – Unites States, 2016-2018. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 67, n. 37, p. 1032-1035, 2018. doi: 10.15585/mmwr.mm6737a3

MOORE, J. E. et al. *Campylobacter*. **Veterinary Research**, v. 36, n.3, p.351-382, 2005. doi: 10.1051/vetres:2005012.

MORTADA, M. et al. In vivo and in vitro assessment of commercial probiotic and organic acid feed additives in broilers challenged with *Campylobacter coli*. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 29, n. 2, p. 435–446, 2020. doi: 10.1016/j.japr.2020.02.001

MOUFTAH, S. F. et al. High-throughput sequencing reveals genetic determinants associated with antibiotic resistance in *Campylobacter* spp. from farm-to-fork. **PLoS One**, v. 16, n. 6, e0256797, 2021. doi: 10.1371/journal.pone.0253797

MOURKAS, E. et al. Gene pool transmission of multidrug resistance among *Campylobacter* from livestock, sewage and human disease. **Environmental Microbiology**, v. 21, n. 12, p. 4597-4613, 2019. doi: 10.1111/1462-2920.14760.

MUGHINI-GRAS, L. et al. Quantifying potential sources of surface water contamination with *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **Water Research**, v. 101, p. 36–45, 2016. doi: 10.1016/j.watres.2016.05.069.

MULDER, A. C. et al. Tracing the animal sources of surface water contamination with *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **Water Research**, v. 187, 116421, 2020. doi: 10.1016/j.watres.2020.116421

MURPHY, C.; CARROLL, C.; JORDAN, N. Environmental survival mechanisms of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 4, p. 623-632, 2006. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.02903.x.

NAGEL, G. M. et al. *Salmonella* and *Campylobacter* reduction and quality characteristics of poultry carcasses treated with various antimicrobials in a post-chill immersion tank. **International Journal of Food Microbiology**, v. 165, n. 3, p. 281–286, 2013. doi: 10.1016/.ijfoodmicro.2013.05.016

NAIR, D. V. . et al. Antimicrobial efficacy of lauric arginate against *Campylobacter jejuni* and spoilage organisms on chicken breast fillets. **Poultry Science**, v. 93, n. 10, p. 2636–2640, 2014. doi: 10.3382/ps.2013-03858

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - NCBI. *Campylobacter*. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/13728>. Acesso em: 10, jan 2021.

NEIMANN, J. et al. A case-control study of risk factors for sporadic *Campylobacter* infections in Denmark. **Epidemiology and Infection**, v. 130, p. 353– 366, 2003. doi: 10.1017/s0950268803008355.

NEOGI, S. B. et al. Risk of multi-drug resistant *Campylobacter* spp. and residual antimicrobials at poultry farms and live bird markets in Bangladesh. **BMC Infectious Disease**, v. 20, n. 1, p. 278, 2020. doi: 10.1186/s12879-020-05006-6

NILSSON, A.; et al. Characterization of swedish *Campylobacter coli* clade 2 and clade 3 water isolates. **Microbiology**, v. 7, n. 4, e00583, 2018. doi: 10.1002/mbo3.583

NISHIYAMA, K. et al. *Lactobacillus gasseri* SBT2055 reduces infection by and colonization of *Campylobacter jejuni*. **PLoS One**, v. 9, e108827, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0108827

NOTHAFT, H. et al. Coadministration of the *Campylobacter jejuni* N-glycan-based vaccine with probiotics improves vaccine performance in broiler chickens. **Applied Environmental Microbiology**, v. 83, e01523-17, 2017. doi: 10.1128/AEM.01523-17

- NYGÅRD, K. et al. Association between environmental risk factors and *Campylobacter* infections in Sweden. **Epidemiology and Infection**, v. 132, p. 317–325, 2004. doi: 10.1017/S0950268803001900
- NYLEN, G. et al. The seasonal distribution of *Campylobacter* infection in nine European countries and New Zealand. **Epidemiology and Infection**, v. 128, n. 3, p. 383-390, 2002. doi: 10.1017/s0950268802006830.
- OECD / FAO. OECD-FAO Agricultural Outlook 2020-2029 , OECD Publishing, Paris / FAO, Roma, 2020. doi: 10.1787/1112c23b-en
- 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.
- O'KANE, P. M.; CONNERTON, I. F. Characterisation of aerotolerant forms of a robust chicken colonizing *Campylobacter coli*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 513, 2017. doi: 10.3389/fmicb.2017.00513
- 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. doi: 10.1139/cjm-2018-0539.
- PARVEEN, N.; CORNELL, K. A. Methylation adenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosides, a critical enzyme for bacterial metabolism. **Molecular Microbiology**, v. 79, p. 7-20, 2011. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07455.x.
- PERNICA, J. M. et al. Correlation of clinical outcomes with multiplex molecular testing of stool from children admitted to hospital with gastroenteritis in Botswana. **Journal of Pediatric Infectious Disease Society**, v. 5, p. 312-318, 2016. doi: 10.1093/jpids/piv028.
- PISKERNIK, S. et al. Reduction of *Campylobacter jejuni* by natural antimicrobials in chicken meat-related conditions. **Food Control**, v. 22, n. 5, p. 718–724, 2011. doi: 10.1016/j.foodcont.2010.11.002
- PLUMMER, P. J. LuxS and quorum-sensing in *Campylobacter*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, n. 22, p. 1-9, 2012. doi: 10.3389/fcimb.2012.00022.
- PRUITT, K. D.; TATUSOVA, T.; MAGLOTT, D. R. NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p.61–65, 2007. doi: 10.1093/nar/gkl842
- QIN, S. et al. Report of ribosomal RNA methylase gene erm(B) in multidrug-resistant *Campylobacter coli*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 4, 964-968, 2014. doi: 10.1093/jac/dkt492.

RAJAN, R. et al. Crystal structure of S-ribosylhomocysteinase (LuxS) in complex with catalytic 2-ketone intermediate. **Biochemistry**, v. 44, n. 10, p. 3745-3753, 2005. doi: 10.1021/bi0477384.

RAJKOVIC, A. et al. Survival of *Campylobacter jejuni* on raw chicken legs packed in high-oxygen or high-carbon dioxide atmosphere after the decontamination with lactic acid/sodium lactate buffer. **International Journal of Food Microbiology**, v. 140, n. 2-3, p. 201–206, 2010. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.034

RAVEL, A. et al. Source attribution of human campylobacteriosis at the point of exposure by combining comparative exposure assessment and subtype comparison based on comparative genomic fingerprinting. **PLoS One**, v. 12, e0183790, 2017. doi: 10.1371/journal.pone.0183790

RIDLEY, A. et al. Potential sources of *Campylobacter* infection on chicken farms: Contamination and control of broiler-harvesting equipment, vehicles and personnel. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 11, p. 233-244, 2011. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05038.x.

RODRIGUES, C. G. et al. Occurrence and characterization of *Campylobacter* spp. isolates in dogs, cats and children. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 4, 2015. doi: 10.1590/S0100-736X2015000400009

ROLLINS, D. M.; COLWELL, R. R. Viable but non-culturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v.52, p.531-538, 1986.

ROSENQUIST, H. et al. *Campylobacter* contamination and the relative risk of illness from organic broiler meat in comparison with conventional broiler meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 162, p. 226–230, 2013. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.01.022.

ROSNER, B. M. et al. A combined case-control and molecular source attribution study of human *Campylobacter* infections in Germany, 2011-2014. **Science Reports**, v. 7, 5139, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-05227-x

ROSSI, D. A. et al. Antibiotic resistance in the alternative lifestyle of *Campylobacter jejuni*. **Frontiers in Cellular and Infectious Microbiology**, v. 11, 535757, 2021. doi: 10.3389/fcimb.2021.535757

ROSSI, D. A. et al. Transmission of *Campylobacter coli* in chicken embryos. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, 2012. doi: 10.1590/S151783822012000200014

ROSSLER, E. et al. Meta-analysis of the prevalence of thermotolerant *Campylobacter* in food-producing animals worldwide. **Zoonoses Public Health**, v. 65, n. 4, p. 1-11, 2019. doi: 10.1111/zph.12558

ROVIRA, J. et al. Biological hazards. In: LUNING, P. A.; DEVLIEGHERE, F.; VERHÉ, R. (ed). Safety in the agrifood chain. Wageningen, Netherlands: Wageningen Academic Publishers, 2006. p. 67-143

RUBINCHIK, S.; SEDDON, A.; KARJYSHEV, A. V. Molecular mechanisms and biological role of *Campylobacter jejuni* attachment to host cells. **European Journal of Microbiology and Immunology**, v. 2, n. 1, p. 32-40, 2012. doi: 10.1556/EuJMI.2.2012.1.6

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. doi: 10.1002/rcm.1584]

RUSSEL, A. B. et al. Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cell. **Nature**, v. 475, n. 7356, p. 343-347, 2011. doi: 10.1038/nature10244

SALLAM, K. I. Prevalence of *Campylobacter* in chicken and chicken by-products retailed in Sapporo area, Hokkaido, Japan. **Food Control**, v. 18, n. 9, p. 1113-1120, 2007. doi: 10.1016/j.foodcont.2006.07.005

SARJIT, A.; DYKES, G. A. Transfer of *Campylobacter* and *Salmonella* from poultry meat onto poultry preparation surfaces. **Journal of Food Protection**, v. 80, n. 5, p. 750-757, 2017. doi:10.4315/0362-028X.JFP-16-414

SELIWIORSTOW, T. et al. Identification of risk factors for *Campylobacter* contamination levels on broiler carcasses during the slaughterprocess. **International Journal of Food Microbiology**, v. 226, p. 26–32, 2016. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.03.010

SHEPPARD, S. K. et al. Evolution of an agriculture-associated disease causing *Campylobacter coli* clade: Evidence from national surveillance data in Scotland. **PLoS ONE**, v. 5, e15708, 2010. doi: 10.1371/journal.pone.0015708

SHEPPARD, S. K. et al.. Convergence of *Campylobacter* species: implications for bacterial evolution. **Science**, 320, 237–239, 2008. doi: 10.1126/science.1155532

SHEPPARD, S. K. et al. Progressive genome-wide introgression in agricultural *Campylobacter coli*. **Molecular Ecology**, v. 22, n. 4, p. 1051-1064, 2013. doi: 10.1111/mec.12162

SHEPPARD, S. K.; MAIDEN, M. C. J. The evolution of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, p. a018119, 2015. doi: 10.1101/cshperspect.a018119

SILVA, J. et al. *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: a review. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, n. 200, 2011. doi: 10.3389/fmicb.2011.00200

SIMMONS, N. A.; GIBBS, F.J. *Campylobacter* spp.in oven-ready poultry. *Journal of Infection.*, v. 1, p. 159–162, 1979. doi: 10.1016/S0163-4453(79)80008-0

- 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. doi: 10.1016/j.jala.2004.01.004
- SKARP, C. P. A.; HÄNNINEM, M. L.; RAUTELIN, H. I. K. Campylobacteriosis: the role of poultry meat. **Clinical of Microbiology Infection**, v. 22, p. 103-109, 2016. doi: 10.1016/j.cmi.2015.11.019
- SKIRROW, M.B. Campylobacter enteritis: A "new" disease. **Britanic Medical Journal**, v. 2, n. 6078, p. 9-11, 1977.
- SKORKO-GLONEK, J. et al. HtrA heat shock protease interacts with phospholipids membranes and undergoes conformational changes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 14, p. 8974-8982, 1997. doi: 10.1074/jbc.272.14.8974.
- SKOUFOS, I.; et al. Evaluation of in-field efficacy of dietary ferric tyrosine on performance, intestinal health and meat quality of broiler chickens exposed to natural *Campylobacter jejuni* challenge. **Livestock Science**, v. 221, p. 44–51, 2019. doi: 10.1016/j.livsci.2019.01.008
- SKOV, M.N. et al. The role of litter beetles as potential reservoir for *Salmonella enterica* spp and Thermophilic *Campylobacter* spp. between broiler flocks. **Avian Diseases**, v.48, p.9-18, 2004. doi: 10.1637/5698.
- SMIALEK, M.; BURCHARDT, S.; KONCICKI, A. The influence of probiotic supplementation in broiler chickens on population and carcass contamination with *Campylobacter* spp.—Field study. **Research in Veterinary Science**, v. 118, p. 312–316, 2018. doi: 10.1016/j.rvsc.2018.03.009
- SORO, A. B. et al. Strategies and novel technologies to control *Campylobacter* in the poultry chain: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, p. 1353-1377, 2020. doi: 10.1111/1541-4337.12544
- SPROSTON, E. L. et al. Multi-locus sequence types of *Campylobacter* carried by flies and slugs acquired from local ruminant faeces. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, p. 829-838, 2010. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04711.x.
- STERN, N. J. et al. Isolation of a *Lactobacillus salivarius* strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the chicken gastrointestinal system. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 9, p. 3111–3116, 2006. doi: 10.1128/aac.00259-06
- STRAKOVA, N. et al. The effect of environmental conditions on the occurrence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in wastewater and surface waters. **Journal of Applied Microbiology**, v. 0, p. 1-11, 2020. doi: 10.1111/jam.15197

SUAREZ, A. et al. Diarrheal illness and prosthetic joint infection caused by *Campylobacter coli* following consumption of undercooked chicken wings. **ID Cases**, v. 18, e00644m, 2019. doi: 10.1016/j.idcr.2019.e00644

SVETOCH, E. A.; STERN, N. J. Bacteriocins to control *Campylobacter* spp. in poultry - A review. **Poultry Science**, v. 89, p. 1763–1768, 2010. doi:10.3382/ps.2010-00659.

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 Disease**, v. 194, n. 1, p. 95-97, 2006. doi: 10.1086/504294.

TANG, Y. et al. Antibiotic resistance and trends in the foodborne pathogen, *Campylobacter*. **Animal Health Research Reviews**, v. 18, n. 2, p. 87–98, 2017. doi: 10.1017/S1466252317000135.

TEH, A. H. T.; LEE, S. M.; DYKES, G. A. Does *Campylobacter jejuni* form biofilms in food-related environments? **Applied Environmental Microbiology**, v. 80, n. 7, p. 5154-5160, 2014. doi: 10.1128/AEM.01493-14

THEOBALD, S. M. D. et al. Further studies on the etiological role of *Vibrio fetus*. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 32, p. 683-689, 1920.

THEPAULT, A. et al. Ruminant and chicken: important sources of Campylobacteriosis in France despite a variation of source attribution in 2009 and 2015. **Science Reports**, v. 8, 9305, 2018. doi: 10.1038/s41598-018-27558-z

VAN BOECKEL, T. P. et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proceedings in National Academy of Sciences of de United States of America**, v. 112, n. 18, p. 5649-5654, 2015. doi: 10.1073/pnas.1503141112

VANDAMME, P. et al. Campylobacteraceae. In: GARRITY, G. M. et al (ed). Bergey's manual of systematic bacteriology: Vol. 2. New York: Springer Science, 2005. p. 1147-1160.

VÉRON, M.; CHATERLAIN, R. Taxonomic study of the genus *Campylobacter* and designation of the neotype strain for the type species *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor). **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, n. 23, p. 122-134, 1973.

VIDAL, A. B. et al. Genetic diversity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from conventional broiler flocks and the impacts of sampling strategy and laboratory method. **Applied Environmental Microbiology**, v. 82, p. 2347-2355, 2016. doi: 10.1128/AEM.03693-15.

VINUEZA-BURGOS, C. et al. Prevalence, antimicrobial resistance and genetic diversity of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* in Ecuadorian broilers at slaughter age. **Poultry Science**, v. 96, p. 2366-2374, 2017. doi:10.3382/ps/pew487

WAGLE, B. R. et al. Application of β -Resorcylic acid as potential antimicrobial feed additive to reduce *Campylobacter* colonization in broiler chickens. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 599, 2017. doi: 10.3389/fmicb.2017.00599

WALLACE, R. L. et al. Antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. causing human infection in Australia: an international comparison. **Microbial Drug Resistance**, v. 0, n. 0, 2020. doi: 10.1089/mdr.2020.0082

WALTER, E. J. S. et al. Incidence of *Campylobacter*-associated Guillain-Barré Syndrome estimated from health insurance data. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 17, n. 1., 2020. doi: 10.1089/fpd.2019.2652

WANG, C. H. et al. Spontaneous bacterial peritonitis caused by *Campylobacter coli* in cirrhotic patient. *Medicine*, v. 99, n. 21, e19887, 2020. doi: 10.1097/MD.00000000000019887

WATSON, J.T.; SPARKMAN, O.D. Introduction to mass spectrometry: instrumentation, applications and strategies for data interpretation. Wiley: England, 2006, p. 860.

WHILEY, H. et al. The role of environmental reservoirs in human campylobacteriosis. **International Journal of Environmental Research Public Health**, v.8, p.5886-5907, 2013. doi: 10.3390/ijerph10115886

WHYTE, P. et al. The effect of transportation stress on excretion rates of campylobacters in market-age broilers. **Poultry Science**, v. 80, n. 6, p. 817–820, 2001. doi: 10.1093/ps/80.6.817

WHYTE, P.; MCGILL, K.; COLLINS, J. D. An assessment of steam pasteurization and hot water immersion treatments for the microbiological decontamination of broiler carcasses. **Food Microbiology**, v. 20, n.1, p. 111–117, 2003. doi: 10.1016/S0740-0020(02)00084-9

WIECZOREK, K.; OSEK, J. Antimicrobial resistance mechanisms among *Campylobacter*. **BioMed Research International**, 340605, p. 1–12, 2013. doi: 10.1155/2013/340605.

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. doi: 10.1099/00221287-148-4-909

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

YANG, H. ; LI, Y. ; JOHNSON, M. G. Survival and death of *Salmonella typhimurium* and *Campylobacter jejuni* in processing water and on chicken skin during poultry scalding and chilling. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 6, p. 770–776, 2001. doi: 10.4315/0362-028x-64.6.770

ZBRUN, et al. Worldwide meta-analysis of the prevalence of *Campylobacter* in animal food products. **Research in Veterinary Science**, v. 132, p. 69-77, 2020. doi: 10.1016/j.rvsc.2020.05.017

ZHANG, P. et al. Multilocus sequence types and antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolates of human patients from Beijing, China, 2017-2018. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 554784, 2020. doi: 10.3389/fmicb.2020.554784

ZHANG, C. et al. Effects of multiple litter amendment applications in commercial broiler houses on ammonia emissions and litter microflora. **Transactions of the ASABE**, v. 59, p. 1393–1401, 2016. doi: 10.13031/trans.59.11725

ANEXO 1 – Normas da revista Pathogens

Instructions for Authors

Shortcuts

- Manuscript Submission Overview
- Manuscript Preparation
- Preparing Figures, Schemes and Tables
- Supplementary Materials, Data Deposit and Software Source Code
- Research and Publication Ethics
- Reviewer Suggestions
- English Corrections
- Preprints and Conference Papers
- Authorship
- Editorial Independence
- Conflict of Interests
- Editorial Procedures and Peer-Review
- Promoting Equity, Diversity and Inclusiveness Within MDPI Journals
- Resource Identification Initiative

Submission Checklist

Please:

1. read the Aims & Scope to gain an overview and assess if your manuscript is suitable for this journal;
2. use the Microsoft Word template or LaTeX template to prepare your manuscript;
3. make sure that issues about publication ethics, research ethics, copyright, authorship, figure formats, data and references format have been appropriately considered;
4. Ensure that all authors have approved the content of the submitted manuscript.
5. Authors are encouraged to add a biography (optional) to the submission and publish it.

Manuscript Submission Overview

Types of Publications

Pathogens has no restrictions on the length of manuscripts, provided that the text is concise and comprehensive. Full experimental details must be provided so that the results can be reproduced. **Pathogens** requires that authors publish all experimental controls and make full datasets available where possible (see the guidelines on Supplementary Materials and references to unpublished data).

Manuscripts submitted to **Pathogens** should neither be published previously nor be under consideration for publication in another journal. The main article types are as follows:

- **Articles:** Original research manuscripts. The journal considers all original research manuscripts provided that the work reports scientifically sound experiments and provides a substantial amount of new information. Authors should not unnecessarily divide their work into several related manuscripts, although short **Communications** of preliminary, but significant, results will be considered. The quality and impact of the study will be considered during peer review.
- **Reviews:** These provide concise and precise updates on the latest progress made in a given area of research. Systematic reviews should follow the PRISMA guidelines. The main text of review papers should be around 4000 words at minimum and include at least two figures or tables.

Submission Process

Manuscripts for **Pathogens** should be submitted online at susy.mdpi.com. The submitting author, who is generally the corresponding author, is responsible for the manuscript during the submission and peer-review process. The submitting author must ensure that all eligible co-authors have been included in the author list (read the criteria to

qualify for authorship) and that they have all read and approved the submitted version of the manuscript. To submit your manuscript, register and log in to the submission website. Once you have registered, click here to go to the submission form for [Pathogens](#). All co-authors can see the manuscript details in the submission system, if they register and log in using the e-mail address provided during manuscript submission.

Accepted File Formats

Authors must use the Microsoft Word template or LaTeX template to prepare their manuscript. Using the template file will substantially shorten the time to complete copy-editing and publication of accepted manuscripts. The total amount of data for all files must not exceed 120 MB. If this is a problem, please contact the Editorial Office pathogens@mdpi.com. Accepted file formats are:

- **Microsoft Word:** Manuscripts prepared in Microsoft Word must be converted into a single file before submission. When preparing manuscripts in Microsoft Word, the [Pathogens](#) Microsoft Word template file must be used. Please insert your graphics (schemes, figures, etc.) in the main text after the paragraph of its first citation.
- **LaTeX:** Manuscripts prepared in LaTeX must be collated into one ZIP folder (including all source files and images, so that the Editorial Office can recompile the submitted PDF). When preparing manuscripts in LaTeX, please use the [Pathogens](#) LaTeX template files. You can now also use the online application writeLaTeX to submit articles directly to [Pathogens](#). The MDPI LaTeX template file should be selected from the writeLaTeX template gallery.
- **Supplementary files:** May be any format, but it is recommended that you use common, non-proprietary formats where possible (see below for further details).

Disclaimer: Usage of these templates is exclusively intended for submission to the journal for peer-review, and strictly limited to this purpose and it cannot be used for posting online on preprint servers or other websites.

Free Format Submission

[Pathogens](#) now accepts free format submission:

- We do not have strict formatting requirements, but all manuscripts must contain the required sections: Author Information, Abstract, Keywords, Introduction, Materials & Methods, Results, Conclusions, Figures and Tables with Captions, Funding Information, Author Contributions, Conflict of Interest and other Ethics Statements. Check the Journal *Instructions for Authors* for more details.
- Your references may be in any style, provided that you use the consistent formatting throughout. It is essential to include author(s) name(s), journal or book title, article or chapter title (where required), year of publication, volume and issue (where appropriate) and pagination. DOI numbers (Digital Object Identifier) are not mandatory but highly encouraged. The bibliography software package [EndNote](#), [Zotero](#), [Mendeley](#), [Reference Manager](#) are recommended.
- When your manuscript reaches the revision stage, you will be requested to format the manuscript according to the journal guidelines.

Cover Letter

A cover letter must be included with each manuscript submission. It should be concise and explain why the content of the paper is significant, placing the findings in the context of existing work and why it fits the scope of the journal. Confirm that neither the manuscript nor any parts of its content are currently under consideration or published in another journal. Any prior submissions of the manuscript to MDPI journals must be acknowledged. The names of proposed and excluded reviewers should be provided in the submission system, not in the cover letter.

Author Biography

Authors are encouraged to add a biography (maximum 150 words) to the submission and publish it. This should be a single paragraph and should contain the following points:

1. Authors' full names followed by current positions;
2. Education background including institution information and year of graduation (type and level of degree received);
3. Work experience;
4. Current and previous research interests;
5. Memberships of professional societies and awards received.

Note for Authors Funded by the National Institutes of Health (NIH)

This journal automatically deposits papers to PubMed Central after publication of an issue. Authors do not need to separately submit their papers through the NIH Manuscript Submission System (NIHMS, <http://nihms.nih.gov/>).

[Return to top]

Manuscript Preparation

General Considerations

- Research manuscripts should comprise:
 - Front matter: Title, Author list, Affiliations, Abstract, Keywords
 - Research manuscript sections: Introduction, Results, Discussion, Materials and Methods, Conclusions (optional).
 - Back matter: Supplementary Materials, Acknowledgments, Author Contributions, Conflicts of Interest, References.
- Review manuscripts should comprise the front matter, literature review sections and the back matter. The template file can also be used to prepare the front and back matter of your review manuscript. It is not necessary to follow the remaining structure. Structured reviews and meta-analyses should use the same structure as research articles and ensure they conform to the PRISMA guidelines.
- Case reports should include a succinct introduction about the general medical condition or relevant symptoms that will be discussed in the case report; the case presentation including all of the relevant de-identified demographic and descriptive information about the patient(s), and a description of the symptoms, diagnosis, treatment, and outcome; a discussion providing context and any necessary explanation of specific treatment decisions; a conclusion briefly outlining the take-home message and the lessons learned.
- Graphical Abstract:

A graphical abstract (GA) is an image that appears alongside the text abstract in the Table of Contents. In addition to summarizing the content, it should represent the topic of the article in an attention-grabbing way. Moreover, it should not be exactly the same as the Figure in the paper or just a simple superposition of several subfigures. Note that the GA must be original and unpublished artwork. Any postage stamps, currency from any country, or trademarked items should not be included in it.

The GA should be a high-quality illustration or diagram in any of the following formats: PNG, JPEG, TIFF, or SVG. Written text in a GA should be clear and easy to read, using one of the following fonts: Times, Arial, Courier, Helvetica, Ubuntu or Calibri.

The minimum required size for the GA is 560 × 1100 pixels (height × width). The size should be of high quality in order to reproduce well.
- Acronyms/Abbreviations/Initialisms should be defined the first time they appear in each of three sections: the abstract; the main text; the first figure or table. When defined for the first time, the acronym/abbreviation/initialism should be added in parentheses after the written-out form.
- SI Units (International System of Units) should be used. Imperial, US customary and other units should be converted to SI units whenever possible.
- Accession numbers of RNA, DNA and protein sequences used in the manuscript should be provided in the Materials and Methods section. Also see the section on Deposition of Sequences and of Expression Data.
- Equations: If you are using Word, please use either the Microsoft Equation Editor or the MathType add-on. Equations should be editable by the editorial office and not appear in a picture format.
- Research Data and supplementary materials: Note that publication of your manuscript implies that you must make all materials, data, and protocols associated with the publication available to readers. Disclose at the submission stage any restrictions on the availability of materials or information. Read the information about Supplementary Materials and Data Deposit for additional guidelines.
- Preregistration: Where authors have preregistered studies or analysis plans, links to the preregistration must be provided in the manuscript.

- Guidelines and standards: MDPI follows standards and guidelines for certain types of research. See https://www.mdpi.com/editorial_process for further information.

[Return to top]

Front Matter

These sections should appear in all manuscript types

- Title: The title of your manuscript should be concise, specific and relevant. It should identify if the study reports (human or animal) trial data, or is a systematic review, meta-analysis or replication study. When gene or protein names are included, the abbreviated name rather than full name should be used.
- Author List and Affiliations: Authors' full first and last names must be provided. The initials of any middle names can be added. The PubMed/MEDLINE standard format is used for affiliations: complete address information including city, zip code, state/province, and country. At least one author should be designated as corresponding author, and his or her email address and other details should be included at the end of the affiliation section. Please read the criteria to qualify for authorship.
- Abstract: The abstract should be a total of about 200 words maximum. The abstract should be a single paragraph and should follow the style of structured abstracts, but without headings: 1) Background: Place the question addressed in a broad context and highlight the purpose of the study; 2) Methods: Describe briefly the main methods or treatments applied. Include any relevant preregistration numbers, and species and strains of any animals used. 3) Results: Summarize the article's main findings; and 4) Conclusion: Indicate the main conclusions or interpretations. The abstract should be an objective representation of the article: it must not contain results which are not presented and substantiated in the main text and should not exaggerate the main conclusions.
- Keywords: Three to ten pertinent keywords need to be added after the abstract. We recommend that the keywords are specific to the article, yet reasonably common within the subject discipline.

Research Manuscript Sections

- Introduction: The introduction should briefly place the study in a broad context and highlight why it is important. It should define the purpose of the work and its significance, including specific hypotheses being tested. The current state of the research field should be reviewed carefully and key publications cited. Please highlight controversial and diverging hypotheses when necessary. Finally, briefly mention the main aim of the work and highlight the main conclusions. Keep the introduction comprehensible to scientists working outside the topic of the paper.
- Results: Provide a concise and precise description of the experimental results, their interpretation as well as the experimental conclusions that can be drawn.
- Discussion: Authors should discuss the results and how they can be interpreted in perspective of previous studies and of the working hypotheses. The findings and their implications should be discussed in the broadest context possible and limitations of the work highlighted. Future research directions may also be mentioned. This section may be combined with Results.
- Materials and Methods: They should be described with sufficient detail to allow others to replicate and build on published results. New methods and protocols should be described in detail while well-established methods can be briefly described and appropriately cited. Give the name and version of any software used and make clear whether computer code used is available. Include any pre-registration codes.
- Conclusions: This section is not mandatory, but can be added to the manuscript if the discussion is unusually long or complex.
- Patents: This section is not mandatory, but may be added if there are patents resulting from the work reported in this manuscript.

[Return to top]

Back Matter

- Supplementary Materials: Describe any supplementary material published online alongside the manuscript (figure, tables, video, spreadsheets, etc.). Please indicate the name and title of each element as follows Figure S1: title, Table S1: title, etc.

- **Funding:** All sources of funding of the study should be disclosed. Clearly indicate grants that you have received in support of your research work and if you received funds to cover publication costs. Note that some funders will not refund article processing charges (APC) if the funder and grant number are not clearly and correctly identified in the paper. Funding information can be entered separately into the submission system by the authors during submission of their manuscript. Such funding information, if available, will be deposited to FundRef if the manuscript is finally published. Please add: "This research received no external funding" or "This research was funded by [name of funder] grant number [xxx]" and "The APC was funded by [XXX]" in this section. Check carefully that the details given are accurate and use the standard spelling of funding agency names at <https://search.crossref.org/funding>, any errors may affect your future funding.
- **Acknowledgments:** In this section you can acknowledge any support given which is not covered by the author contribution or funding sections. This may include administrative and technical support, or donations in kind (e.g., materials used for experiments).
- **Author Contributions:** Each author is expected to have made substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data; or the creation of new software used in the work; or have drafted the work or substantively revised it; AND has approved the submitted version (and version substantially edited by journal staff that involves the author's contribution to the study); AND agrees to be personally accountable for the author's own contributions and for ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work, even ones in which the author was not personally involved, are appropriately investigated, resolved, and documented in the literature.

For research articles with several authors, a short paragraph specifying their individual contributions must be provided. The following statements should be used "Conceptualization, X.X. and Y.Y.; Methodology, X.X.; Software, X.X.; Validation, X.X., Y.Y. and Z.Z.; Formal Analysis, X.X.; Investigation, X.X.; Resources, X.X.; Data Curation, X.X.; Writing – Original Draft Preparation, X.X.; Writing – Review & Editing, X.X.; Visualization, X.X.; Supervision, X.X.; Project Administration, X.X.; Funding Acquisition, Y.Y.", please turn to the CRediT taxonomy for the term explanation. For more background on CRediT, see here. "Authorship must include and be limited to those who have contributed substantially to the work. Please read the section concerning the criteria to qualify for authorship carefully".
- **Institutional Review Board Statement:** In this section, please add the Institutional Review Board Statement and approval number for studies involving humans or animals. Please note that the Editorial Office might ask you for further information. Please add "The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board (or Ethics Committee) of NAME OF INSTITUTE (protocol code XXX and date of approval)." OR "Ethical review and approval were waived for this study, due to REASON (please provide a detailed justification)." OR "Not applicable" for studies not involving humans or animals. You might also choose to exclude this statement if the study did not involve humans or animals.
- **Informed Consent Statement:** Any research article describing a study involving humans should contain this statement. Please add "Informed consent was obtained from all subjects involved in the study." OR "Patient consent was waived due to REASON (please provide a detailed justification)." OR "Not applicable" for studies not involving humans. You might also choose to exclude this statement if the study did not involve humans.

Written informed consent for publication must be obtained from participating patients who can be identified (including by the patients themselves). Please state "Written informed consent has been obtained from the patient(s) to publish this paper" if applicable.
- **Data Availability Statement:** In this section, please provide details regarding where data supporting reported results can be found, including links to publicly archived datasets analyzed or generated during the study. Please refer to suggested Data Availability Statements in section "MDPI Research Data Policies". You might choose to exclude this statement if the study did not report any data.
- **Conflicts of Interest:** Authors must identify and declare any personal circumstances or interest that may be perceived as influencing the representation or interpretation of reported research results. If there is no conflict of interest, please state "The authors declare no conflict of interest." Any role of the funding sponsors in the choice of research project; design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results must be declared in this section. Pathogens does not publish studies funded partially or fully by the tobacco industry. Any projects funded by industry must pay special attention to the full declaration of funder involvement. If there is no role, please state "The sponsors had no role in the design, execution, interpretation, or writing of the study". For more details please see Conflict of Interest.
- **References:** References must be numbered in order of appearance in the text (including table captions and figure legends) and listed individually at the end of the manuscript. We recommend preparing the references with a bibliography software package, such as EndNote, ReferenceManager or Zotero to

avoid typing mistakes and duplicated references. We encourage citations to data, computer code and other citable research material. If available online, you may use reference style 9. below.

- Citations and References in Supplementary files are permitted provided that they also appear in the main text and in the reference list.

In the text, reference numbers should be placed in square brackets [], and placed before the punctuation; for example [1], [1–3] or [1,3]. For embedded citations in the text with pagination, use both parentheses and brackets to indicate the reference number and page numbers; for example [5] (p. 10). or [6] (pp. 101–105).

The reference list should include the full title, as recommended by the ACS style guide. Style files for Endnote and Zotero are available.

References should be described as follows, depending on the type of work:

☐ Journal Articles:

1. Author 1, A.B.; Author 2, C.D. Title of the article. **Abbreviated Journal Name** Year, **Volume**, page range.

☐ Books and Book Chapters:

2. Author 1, A.; Author 2, B. **Book Title**, 3rd ed.; Publisher: Publisher Location, Country, Year; pp. 154–196.

3. Author 1, A.; Author 2, B. Title of the chapter. In **Book Title**, 2nd ed.; Editor 1, A., Editor 2, B., Eds.; Publisher: Publisher Location, Country, Year; Volume 3, pp. 154–196.

☐ Unpublished materials intended for publication:

4. Author 1, A.B.; Author 2, C. Title of Unpublished Work (optional). Correspondence Affiliation, City, State, Country. year, **status** (manuscript in preparation; to be submitted).

5. Author 1, A.B.; Author 2, C. Title of Unpublished Work. **Abbreviated Journal Name** year, **phrase indicating stage of publication** (submitted; accepted; in press).

☐ Unpublished materials not intended for publication:

6. Author 1, A.B. (Affiliation, City, State, Country); Author 2, C. (Affiliation, City, State, Country). Phase describing the material, year. (phase: Personal communication; Private communication; Unpublished work; etc.)

☐ Conference Proceedings:

7. Author 1, A.B.; Author 2, C.D.; Author 3, E.F. Title of Presentation. In **Title of the Collected Work** (if available), Proceedings of the Name of the Conference, Location of Conference, Country, Date of Conference; Editor 1, Editor 2, Eds. (if available); Publisher: City, Country, Year (if available); Abstract Number (optional), Pagination (optional).

☐ Thesis:

8. Author 1, A.B. Title of Thesis. Level of Thesis, Degree-Granting University, Location of University, Date of Completion.

☐ Websites:

9. Title of Site. Available online: URL (accessed on Day Month Year).

Unlike published works, websites may change over time or disappear, so we encourage you create an archive of the cited website using a service such as WebCite. Archived websites should be cited using the link provided as follows:

10. Title of Site. URL (archived on Day Month Year).

See the Reference List and Citations Guide for more detailed information.

[Return to top]

Preparing Figures, Schemes and Tables

- File for Figures and Schemes must be provided during submission in a single zip archive and at a sufficiently high resolution (minimum 1000 pixels width/height, or a resolution of 300 dpi or higher). Common formats are accepted, however, TIFF, JPEG, EPS and PDF are preferred.
- **Pathogens** can publish multimedia files in articles or as supplementary materials. Please contact the editorial office for further information.
- All Figures, Schemes and Tables should be inserted into the main text close to their first citation and must be numbered following their number of appearance (Figure 1, Scheme I, Figure 2, Scheme II, Table 1, etc.).
- All Figures, Schemes and Tables should have a short explanatory title and caption.
- All table columns should have an explanatory heading. To facilitate the copy-editing of larger tables, smaller fonts may be used, but no less than 8 pt. in size. Authors should use the Table option of Microsoft Word to create tables.
- Authors are encouraged to prepare figures and schemes in color (RGB at 8-bit per channel). There is no additional cost for publishing full color graphics.

[Return to top]

Supplementary Materials, Data Deposit and Software Source Code

MDPI Research Data Policies

MDPI is committed to supporting open scientific exchange and enabling our authors to achieve best practices in sharing and archiving research data. We encourage all authors of articles published in MDPI journals to share their research data. Individual journal guidelines can be found at the journal 'Instructions for Authors' page. Data sharing policies concern the minimal dataset that supports the central findings of a published study. Generated data should be publicly available and cited in accordance with journal guidelines.

MDPI data policies are informed by TOP Guidelines.

Where ethical, legal or privacy issues are present, data should not be shared. The authors should make any limitations clear in the Data Availability Statement upon submission. Authors should ensure that data shared are in accordance with consent provided by participants on the use of confidential data.

Data Availability Statements provide details regarding where data supporting reported results can be found, including links to publicly archived datasets analyzed or generated during the study.

Below are suggested Data Availability Statements:

- Data available in a publicly accessible repository
The data presented in this study are openly available in [repository name e.g., FigShare] at [doi], reference number [reference number].
- Data available in a publicly accessible repository that does not issue DOIs
Publicly available datasets were analyzed in this study. This data can be found here: [link/accession number]
- Data available on request due to restrictions eg privacy or ethical
The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to [insert reason here]
- 3rd Party Data
Restrictions apply to the availability of these data. Data was obtained from [third party] and are available [from the authors / at URL] with the permission of [third party].
- Data sharing not applicable
No new data were created or analyzed in this study. Data sharing is not applicable to this article.

- Data is contained within the article or supplementary material
The data presented in this study are available in [insert article or supplementary material here]

Data citation:

- [dataset] Authors. Year. Dataset title; Data repository or archive; Version (if any); Persistent identifier (e.g., DOI).

Computer Code and Software

For work where novel computer code was developed, authors should release the code either by depositing in a recognized, public repository such as GitHub or uploading as supplementary information to the publication. The name, version, corporation and location information for all software used should be clearly indicated. Please include all the parameters used to run software/programs analyses.

Supplementary Material

Additional data and files can be uploaded as "Supplementary Files" during the manuscript submission process. The supplementary files will also be available to the referees as part of the peer-review process. Any file format is acceptable; however, we recommend that common, non-proprietary formats are used where possible.

References in Supplementary Files

Citations and References in Supplementary files are permitted provided that they also appear in the reference list of the main text.

Unpublished Data

Restrictions on data availability should be noted during submission and in the manuscript. "Data not shown" should be avoided: authors are encouraged to publish all observations related to the submitted manuscript as Supplementary Material. "Unpublished data" intended for publication in a manuscript that is either planned, "in preparation" or "submitted" but not yet accepted, should be cited in the text and a reference should be added in the References section. "Personal Communication" should also be cited in the text and reference added in the References section. (see also the MDPI reference list and citations style guide).

Remote Hosting and Large Data Sets

Data may be deposited with specialized service providers or institutional/subject repositories, preferably those that use the DataCite mechanism. Large data sets and files greater than 60 MB must be deposited in this way. For a list of other repositories specialized in scientific and experimental data, please consult databib.org or re3data.org. The data repository name, link to the data set (URL) and accession number, doi or handle number of the data set must be provided in the paper. The journal Data also accepts submissions of data set papers.

Deposition of Sequences and of Expression Data

New sequence information must be deposited to the appropriate database prior to submission of the manuscript. Accession numbers provided by the database should be included in the submitted manuscript. Manuscripts will not be published until the accession number is provided.

- *New nucleic acid sequences* must be deposited in one of the following databases: GenBank, EMBL, or DDBJ. Sequences should be submitted to only one database.
- *New high throughput sequencing (HTS) datasets* (RNA-seq, ChIP-Seq, degradome analysis, ...) must be deposited either in the GEO database or in the NCBI's Sequence Read Archive (SRA).
- *New microarray data* must be deposited either in the GEO or the ArrayExpress databases. The "Minimal Information About a Microarray Experiment" (MIAME) guidelines published by the Microarray Gene Expression Data Society must be followed.
- *New protein sequences* obtained by protein sequencing must be submitted to UniProt (submission tool SPIN). Annotated protein structure and its reference sequence must be submitted to RCSB of Protein Data Bank.

All sequence names and the accession numbers provided by the databases must be provided in the Materials and Methods section of the article.

Deposition of Proteomics Data

Methods used to generate the proteomics data should be described in detail and we encourage authors to adhere to the "Minimum Information About a Proteomics Experiment". All generated mass spectrometry raw data must be deposited in the appropriate public database such as ProteomeXchange, PRIDE or jPOST. At the time of

submission, please include all relevant information in the materials and methods section, such as repository where the data was submitted and link, data set identifier, username and password needed to access the data.

[Return to top]

Research and Publication Ethics

Research Ethics

Research Involving Human Subjects

When reporting on research that involves human subjects, human material, human tissues, or human data, authors must declare that the investigations were carried out following the rules of the Declaration of Helsinki of 1975 (<https://www.wma.net/what-we-do/medical-ethics/declaration-of-helsinki/>), revised in 2013. According to point 23 of this declaration, an approval from the local institutional review board (IRB) or other appropriate ethics committee must be obtained before undertaking the research to confirm the study meets national and international guidelines. As a minimum, a statement including the project identification code, date of approval, and name of the ethics committee or institutional review board must be stated in Section 'Institutional Review Board Statement' of the article.

Example of an ethical statement: "All subjects gave their informed consent for inclusion before they participated in the study. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and the protocol was approved by the Ethics Committee of XXX (Project identification code)."

For non-interventional studies (e.g. surveys, questionnaires, social media research), all participants must be fully informed if the anonymity is assured, why the research is being conducted, how their data will be used and if there are any risks associated. As with all research involving humans, ethical approval from an appropriate ethics committee must be obtained prior to conducting the study. If ethical approval is not required, authors must either provide an exemption from the ethics committee or are encouraged to cite the local or national legislation that indicates ethics approval is not required for this type of study. Where a study has been granted exemption, the name of the ethics committee which provided this should be stated in Section 'Institutional Review Board Statement' with a full explanation regarding why ethical approval was not required.

A written informed consent for publication must be obtained from participating patients. Data relating to individual participants must be described in detail, but private information identifying participants need not be included unless the identifiable materials are of relevance to the research (for example, photographs of participants' faces that show a particular symptom). Patients' initials or other personal identifiers must not appear in any images. For manuscripts that include any case details, personal information, and/or images of patients, authors must obtain signed informed consent for publication from patients (or their relatives/guardians) before submitting to an MDPI journal. Patient details must be anonymized as far as possible, e.g., do not mention specific age, ethnicity, or occupation where they are not relevant to the conclusions. A template permission form is available to download. A blank version of the form used to obtain permission (without the patient names or signature) must be uploaded with your submission. Editors reserve the right to reject any submission that does not meet these requirements.

You may refer to our sample form and provide an appropriate form after consulting with your affiliated institution. For the purposes of publishing in MDPI journals, a consent, permission, or release form should include unlimited permission for publication in all formats (including print, electronic, and online), in sublicensed and reprinted versions (including translations and derived works), and in other works and products under open access license. To respect patients' and any other individual's privacy, please do not send signed forms. The journal reserves the right to ask authors to provide signed forms if necessary.

If the study reports research involving vulnerable groups, an additional check may be performed. The submitted manuscript will be scrutinized by the editorial office and upon request, documentary evidence (blank consent forms and any related discussion documents from the ethics board) must be supplied. Additionally, when studies describe groups by race, ethnicity, gender, disability, disease, etc., explanation regarding why such categorization was needed must be clearly stated in the article.

Ethical Guidelines for the Use of Animals in Research

The editors will require that the benefits potentially derived from any research causing harm to animals are significant in relation to any cost endured by animals, and that procedures followed are unlikely to cause offense to the majority of readers. Authors should particularly ensure that their research complies with the commonly-accepted '3Rs':

- Replacement of animals by alternatives wherever possible,

- Reduction in number of animals used, and
- Refinement of experimental conditions and procedures to minimize the harm to animals.

Authors must include details on housing, husbandry and pain management in their manuscript.

For further guidance authors should refer to the Code of Practice for the Housing and Care of Animals Used in Scientific Procedures [2], American Association for Laboratory Animal Science [3] or European Animal Research Association [4].

If national legislation requires it, studies involving vertebrates or higher invertebrates must only be carried out after obtaining approval from the appropriate ethics committee. As a minimum, the project identification code, date of approval and name of the ethics committee or institutional review board should be stated in Section 'Institutional Review Board Statement'. Research procedures must be carried out in accordance with national and institutional regulations. Statements on animal welfare should confirm that the study complied with all relevant legislation. Clinical studies involving animals and interventions outside of routine care require ethics committee oversight as per the American Veterinary Medical Association. If the study involved client-owned animals, informed client consent must be obtained and certified in the manuscript report of the research. Owners must be fully informed if there are any risks associated with the procedures and that the research will be published. If available, a high standard of veterinary care must be provided. Authors are responsible for correctness of the statements provided in the manuscript.

If ethical approval is not required by national laws, authors must provide an exemption from the ethics committee, if one is available. Where a study has been granted exemption, the name of the ethics committee that provided this should be stated in Section 'Institutional Review Board Statement' with a full explanation on why the ethical approval was not required.

If no animal ethics committee is available to review applications, authors should be aware that the ethics of their research will be evaluated by reviewers and editors. Authors should provide a statement justifying the work from an ethical perspective, using the same utilitarian framework that is used by ethics committees. Authors may be asked to provide this even if they have received ethical approval.

MDPI endorses the ARRIVE guidelines (www.nc3rs.org.uk/ARRIVE) for reporting experiments using live animals. Authors and reviewers must use the ARRIVE guidelines as a checklist, which can be found at <https://arriveguidelines.org/sites/arrive/files/documents/ARRIVE%20Compliance%20Questionnaire.pdf>. Editors reserve the right to ask for the checklist and to reject submissions that do not adhere to these guidelines, to reject submissions based on ethical or animal welfare concerns or if the procedure described does not appear to be justified by the value of the work presented.

1. NSW Department of Primary Industries and Animal Research Review Panel. Three Rs. Available online: <https://www.animaethics.org.au/three-rs>
2. Home Office. Animals (Scientific Procedures) Act 1986. Code of Practice for the Housing and Care of Animals Bred, Supplied or Used for Scientific Purposes. Available online: https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/388535/CoPanimalsWeb.pdf
3. American Association for Laboratory Animal Science. The Scientific Basis for Regulation of Animal Care and Use. Available online: <https://www.aalas.org/about-aalas/position-papers/scientific-basis-for-regulation-of-animal-care-and-use>
4. European Animal Research Association. EU regulations on animal research. Available online: <https://www.eara.eu/animal-research-law>

Research Involving Cell Lines

Methods sections for submissions reporting on research with cell lines should state the origin of any cell lines. For established cell lines the provenance should be stated and references must also be given to either a published paper or to a commercial source. If previously unpublished *de novo* cell lines were used, including those gifted from another laboratory, details of institutional review board or ethics committee approval must be given, and confirmation of written informed consent must be provided if the line is of human origin.

An example of Ethical Statements:

The HCT116 cell line was obtained from XXXX. The MLH1⁺ cell line was provided by XXXXX, Ltd. The DLD-1 cell line was obtained from Dr. XXXX. The DR-GFP and SA-GFP reporter plasmids were obtained from Dr. XXX and the Rad51K133A expression vector was obtained from Dr. XXXX.

Research Involving Plants

Experimental research on plants (either cultivated or wild) including collection of plant material, must comply with institutional, national, or international guidelines. We recommend that authors comply with the Convention on Biological Diversity and the Convention on the Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora.

For each submitted manuscript supporting genetic information and origin must be provided. For research manuscripts involving rare and non-model plants (other than, e.g., *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana*, *Oryza sativa*, or many other typical model plants), voucher specimens must be deposited in an accessible herbarium or museum. Vouchers may be requested for review by future investigators to verify the identity of the material used in the study (especially if taxonomic rearrangements occur in the future). They should include details of the populations sampled on the site of collection (GPS coordinates), date of collection, and document the part(s) used in the study where appropriate. For rare, threatened or endangered species this can be waived but it is necessary for the author to describe this in the cover letter.

Editors reserve the rights to reject any submission that does not meet these requirements.

An example of Ethical Statements:

Torenia fournieri plants were used in this study. White-flowered Crown White (CrW) and violet-flowered Crown Violet (CrV) cultivars selected from 'Crown Mix' (XXX Company, City, Country) were kindly provided by Dr. XXX (XXX Institute, City, Country).

Arabidopsis mutant lines (SALKxxxx, SAILxxxx,...) were kindly provided by Dr. XXX, institute, city, country).

Ethical Guidelines for the Use of Animals in Research

The editors will require that the benefits potentially derived from any research causing harm to animals are significant in relation to any cost endured by animals, and that procedures followed are unlikely to cause offense to the majority of readers. Authors should particularly ensure that their research complies with the commonly-accepted '3Rs':

- Replacement of animals by alternatives wherever possible,
- Reduction in number of animals used, and
- Refinement of experimental conditions and procedures to minimize the harm to animals.

Any experimental work must also have been conducted in accordance with relevant national legislation on the use of animals for research. For further guidance authors should refer to the Code of Practice for the Housing and Care of Animals Used in Scientific Procedures [1].

Manuscripts containing original descriptions of research conducted in experimental animals must contain details of approval by a properly constituted research ethics committee. As a minimum, the project identification code, date of approval and name of the ethics committee or institutional review board should be stated in Section 'Institutional Review Board Statement'.

Pathogens endorses the ARRIVE guidelines (www.nc3rs.org.uk/ARRIVE) for reporting experiments using live animals. Authors and reviewers can use the ARRIVE guidelines as a checklist, which can be found at <https://arriveguidelines.org/resources/questionnaire>.

1. Home Office. Animals (Scientific Procedures) Act 1986. Code of Practice for the Housing and Care of Animals Used in Scientific Procedures. Available online: <http://www.official-documents.gov.uk/document/hc8889/hc01/0107/0107.pdf>.

Research Involving Cell Lines

Methods sections for submissions reporting on research with cell lines should state the origin of any cell lines. For established cell lines the provenance should be stated and references must also be given to either a published paper or to a commercial source. If previously unpublished *de novo* cell lines were used, including those gifted from another laboratory, details of institutional review board or ethics committee approval must be given, and confirmation of written informed consent must be provided if the line is of human origin.

An example of Ethical Statements:

The HCT116 cell line was obtained from XXXX. The MLH1⁺ cell line was provided by XXXXX, Ltd. The DLD-1 cell line was obtained from Dr. XXXX. The DR-GFP and SA-GFP reporter plasmids were obtained from Dr. XXX and the Rad51K133A expression vector was obtained from Dr. XXXX.

Research Involving Plants

Experimental research on plants (either cultivated or wild) including collection of plant material, must comply with institutional, national, or international guidelines. We recommend that authors comply with the Convention on Biological Diversity and the Convention on the Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora.

For each submitted manuscript supporting genetic information and origin must be provided. For research manuscripts involving rare and non-model plants (other than, e.g., *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana*, *Oryza sativa*, or many other typical model plants), voucher specimens must be deposited in an accessible herbarium or museum. Vouchers may be requested for review by future investigators to verify the identity of the material used in the study (especially if taxonomic rearrangements occur in the future). They should include details of the populations sampled on the site of collection (GPS coordinates), date of collection, and document the part(s) used in the study where appropriate. For rare, threatened or endangered species this can be waived but it is necessary for the author to describe this in the cover letter.

Editors reserve the rights to reject any submission that does not meet these requirements.

An example of Ethical Statements:

Torenia fournieri plants were used in this study. White-flowered Crown White (CrW) and violet-flowered Crown Violet (CrV) cultivars selected from 'Crown Mix' (XXX Company, City, Country) were kindly provided by Dr. XXX (XXX Institute, City, Country).

Arabidopsis mutant lines (SALKxxxx, SAILxxxx,...) were kindly provided by Dr. XXX, institute, city, country).

Clinical Trials Registration

Registration

MDPI follows the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) guidelines which require and recommend registration of clinical trials in a public trials registry at or before the time of first patient enrollment as a condition of consideration for publication.

Purely observational studies do not require registration. A clinical trial not only refers to studies that take place in a hospital or involve pharmaceuticals, but also refer to all studies which involve participant randomization and group classification in the context of the intervention under assessment.

Authors are strongly encouraged to pre-register clinical trials with an international clinical trials register and cite a reference to the registration in the abstract and Methods section. Suitable databases include clinicaltrials.gov, the EU Clinical Trials Register and those listed by the World Health Organisation International Clinical Trials Registry Platform.

Approval to conduct a study from an independent local, regional, or national review body is not equivalent to prospective clinical trial registration. MDPI reserves the right to decline any paper without trial registration for further peer-review. However, if the study protocol has been published before the enrolment, the registration can be waived with correct citation of the published protocol.

CONSORT Statement

MDPI requires a completed CONSORT 2010 checklist and flow diagram as a condition of submission when reporting the results of a randomized trial. Templates for these can be found here or on the CONSORT website (<http://www.consort-statement.org>) which also describes several CONSORT checklist extensions for different designs and types of data beyond two group parallel trials. At minimum, your article should report the content addressed by each item of the checklist.

[Return to top]

Sex and Gender in Research

We encourage our authors to follow the 'Sex and Gender Equity in Research – SAGER – guidelines' and to include sex and gender considerations where relevant. Authors should use the terms sex (biological attribute) and gender (shaped by social and cultural circumstances) carefully in order to avoid confusing both terms. Article titles and/or abstracts should indicate clearly what sex(es) the study applies to. Authors should also describe in the background, whether sex and/or gender differences may be expected; report how sex and/or gender were accounted for in the design of the study; provide disaggregated data by sex and/or gender, where appropriate; and discuss respective results. If a sex and/or gender analysis was not conducted, the rationale should be given in the Discussion. We suggest that our authors consult the full guidelines before submission.

[Return to top]

Borders and Territories

Potential disputes over borders and territories may have particular relevance for authors in describing their research or in an author or editor correspondence address, and should be respected. Content decisions are an editorial matter and where there is a potential or perceived dispute or complaint, the editorial team will attempt to find a resolution that satisfies parties involved.

MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Publication Ethics Statement

Pathogens is a member of the Committee on Publication Ethics (COPE). We fully adhere to its Code of Conduct and to its Best Practice Guidelines.

The editors of this journal enforce a rigorous peer-review process together with strict ethical policies and standards to ensure to add high quality scientific works to the field of scholarly publication. Unfortunately, cases of plagiarism, data falsification, image manipulation, inappropriate authorship credit, and the like, do arise. The editors of Pathogens take such publishing ethics issues very seriously and are trained to proceed in such cases with a zero tolerance policy.

Authors wishing to publish their papers in Pathogens must abide to the following:

- Any facts that might be perceived as a possible conflict of interest of the author(s) must be disclosed in the paper prior to submission.
- Authors should accurately present their research findings and include an objective discussion of the significance of their findings.
- Data and methods used in the research need to be presented in sufficient detail in the paper, so that other researchers can replicate the work.
- Raw data should preferably be publicly deposited by the authors before submission of their manuscript. Authors need to at least have the raw data readily available for presentation to the referees and the editors of the journal, if requested. Authors need to ensure appropriate measures are taken so that raw data is retained in full for a reasonable time after publication.
- Simultaneous submission of manuscripts to more than one journal is not tolerated.
- Republishing content that is not novel is not tolerated (for example, an English translation of a paper that is already published in another language will not be accepted).
- If errors and inaccuracies are found by the authors after publication of their paper, they need to be promptly communicated to the editors of this journal so that appropriate actions can be taken. Please refer to our policy regarding Updating Published Papers.
- Your manuscript should not contain any information that has already been published. If you include already published figures or images, please obtain the necessary permission from the copyright holder to publish under the CC-BY license. For further information, see the Rights and Permissions page.
- Plagiarism, data fabrication and image manipulation are not tolerated.

- **Plagiarism is not acceptable** in Pathogens submissions.

Plagiarism includes copying text, ideas, images, or data from another source, even from your own publications, without giving any credit to the original source.

Reuse of text that is copied from another source must be between quotes and the original source must be cited. If a study's design or the manuscript's structure or language has been inspired by previous works, these works must be explicitly cited.

If plagiarism is detected during the peer review process, the manuscript may be rejected. If plagiarism is detected after publication, we may publish a correction or retract the paper.

- **Image files must not be manipulated or adjusted in any way** that could lead to misinterpretation of the information provided by the original image.

Irregular manipulation includes: 1) introduction, enhancement, moving, or removing features from the original image; 2) grouping of images that should obviously be presented separately (e.g., from different parts of the same gel, or from different gels); or 3) modifying the contrast, brightness or color balance to obscure, eliminate or enhance some information.

If irregular image manipulation is identified and confirmed during the peer review process, we may reject the manuscript. If irregular image manipulation is identified and confirmed after publication, we may correct or retract the paper.

Our in-house editors will investigate any allegations of publication misconduct and may contact the authors' institutions or funders if necessary. If evidence of misconduct is found, appropriate action will be taken to correct or retract the publication. Authors are expected to comply with the best ethical publication practices when publishing with MDPI.

Citation Policy

Authors should ensure that where material is taken from other sources (including their own published writing) the source is clearly cited and that where appropriate permission is obtained.

Authors should not engage in excessive self-citation of their own work.

Authors should not copy references from other publications if they have not read the cited work.

Authors should not preferentially cite their own or their friends', peers', or institution's publications.

Authors should not cite advertisements or advertorial material.

In accordance with COPE guidelines, we expect that "original wording taken directly from publications by other researchers should appear in quotation marks with the appropriate citations." This condition also applies to an author's own work. COPE have produced a discussion document on citation manipulation with recommendations for best practice.

[Return to top]

Reviewer Suggestions

During the submission process, please suggest three potential reviewers with the appropriate expertise to review the manuscript. The editors will not necessarily approach these referees. Please provide detailed contact information (address, homepage, phone, e-mail address). The proposed referees should neither be current collaborators of the co-authors nor have published with any of the co-authors of the manuscript within the last five years. Proposed reviewers should be from different institutions to the authors. You may identify appropriate Editorial Board members of the journal as potential reviewers. You may suggest reviewers from among the authors that you frequently cite in your paper.

[Return to top]

English Corrections

To facilitate proper peer-reviewing of your manuscript, it is essential that it is submitted in grammatically correct English. Advice on some specific language points can be found [here](#).

If you are not a native English speaker, we recommend that you have your manuscript professionally edited before submission or read by a native English-speaking colleague. This can be carried out by MDPI's English editing service. Professional editing will enable reviewers and future readers to more easily read and assess the content of submitted manuscripts. All accepted manuscripts undergo language editing, however an additional fee will be charged to authors if very extensive English corrections must be made by the Editorial Office: pricing is according to the service [here](#).

[Return to top]

Preprints and Conference Papers

[Pathogens](#) accepts submissions that have previously been made available as preprints provided that they have not undergone peer review. A preprint is a draft version of a paper made available online before submission to a journal.

MDPI operates [Preprints](#), a preprint server to which submitted papers can be uploaded directly after completing journal submission. Note that [Preprints](#) operates independently of the journal and posting a preprint does not affect the peer review process. Check the [Preprints](#) instructions for authors for further information.

Expanded and high-quality conference papers can be considered as articles if they fulfill the following requirements: (1) the paper should be expanded to the size of a research article; (2) the conference paper should be cited and noted on the first page of the paper; (3) if the authors do not hold the copyright of the published conference paper, authors should seek the appropriate permission from the copyright holder; (4) authors are asked to disclose that it is conference paper in their cover letter and include a statement on what has been changed compared to the original conference paper. Pathogens does not publish pilot studies or studies with inadequate statistical power.

Unpublished conference papers that do not meet the above conditions are recommended to be submitted to the Proceedings Series journals.

[Return to top]

Authorship

MDPI follows the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) guidelines which state that, in order to qualify for authorship of a manuscript, the following criteria should be observed:

- Substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the work; AND
- Drafting the work or revising it critically for important intellectual content; AND
- Final approval of the version to be published; AND
- Agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Those who contributed to the work but do not qualify for authorship should be listed in the acknowledgments. More detailed guidance on authorship is given by the International Council of Medical Journal Editors (ICMJE).

Any change to the author list should be approved by all authors including any who have been removed from the list. The corresponding author should act as a point of contact between the editor and the other authors and should keep co-authors informed and involve them in major decisions about the publication. We reserve the right to request confirmation that all authors meet the authorship conditions.

For more details about authorship please check MDPI ethics website.

Reviewers Recommendation

Authors can recommend potential reviewers. Journal editors will check to make sure there are no conflicts of interest before contacting those reviewers, and will not consider those with competing interests. Reviewers are asked to declare any conflicts of interest. Authors can also enter the names of potential peer reviewers they wish to exclude from consideration in the peer review of their manuscript, during the initial submission progress. The editorial team will respect these requests so long as this does not interfere with the objective and thorough assessment of the submission.

Editorial Independence

Lack of Interference With Editorial Decisions

Editorial independence is of utmost importance and MDPI does not interfere with editorial decisions. All articles published by MDPI are peer reviewed and assessed by our independent editorial boards, and MDPI staff are not involved in decisions to accept manuscripts. When making an editorial decision, we expect the academic editor to make their decision based only upon:

- The suitability of selected reviewers;
- Adequacy of reviewer comments and author response;
- Overall scientific quality of the paper.

In all of our journals, in every aspect of operation, MDPI policies are informed by the mission to make science and research findings open and accessible as widely and rapidly as possible.

Editors and Editorial Staff as Authors

Editorial staff or editors shall not be involved in processing their own academic work. Submissions authored by editorial staff/editors will be assigned to at least two independent outside reviewers. Decisions will be made by other Editorial Board Members who do not have a conflict of interest with the author. Journal staff are not involved in the processing of their own work submitted to any MDPI journals.

Conflict of Interests

According to The International Committee of Medical Journal Editors, "Authors should avoid entering into agreements with study sponsors, both for-profit and non-profit, that interfere with authors' access to all of the study's data or that interfere with their ability to analyze and interpret the data and to prepare and publish manuscripts independently when and where they choose."

All authors must disclose all relationships or interests that could inappropriately influence or bias their work. Examples of potential conflicts of interest include but are not limited to financial interests (such as membership, employment, consultancies, stocks/shares ownership, honoraria, grants or other funding, paid expert testimonies and patent-licensing arrangements) and non-financial interests (such as personal or professional relationships, affiliations, personal beliefs).

Authors can disclose potential conflicts of interest via the online submission system during the submission process. Declarations regarding conflicts of interest can also be collected via the MDPI disclosure form. The corresponding author must include a summary statement in the manuscript in a separate section "Conflicts of Interest" placed just before the reference list. The statement should reflect all the collected potential conflict of interest disclosures in the form.

See below for examples of disclosures:

Conflicts of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stocks in Company Y. Author C has been involved as a consultant and expert witness in Company Z. Author D is the inventor of patent X.

If no conflicts exist, the authors should state:

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

[Return to top]

Editorial Procedures and Peer-Review

Initial Checks

All submitted manuscripts received by the Editorial Office will be checked by a professional in-house **Managing Editor** to determine whether they are properly prepared and whether they follow the ethical policies of the journal, including those for human and animal experimentation. Manuscripts that do not fit the journal's ethics policy or do not meet the standards of the journal will be rejected before peer-review. Manuscripts that are not properly prepared will be returned to the authors for revision and resubmission. After these checks, the **Managing Editor** will consult the journals' **Editor-in-Chief** or **Associate Editors** to determine whether the manuscript fits the scope of the journal and whether it is scientifically sound. No judgment on the potential impact of the work will be made at this stage. Reject decisions at this stage will be verified by the **Editor-in-Chief**.

Peer-Review

Once a manuscript passes the initial checks, it will be assigned to at least two independent experts for peer-review. A single-blind review is applied, where authors' identities are known to reviewers. Peer review comments are confidential and will only be disclosed with the express agreement of the reviewer.

In the case of regular submissions, in-house assistant editors will invite experts, including recommendations by an academic editor. These experts may also include **Editorial Board Members** and Guest Editors of the journal. Potential reviewers suggested by the authors may also be considered. Reviewers should not have published with any of the co-authors during the past five years and should not currently work or collaborate with any of the institutions of the co-authors of the submitted manuscript.

Optional Open Peer-Review

The journal operates optional open peer-review: Authors are given the option for all review reports and editorial decisions to be published alongside their manuscript. In addition, reviewers can sign their review, i.e., identify

themselves in the published review reports. Authors can alter their choice for open review at any time before publication, but once the paper has been published changes will only be made at the discretion of the Publisher and Editor-in-Chief. We encourage authors to take advantage of this opportunity as proof of the rigorous process employed in publishing their research. To guarantee impartial refereeing, the names of referees will be revealed only if the referees agree to do so, and after a paper has been accepted for publication.

Editorial Decision and Revision

All the articles, reviews and communications published in MDPI journals go through the peer-review process and receive at least two reviews. The in-house editor will communicate the decision of the academic editor, which will be one of the following:

- *Accept after Minor Revisions:*
The paper is in principle accepted after revision based on the reviewer's comments. Authors are given five days for minor revisions.
- *Reconsider after Major Revisions:*
The acceptance of the manuscript would depend on the revisions. The author needs to provide a point by point response or provide a rebuttal if some of the reviewer's comments cannot be revised. Usually, only one round of major revisions is allowed. Authors will be asked to resubmit the revised paper within a suitable time frame, and the revised version will be returned to the reviewer for further comments.
- *Reject and Encourage Resubmission:*
If additional experiments are needed to support the conclusions, the manuscript will be rejected and the authors will be encouraged to re-submit the paper once further experiments have been conducted.
- *Reject:*
The article has serious flaws, and/or makes no original significant contribution. No offer of resubmission to the journal is provided.

All reviewer comments should be responded to in a point-by-point fashion. Where the authors disagree with a reviewer, they must provide a clear response.

Author Appeals

Authors may appeal a rejection by sending an e-mail to the Editorial Office of the journal. The appeal must provide a detailed justification, including point-by-point responses to the reviewers' and/or Editor's comments. The **Managing Editor** of the journal will forward the manuscript and related information (including the identities of the referees) to the Editor-in-Chief, Associate Editor, or Editorial Board member. The academic Editor being consulted will be asked to give an advisory recommendation on the manuscript and may recommend acceptance, further peer-review, or uphold the original rejection decision. A reject decision at this stage is final and cannot be reversed.

In the case of a special issue, the **Managing Editor** of the journal will forward the manuscript and related information (including the identities of the referees) to the **Editor-in-Chief** who will be asked to give an advisory recommendation on the manuscript and may recommend acceptance, further peer-review, or uphold the original rejection decision. A reject decision at this stage will be final and cannot be reversed.

Production and Publication

Once accepted, the manuscript will undergo professional copy-editing, English editing, proofreading by the authors, final corrections, pagination, and, publication on the www.mdpi.com website.

[Return to top]

Promoting Equity, Diversity and Inclusiveness Within MDPI Journals

Our Managing Editors encourage the Editors-in-Chief and Associate Editors to appoint diverse expert Editorial Boards. This is also reflective in our multi-national and inclusive workplace. We are proud to create equal opportunities without regard to gender, ethnicity, sexual orientation, age, religion, or socio-economic status. There is no place for discrimination in our workplace and editors of MDPI journals are to uphold these principles in high regard.

[Return to top]

Resource Identification Initiative

To improve the reproducibility of scientific research, the Resource Identification Initiative aims to provide unique persistent identifiers for key biological resources, including antibodies, cell lines, model organisms and tools.

We encourage authors to include unique identifiers - RRIDs- provided by the Resource Identification Portal in the dedicated section of the manuscript.

To help authors quickly find the correct identifiers for their materials, there is a single website where all resource types can be found and a 'cite this' button next to each resource, that contains a proper citation text that should be included in the methods section of the manuscript.