

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos



Dissertação

“*Campylobacter* termofílicos em frangos de corte e em aviários na região sul do Rio Grande do Sul: ocorrência, diversidade genética, perfil de resistência a antimicrobianos e detecção de genes de virulência”

Tassiana Ramires

Pelotas, 2017

Tassiana Ramires

“*Campylobacter* termofílicos em frangos de corte e em aviários na região sul do Rio Grande do Sul: ocorrência, diversidade genética, perfil de resistência a antimicrobianos e detecção de genes de virulência”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos (área do conhecimento: Microbiologia de Alimentos).

Orientador: Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Odir Antônio Dellagostin

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

R173c Ramires, Tassiana

Campylobacter termofílicos em frangos de corte e em aviários na região sul do Rio Grande do Sul: ocorrência, diversidade genética, perfil de resistência a antimicrobianose detecção de genes de virulência. / Tassiana Ramires ; Wladimir Padilha da silva, orientador ; Odir Antônio Dellagostin, coorientador. — Pelotas, 2017.

72 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Granjas. 2. C. jejuni. 3. PFGE. 4. CiaB. 5. Operon cdt. I. silva, Wladimir Padilha da, orient. II. Dellagostin, Odir Antônio, coorient. III. Título.

CDD : 636.51

Dedico à minha mãe Marly, por nunca ter
medido esforços por mim e ser sempre
a minha maior incentivadora.

*“É preciso ter dúvidas. Só os estúpidos têm
uma confiança absoluta em si mesmos”*

Orson Welles

Agradecimentos

À minha mãe Marly, por estar sempre presente nos momentos em que eu mais precisei, sem ela com certeza as minhas realizações não seriam possíveis. É por ela que sigo sempre em busca do meu melhor.

Ao meu pai Paulo, pelo incentivo em momentos difíceis e por se fazer presente sempre como meu grande amigo.

À minha irmã Tatiane, por ser minha melhor amiga e pela valorização que sempre recebo dela.

Ao meu afilhado Bernardo, por ser fonte de amor em nossa família e estímulo para que eu seja um bom exemplo a ele.

Ao meu companheiro Iaslei, por fazer parte de mais essa caminhada, me compreendendo e auxiliando a contornar os momentos árdus, além de participar das minhas conquistas como se fossem as dele. Obrigada por todo o amor e carinho e por querer me ver sempre bem e feliz.

Às minhas avós Clélia e Cely (*in memoriam*), que sempre me motivaram da maneira mais pura e sincera.

A todos os meus familiares, tios e primos que sempre me valorizam e compreendem a ausência nos encontros de família.

Ao meu orientador Wladimir Padilha da Silva, por ter acreditado em mim e ter me recebido de braços abertos em seu laboratório, sendo exemplo de pessoa e profissional.

Ao meu co-orientador Odir Antônio Dellagostin, pela cooperação na realização deste trabalho.

Aos meus amigos, Amanda, Nayana, Rodrigo, Deia, Carol L., Luiz S., Thiago F., Flávia, Daniel, Verônica e Rafa Soares, alguns mais distantes fisicamente ao longo dos últimos anos, outros companheiros de todas as horas, meu muito obrigada por tudo.

À minha querida amiga Greici, que me inspirou desde o início do meu mestrado e me ajudou a ser capaz de trabalhar com a nossa querida *Campylobacter*.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos que fazem com que eu me realize em fazer parte dessa equipe. A vocês Adriana,

Andréia, Camila, Cláudio, Darla, Graciela, Guilherme, Helena, Isabela, Juliana, Letícia, Louise, Mariana, Natalie, Pedro e Ytacyana, aos professores Celso e Ângela, pelas palavras de conforto e apoio quando necessários.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem contribuir com este trabalho.

Ao CNPq pela concessão de bolsa de estudos.

À Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de executar este trabalho.

A todos que de uma forma ou de outra me auxiliaram e torceram pela realização desse sonho, meu muito obrigada!

Resumo

Ramires, Tassiana. “***Campylobacter* termofílicos em frangos de corte e em aviários na região sul do Rio Grande do Sul: ocorrência, diversidade genética, perfil de resistência a antimicrobianos e detecção de genes de virulência.**” 2017. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

Campylobacter termofílicos são, atualmente, as principais bactérias causadoras de doenças gastrointestinais em todo o mundo. Esse grupo é assim denominado devido a sua temperatura ótima de multiplicação oscilar entre 42 °C e 43 °C, sendo *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari* e *C. upsaliensis*, as principais espécies envolvidas nos casos de campilobacteriose em humanos. Dentre essas espécies, a mais relacionada à essa doença é *C. jejuni*, seguida por *C. coli*. O principal reservatório desses micro-organismos são as aves, principalmente os frangos, possivelmente pela temperatura corporal desses animais ser similar à temperatura ótima para *Campylobacter* termofílicos. Com isso, o objetivo desse estudo foi avaliar a ocorrência, a diversidade genética, o perfil de resistência a antimicrobianos e a presença de genes associados à virulência em isolados de *Campylobacter* termofílicos provenientes de frangos de corte e na cama de aviário em granjas aviárias da região sul do Rio Grande do Sul, Brasil. Um total de 48 amostras foram coletadas em três diferentes granjas (A, B e C), incluindo uma amostra de *swab* de arrasto da cama do aviário e 15 *pools* de amostras de *swab* de cloaca em cada granja. Das três granjas amostradas, apenas a granja C apresentou contaminação por *Campylobacter* termofílicos, sendo todos os isolados identificados por técnicas fenotípicas e moleculares como *C. jejuni*. Dessas 16 amostras positivas, obtiveram-se 28 isolados, sendo 16 pelo isolamento em ágar Preston e 12 do ágar mCCD. A diversidade genética entre os isolados foi avaliada por PFGE, verificando-se que todos os isolados apresentaram um único padrão de macrorestrição, sugerindo clonalidade entre os isolados e a presença de apenas uma fonte de infecção por *Campylobacter* nessa granja. O perfil de resistência a antimicrobianos foi avaliado pelo teste de disco difusão em ágar, utilizando-se oito antimicrobianos distintos, de três classes diferentes: tetraciclina, quinolonas e macrolídeos. Os isolados apresentaram perfil similar de resistência a antimicrobianos, sendo resistentes às quinolonas e tetraciclina e sensíveis aos macrolídeos. Devido a relação clonal e ao perfil de resistência similar, um isolado representativo foi selecionado para detecção dos genes de virulência. A técnica de PCR foi utilizada para detectar a presença dos genes *ciaB*, *cadF*, *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*, sendo o isolado selecionado positivo todos os genes pesquisados. Dessa forma, a presença de *C. jejuni* resistente a antimicrobianos e com potencial de virulência em frangos de corte prontos para o abate e na cama de aviário durante o período de produção é um risco à saúde pública, pois esses micro-organismos podem ser introduzidos no ambiente do abatedouro e contaminar as carcaças durante o abate.

Palavras-chave: granjas, *C. jejuni*, *C. coli*, PFGE, *cadF*, *ciaB*, operon *cdt*

Abstract

Ramires, Tassiana. “**Thermophilic *Campylobacter* in broilers and broilers farms in the southern region of Rio Grande do Sul: occurrence, genetic diversity, antimicrobial resistance profile and detection of virulence genes.**” 2017. 72f. Dissertation (MSc in Food Science and Technology) – Postgraduate Program in Food Science and Technology, Faculty of Agronomy Eliseu Maciel, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil, 2017.

Thermophilic *Campylobacter* are currently the leading bacteria causing of gastrointestinal diseases worldwide. This group is so named because its optimal multiplication temperature oscillates between 42 °C and 43 °C, being *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari* and *C. upsaliensis*, the main species involved in cases of human campylobacteriosis. Among these species, the most related to this disease is *C. jejuni*, followed by *C. coli*. The main reservoir of these microorganisms are birds, especially chickens, possibly because the body temperature of these animals coincides with the optimal temperature for thermophilic *Campylobacter*. Therefore, the aim of this study was to verify the occurrence, genetic relationship, antimicrobial susceptibility, and the presence of virulence genes in thermophilic *Campylobacter* from broilers and broiler bedding from the southern region of Rio Grande do Sul, Brazil. A total of 48 samples were collected in three different farms (A, B and C), which comprising one sample of drag swab and 15 pools of cloacal swabs in each farm. From the three farms sampled, only the farm C showed thermophilic *Campylobacter* contamination. All isolates were identified by phenotypic and molecular techniques such as *C. jejuni*. Of these 16 positive samples, 28 isolates were obtained, 16 being isolated by Preston agar and 12 by mCCD agar. The genetic diversity among the isolates was evaluated by PFGE, and it was observed that all the isolates belonged to the same macrorestriction pattern, suggesting clonality among the isolates and the presence of only one source of *Campylobacter* infection in this farm. The antimicrobial resistance profile was evaluated by the agar disc diffusion test using eight distinct antimicrobial agents from three different classes: tetracyclines, quinolones and macrolides. The isolates presented a similar antimicrobial resistance profile, being resistant to quinolones and tetracyclines and susceptible to macrolides. As the isolates shared the same PFGE pattern and similar resistance profile, a representative isolate was chosen for investigation of virulence genes. A PCR assay was carried out aiming to identify the presence of *ciaB*, *cadF*, *cdtA*, *cdtB* and *cdtC* virulence genes and all the genes evaluated were found. Thus, the presence of *C. jejuni* resistant to antimicrobial agents and harboring virulence genes in broilers and broiler farm during the broiler production period may represent a potential risk to public health, because these microorganisms can be introduced into the abattoir environment and may contaminate the carcasses during slaughter.

Keywords: broiler farms, *C. jejuni*, *C. coli*, PFGE, *cadF*, *ciaB*, *cdt* operon

Lista de Figuras

Figuras Revisão Bibliográfica

- Figura1- Dados epidemiológicos referentes aos principais causadores de doenças transmitidas por alimentos no Brasil..... **15**
- Figura 2- Morfologia de *Campylobacter jejuni* por microscopia eletrônica e por microscópico óptico em aumento de 100x..... **18**
- Figura 3- Colônias características de *Campylobacter jejuni* em dois meios de cultivo..... **21**
- Figura 4- Teste da hidrólise do hipurato de sódio..... **21**

Figuras Manuscrito

- Figura 1- Dendrograma representativo dos pulsotipos obtidos pela análise da PFGE com digestão da *SmaI*..... **51**
- Figura 2- Dendrograma representativo dos pulsotipos obtidos pela análise da PFGE com digestão da *KpnI*..... **52**
- Figura 3- Eletroforese demonstrando os produtos de amplificação dos genes *cadF*, *ciaB*, *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* em um isolado de *Campylobacter jejuni* por PCR..... **53**

Lista de Tabelas

Tabela Manuscrito

Tabela 1- Sequências de oligonucleotídeos utilizados para verificação da presença de genes associados à virulência em <i>Campylobacter jejuni</i> , através de PCR.....	50
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

Sumário

1. Introdução.....	14
1.1 Objetivo Geral	17
1.2 Objetivos Específicos	17
2. Revisão Bibliográfica	18
2.1 Caracterização do gênero <i>Campylobacter</i>	18
2.2 Cultivo, identificação e diferenciação	19
2.3 Epidemiologia e campilobacteriose humana	22
2.4 Resistência a antimicrobianos.....	25
2.5 Mecanismos de patogenicidade	26
3 Manuscrito	Erro! Indicador não definido.
4 Considerações Finais	54
5 Referências Bibliográficas	55
Apêndices.....	65

1. Introdução

O consumo e a produção de carne de frango têm apresentado aumento significativo nos últimos anos no Brasil. Os dados da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA) mostram que o Brasil superou a China em 2015 e se tornou o segundo maior produtor mundial de carne de frango, atrás apenas dos Estados Unidos da América (EUA). De acordo com os dados da ABPA, a produção brasileira de frango chegou a 13,146 milhões de toneladas, um volume 3,46% superior ao registrado em 2014. Em relação ao consumo interno, o ano de 2015 também apresentou avanço, de 1,1%, em relação ao ano anterior, atingindo 43,25 quilos por habitante ao ano (ABPA, 2016).

Nesse contexto, a avaliação da qualidade sanitária e microbiológica dos lotes de frangos de corte se faz necessária, devido a consequência desses fatores à qualidade do produto final. Os frangos de corte são grandes responsáveis pela disseminação de micro-organismos patogênicos, propiciando, dessa forma, a ocorrência de doenças transmitidas por alimentos (DTA). Embora existam diversos veículos potenciais, a carne de frango tem sido identificada como um dos veículos alimentares mais importantes para a transmissão de *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. (FAO/WHO, 2009).

Atualmente, *Campylobacter* é a principal bactéria causadora de DTA (WANG et al., 2013; KIRK et al., 2015). *Campylobacter* spp. são responsáveis por até 14% dos casos de diarreia humana em todo o mundo e, além disso, são a causa mais frequentemente identificada da síndrome de Guillain-Barré (OLSON et al., 2008). Espécies do gênero *Campylobacter* spp. são os agentes etiológicos da campilobacteriose, sendo as espécies termofílicas, com temperatura ótima de multiplicação entre 42 °C e 43 °C, as mais comumente associadas aos quadros de infecção por este patógeno. Dentre essas espécies termofílicas as mais envolvidas em casos de campilobacteriose em humanos são *C. jejuni* e *C. coli* (JACOBS-REITSMA et al., 1995; SAMUEL et al., 2004; LITTLE et al., 2008). Atualmente, sabe-se que os frangos são hospedeiros naturais para *C. jejuni* e que o comércio de frangos de corte colonizados pelo micro-organismo é o principal meio para a transmissão desse patógeno aos seres humanos (HERMANS et al., 2011).

No Brasil, assim como em outros países em desenvolvimento, poucos casos de doenças de origem alimentar são atribuídos a essa bactéria, principalmente devido a falhas no processo de notificação e por não existirem programas nacionais de vigilância destinados ao acompanhamento de campilobacteriose. Na contramão dos dados mundiais, *Campylobacter* não figura como um importante causador de DTA no Brasil. Além disso, mais de 70% dos agentes causadores de DTA nesse país não são identificados (BRASIL, 2016).

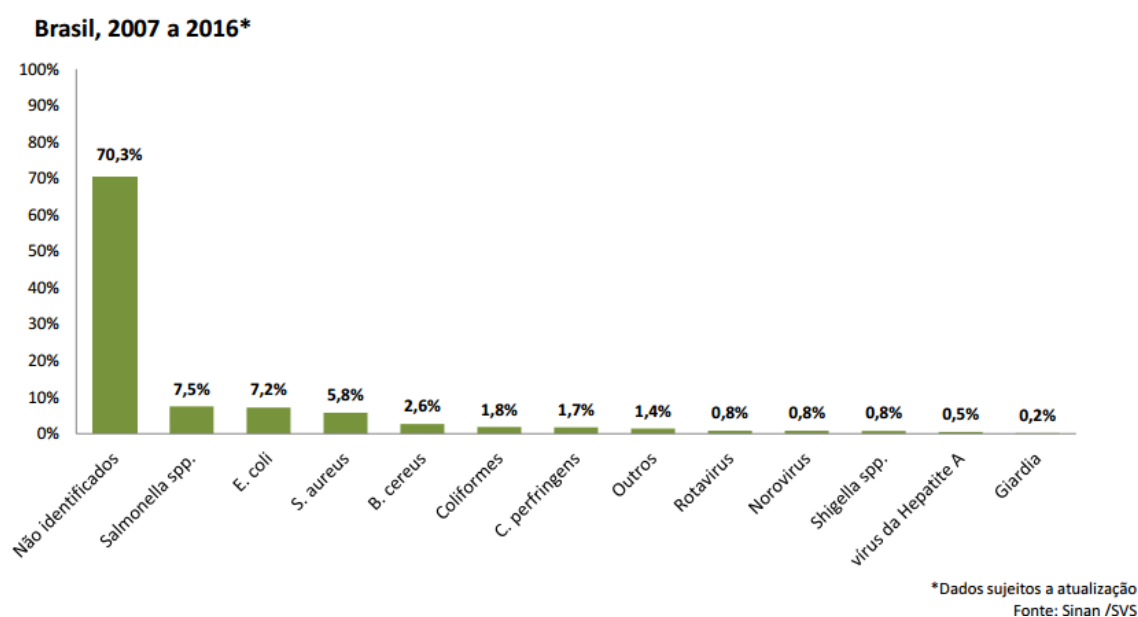


Figura 1. Dados epidemiológicos referentes aos principais causadores de doenças transmitidas por alimentos no Brasil, entre os anos de 2007 e 2016

Várias técnicas de tipificação molecular permitem agrupar e diferenciar isolados a partir de diferentes fontes, sendo excelentes ferramentas para auxiliar na vigilância e prevenção da campilobacteriose em humanos. Entre os métodos disponíveis atualmente, a eletroforese em gel de campo pulsado (*Pulsed-field gel electrophoresis*- PFGE) é uma técnica altamente discriminatória a qual tem sido amplamente utilizada para a tipificação molecular de *Campylobacter* spp., sendo considerada o “padrão ouro” para essa finalidade (GIBSON et al., 1994; HÄNNINEN et al., 1998; MELERO et al., 2012; MA, et al., 2014).

Diversos autores têm descrito que a resistência a antimicrobianos por isolados de *Campylobacter* spp. tem aumentado globalmente, se configurando

como um problema de saúde pública e tornando-se uma grande preocupação quanto a sua presença na cadeia alimentar (POLLETT et al., 2012; NOBILE et al., 2013; WIECZOREK & OSEK, 2013; BAI et al., 2014; ZHOU et al., 2016). A resistência a certos antimicrobianos tem se propagado, principalmente em relação aos macrolídeos (eritromicina, claritromicina e azitromicina) e fluorquinolonas, os quais são comumente empregados no tratamento de infecções humanas (GE et al., 2013; ZHOU et al., 2016).

Apesar dos avanços em relação aos estudos de *Campylobacter* spp., os fatores de virulência, especialmente os responsáveis pela disseminação sistêmica das infecções por *C. jejuni*, continuam a ser pouco conhecidos (PLUMMER et al., 2011). Entretanto, sabe-se que fatores relacionados com a motilidade, capacidade de adesão e invasão às células epiteliais intestinais e a produção de citotoxina são fundamentais para a virulência desses microorganismos (BOLTON, 2015; GHUNAIM et al., 2015).

Os esforços a fim de reduzir as infecções por *Campylobacter* spp. em humanos estão diretamente relacionados a um melhor entendimento dos aspectos biológicos desse patógeno. Sendo assim, devido à campilobacteriose ser uma zoonose, podendo ser transmitida do animal para o homem, a pesquisa sobre a prevalência de *Campylobacter* termofílicos em lotes de frangos prontos para o abate, assim como seu perfil de resistência a antimicrobianos, é fundamental para a garantia da segurança dos alimentos.

Os resultados deste estudo contribuirão para um melhor entendimento sobre a ocorrência e potencial de virulência de *Campylobacter* termofílicos na produção de frangos de corte na região sul do Rio Grande do Sul, e subsequente preparação de estratégias adequadas para seu controle e prevenção.

1.1 Objetivo Geral

Estudar a ocorrência de *Campylobacter* termofílicos em lotes de frangos de corte prontos para o abate e na cama de aviário de granjas aviárias da região sul do Rio Grande do Sul, Brasil, identificando espécie prevalente, diversidade genética, perfil de resistência a antimicrobianos e presença de genes associados à virulência nos isolados.

1.2 Objetivos Específicos

Objetivo 1. Avaliar a ocorrência de *Campylobacter* termofílicos em lotes de frangos de corte prontos para o abate e na cama de aviários.

Objetivo 2. Identificar a espécie prevalente através de testes fenotípicos e moleculares.

Objetivo 3. Avaliar a diversidade genética e identificar grupos clonais predominantes entre os isolados.

Objetivo 4. Avaliar o perfil de resistência a antimicrobianos dos isolados.

Objetivo 5. Verificar a presença de genes de virulência nos isolados.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Caracterização do gênero *Campylobacter*

Atualmente, o gênero *Campylobacter* é composto por 24 espécies (WHO, 2013). Esses micro-organismos são gram-negativos, apresentam formato espiralado, também conhecido como “asa de gaivota”, possuindo 0,2 a 0,8 μm de largura e 0,5 a 5 μm de comprimento. São microaerófilos, tendo multiplicação máxima em atmosfera contendo, aproximadamente, 5% de O_2 , 10% de CO_2 e 85% de N_2 , além de serem organismos comensais do trato intestinal de mamíferos e aves (YAN et al., 2005; LEVIN, 2007; GARÉNAUX et al., 2008; SILVA et al., 2011; BOLTON, 2015). Não são micro-organismos hemolíticos e não possuem a capacidade de formar esporos. A maioria das espécies apresenta motilidade em movimento de “saca-rolhas”, devido a um único flagelo em uma, ou ambas, extremidades da célula (NACHAMKIN, 2001).

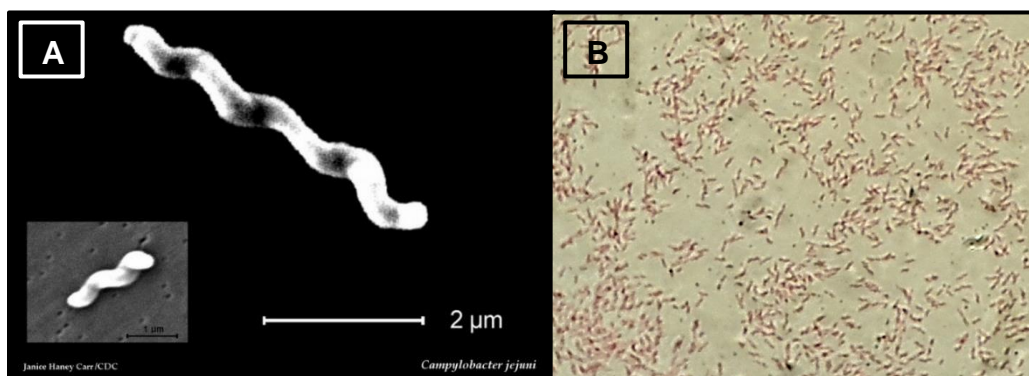


Figura 2. Morfologia de *Campylobacter jejuni* por microscopia eletrônica (A- Fonte: <http://www.bacteriainphotos.com>) e por microscópio óptico em aumento de 100 x (B- Fonte: a autora)

Campylobacter spp. possuem metabolismo fastidioso, não fermentam nem oxidam carboidratos, obtendo de aminoácidos e produtos intermediários do Ciclo de Krebs as suas principais fontes de energia. Produzem a enzima oxidase, podendo sintetizar, ou não, a enzima catalase, além da maioria das espécies não hidrolisar o hipurato (VANDAMME et al., 1991; SILVA et al., 2011; STERN, et al, 2001). Segundo PARKHILL et al. (2000), o genoma de *Campylobacter*

possui entre 1600 e 1700 Kb, com uma pequena variação para *C. upsaliensis*, que possui cerca de 2000 Kb. Comparado ao de outras bactérias, o genoma dessa bactéria é considerado pequeno, o que se sugere ser a explicação para o metabolismo fastidioso e para a incapacidade de fermentar açúcares (THOMÉ, 2006).

São bactérias muito suscetíveis ao estresse ambiental, sendo facilmente inativadas quando expostas ao ar atmosférico, ressecamento, pH abaixo de 4,9 e acima de 9,0, além de armazenamento prolongado (MOURA, 2010; SILVA et al., 2011). Esses micro-organismos possuem a característica de alterar sua morfologia para cocos quando submetidos a situações adversas ou quando em culturas muito velhas (DEBRUYNE et al., 2008; PARK et al., 2002). Sob essas condições desfavoráveis, as células dessas bactérias se mantêm em um estado viável, mas não cultivável (Células Viáveis Não Cultiváveis - CVNC), permanecendo em um estado dormente até que o ambiente volte a ser favorável a elas. Essas CVNC possuem um importante papel no mecanismo de sobrevivência e nas elevadas taxas de contaminação de *Campylobacter* pois, apesar de não se multiplicarem em meios seletivos utilizados para o seu isolamento, permanecem aptos a causar infecção em humanos (CORRY et al., 1995; KETLEY, 1997; ALTEKRUSE, et al., 1999; LEE & NEWELL, 2006).

2.2 Cultivo, identificação e diferenciação

O diagnóstico laboratorial de *Campylobacter* spp. ainda é um desafio, devido à dificuldade desse micro-organismo se multiplicar *in vitro*, prejudicando o seu isolamento e consequente identificação (FITZGERALD, 2015). O cultivo microbiológico é o padrão ouro para a pesquisa de *Campylobacter* termofílicos. Porém, devido ao seu metabolismo fastidioso e a necessidade de um ambiente microaerófilo, se faz necessária a utilização de meios de cultivos mais elaborados e suplementados, capazes de favorecer o desenvolvimento desses micro-organismos ao mesmo tempo que inibem a microbiota acompanhante. Os meios seletivos não eliminam todos os outros micro-organismos entéricos acompanhantes, mas limitam o seu desenvolvimento, favorecendo assim, o isolamento de *Campylobacter* (SMIBERT, 1981).

Os protocolos descritos para o cultivo dessa bactéria utilizam meios líquidos e sólidos, com o uso de sangue ou carvão ativado para o aprisionamento do O₂ (LAI-KING et al., 1985; CORRY et al., 1995; ISO, 2006). A principal metodologia recomendada para o isolamento e identificação de *Campylobacter* spp. é a ISO 10272-1 (*Internacional Organization for Standardization*), a qual descreve o uso de água peptonada tamponada (APT), com enriquecimento seletivo com caldo Bolton, inoculação em ágar Carvão Cefoperazone Desoxicolato modificado (mCCDA).

As colônias de *Campylobacter* spp. normalmente são planas, com coloração acinzentada ou translúcidas e formato irregular, arredondadas ou convexas. Podem apresentar brilho d'água ao refletir a luz ambiental. Usualmente, apresentam crescimento confluyente ao longo da linha de semeadura nos meios sólidos (KONEMAN et al., 1992; GHARST et al., 2013).

Além de meios de cultivo específicos, é necessário ainda, uma fonte geradora de microaerofilia, sendo as mais indicadas os discos de microaerofilia ou a mistura gasosa. A atmosfera ideal para o desenvolvimento de *Campylobacter* termofílicos é 85% de N₂, 5% de O₂ e 10% de CO₂ (SMIBERT, 1981). A adição de antibióticos aos meios de cultura é necessária para inibir a microbiota fecal competidora, a fim de favorecer a multiplicação das bactérias do gênero *Campylobacter* (KUANA et al., 2008a).

As colônias de *Campylobacter* spp. usualmente são planas, com coloração acinzentada ou translúcidas e formato irregular, arredondadas ou convexas. Podem apresentar tanto aspecto de secas, quanto de úmidas e uma aparência de brilho d'água ao refletir a luz ambiental. Existe uma tendência de as colônias apresentarem crescimento confluyente ao longo da linha de semeadura nos meios sólidos. Reações hemolíticas não são observadas em ágar sangue (KONEMAN et al., 1992).

Após a identificação presuntiva das colônias suspeitas, é realizada a coloração de Gram, verificando-se a morfologia característica das células de *Campylobacter* spp.. Após, realizam-se os testes da produção das enzimas oxidase e catalase, as quais serão sempre produzidas pelas espécies termofílicas (VANDAMME, 2000).

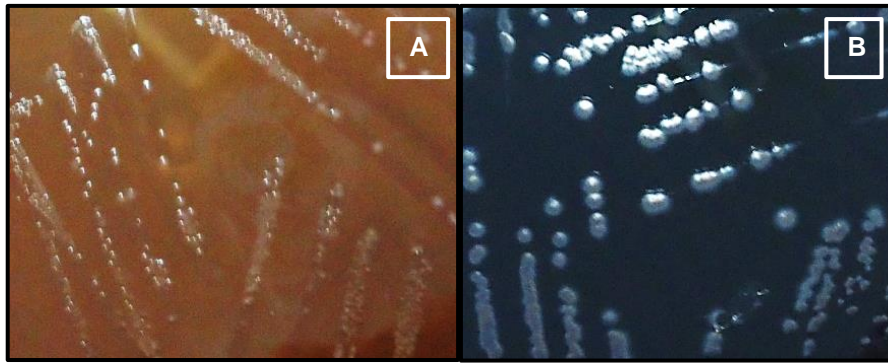


Figura 3. Colônias características de *Campylobacter jejuni* em dois meios de cultivo. A- ágar Preston. B- ágar mCCD (Fonte: a autora)

A diferenciação das espécies é feita associando-se o teste de hidrólise do acetato de indoxil ao teste da hidrólise do hipurato de sódio. *Campylobacter jejuni* e *C. coli* hidrolisam o acetato de indoxil, enquanto *C. lari* não tem essa capacidade. Com relação ao teste da hidrólise do hipurato de sódio, o qual diferencia as duas espécies mais isoladas em casos de infecção, *C. jejuni* hidrolisa o indoxil e *C. coli* não (NACHAMKIN, 1995). Porém, existem relatos na literatura de culturas atípicas de *C. jejuni*, as quais apresentam o fenótipo hipurato-negativo (NICHOLSON; PATTON, 1995), dificultando a identificação baseada essencialmente nesses testes fenotípicos.

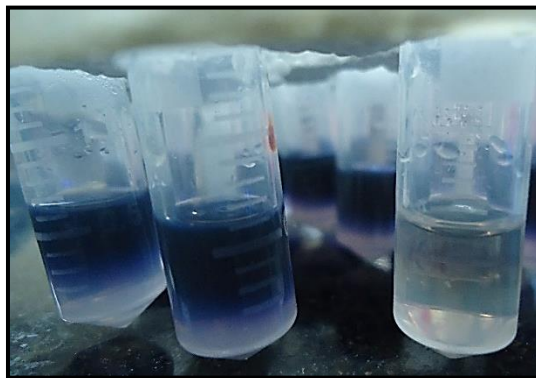


Figura 4. Teste da hidrólise do hipurato de sódio. Resultado positivo em roxo (a esquerda) e resultado negativo em coloração inalterada (a direita). (Fonte: a autora)

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem sido bastante utilizada como prova complementar às análises convencionais. Essa técnica pode ser utilizada para a confirmação em nível molecular, podendo ser empregada para a identificação de gênero, bem como para diferenciação entre espécies (DENIS

et al., 1999; KORCZAK et al., 2006). O emprego da PCR oferece uma alternativa aos métodos fenotípicos tradicionais utilizados para a identificação e diferenciação de espécies de *Campylobacter* spp., sendo um método preciso e de simples execução, diminuindo o tempo de diagnóstico e aumentando a sensibilidade, pela detecção de sequências específicas de DNA. Dessa forma, essa técnica possibilita o diagnóstico rápido de *Campylobacter* em alimentos contaminados, permitindo que medidas de controle possam ser adotadas em um tempo menor (LINTON, 1996, HARMON, 1997, MOORE et al., 2005; AÇIK & ÇETINKAYA, 2006).

A PFGE tem sido amplamente utilizada para a tipificação molecular de *C. jejuni* devido ao seu alto poder discriminatório (GIBSON et al., 1994; HÄNNINEN et al., 1998). É usada tanto para estudos de surtos hospitalares de pequenas proporções, quanto na comparação de populações bacterianas, envolvendo micro-organismos de diferentes países, ampliando a finalidade epidemiológica da técnica (LIU et al., 1999). Essa técnica baseia-se na digestão do cromossomo de *Campylobacter*, por restrição com as enzimas *SmaI* ou *KpnI*, em um pequeno número de grandes fragmentos, os quais são separados por eletroforese com base nos seus tamanhos (RIBOT et al., 2001).

2.3 Epidemiologia e campilobacteriose humana

Dentre todas as espécies do gênero *Campylobacter*, o grupo dos termofílicos é o mais importante em termos de saúde pública e é representado pelas espécies *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* e *C. upsaliensis*, que são as mais frequentes em casos de campilobacteriose humana. Essas espécies se enquadram nesse grupo devido a sua temperatura ótima de multiplicação oscilar entre 42 °C e 43 °C (VANDAMME et al., 1991; RESS et al., 1995; MOORE et al., 2005). Das quatro espécies, *C. jejuni* e *C. coli*, são as de maior importância em saúde pública, sendo *C. jejuni* a mais envolvida em casos de infecções humanas e também a mais prevalente em aves (BOLTON, 2015).

Segundo PARK (2002), a campilobacteriose é resultado da ingestão de alimentos de origem animal contaminados por esses micro-organismos, apesar de ser desconhecido o número de infecções causadas por animais de estimação e água contaminada. As aves são os hospedeiros primários de *Campylobacter*

termofílicos, possivelmente por apresentarem uma temperatura corporal ótima para a multiplicação desses micro-organismos (HALD et al., 2015), sendo os frangos de corte os responsáveis pela transmissão de cerca de 80% dos casos de campilobacteriose (EFSA, 2010). Evans e Sayers (2000) relatam que a colonização por *Campylobacter* spp. em aves depende da idade dos animais e que sua frequência aumenta proporcionalmente à idade deles. Quando um animal é colonizado esses micro-organismos tendem a se disseminar rapidamente através de todo o lote. A incidência do patógeno é maior no período final da criação dos frangos, persistindo até o abate (GREGORY et al., 1997).

As bactérias do gênero *Campylobacter* habitam o trato digestivo, sendo bem adaptadas as aves, as quais normalmente não apresentam sinais clínicos (ZHANG, 2008). Colonizam, principalmente, as criptas profundas do ceco, sendo preferencialmente encontradas na camada de muco, perto das células epiteliais, onde contagens extremamente altas (até 10^{10} UFC.g⁻¹ de intestino infectado) podem ser detectadas (YOUNG, 2007).

Desde 2005, esses patógenos têm sido apontados como os principais agentes zoonóticos responsáveis por gastroenterites em humanos na União Europeia, onde foram registrados 215.000 casos em 2013 e 236.851 casos em 2014 (EFSA/ ECDC, 2015). *Campylobacter* é a causa mais comum de doenças diarreicas nos EUA e, no ano de 2013, foram identificados 6.611 casos de infecção, 1.010 hospitalizações e 12 mortes decorrentes de doenças nas quais houve o envolvimento dessa bactéria (CDC, 2014).

No Reino Unido, foram estimados mais de 320.000 casos de gastroenterites causadas por *Campylobacter* spp., somente na Inglaterra e País de Gales, no ano de 2008, tornando este micro-organismo o principal patógeno transmitido por alimentos daquela região (FSA, 2011). Segundo dados do Departamento de Saúde da Austrália, foram notificados mais de 17.733 casos documentados de campilobacteriose em 2011, tornando esse micro-organismo o maior causador de gastroenterites do país (DHA, 2015). Na Nova Zelândia foram notificados 6818 casos no ano de 2016, com taxas de 148,4 casos de campilobacteriose para cada 100.000 habitantes (NZPHSP, 2016).

Segundo a Instrução Normativa nº 78, de 3 de novembro de 2003, o único controle microbiológico exigido para os estabelecimentos avícolas é referente a *Salmonella* spp., onde as granjas devem ser consideradas livres desse

patógeno. Em alimentos, a pesquisa de *Campylobacter* termofílicos também não é preconizada no Brasil (ANVISA, RDC Nº 12), colaborando para que essas bactérias sejam pouco conhecidas e estudadas em nosso país. O governo não dispõe de dados estatísticos, tampouco de programas de prevenção, para esse patógeno. Dessa maneira, a colaboração entre médicos, pesquisadores e veterinários se torna cada vez mais importante para que seja possível a ampliação da coleta de dados e o fornecimento de informações básicas para as intervenções, visando o controle efetivo da campilobacteriose (BRONZWAER *et al.*, 2009).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2011), a campilobacteriose é normalmente manifestada após 2 a 5 dias do início da infecção, mas pode variar de 1 a 10 dias. Os sintomas clínicos mais comuns dessa doença incluem diarreia (frequentemente sanguinolenta), dor abdominal, febre, dor de cabeça, náuseas e / ou vômitos, os quais geralmente duram de 3 a 6 dias. Algumas complicações pós infecção podem incluir artrite reativa (inflamação dolorosa das articulações que pode durar vários meses), síndrome do intestino irritável e doença neurológica, como a síndrome de Guillain-Barré (SGB), que resulta em paralisia muscular, podendo ocasionar disfunção respiratória grave.

Campylobacter jejuni é a bactéria mais comumente associada a casos da SGB, precedendo a paralisia em 30% dos pacientes acometidos (YUKI & HARTUNG, 2012). O desenvolvimento da síndrome ocorre através de um mecanismo de mimetismo antigênico entre os lipo-oligossacarídeos da bactéria e os gangliosídeos da membrana dos nervos periféricos (MOORE *et al.*, 2005).

A partir do momento em que o quadro da infecção por *Campylobacter* spp. se torna sistêmico, uma das respostas imunes é a produção de anticorpos específicos para a estrutura dos lipo-oligossacarídeos. No entanto, o organismo humano contém compostos com estrutura molecular muito semelhante a essa estrutura bacteriana, sendo esses compostos encontrados na membrana celular de células nervosas humanas. Assim, como a estrutura do lipo-oligossacarídeo de *Campylobacter* spp. assemelha-se à estrutura molecular do gangliosídeo, os anticorpos produzidos com a finalidade de debelar a bactéria reagem contra a membrana das células nervosas humanas. O resultado é o dano ao nervo, e a consequência é a evolução para uma paralisia muscular, característica da

síndrome de Guillain-Barré, causando o comprometimento dos estímulos nervosos neuronais (REES, 1995).

Além disso, estima-se que de 2 a 5% dos casos de artrite reativa e 33% dos casos de síndrome do intestino irritável são ocasionados em decorrência da prévia infecção por *Campylobacter* termofílicos (POPE, 2007; MARSHALL, 2009). As infecções por *Campylobacter* spp. são normalmente relatadas em casos isolados, diferentemente de outros patógenos entéricos, nos quais os surtos são detectados com maior frequência (FITZGERALD, 2015).

2.4 Resistência a antimicrobianos

A introdução de agentes antimicrobianos na prática clínica da medicina humana e animal representa uma das maiores conquistas do ramo da saúde. No entanto, casos emergentes de resistência a antimicrobianos vêm surgindo (AARESTRUP, 2005; BAI et al., 2014; ZHOU et al., 2016). A resistência aos antimicrobianos é reconhecida pela World Health Organization (WHO), como um dos maiores problemas de saúde pública da atualidade, já que representa um problema de dimensões globais (MOORE et al, 2006).

Quando expostos a antimicrobianos, *Campylobacter* spp., assim como outras bactérias, podem diminuir sua sensibilidade a estes fármacos, tornando-se potenciais reservatórios de genes de resistência, os quais podem ser transmitidos horizontalmente a outras bactérias patogênicas. Por este motivo, a resistência a antimicrobianos de bactérias comensais do trato gastrointestinal é um indicador da pressão seletiva exercida devido ao uso destes fármacos (ZHANG et al., 2006). Além disso, antimicrobianos podem permanecer como resíduos em produtos de origem animal ou podem ser eliminados no ambiente, através de efluentes humanos ou animais, favorecendo a seleção de bactérias resistentes (FÀBREGA et al., 2008).

Apesar das infecções causadas por *Campylobacter* spp. serem geralmente auto limitantes e tratadas basicamente com fluidoterapia, em casos de infecções graves, em gestantes, crianças, idosos e imunocomprometidos, se faz necessário o uso de antimicrobianos (AARESTRUP, F. M, 2005; HAN et al., 2007; KURINCIC et al., 2007; WIECZOREK & OSEK, 2013). Quando a causa da infecção é comprovadamente *Campylobacter* spp. a terapia antimicrobiana

indicada é o uso dos macrolídeos, principalmente a eritromicina ou, alternativamente, um dos macrolídeos mais recentes, como a claritromicina ou a azitromicina (BLASER & ENGBERG, 2008).

As fluorquinolonas (por exemplo, ciprofloxacina) são também comumente utilizadas em razão de serem as drogas de eleição para o tratamento de doenças diarreicas não diagnosticadas, tal como a diarreia dos viajantes (AARESTRUP et al., 2008). Tetraciclina, doxiciclina e cloranfenicol são drogas alternativas que podem ser usadas para o tratamento da campilobacteriose (SKIRROW & BLASER, 2000).

2.5 Mecanismos de patogenicidade

A rota de contaminação para os humanos apresenta muitos obstáculos para *Campylobacter* termofílicos, porém, os mecanismos de sobrevivência e infecção desses micro-organismos ainda são insuficientemente compreendidos (REPÉRANT et al., 2016). Nas aves, essas bactérias estabelecem uma população que coloniza as criptas da mucosa cecal, porém, sem desencadear doença nas aves, tampouco alterações na mucosa do ceco (COWARD et al., 2008; MEADE et al., 2009).

Em humanos, após a ingestão de alimentos contaminados por *Campylobacter* spp., esses patógenos colonizam o trato intestinal (íleo, jejuno e cólon), por vezes, sem apresentação sintomatológica. O resultado da doença é dependente do estado imune do hospedeiro e das características de virulência da estirpe do patógeno. Apesar dos mecanismos de patogenicidade ainda não se encontrarem completamente esclarecidos, sabe-se que os potenciais fatores de virulência destes agentes bacterianos são a motilidade, adesão, invasão e produção de toxinas (BANG et al., 2003; BOLTON, 2015).

O gene *cadF* codifica uma proteína que interage com a fibronectina da matriz extracelular do hospedeiro, participando da colonização da superfície celular (MONTEVILLE, YOON & KONKEL, 2003). A adesina CadF é requerida por *C. jejuni* para uma eficaz adesão e invasão das células do epitélio intestinal do hospedeiro, sendo a ligação de CadF o primeiro passo para que ocorra a internalização bacteriana (MONTEVILLE & KONKEL, 2002). Esta adesina se liga a fibronectina, que é uma glicoproteína presente em regiões de junção de células

do epitélio gastrintestinal, e proporciona um local com potencial ligação para os patógenos (QUARONI et al, 1978). A ligação de CadF promove a interação entre o patógeno e a célula do hospedeiro, facilitando a colonização do micro-organismo (KRAUSE-GRUSZCZYNSKA et al., 2007).

Após a colonização da célula do hospedeiro, *C. jejuni* invade as células intestinais. O contato desta bactéria com as células epiteliais provoca danos, os quais perturbam o funcionamento normal de absorção intestinal (KONKEL, 2001). O micro-organismo secreta uma proteína, CiaB, que é necessária para a invasão celular, pois esta proteína é reconhecida pelos receptores celulares (KONKEL, 2003). A secreção desta proteína requer um estímulo ambiental como, por exemplo, a presença de sais biliares no ambiente ou componentes da célula hospedeira (RIVERA-AMILL et al., 2001).

Os flagelos de *C. jejuni* também são importantes na secreção de CiaB (GUERRY, 2007). A invasão, que ocorre por endocitose, se inicia com a sinalização na superfície da célula hospedeira, cujo sinal é reconhecido por receptores, presentes na membrana celular, que estão associados as proteínas citoplasmáticas. Essas proteínas formam depressões na membrana externa e, quando os receptores estão ligados aos micro-organismos, essas depressões aumentam e se transformam em vacúolos citoplasmáticos (LEVIN, 2007). A invasão provoca edema celular, perda de microvilosidades e apoptose, devido ao efeito citotóxico de *C. jejuni*. Posteriormente, o vacúolo formado, migra até a lâmina própria e, então, *C. jejuni* é liberado, juntamente com o conteúdo da célula epitelial, desencadeando um processo inflamatório (KONKEL et al, 2001; LEVIN, 2007; SILVA et al., 2011).

Campylobacter termófilos sintetizam, entre outras, a toxina citoletal distensiva (CDT), sendo três os genes responsáveis pela codificação desta toxina: *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*. Para que ocorra a máxima atividade da toxina, os três genes devem ser expressos (ASAKURA et al., 2007). A proteína expressa pelo gene *cdtB* é transportada com o auxílio de outras proteínas, expressas pelos genes *cdtA* e *cdtC*, além de serem responsáveis também pela sua interiorização na célula do hospedeiro. Dentro da célula, essa proteína irá provocar o bloqueio do ciclo celular, pois exibe uma atividade semelhante à DNase, resultando na degradação do DNA. Por fim, as células do hospedeiro respondem à degradação (SMITH & BAYLES, 2006), bloqueando certas fases na divisão celular, o que

resulta na distensão citoplasmática e, por consequência, na lise celular (ABUOUN et al., 2005). Além disso, existem evidências de que a secreção de CDT, por enterobactérias, aumenta a probabilidade da ocorrência de mutações envolvidas no desencadeamento de processos tumorais, em células do trato intestinal humano (GAGNAIRE et al., 2017).

3 Short Communication

Thermophilic *Campylobacter* isolated from broilers and broiler farms: occurrence, genetic diversity, antimicrobial resistance profile, and detection of virulence genes

Short communication a ser submetido ao periódico
Food Control.

Fator de Impacto: 3,388

3. Short Communication

Thermophilic *Campylobacter* from broilers and broiler farms: occurrence, genetic relationship, antimicrobial susceptibility, and virulence genes

Tassiana Ramires¹, Mauricéia Greici de Oliveira¹, Adriana Souto Pereira Nuncio¹, Natalie Rauber Kleinubing¹, Graciela Volz Lopes¹, Odir Antônio Dellagostin², Wladimir Padilha da Silva^{1,2}

¹ Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

² Universidade Federal de Pelotas, Centro de Biotecnologia, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

ABSTRACT

The aim of this study was to verify the occurrence, genetic relationship, antimicrobial susceptibility, and the presence of virulence genes in thermophilic *Campylobacter* from broilers and broiler bedding from the southern region of Rio Grande do Sul, Brazil. A total of 48 samples were collected in three different farms (A, B and C), which comprising one sample of drag swab and 15 pools of cloacal swabs in each farm. Thermophilic *Campylobacter* was detected in all drag swab and cloacal swab samples from the farm C, with all isolates belonging to *C. jejuni* species. In the farms A and B all samples were negative for thermophilic *Campylobacter*. The PFGE showed that all *Campylobacter* isolates belonged to the same macrorestriction pattern and were resistant to ciprofloxacin, doxycycline, enrofloxacin, nalidixic acid, and tetracycline, showing similar resistance profile. PCR assay was performed to evaluate the virulence genes and the *cadF*, *ciaB*, *cdtA*, *cdtB*, and *cdtC* genes were detected. The presence of *C. jejuni* in broilers and poultry bedding during the broiler production period may represents a potential risk for introduction of this pathogen in the abattoir environment. *Campylobacter* isolates resistant to antimicrobial agents and harboring virulence genes present in broilers can contaminate their carcasses during slaughter and find their way into the food chain.

Keywords: thermophilic *Campylobacter*, broiler, *C. jejuni*, PFGE.

1. Introduction

Campylobacteriosis in humans is caused by the group of microorganisms recognized as thermophilic *Campylobacter* and these pathogens are a leading cause of zoonotic enteric infections in developed and developing countries worldwide (WHO, 2000; Havelaar et al., 2015). Most infections are caused by *Campylobacter jejuni*, followed by *C. coli* and *C. lari* (EFSA, 2012a). According to European Food Safety Authority (EFSA, 2015), campylobacteriosis is the most commonly reported zoonosis in the European Union being responsible for nine million cases of human campylobacteriosis with an estimated economic cost of EUR 2.4 billion per year. Unfortunately, in Brazil this disease is still underdiagnosed and underreported. A cohort study was conducted in some developing countries (Brazil, Peru, and South Africa) and it was found that *Campylobacter* is the main bacterial pathogen associated with diarrhea in the first two years of life (Platts-Mills et al., 2015).

The most common clinical symptoms of *Campylobacter* infections include diarrhea (frequently bloody), abdominal pain, fever, headache, nausea, and vomiting, which can progress to more severe cases, such as bacteremia, hepatitis and pancreatitis, or in systemic infections that can lead to Guillain-Barré syndrome and reactive arthritis (WHO, 2016). The symptoms of campylobacteriosis are usually self-limiting, but in severe cases it is necessary to introduce antibacterial treatment (Jonaidi-Jafari, Khamesipour, Ranjbar, & Kheiri, 2016). In this cases, macrolides (in particular, erythromycin, or alternatively, clarithromycin, or azithromycin) and fluoroquinolones (such as ciprofloxacin) are the frontline agents used in the treatment of the disease (Blaser & Engberg, 2008;

Rozynek et al., 2013). However, resistance to quinolones and macrolides have been reported and associated to the indiscriminate use of these antimicrobial agents in food-producing animals (Abdollahpour, Zendeabad, Alipour, & Khayatzaheh, 2015).

Different from other pathogens such as *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* there are few studies about the virulence mechanisms of thermophilic *Campylobacter* (Bolton, 2015), nevertheless it is known that the main mechanisms involved with the virulence of these microorganisms are motility, adhesion and invasion (Bang et al., 2003). The *cadF* gene encodes a protein that interacts with host extracellular matrix fibronectin, participating in cell surface colonization (Monteville, Yoon & Konkel, 2003), while the *ciaB* gene encodes a protein involved in cell invasion (Rivera-Amill, Kim, Seshu, & Konkel, 2001). Thermophilic *Campylobacter* synthesize the cytotoxic distensive toxin (CDT), with three genes responsible for the coding of this toxin: *cdtA*, *cdtB* and *cdtC*. Through molecular techniques, such as Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), it becomes possible to verify the genetic relationship among microorganisms. This technique is widely used for the typing of *Campylobacter* due to its high discriminatory power (Gibson, Sutherland, & Owen, 1994; Hänninen, Pajarre, Klossner, & Rautelin, 1998; Melero, Juntunen, Hänninen, Jaime, & Rovira, 2012).

Birds, especially poultry, are considered to be primary reservoirs of *Campylobacter* and may be their asymptomatic carriers (Abulreesh et al., 2006; Park, 2002;), probably because the high body temperature of these animals is proper for the development of thermophilic microorganisms (Hald et al., 2015). It is known that the broiler production chain has an important role in epidemiology of campylobacteriosis (EFSA, 2010) and chicken meats represents an important

source of human *Campylobacter* infection. Even with all the biosafety control that currently exists in farms, it hasn't been enough to avoid poultry meat from being contaminated with *C. jejuni*. (Zampara, Sørensen, Elsser-Gravesen, & Brøndsted, 2016).

In Brazil, the data about thermophilic *Campylobacter* are still precarious, especially due to difficulties to isolate and identify *Campylobacter*, which is more complex than for other pathogens (Panzenhagen et al., 2016). Therefore, the aim of this study was to verify the occurrence, genetic relationship, antimicrobial susceptibility, and the presence of virulence genes in isolates of thermophilic *Campylobacter* from broilers and broiler beddings from the southern region of Rio Grande do Sul, Brazil.

2. Material and methods

2.1 Sampling

Three sampling processes were carried out in November (2015) and January (2016) in broiler farms located in the southern region of Rio Grande do Sul, Brazil. A total of forty-eight samples were collected from broilers aged between 40 to 45 days old from three different broiler farms (A, B and C), which comprising one sample of drag swab and 15 pools of cloacal swabs (three animals per pool) in each farm. All samples were collected with sterile swabs and transported to the Food Microbiology Laboratory of the Department of Science and Agroindustrial Technology FAEM/UFPel in Cary Blair media (Oxoid®) in isothermal boxes.

2.2 Isolation and phenotypic identification of thermophilic *Campylobacter*

The isolation and phenotypic identification of thermophilic *Campylobacter* was performed in accordance with the International Organization for Standardization (ISO 10272-1, 2006), with some adaptations, such as potassium clavulanate supplementation in Bolton broth, in the pre-enrichment step, and the 24 hour incubation period in the same step. The samples were submitted for selective enrichment in Bolton broth (Oxoid®) at 42 °C for 24 h in microaerophilic conditions (5% O₂, 10% CO₂, and 85% N₂) (White Martins®). The inoculum was sown on mCCD agar (Oxoid®) and Preston agar (Oxoid®) (Bolton and Robertson, 1982) supplemented, with incubation at 42 °C under microaerophilic atmosphere for 48 h. The characteristics of the colonies were analyzed by the morphological identification and by the phenotypic tests of oxidase, catalase, indoxyl acetate and sodium hippurate. The isolates confirmed as thermophilic *Campylobacter* were preserved in freezing medium and stored at -80 °C.

The *C. jejuni* ATCC 33291, *C. lari* NCTC 11352, and *C. coli* CAMPY 1008 standard strains, which were provided by the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ) in Rio de Janeiro, were used as the positive controls for isolation and phenotypic tests.

2.3 Molecular identification of thermophilic *Campylobacter* and detection of virulence genes

The genotypic identification was performed through the polymerase chain reaction (PCR) following conditions and primers previously described by Josefsen, Lübeck, Hansen and Hoorfar (2004) to confirm *Campylobacter* spp., and a multiplex PCR to identify the species (Maćkiw, Korsak, Rzewuska, Tomczuk, & Rożynek, 2012). Also, a PCR was performed to verify the genes involved with the virulence of thermophilic *Campylobacter*. The genes searched were *ciaB*, *cadF*, *cdtA*, *cdtB* and *cdtC*, using the primers and protocols previously described (Table 1).

2.4 Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

All isolates were submitted to PFGE following the protocol described by Ribot, Fitzgerald, Kubota, Swaminathan, and Barrett (2001) and the recommendations of PulseNet (<http://www.cdc.gov/pulsenet/protocos.htm>), using *SmaI* and *KpnI* as restriction endonucleases and *Salmonella* Braenderup H9812 as the reference marker (digested with *XbaI* as a size standard). The endonuclease *KpnI* was used to check the diversity of isolates with similar *SmaI* genotype. The macrorestriction fragments were separated using the CHEF system - DR II (Bio-Rad, USA) stained with ethidium bromide, and visualized with the photodocumentation L-Pix system (Loccus Biotecnologia®). Band patterns were analyzed with BioNumerics 7.1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) using the Dice coefficient and the unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA). A 1% band optimization, 2% band tolerance and $\geq 95\%$ cutting point for similarity were used in the analysis (Wieczorek, Denis & Osek, 2015)

2.5 Antimicrobial susceptibility testing

Antimicrobial susceptibility of the isolates was determined by agar disc diffusion. The following discs were used: ciprofloxacin (CIP 5 µg), enrofloxacin (ENO 5 µg), nalidixic acid (NAL 30 µg), azithromycin (AZI 15 µg), clarithromycin (CLA 15 µg), erythromycin (ERI 15 µg), doxycycline (DOX 30 µg) and tetracycline (TET 30 µg). *In vitro* susceptibility testing was performed and evaluated according to the specifications of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2015). *Campylobacter jejuni* ATCC 33560 was used for quality control purposes. The isolates were classified as susceptible or resistant to the antimicrobial agents tested.

2.6 Statistical analysis

The data were transferred to a Statistica Software 8.0 for statistical analysis. We performed chisquared tests. A P value of less than 0.05 was considered significant.

3. Results

Of a total of three broiler farms in only one (33.3%) was detected thermophilic *Campylobacter* and from that broiler farm 100% of the samples were positive. In this farm, all drag swab and cloacal swab samples (16/16) were positive for *Campylobacter*, totalizing 28 *Campylobacter* presuntive isolates

obtained from two different culture medium, Preston and mCCD agar. The PCR assay confirmed the genus in all tested isolates and *Campylobacter jejuni* was the only species identified by PCR.

A total of 28 *Campylobacter* isolates were submitted to the macrorestriction analysis (PFGE) for evaluate their molecular relationship. The isolates shared the same *Sma*I-macrorestriction pattern. The dendrogram showed 26 isolates with 100% of similarity and two isolates with 98.1% of similarity (Figure 1). As recommended, the *Kpn*I digestion was performed for the subtyping of clusters generated by *Sma*I, but it was not able to differentiate the *Campylobacter* isolates (Figure 2).

In this study, *Campylobacter* isolates were resistant to two classes of antimicrobial agents (tetracyclines and quinolones), being all isolates resistant to ciprofloxacin, doxycycline, enrofloxacin, nalidixic acid, and tetracycline. On the other hand, all isolates were susceptible to macrolide class. As the isolates shared the same PFGE pattern and the same resistance profile, a representative isolate was chosed for investigation of virulence genes. A PCR assay was carried out aiming to identify the presence of *ciaB*, *cadF*, *cdtA*, *cdtB* and *cdtC* virulence genes and all the genes evaluated were found (Figure 3).

4. Discussion

The percentual of thermophilic *Campylobacter* observed in this study was 33.3% (16/48). Gomes, Curcio, Ladeira, Fernández, and Meireles (2006) studying the occurrence of thermophilic *Campylobacter* species in broiler flocks from small farms in the same region of southern Brazil, observed that 5.2% of the

samples collected were contaminated with this microorganism. This difference in the percentage of *Campylobacter* from the same sampled region may be because the chickens were raised in non-industrial establishments with a small number of housed animals, decreasing the probability of horizontal transmission. It is important to emphasize that these animals are usually colonized and contribute to the stay of *C. jejuni* in the environment.

The occurrence of *Campylobacter* is quite variable in different studies. Høg and co-workers (2016) isolated *Campylobacter* in 21% and 4% of the samples from broiler flocks in Denmark and Norway, respectively. Out of 101 cloacal swab samples, 44 (43.7%) were found to be positive for *Campylobacter* from an abattoir in Denmark (Krause et al., 2006). Thermophilic *Campylobacter* were isolated from 85%, 98% and 80% of droppings, caecal content and neck skin, respectively, from broilers in some farms and slaughterhouses in Algeria (Messad, Hamdi, Bouhamed, & Ramdani-Bougoussa, 2014). These differences may be due to the type and number of samples, different sampling methods, transport conditions, isolation methodology and different sanitary conditions in broiler farms (Panzenhagen et al., 2016).

Thermophilic *Campylobacter* was isolated only in the farm C among the three broiler farms evaluated. The farm C had two broiler houses, while the other two farms had only one. The number of broiler houses on the farm may have influenced the presence of *Campylobacter*. Høg and co-workers (2016) performed a survey of risk factors for *Campylobacter* colonization of broilers and demonstrated that the increased number of broiler houses on the farm was a risk factor for Norway. This can be explained by the transmission between the houses

of broilers in the same property via footwear, clothes, unclean hands or equipment (Sommer, Heuer, Sørensen, & Madsen, 2013).

It is noteworthy that in the farm C all 16 samples were positive to thermophilic *Campylobacter*. High number of positive samples for thermophilic *Campylobacter* in the same broiler farm was also described by Messad and co-workers (2014), which that also found 100% of the samples contaminated with this microorganism. The authors suggest that horizontal transmission is the most significant mode of broiler flock colonization. Besides that, the high body temperature of the broilers, the coprophagia and fecal excretion are also important factors for the dissemination of these microorganisms in chicken flocks (Humphrey, O'Brien, & Madsen, 2007).

For *Campylobacter* isolation, the mCCD agar is the most used worldwide and the best choice due to its simplicity and cost (Gharst, Oyarzabal and Hussain, 2013). In our study, among 28 *Campylobacter* isolates, 16 were obtained from Preston agar and 12 from mCCD agar. The Preston agar was more efficient ($p < 0,05$) for isolating of *Campylobacter*, when compared to mCCD agar. In our knowledge, although these two culture media are very used for *Campylobacter* isolation, there are lack of studies comparing their efficacy. Regarding specie identification, all isolates were confirmed as *C. jejuni* by their ability to hydrolyse sodium hippurate and by PCR assay, evidencing the higher prevalence of this species in broilers (Chen et al., 2010; Damjanova et al., 2011; Ewnetu & Mihret, 2010; Messad et al., 2014).

The molecular typing of the isolates by PFGE showed that the isolates shared the same *Sma*I-macrorestriction pattern. Digestion with *Kpn*I endonuclease was performed for subtyping of the patterns generated by *Sma*I to

increase the discriminatory power. However, we didn't obtain different patterns with this endonuclease, as well reported in other studies (Gruntar, Ocepek, Avbersek, Mićunović, & Pate, 2010; Lindmark et al., 2004; Ono, Kurazono, Niwa, & Itoh, 2003). The clonal profile among *C. jejuni* isolates from poultry was also previously described (Gruntar, Biasizzo, Kušar, Pate, & Ocepek, 2015; Ring et al., 2005; Thomas, Long, Good, Panaccio, & Widders, 1997). This clonal relationship may indicate a common contamination origin for *C. jejuni* in the positive broiler farms (Ring, Zychowska, & Stephan, 2005; Workman, Mathison and Lavoie, 2008).

Resistance to quinolones, specifically ciprofloxacin, nalidixic acid and enrofloxacin, and tetracyclines, specifically tetracycline and doxycycline, were observed among the *C. jejuni* isolates in our study. Despite this, all were susceptible to macrolides. Similar results were also observed in other countries (Luber, Wagner, Hahn, & Bartelt, 2003; Messad et al., 2014; Nobile, Costantino, Bianco, Pileggi, & Pavia, 2013; Zbrun et al., 2015). Resistance to quinolone and tetracyclines have increased among *Campylobacter* spp. isolates worldwide (EFSA, 2012b; Hungaro et al., 2015; Maćkiw et al., 2012). It is a public health concern because fluoroquinolones, such as ciprofloxacin, are recommended for treatment of campylobacteriosis in humans (Allos, 2001; Ruiz-Palacios, 2007). The main cause of the increase in quinolone resistance is the abusive use in veterinary medicine, especially in broiler production chain, as growth promotion, disease prevention, treatment or control (Avrain et al., 2003; Endtz et al., 1991; Giacomelli, Salata, Martini, Montesissa, & Piccirillo, 2014; Messad et al., 2014; Saenz et al., 2000). Additionally, it is known that the use of coccidicidal in broiler

farms can increase the resistance rate of *Campylobacter* to some antimicrobial agents, including tetracyclines and nalidixic acid (Avrain et al., 2003).

A representative isolate was chosen for investigation of virulence genes that are important in the *C. jejuni* pathogenesis. This isolate carried five virulence genes (*cadF*, *ciaB*, *cdtA*, *cdtB* and *cdtC*) necessary for *Campylobacter* invasion, adhesion and toxin production, during infection in intestinal epithelial cells. It is known that isolates mutants with deletions in the *cadF* and *ciaB* genes have a reduction in their potentials for adhesion and internalization in cellular models (Konkel et al., 1999b; Monteville et al., 2003). The presence of the *cdt* operon demonstrates the high virulence potential, since the CDT toxin promotes DNA damage, therefore, its presence is supposed to be associated with the severity of the disease caused by *C. jejuni* (Ghorbanalizadgan, Bakhshi, Lili, Najar-Peerayeh, & Nikmanesh, 2014).

5. Conclusion

The presence of *C. jejuni* in broilers and poultry bedding during the broiler production period on farms of Southern Brazil, may represent a potential risk for introduction of this pathogen in the abattoir environment. The close genetic relationship of the *C. jejuni* isolates indicates a unique source of contamination in this broiler farm. In addition, the presence of *C. jejuni* resistant to antimicrobial agents and harboring virulence genes in broilers and broiler farm during the broiler production period may represent a potential risk to public health, because these microorganisms can be introduced into the abattoir environment and may contaminate the carcasses during slaughter.

Acknowledgments:

The authors wish to thank to National Council of Technological and Scientific Development - CNPq (483807/2012-5).

Referências:

- Abdollahpour, N., Zendeabad, B., Alipour, A., & Khayatzadeh, J. (2015). Wild-Bird feces as a source of *Campylobacter jejuni* infection in children's playground in Iran. *Food Control*, 50, 378-381. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.09.007
- Abulreesh, H. H., Paget, T. A., and Goulder, R. (2006). *Campylobacter* in waterfowl and aquatic environments: incidence and methods of detection. *Environmental Science & Technology*, 40, 7122–7131. doi: 10.1021/es060327l
- Allos, B. M. (2001). *Campylobacter jejuni* infection: update on emerging issues and trends. *Clinical Infection and Diseases*, 32(8), 1201-1206. doi: 10.1086/319760
- Avrain, L., Humbert, F., L'Hospitalier, R., Sanders, P., Vernozy-Rozand, C., & Kempf, I. (2003). Antimicrobial resistance in *Campylobacter* from broilers: association with production type and antimicrobial use. *Veterinary Microbiology*, 96(3), 267-276. doi: 10.1016/j.vetmic.2003.07.001
- Bang, D. D., Nielsen, E. M., Scheutz, F., Pedersen, K., Handberg, K., & Madsen, M. (2003). PCR Detection of seven virulence and toxin genes of *Campylobacter jejuni* isolates from Danish pigs and cattle and cytolethal distending toxin production of the isolates. *Journal of Applied Microbiology*, 94(6), 1003-1014. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.01926.x
- Blaser M.J., & Engberg J. (2008). Clinical aspects of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* infections. 3rd ed. Washington, DC: ASM Press. 99-121.
- Bolton, D. J. (2015). *Campylobacter* virulence and survival factors. *Food Microbiology*, v. 48, p. 99-108. doi: 10.1016/j.fm.2014.11.017

- Bolton, F. J., & Robertson, L. (1982). A selective medium for isolating *Campylobacter jejuni/coli*. *Journal of Clinical Pathology* 35, 462 – 467.
- Chen, X., Naren, G.W., Wu, C.M., Wang, Y., Dai, L., Xia, L.N., Luo, P.J., Zhang, Q., & Shen, J.Z. (2010). Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolates in broilers from China. *Veterinary Microbiology*, 144, 133–139. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.12.035
- Damjanova, I., Jakab, M., Farkas, T., Meszaros, J., Galántai, Z., Turcsányi, I., Bistyák, A., Juhász, Á., Pászti, J., & Kiss, I. (2011). From farm to fork follow-up of thermotolerant *Campylobacters* throughout the broiler production chain and in human cases in a Hungarian county during a ten-months period. *International Journal of Food Microbiology*, 150, 95–102. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.011
- Datta, S., Niwa, H., & Itoh, K. (2003). Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler and bovine faeces. *Journal of Medical Microbiology*, 52, 345–348. doi:10.1099/jmm.0.05056-0
- EFSA. (2010). Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Scientific Opinion on quantification of the risk posed by broiler meat to human campylobacteriosis in the EU. *EFSA Journal*. 8 (1), 1437. doi:10.2903/j.efsa.2010.1437
- EFSA. (2012). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *EFSA Journal*. 10, 2597. doi: 10.2903/j.efsa.2012.2597
- EFSA. (2012b). The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2010. *EFSA Journal*, 10, 2598. doi: 10.2903/j.efsa.2012.2598
- EFSA. (2015). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal*, 13(1), 3991. doi: 10.2903/j.efsa.2015.3991
- Endtz, H. P., Ruijs, G.J., van Klingeren, B., Jansen, W.H., van der Reyden, T., & Mouton, R.P. (1991). Quinolone resistance in *Campylobacter* isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 27(2), 199-208. doi: 10.1093/jac/27.2.199

- EUCAST (European Committee on Antimicrobial Suscetibility Testing). (2015). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_5.0_Breakpoint_Table_01.pdf (Accessed 30.01.17)
- Ewnetu, D., & Mihret, A. (2010). Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolates from humans and chickens in Bahir Dar, Ethiopia. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7, 667–670. doi:10.1089/fpd.2009.0433
- Gharst, G., Oyarzabal, O. A., & Hussain, S. K. (2013). Review of current methodologies to isolate and identify *Campylobacter* spp. from foods. *Journal of Microbiological Methods*, 95, 84-92. doi: 10.1016/j.mimet.2013.07.014
- Ghorbanalizadgan, M., Bakhshi, B., Lili, A.K., Najar-Peerayeh, S., & Nikmanesh, B. (2014). A molecular survey of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* virulence and diversity. *Iranian Biomedical Journal*, 18(3): 158-164. doi: doi: 10.6091/ibj.1359.2014
- Giacomelli, M., Salata, C., Martini, M., Montesissa, C., & Piccirillo, A. (2014). Antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from poultry in Italy. *Microbiology Drug Resistance*, 20(2), 181-188. doi: 10.1089/mdr.2013.0110.
- Gibson, J.R., Sutherland, K., & Owen, R.J. (1994). Inhibition of DNase activity in PFGE analysis of DNA from *Campylobacter jejuni*. *Letters in Applied Microbiology*, 19(5), 357-358. doi: 10.1111/j.1472-765X.1994.tb00474.x
- Gomes, F. R., Curcio, B. R., Ladeira, S. R. L., Fernández, H., & Meireles, M. C. A. (2006). *Campylobacter jejuni* occurrence in chicken fecal samples from small properties in pelotas, southern of brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37, 375-378. doi: 10.1590/S1517-83822006000300032
- Gruntar, I., Biasizzo, M., Kušar, D., Pate, M., & Ocepek, M. (2015). *Campylobacter jejuni* contamination of broiler carcasses: Population dynamics and genetic profiles at slaughterhouse level. *Food Microbiology*, 50, 97-101. doi: 10.1016/j.fm.2015.03.007
- Gruntar, I., Ocepek, M., Avbersek, J., Mićunović, J., & Pate, M. (2010). A pulsed-field gel electrophoresis study of the genetic diversity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in poultry flocks in Slovenia. *Acta Veterinaria Hungarica*, 58(1), 19-28. doi: 10.1556/AVet.58.2010.1.2

- Hald, B., Skov, M. N., Nielsen, E. M., Rahbek, C., Madsen, J. J., Wainø, M., Chriél, M., Nordentoft, S., Baggesen, D. L., & Madsen, M. (2015). *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in wild birds on Danish livestock farms. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 58(11), 1-10. doi: 10.1186/s13028-016-0192-9
- Hänninen, M.-L., Pajarre, S., Klossner, M.-L., & Rautelin, H. (1998). Typing of human *Campylobacter jejuni* isolates in Finland by pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 1787-1789.
- Havelaar, A.H., Kirk, M. D., Torgerson, P. R., Gibb, H. J., Hald, T., Lake, R. J., Praet, N., Bellinger, D. C., de Silva, N. R., Gargouri, N., Speybroeck, N., Cawthorne, A., Mathers, C., Stein, C., Angulo, F. J., & Devleeschauwer, B. (2015). World Health Organization Global estimates and regional comparisons of the burden of foodborne disease in 2010. *Plos Med*, 12(12). doi: 10.1371/journal.pmed.1001923
- Høg, B., Sommer, H. M., Larsen, L. S., Sorensen, A. I. V., David, B., Hofshagen, M., & Rosenquist, H. (2016). Farm specific risk factors for *Campylobacter* colonisation in Danish and Norwegian broilers. *Preventive Veterinary Medicine*, 130, 137-145. doi: 10.1016/j.prevetmed.2016.04.002
- Humphrey, T., O'Brien, S., & Madsen, M. (2007). Campylobacters as zoonotic pathogens: a food production perspective. *International Journal of Food Microbiology*, 117, 237-257. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.01.006
- Hungaro, H. M., Mendonça, R. C. S., Rosa, V. O., Badaró, A. C. L., Moreira, M. A. S., & Chaves, J. B. P. (2015). Low contamination of *Campylobacter* spp. on chicken carcasses in Minas Gerais state, Brazil: Molecular characterization and antimicrobial resistance. *Food Control*, 51, 15-22. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.11.001
- ISO (International Organization for Standard). (2006). Microbiology of Food and animal feeding stuffs – Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. – Part 1: Detection method. (ISO 10272-1:2006 [E]). 16 p.
- Jonaidi-Jafari, N., Khamesipour, F., Ranjbar, R., & Kheiri, R. (2016). Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* species isolated from the avian eggs. *Food Control*, 70, 35-40. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.05.018
- Josefsen, M. H., Lübeck, P. S., Hansen, F., & Hoorfar, J. (2004). Towards an international standard for PCR-based detection of foodborne thermotolerant Campylobacters: interaction of enrichment media and pre-

PCR treatment on carcass rinse samples. *Journal of Microbiological Methods*, 58, 39-48. doi: 10.1016/j.mimet.2004.03.001

Konkel M.E., Gray S.A., Kim B.J., Garvis S.G., & Yoon J. (1999a). Identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* based on the cadF virulence gene and its product. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 3, 510-517.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC84446>

Konkel, M.E., Kim, B.J., Rivera-Amill, V., & Garvis, S.G. (1999b). Bacterial secreted proteins are required for the internalization of *Campylobacter jejuni* into cultured mammalian cells. *Molecular Microbiology*, 32, 691-701. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01376.x

Krause, M., Josefsen, M. H., Lund, M., Jacobsen, N. R., Brorsen, L., Moos, M. , Stockmarr, A., & Hoorfar, J. (2006). Comparative, Collaborative, and On-Site Validation of a TaqMan PCR Method as a Tool for Certified Production of Fresh, *Campylobacter*-Free Chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(8), 5463–5468. doi: 10.1128/AEM.00291-06

Lindmark, H., Harbom, B., Thebo, L., Andersson, L., Hedin, G., Ostermam, B., Lindberg, T., Andersson, Y., Westöö, A., & Olsson Engvall, E. (2004). Genetic characterization and antibiotic resistance of *Campylobacter jejuni* isolated from meats, water, and humans in Sweden. *Journal Clinical of Microbiology*, 42 (2), 700-706. doi: 10.1128/JCM.42.2.700-706.2004

Luber, P., Wagner, J., Hahn, H., & Bartelt, E. (2003). Antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated in 1991 and 2001-2002 from poultry and humans in Berlin, Germany. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(12), 3825-3830. doi: 10.1128/AAC.47.12.3825-3830.2003

Maćkiw, E., Korsak, D., Rzewuska, K., Tomczuk, K., & Rożynek, E. (2012). Antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from food in Poland. *Food Control*, 23, 297-301. doi: 10.1016/j.foodcont.2011.08.022

Melero, B., Juntunen, P., Hänninen, M.L., Jaime, I., & Rovira, J. (2012). Tracing *Campylobacter jejuni* strains along the poultry meat production chain from farm to retail by pulsed-field gel electrophoresis, and the antimicrobial resistance of isolates. *Food Microbiology*, 32, 124-128. doi: 10.1016/j.fm.2012.04.020

- Messad, S., Hamdi, T. M., Bouhamed, R., & Ramdani-Bouguesa, N. (2014). Frequency of contamination and antimicrobial resistance of thermotolerant *Campylobacter* isolated from some broiler farms and slaughterhouses in the region of Algiers. *Food Control*, 40, 324-328. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.12.016
- Monteville, M. R., Yoon, J. E., & Konkel, M. E. (2003) Maximal adherence and invasion of INT 407 cells by *Campylobacter jejuni* requires the CadF outer membrane protein and microfilament reorganisation. *Microbiology*, v. 149, p. 153-165. doi: 10.1099/mic.0.25820-0
- Nobile, C. G. A., Costantino, R., Bianco, A., Pileggi, C., & Pavia, M. (2013). Prevalence and pattern of antibiotic resistance of *Campylobacter* spp. in poultry meat in Southern Italy. *Food Control*, 32(2), 715-718. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.02.011
- Ono, K., Kurazono, T., Niwa, H., & Itoh, K. (2003). Comparison of three methods for epidemiological typing of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Current Microbiology*, 47(5), 364-371. doi: 10.1007/s00284-002-4037-6
- Panzenhagen P.H.N., Aguiar W.S., Frasso B. S., Pereira V. L. A., Abreu D.L. C., Rodrigues D. P., do Nascimento E.R., & de Aquino M.H.C. (2016). Prevalence and fluoroquinolones resistance of *Campylobacter* and *Salmonella* isolates from poultry carcasses in Rio de Janeiro, Brazil, *Food Control*, 61, 243-247. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.10.002
- Park, S. F. (2002). The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 74, 177–188. doi: 10.1016/S0168-1605(01)00678-X
- Platts-Mills, J. A., Babji, S., Bodhidatta, L., Gratz, J., Haque, R., Havt, A., McCormick, B. J. J., McGrath, M., Olortegui, M. P., Samie, A., Shakoor, S., Mondal, D., Lima, I. F. N., Hariraju, D., Rayamajhi, B. B., Qureshi, S., Kabir, F., Yori, P. P., Mufamadi, B., Amour, C., Carreon, J. D., Richard, S. A., Lang, D., Bessong, P., Mduma, E., Ahmed, T., Lima, A. A. A. M., Mason, C. J., Zaidi, A. K. M., Bhutta, Z. A., Kosek, M., Guerrant, R. L., Gottlieb, M., Miller, M., Kang, G., Houpt, E. R., & The MAL-ED Network Investigators. (2015). Pathogen-specific burdens of community diarrhoea in developing countries: a multisite birth cohort study (MAL-ED). *Lancet Global Health*, 3, 564–575. doi: 10.1016/ S2214-109X(15)00151-5
- Ribot, E.M., Fitzgerald, C., Kubota, K., Swaminathan, B., & Barrett, T.J. (2001). Rapid Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocol for Subtyping of

- Campylobacter jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 1889-1894. doi: 10.1128/JCM.39.5.1889-1894.2001
- Ring, M., Zychowska, M. A., & Stephan, R. (2005). Dynamics of *Campylobacter* spp. spread investigated in 14 broiler flocks in Switzerland. *Avian Diseases*, 49(3), 390-396. doi: 10.1637/7319-010305R1.1
- Rivera-Amill, V., Kim, B. J., Seshu, J., & Konkel, M. E. (2001). Secretion of the virulence associated *Campylobacter* invasion antigens from *Campylobacter jejuni* requires a stimulatory signal. *The Journal of Infectious Diseases*, 183, 1607-1616. doi: 10.1086/320704
- Rożynek, E., Maćkiw, E., Kamińska, W., Tomczuk, K., Antos-Bielska, M., Dzierżanowska-Fangrat, K., & Korsak, D., 2013. Emergence of macrolide-resistant *Campylobacter* strains in chicken meat in Poland and the resistance mechanisms involved. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10, 655- 660. doi:10.1089/fpd.2012.1333.
- Ruiz-Palacios, G. M. (2007). The health burden of *Campylobacter* infection and the impact of antimicrobial resistance: playing chicken. *Clinical Infectious Diseases*, 44, 701–703. doi: 10.1086/509936
- Saenz, Y., Zaraga, M., Lantero, M., Gastanares, M.J., Baquero, F., & Torres, C. (2000). Antibiotic resistance in *Campylobacter* strains isolated from animals, foods, and humans in Spain in 1997-1998. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(2), 267-271.
- Sommer, H. M, Heuer, O. E., Sørensen, A. I. V., & Madsen, M. (2013). Analysis of factors important for the occurrence of *Campylobacter* in Danish broiler flocks. *Preventive Veterinary Medicine*, 111, 100–111. doi: 10.1016/j.prevetmed.2013.04.004
- Thomas, L. M., Long, K. A., Good, R. T., Panaccio, M., & Widders, P. R. (1997). Genotypic diversity among *Campylobacter jejuni* isolates in a commercial broiler flock. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 1874–1877.
- Wieczorek, K., Denis, E., & Osek, J. (2015). Comparative analysis of antimicrobial resistance and genetic diversity of *Campylobacter* from broilers slaughtered in Poland. *International Journal of Food Microbiology*, 210, 24–32. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.006
- WHO. The increasing incidence of human campylobacteriosis. Report and Proceedings of a WHO Consultation of Experts. Copenhagen, Denmark. (2000).

http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/67767/1/WHO_CDS_CSRAPH_2001.7.pdf (Accessed 30.01.2017)

WHO. *Campylobacter*. (2016). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/en/> (Accessed in 30.31.17)

Workman, S. N., Mathison, G. E., & Lavoie, M. C. (2008). An investigation of sources of *Campylobacter* in a poultry production and packing operation in Barbados. *International Journal of Food Microbiology*, 121, 106–111. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.10.014

Zampara, A., Sørensen, M. C. H, Elsser-Gravesen, A., & Brøndsted, L. (2016). Significance of phage-host interactions for biocontrol of *Campylobacter jejuni* in Food. *Food Control*, 73(B), 1169-1175. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.10.033

Zbrun, M. V., Olivero. C., Romero-Scharpen, A., Rossler, E., & Soto, L. P., Astesana, D. M., Blajman, J. E., Berisvil, A., Signorini, M. L., & Frizzo, L. S. (2015). Antimicrobial resistance in thermotolerant *Campylobacter* isolated from different stages of the poultry meat supply chain in Argentina, *Food Control*, 57, 136-141. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.03.045

Table 1. Primers for identification of *ciaB*, *cadF*, *cdtA*, *cdtB*, and *cdtC* virulence genes of thermophilic *Campylobacter*

Encoding gene	Primer	Sequence	Amplicon (bp)	Reference
<i>ciaB</i>	F	TGCGAGATTTTTTCGAGAATG	527	Zeng et al. (2006)
	R	TGCCCCGCCTTAGAACTTACA		
<i>cadF</i>	F	TTGAAGGTAATTTAGATATG	400	Konkel et al. (1999a)
	R	CTAATACCTAAAGTTGAAAC		
<i>cdtA</i>	F	CCTTGTGATGCAAGCAAT C	370	Datta et al. (2003)
	R	ACACTCCATTTGCTTTCT G		
<i>cdtB</i>	F	CAGAAAGCAAATGGAGTGTT	620	Datta et al. (2003)
	R	AGCTAAAAGCGGTGGAGTAT		
<i>cdtC</i>	F	CGATGAGTTAAAACAAAAAGATA	182	Datta et al. (2003)
	R	TTGGCATTATAGAAAATACAGTT		

F: forward primer; R: reverse primer

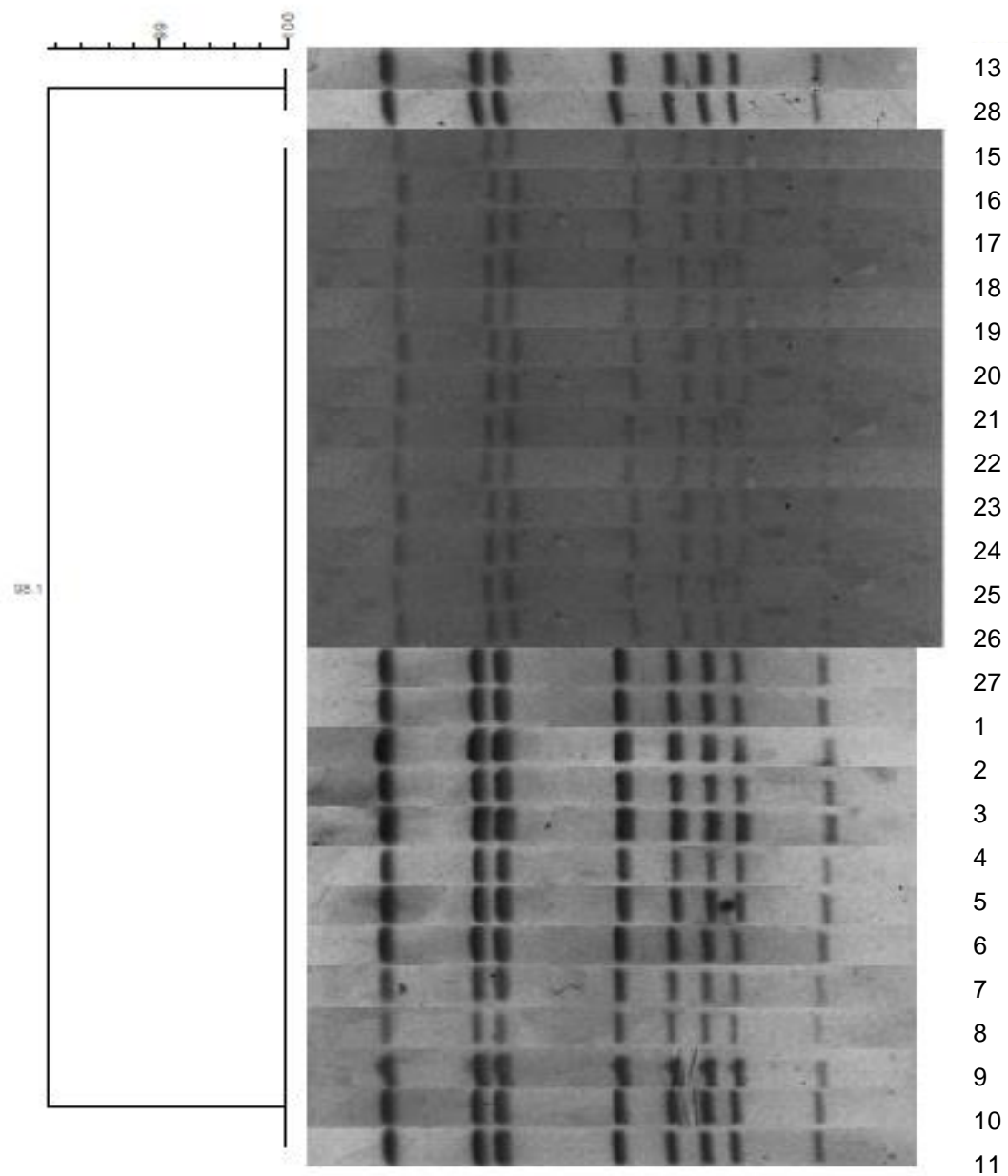


Figure 1. Dendrogram of PFGE patterns digested with *Sma*I. Cluster analysis was performed with Bionumerics 7.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) by using the Dice correlation coefficient and the unweighted pair group mathematical average (UPGMA) clustering algorithm

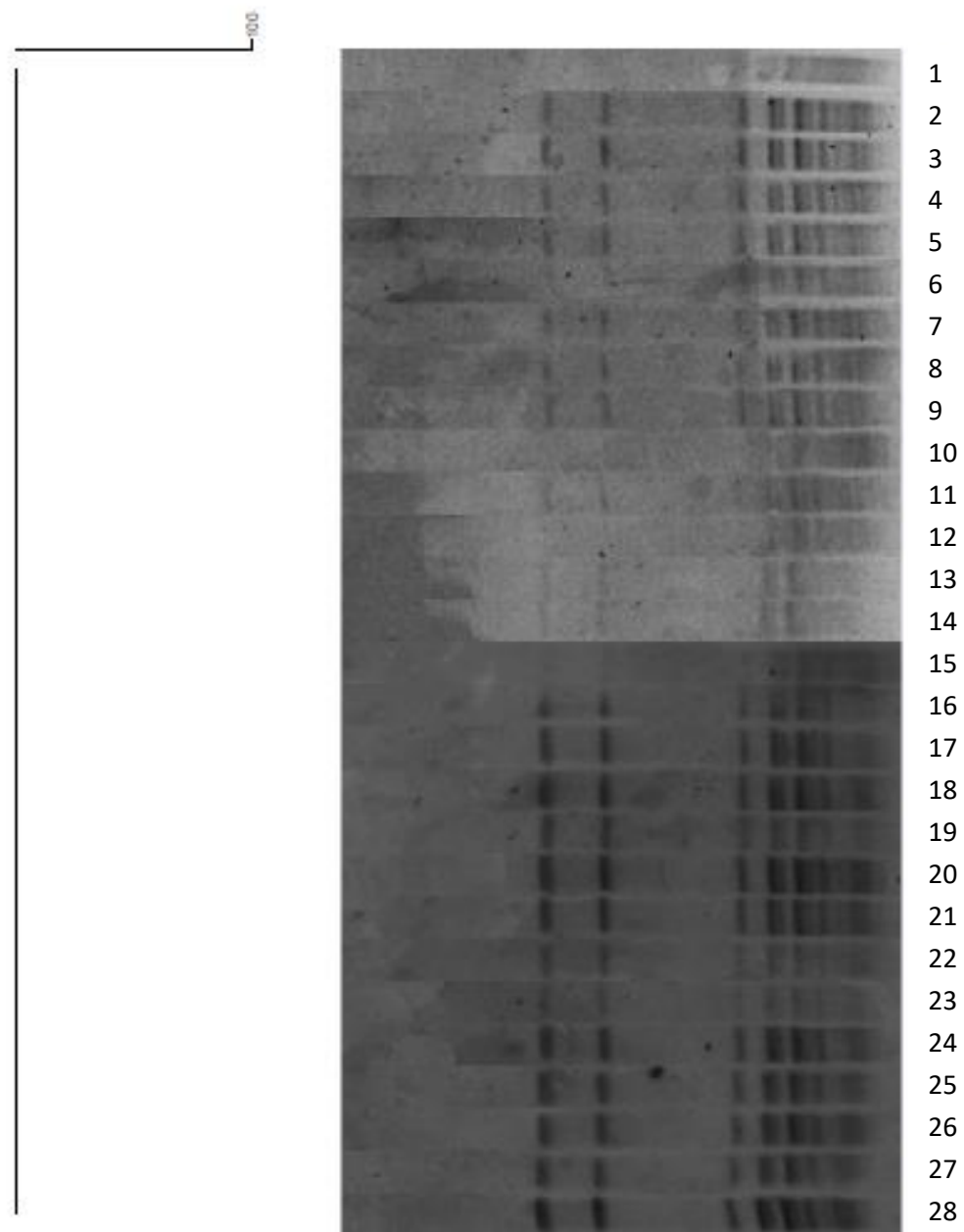


Figure 2. Dendrogram of PFGE patterns digested with *KpnI*. Cluster analysis was performed with Bionumerics 7.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) by using the Dice correlation coefficient and the unweighted pair group mathematical average (UPGMA) clustering algorithm

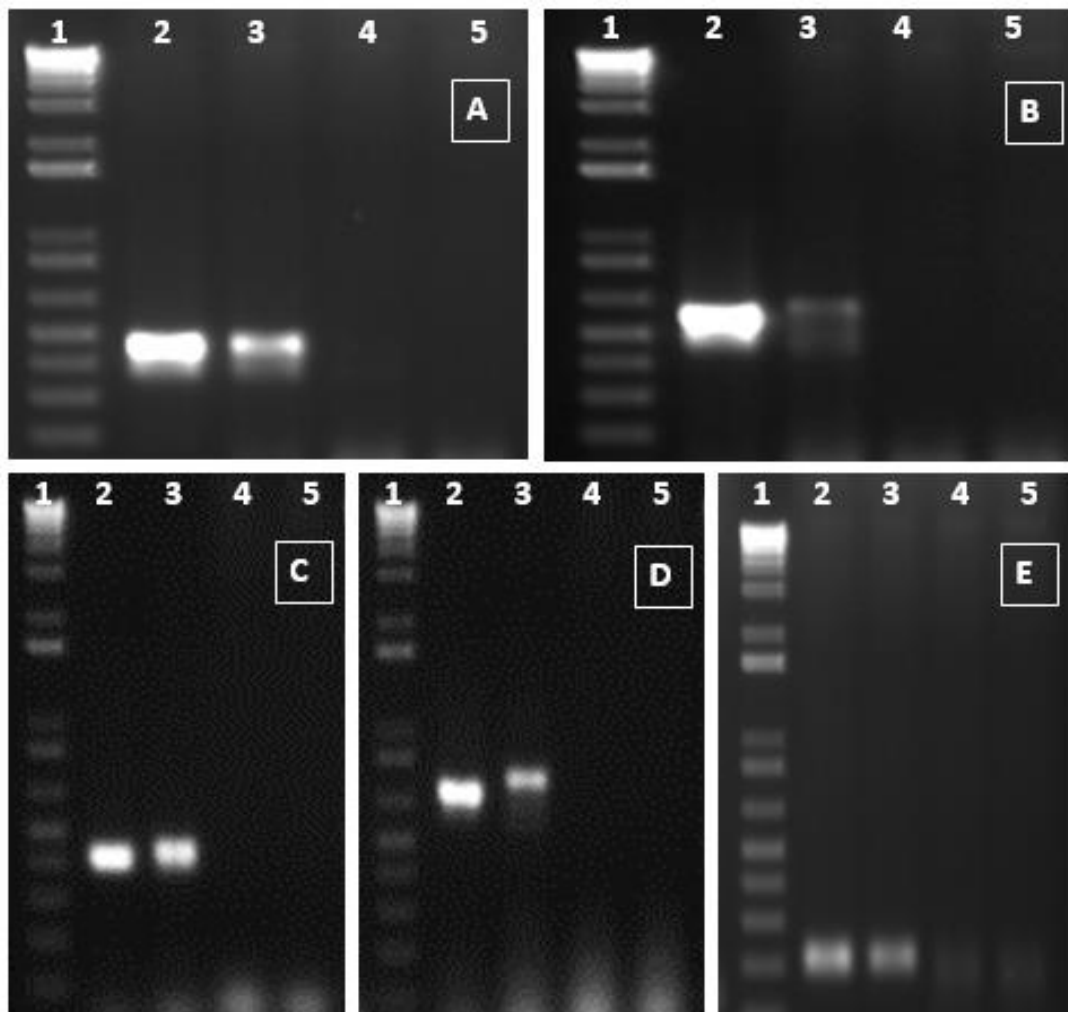


Figure 3. PCR amplification of virulence genes. Columns 1 represent the 1 kb ladder, columns 2 represent the thermophilic *Campylobacter* isolate, columns 3 represent the positive control of the reaction (*C. jejuni* ATCC 33291), columns 4 represent the negative control (*Salmonella* Enteritidis ATCC 13076); columns 5 represent the negative control of the reaction (ultra-pure water). A: *cadF* gene (400 bp). B: *ciaB* gene (527 bp). C: *cdtA* gene (370 bp). D: *cdtB* gene (620 bp). E: *cdtC* gene (182 bp)

4 Considerações Finais

Há ocorrência de *Campylobacter* termofílicos em frangos prontos para o abate na região sul do Rio Grande do Sul, Brasil;

A espécie prevalente entre *Campylobacter* termofílicos avaliados é *C. jejuni*, cujos isolados apresentam relação clonal, sugerindo uma única fonte de contaminação na propriedade;

Os isolados de *C. jejuni* apresentam resistência as fluorquinolonas e tetraciclina, e sensibilidade aos macrolídeos testados;

Os isolados de *C. jejuni* possuem os genes associados à adesão, invasão e produção de citotoxina.

5 Referências Bibliográficas

- AARESTRUP, F.M. Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 96, p. 271-281, 2005.
- AARESTRUP, F.M.; MCDERMOTT, P.F.; WEGENER, H.C. Transmission of antibiotic resistance from food animals to humans. In: Nachamkin, I., Szymanski, C.M., Blaser, M.J. (Eds.), **Campylobacter**. ASM press, Washington, D. C., p. 645–665, 2008.
- ABUOUN. M.; MANNING, G.; CAWTHRAW, S.A.; RIDLEY, A.; AHMED, I.H.; WASSENNAR, 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. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 3053-3065, 2005.
- AÇIK, M.N.; ÇETINKAYA, B. Heterogeneity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains from health sheep. **Veterinary Microbiology**, n.115, p. 370-375, 2006.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA — ANVISA. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União. 12 jan 2001.
- ALTEKRUSE, S.F.; STERN, N.J.; FIELDS, P.I.; SWERDLOW, D.L. *Campylobacter jejuni* - An emerging foodborne pathogen. **Perspectives**, v. 5, p. 28-35, 1999.
- 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. **Microbiology Pathogenesis**, v. 42, p.174-183, 2007.
- BAI, Y.; CUI, S.; XU, X.; LI, F. Enumeration and characterization of *Campylobacter* species from retail chicken carcasses in Beijing, China. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.11, p. 861–867, 2014.
- BANG, D. D.; NIELSEN, E. M.; SCHEUTZ, F.; PEDERSEN, K.; HANDBERG, K.; MADSEN, M. PCR Detection of seven virulence and toxin genes of *Campylobacter jejuni* isolates from Danish pigs and cattle and cytolethal distending toxin production of the isolates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p.1003-1014, 2003.
- BLASER, M.J.; ENGBERG, J. Clinical aspects of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* infections. In: Nachamkin, I., Szymanski, C.M., Blaser,

- M.J. (Editores), **Campylobacter** 3ª Edição. ASM press, Washington, D. C., p. 99-121, 2008.
- BOLTON, D.J. *Campylobacter* virulence and survival factors. **Food Microbiology**, v. 48, p. 99-108, 2015.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.º 78 de 03 de nov. 2003. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 05 de nov. 2003. Seção 1. p.3. Disponível em: <<https://idaf.es.gov.br/Media/idaf/Documentos/Legisla%C3%A7%C3%A3o/DDZIA/12%20DDZIA%20%20INSTRU%C3%87%C3%83O%20NORMATIVA%20N%C2%BA%2078,%20SALMONELLA.pdf>> Acesso em: 13 de março de 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**, 2016. Disponível em: <<http://u.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/08/Apresenta----o-Surtos-DTA-2016.pdf>>. Acesso em: 30 de janeiro de 2017.
- BRONZWAER, S.; HUGASA, M.; COLLINS, J.D.; NEWELL, D.G.; ROBINSON, T.; MAKELA, A. P.; HAVELAAR, A. Scientific Colloquium-assessing health benefits of controlling *Campylobacter* in the food chain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 131, p. 284-285, 2009.
- CDC - Centers for Disease Control and Prevention. **Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food — Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2006–2013. Morbidity and Mortality Weekly Report**. v. 63, p. 328-332, 2014.
- CORRY, J.E.; POST, D.E.; COLIN, P.; LAISNEY, M.J. Culture media for the isolation of *Campylobacter*s. **International Journal of Food Microbiology**, v. 26, p. 43-76, 1995.
- COWARD, C.; VAN DIEMEN, P.M.; CONLAN, A.J.K.; GOG, J.R.; STEVENS, M.P.; JONES, M.A.; MASKELL, D.J. Competing isogenic *Campylobacter* strains exhibit variable population structures in vivo. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 3857-3867, 2008.
- DEBRUYNE, L.; GEVERS, D. VANDAMME, P. "Taxonomy of the family *Campylobacteraceae*". **Campylobacter**, 3ª Edição. In: Nachamkin, I.; Szymanski, C.M.; Blaser, M.J. (Washington, DC: ASM), p. 3–27, 2008.
- DENIS, M.; SOUMET, C.; RIVOAL, K.; ERMEL, G.; BLIVET, D.; SALVAT, G.; COLIN, P. Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, p. 406–410, 1999.
- DHA (DEPARTMENT OF HEALTH AND AGEING) Monitoring the incidence and causes of diseases potentially transmitted by food in Australia: Annual Report of the OzFoodNet Network, 2011. Online. Acessado em 25 de janeiro de

2017. Disponível em:
<https://health.gov.au/internet/main/publishing.nsf/Content/cda-cdi3902g.htm>
- EFSA (European Food Safety Authority). Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses in the EU, 2008. **EFSA Journal**, v. 8, p. 1503-1602, 2010.
- EFSA (European Food Safety Authority), ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. **EFSA Journal**, v. 13, 2015.
- EVANS, S. J.; SAYERS, A. R. A longitudinal study of *Campylobacter* infection of broiler flocks in Great Britain. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 46, n. 3, p. 209-223, 2000.
- FÀBREGA, A.; SÁNCHEZ-CÉSPEDES, J.; SOTO, S.; VILA, J. Quinolone resistance in the food chain. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 31, p. 307-315, 2008.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), WHO (World Health Organization). **Salmonella and Campylobacter in chicken meat: Meeting report**. Microbiological risk assessment series N° 19. Rome. 56 p., 2009.
- FITZGERALD, C. *Campylobacter*. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 35, p. 289-298, 2015.
- FSA (FOOD STANDARDS AGENCY). **Food disease strategy 2010-15. United Kingdom, 2011**. Online. Acessado em 25 de janeiro de 2017. Disponível em: <https://www.food.gov.uk/sites/default/files/multimedia/pdfs/fds2015.pdf>
- GAGNAIRE, A.; NADEL, B.; RAOULT, D.; NEEFJES, J.; GORVEL, J.P. Collateral damage: insights into bacterial mechanisms that predispose host cells to cancer. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, p. 109–128, 2017.
- GARÉNAUX, A.; JUGIAU, F.; JORGE, R.; DENIS, M.; FEDERIGHI, M.; RITZ, M. *Campylobacter jejuni* strains from different origins under oxidative stress conditions: effect of temperature. **Current Microbiology**, v.56, p. 293-297, 2008.
- GE, B.; WANG, F.; SJÖLUND-KARLSSON, M.; MCDERMOTT, P.F. Antimicrobial resistance in *Campylobacter*: susceptibility testing methods and resistance trends. **Journal of Microbiological Methods**, v. 95, p. 57-67, 2013.
- GHARST, G., OYARZABAL, O. A., HUSSAIN, S. K. Review of current methodologies to isolate and identify *Campylobacter* spp. from foods. **Journal of Microbiological Methods**, v. 95, p. 84–92, 2013.

- GIBSON, J.R.; SUTHERLAND, K.; OWEN, R.J. Inhibition of DNase activity in PFGE analysis of DNA from *Campylobacter jejuni*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 19, p. 357-358, 1994.
- GREGORY, E.; BARNHART, H.; DREESEN, D.W.; STERN, N.J.; CORN, J.L. Epidemiological study of *Campylobacter* spp. In broilers: source, time of colonization, and prevalence. **Avian Diseases**, v. 41, n. 4, p. 890-898, 1997.
- GUERRY, P. *Campylobacter* flagella: not just for motility. Review. **Trends in Microbiology**, v. 15, n.10, 2007.
- HALD, B.; SKOV, M.N.; NIELSEN, E.M.; RAHBEK, C.; MADSEN, J.J.; WAINØ, M.; CHRIÉL, M.; NORDENTOFT, S.; BAGGESEN, D.L.; MADSEN, M. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in wild birds on Danish livestock farms. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 58, 2015.
- HAN, K.; JANG, S.S.; CHOO, E.; HEU, S.; RYU, S. Prevalence, genetic diversity and antibiotic resistance patterns of *Campylobacter jejuni* from retail raw chickens in Korea. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, p. 50-59, 2007.
- HÄNNINEN, M.-L.; PAJARRE, S.; KLOSSNER, M.-L.; RAUTELIN, H. Typing of human *Campylobacter jejuni* isolates in Finland by pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 1787-1789, 1998.
- HARMON, K.M.; RANSOM, G.M.; WESLEY, I.V. Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by polymerase chain reaction. **Molecular and Cellular Probes**, n. 11, p. 195-200, 1997.
- HERMANS, D.; VAN DEUN, K.; MARTEL, A.; VAN IMMERSEEL, F.; MESSENS, W.; HEYNDRIKX, M.; HAESEBROUCK, F.; PASMANS, F. Colonization factors of *Campylobacter jejuni* in the chicken gut. **Veterinary Research**, n. 42:82, p.1-14, 2011.
- ISO (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION), 2006. **Microbiology of FOOD and animal feeding stuffs – Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp.** – Parte 1: Detection method. 16 p., 2006.
- JACOBS-REITSMA, W.F.; VAN DE GIESSEN, A.W.; BOLDER, N.M.; MULDER, R.W.A.W. Epidemiology of *Campylobacter* spp. at two Dutch broiler farms. **Epidemiology and Infection**, v. 114, p. 413–421, 1995.
- KETLEY, J. M. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. **Microbiology**, v. 143, p. 5-21, 1997.
- KIRK, M.D; PIRES, S.M.; BLACK, R.E.; CAIPO, M.; CRUMP, J.A.; DEVLEESSCHAUWER, B.; DÖPFER, D.; FAZIL, A.; FISCHER-WALKER, C.L.; HALD, T.; HALL, A.J.; KEDDY, K.H.; LAKE, R.J.; LANATA,

- C.F.; TORGERSON, P.R.; HAVELAAR, A.H.; ANGULO, F.J. 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, 2015.
- KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERG, P.C.; WINN JR, W. C. **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. 4th ed. J.B. Lippincot Company. Philadelphia, 1154 p, 1992.
- KONKEL, M.E.; MONTEVILLE, M.R.; RIVERA-AMILL, V.; JOENS, L.A. The Pathogenesis of *Campylobacter jejuni*-Mediated Enteritis. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, p. 55-71, 2001.
- KORCZAK, B.M.; STIEBER, R.; EMLER, S.; BURNENS, A.P.; FREY, J.; KUHNERT, P. Genetic relatedness within the genus *Campylobacter* inferred from *rpoB* sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 937–45, 2006.
- KRAUSE-GRUSZCZYNSKA, M.; VAN ALPHEN, L.B.; OYARZABAL, O. A.; ALTER, T.; HANEL, I.; SCHLIEPHAKE, A.; KONIG, W.; VAN PUTTEN, J. P.; KONKEL, M.E.; BACKERT, S. Expression patterns and role of the CadF protein in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 274, p. 9–16, 2007.
- KUANA, S.L.; SANTOS, L.R.; RODRIGUES, L.B.; SALLE, C.T.P.; MORAES, H.L.S.; NASCIMENTO, V.P. Ocorrência de *Campylobacter* em Lotes de frangos de corte e nas carcaças correspondentes. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 2, p. 480-486, 2008a.
- KURINCIC, M.; BOTTELDOORN, N.; HERMAN, L.; SMOLE MOZINA, S. Mechanisms of erythromycin resistance of *Campylobacter* spp. isolated from food, animals and humans. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, p. 186-190, 2007.
- LAI-KING, N.G.; STILES, M.E.; TAYLOR, D.E. Comparison of basal media for culturing *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 21, n. 2, p. 226-230, 1985.
- LEE, M.D.; NEWELL, D.G. *Campylobacter* in poultry: filling an ecological niche. **Avian diseases**, v. 50, p. 1-9, 2006.
- LEVIN, R.E. *Campylobacter jejuni*: a review of its characteristics, pathogenicity, ecology, distribution, subspecies characterization and molecular methods of detection. **Food Biotechnology**, v.21, p. 271-347, 2007.
- LINTON, D.; OWEN, R.J.; STAMLEY, J. Rapid identification by PCR of the genus *Campylobacter* and of five *Campylobacter* species enteropathogenic for man and animals. **Research in Microbiology**, v. 147, p. 707-718, 1996.

- LITTLE, C.L.; RICHARDSON, J.F.; OWEN, R.J.; DE PINNA, E.; THRELFALL, E.J. *Campylobacter* and *Salmonella* in raw redmeats in the United Kingdom: prevalence, characterization and antimicrobial resistance pattern, 2003–2005. **Food Microbiology**, v. 25, p. 538–543, 2008.
- LIU S-L; SCHRYVERS, A.B.; SANDERSON, K.E.; JOHNSTON, R.N. Bacterial phylogenetic clusters revealed by genome structure. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p. 6747-6755, 1999.
- MA, L.; WANG, Y.; SHEN, J.; ZHANG, Q.; WU, C. Tracking *Campylobacter* contamination along a broiler chicken production chain from the farm level to retail in China. **International Journal of Food Microbiology**, v. 181, p. 77–84, 2014.
- MARSHALL, J.K. Post-infectious irritable bowel syndrome following water contamination. **Kidney International Supplement**, ed. 112, p. S42–43, 2009.
- MEADE, K.G.; NIRCIANDI, F.; CAHALANE, S.; REIMAN, C.; ALLAN, B.; O'FARRELLY, C. Comparative in vivo infection models yield insights on early host immune response to *Campylobacter* in chickens. **Immunogenetics**, v. 61, p. 101-110, 2009.
- MELERO, B.; JUNTUNEN, P.; HÄNNINEN, M.L.; JAIME, I.; ROVIRA, J. Tracing *Campylobacter jejuni* strains along the poultry meat production chain from farm to retail by pulsed-field gel electrophoresis, and the antimicrobial resistance of isolates. **Food Microbiology**, v. 32, p. 124-128, 2012.
- MONTEVILLE, M. R.; KONKEL, M. E. Fibronectin-facilitated invasion of T84-eukaryotic cells by *Campylobacter jejuni* occurs preferentially at the basolateral cell surface. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 6665–6671, 2002.
- MONTEVILLE, M. R., 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 reorganisation. **Microbiology**, v. 149, p. 153-165, 2003.
- MOORE, J. E.; CORCORAN, D.; DOOLEY, J. S. G. *Campylobacter*. **Veterinary Research**, v. 36, p. 351-382, 2005.
- MOORE, J.E.; BARTON, M.D.; BLAIR, I.S.; CORCORAN, D.; DOOLEY, J.S.G.; FANNING, S.; KEMPF, I.; LASTOVICA, A.J.; LOWERY, C.J.; MATSUDA, M.; MCDOWELL, D.A.; MCMAHON, A.; MILLAR, B.C.; RAO, J.R.; ROONEY, P.J.; SEAL, B.S.; SNELLING, W.J.; TOLBA, O. The epidemiology of antibiotic resistance in *Campylobacter*. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 1955-1966, 2006.
- MOURA, Helenira Melo de. **Isolamento e análise de resistência a antimicrobianos de cepas de *Campylobacter jejuni* em amostras de carnes de aves resfriadas comercializadas no Distrito Federal.**

- Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2010.
- NACHAMKIN, I. *Campylobacter* and *Arcobacter*. In: MURRAY., E. J. BARON., C. F. TENOVER., R. H. YOLKEN (Editores). **Manual of Clinical Microbiology**. 6ª Edição, p. 483-491, 1995.
- NACHAMKIN, I. *Campylobacter jejuni*. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. (Editores) **Food Microbiology Fundamentals and Frontiers**. Washington, D.C: ASM Press, cap. 9, p.179-192, 2001.
- NICHOLSON, M.A; PATTON, C.M. Evaluation of disk method for hippurate hydrolysis by *Campylobacter* species. **Journal of Clinical. Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 1341-43, 1995.
- NOBILE, C. G. A.; COSTANTINO, R.; BIANCO, A.; PILEGGI, C.; PAVIA, M. Prevalence and pattern of antibiotic resistance of *Campylobacter* spp. in poultry meat in Southern Italy. **Food Control**, v. 32, p. 715-718, 2013.
- NZPHSP (New Zealand Public Health Surveillance Report). Dezembro 2016: Public Health Surveillance Report. v. 14, 2016. Disponível em: < https://surv.esr.cri.nz/PDF_surveillance/NZPHSR/2016/NZPHSRDec2016.pdf > Acesso em 06 fev 2017.
- OLSON, C.K.; ETHELBERG, S.; VAN PELT, W.; TAUXE, R.V. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in industrialized nations. In: Nachamkin, I., Szymanski, C.M., Blaser, M.J. (Editores), **Campylobacter**, 3rd ed. ASM Press, Washington DC, 2008.
- PARK, S.F. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, p. 177-188, 2002.
- PARKHILL, J.; WREN, B.W.; MUNGALL, K.; KELLEY, J.M.; CHURCHER, C.; BASHAM, D.; CHILLINGWORTH, T.; DAVIES, R.M.; FELTWELL, T.; HOLROYD, S.; JAGELS, K.; KARLYSHEV, A.V.; MOULE, S.; PALLEN, M.J.; PENN, C.W.; QUALL, M. A.; RAJANDREAM, M-A.; RUTHERFORD, K.M.; van VLLET, A.H.M.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B.G. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. **Nature**, v. 403, p. 665-668, 2000.
- PLUMMER, P.; SAHIN, O.; BURROUGH, E.; SIPPY, R.; MOU, K.; RABENOLD, J.; YAEGER, M.; AND ZHANG, Q. Critical Role of LuxS in the Virulence of *Campylobacter jejuni* in a Guinea Pig Model of Abortion. **Infection and Immunity**, p. 585–593. 2011.
- POLLETT, S.; ROCHA, C.; ZERPA, R.; PATIÑO, L.; VALENCIA, A.; CAMIÑA, M.; GUEVARA, J.; LOPEZ, M.; CHUQUIRAY, N.; SALAZAR-LINDO, E.; CALAMPA, C.; CASAPIA, M.; MEZA, R.; BERNAL, M.; TILLEY, D.; GREGORY, M.; MAVES, R.; HALL, E.; JONES, F.; ARRIOLA, C.

- S.; ROSENBAUM, M.; PEREZ, J.; KASPER, M. *Campylobacter* antimicrobial resistance in Peru: a ten-year observational study. **BMC Infectious Diseases**, p. 1-7, 2012.
- POPE, J.E.; KRIZOVA, A.; GARG, A.X.; THIESSEN-PHILBROOK, H.; OUMET, J.M. *Campylobacter* reactive arthritis: a systematic review. **Seminars in Arthritis & Rheumatism**, v. 37, p. 48-55, 2007.
- QUARONI, A.; ISSELBACHER, K. J.; RUOSLAHTI, E. Fibronectin synthesis by epithelial crypt cells of rat small intestine. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 75, p. 5548-5552, 1978.
- REES, J.H.; SOUDAIN, S.E.; GREGSON N.A.; HUGHES, R.A.C. *Campylobacter jejuni* infection and Guillain- Barré syndrome. **The New England Journal of Medicine**, v. 333, p. 1374-1379, 1995.
- REPÉRANT, E.; LAISNEY, M.J.; NAGARD, B.; QUESNE, S.; ROUXEL, S.; LE GALL, F.; CHEMALY, M.; DENIS, M. Influence of enrichment and isolation media on the detection of *Campylobacter* spp. in naturally contaminated chicken samples. **Journal of Microbiological Methods**, v.128, p. 42–47, 2016.
- RIBOT, E.M.; FITZGERALD, C.; KUBOTA, K.; SWAMINATHAN, B.; BARRETT, T.J. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 1889–1894, 2001.
- RIVERA-AMILL, V.; KIM, B. J.; SESHU, J.; KONKEL, M. E. Secretion of the virulence associated *Campylobacter* invasion antigens from *Campylobacter jejuni* requires a stimulatory signal. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 183, p. 1607–1616, 2001.
- SAMUEL, M.; VUGIA, D.; SHALLOW, S., MARCUS, R.; SEGLER, S.; MCGIVERN, T.; KASSENBOG, H.; REILLY, K.; KENNEDY, M.; ANGULO, F.; TAUXE, R.V. Epidemiology of sporadic *Campylobacter* infection in the United States and the declining trend in incidence. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38 (Supplement 3), 2004.
- SILVA, J.; LEITE, D.; FERNANDES, M.; MENA, C.; GIBBS, P.A.; TEIXEIRA, P. *Campylobacter* spp. as foodborne pathogen: a review. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, p. 1-12, 2011.
- SKIRROW, M.B., BLASER, M.J. Clinical aspects of *Campylobacter* infection, In: NACHAMKIN, I.; BLASER, M.J. (Editores). **Campylobacter**, 2nd ed. ASM press, Washington, D. C., pp. 69–88, 2000.
- SMIBERT, R. M. The genus *Campylobacter*. In. Star (Ed.) et al. **The Prokaryotes, a Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria**, New York: Springer-Verlag, p. 609-617, 1981.

- SMITH, J.L.; BAYLES, D.O. The contribution of cytolethal distending toxin to bacterial pathogenesis. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 32, p. 227-248, 2006.
- STERN, N. J. *Campylobacter fetus* subs. *jejuni*: recovery methodology on eviscerated pork, lamb. and beef carcaces. **Journal of Food Science**, v. 46, p. 660-661, 1981.
- STERN, N. J.; FEDORKA-CRAY, P.; BAILEY, J. S.; COX, N. A.; CRAVEN, S. E.; HIETT, K. L.; MUSGROVE, M. T.; LADELY, S.; COSBY, D.; MEAD, G. C. Distribution of *Campylobacter* spp. in Selected U.S. Poultry Production and Processing Operations. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 11, p. 1705-1710, 2011.
- THOMÉ, J.D.S. **Citotoxinas e hemolisinas produzidas por *Campylobacter jejuni* isolados de diferentes origens**. 88f. Dissertação – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, 2006.
- VANDAMME, P. Taxonomy of the family *Campylobacteriaceae*. In: NACHAMKIN, I.; M. J BLASER. **Campylobacter**. Washington, D.C:ASM Press, 2nd edition. p. 3 26. 2000.
- VANDAMME, P.; FALSEN, E.; ROSSAU, R.; HOSTE, B.; SEGERS, P.; TYTGAT, R.; DE LEY, J. Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 41, p. 88-103, 1991.
- WANG, J.; GUO, Y.C.; LI, N. Prevalence and risk assessment of *Campylobacter jejuni* in chicken in China. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 26, n. 4, p. 243-248, 2013.
- WIECZOREK, K.; OSEK, J. Antimicrobial resistance mechanisms among *Campylobacter*. **BioMed Research International**, v. 2013, p.1-12, 2013.
- WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Campylobacter**. 2011. Acessado em 25 de janeiro de 2017. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/en/>
- WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **The global view of campylobacteriosis: report of an expert consultation**. 2013. Acessado em 25 de janeiro de 2017. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/80751/1/9789241564601_eng.pdf
- YAN, S.S.; PENDRAK, M.L.; FOLEY, S.L.; POWERS, J.H. *Campylobacter* infection and Guillain-Barré syndrome: public health concerns from a microbial food safety perspective. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v. 5, p. 285-305, 2005.

YOUNG, K. T.; LINDSAY M. DAVIS, L.M.; DIRITA, V.J. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. **Nature Reviews**, v. 5, p. 665-678, 2007.

YUKI, N.; HARTUNG, H.P. Guillain–Barré Syndrome. *The New England Journal of Medicine*, v. 366, p. 2294-2304, 2012.

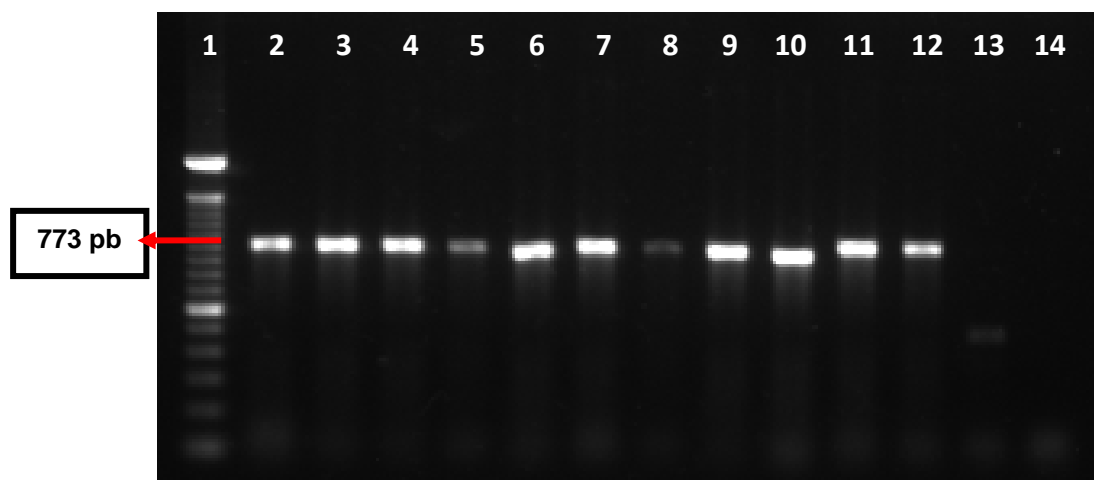
ZHANG, Q. Campylobacteriosis. In: SAIF, Y.M (Editor). **Diseases of Poultry**. 12ed.Iowa: Brackwell Publishing. p.675-690. 2008.

ZHANG, Q.; SAHIN, O.; McDERMOTT, P.F.; PAYOT, S. Fitness of antimicrobial-resistant *Campylobacter* and *Salmonella*. **Microbes and Infection**, v.8, p.1972-1978, 2006.

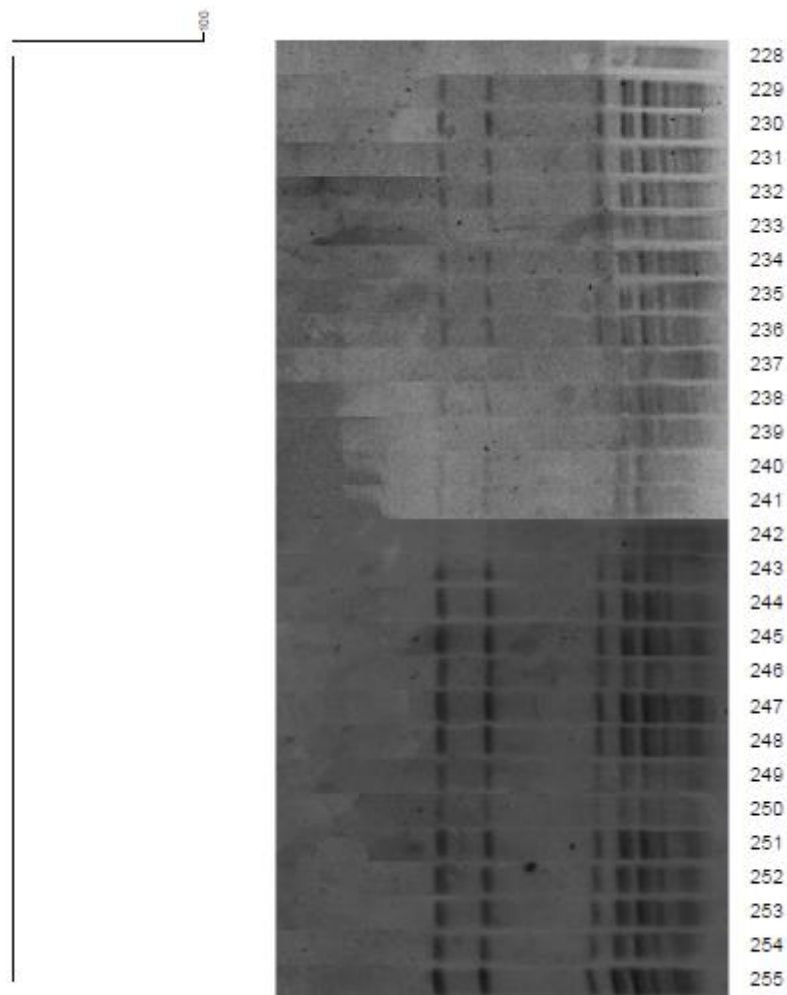
ZHOU, J.; ZHANG, M.; YANG, W.; FANG, Y.; WANG, G.; HOU, F. A seventeen-year observation of the antimicrobial susceptibility of clinical *Campylobacter jejuni* and the molecular mechanisms of erythromycin-resistant isolates in Beijing, China. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 42, p. 28–33, 2016.

Apêndices

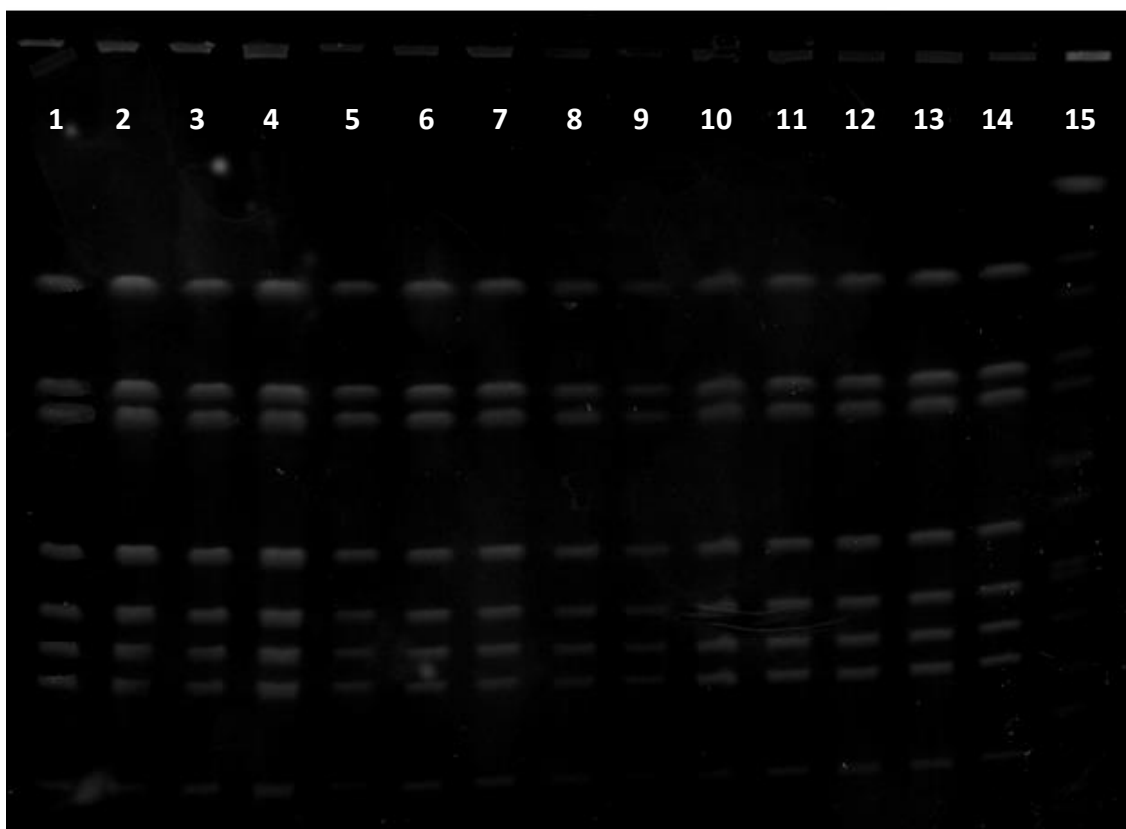
Apêndice A- PCR Multiplex para confirmação de espécie



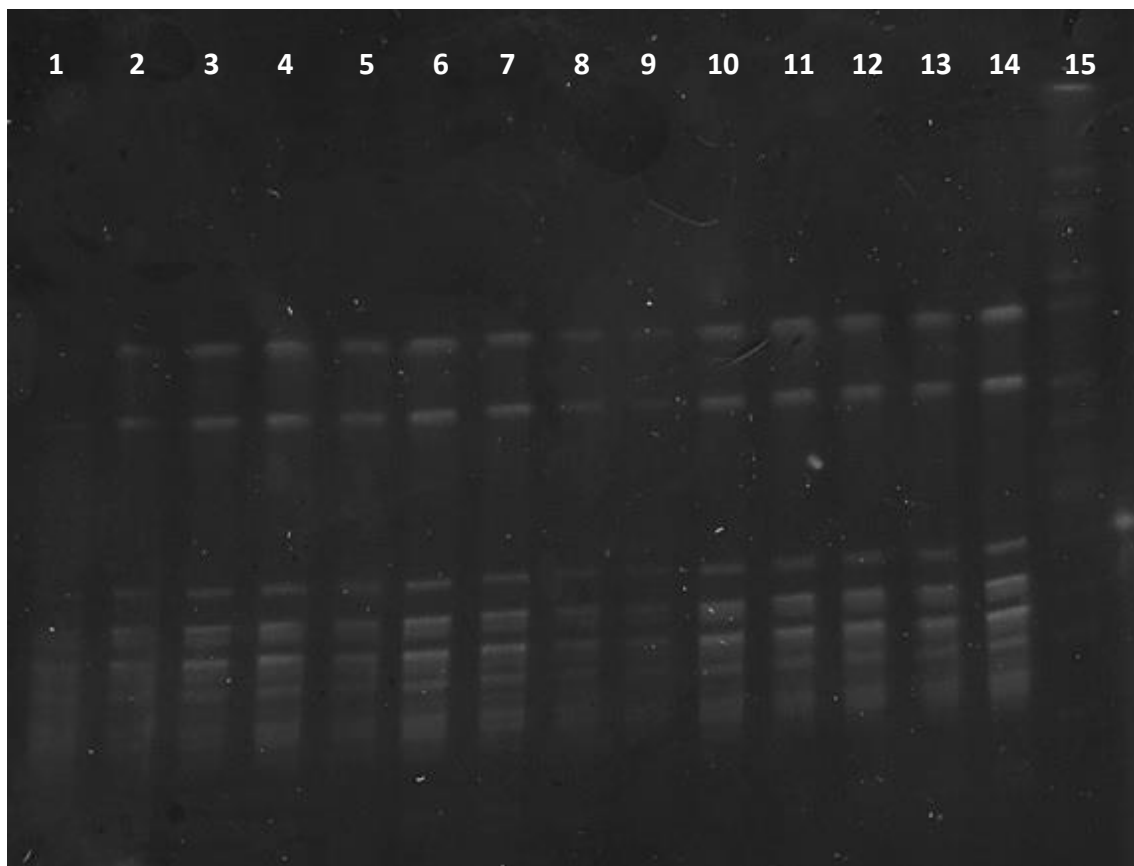
Coluna 1: Marcador de 100 pb; 2 - Isolado 230; 3 - Isolado 231; 4 - Isolado 232;
5 - Isolado 234; 6 - Isolado 237; 7 - Isolado 241; 8 - Isolado 242; 9 - Isolado 243;
10 - Isolado 244; 11 - Isolado 245; 12 - ATCC 33291 *C. jejuni*; 13 - CAMPY 1003
C. coli; 14 - Água ultrapura

Apêndice B- Dendrograma da PFGE com a enzima de restrição *KpnI*

Dendrograma da PFGE a partir da restrição com *KpnI*. A análise de *clusters* foi realizada com o software Bionumerics 7.1 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica), utilizando o coeficiente de correlação de dados e o algoritmo de agrupamento da média matemática do grupo de pares não ponderado (UPGMA)

Apêndice C- Foto da PFGE com digestão da *Sma*I

Coluna 1. Isolado 228; 2. Isolado 229; 3. Isolado 230; 4. Isolado 231; 5. Isolado 232; 6. Isolado 233; 7. Isolado 234; 8. Isolado 235; 9. Isolado 236; 10. Isolado 237; 11. Isolado 238; 12. Isolado 239; 13. Isolado 240; 14. Isolado 241; 15. Marcador *Salmonella* Branderup H9812

Apêndice D- Foto da PFGE com digestão da *KpnI*

Coluna 1. Isolado 228; 2. Isolado 229; 3. Isolado 230; 4. Isolado 231; 5. Isolado 232; 6. Isolado 233; 7. Isolado 234; 8. Isolado 235; 9. Isolado 236; 10. Isolado 237; 11. Isolado 238; 12. Isolado 239; 13. Isolado 240; 14. Isolado 241; 15. Marcador *Salmonella* Branderup H9812

Apêndice E- Informações sobre as amostras

Tabela 1. Número de amostras coletadas em cada granja e o isolamento de *Campylobacter jejuni* proveniente de cada meio de cultivo

	Nº Amostras		Nº Isolados (%)	
	<i>Pool Swabs</i> de Cloaca	<i>Swab</i> de Arrasto	Ágar Preston	Ágar mCCD
Granja 1	15	1	16 (100%)	12 (75%)
Granja 2	15	1	0	0
Granja 3	15	1	0	0

Apêndice F- Imagem da amostragem das granjas por swab de arrasto



Apêndice G- Imagem da amostragem dos frangos de corte por *swab* de cloaca

