



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

Pesquisa de *Campylobacter* spp., genes de virulência, resposta à ação de enterocinas e antimicrobiana *in vitro*, em carcaças e frangos de corte

SARUANNA MILLENA DOS SANTOS CLEMENTE

RECIFE

2023



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

Pesquisa de *Campylobacter* spp., genes de virulência, resposta à ação de enterocinas e antimicrobiana *in vitro*, em carcaças e frangos de corte

SARUANNA MILLENA DOS SANTOS CLEMENTE

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Mércia Rodrigues Barros

RECIFE

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C626p

Clemente, SARUANNA MILLENA DOS SANTOS

Pesquisa de *Campylobacter* spp., genes de virulência, resposta à ação de enterocinas e antimicrobiana in vitro, em carcaças e frangos de corte: Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal. / SARUANNA MILLENA DOS SANTOS Clemente. - 2023.
133 f.

Orientador: MERCIA RODRIGUES BARROS.
Inclui referências e apêndice(s).

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, 2023.

1. Avicultura. 2. Campilobacteriose. 3. Enterocinas. 4. Multirresistência. 5. Saúde Pública. I. BARROS, MERCIA RODRIGUES, orient. II. Título

CDD 636.089

SARUANNA MILLENA DOS SANTOS CLEMENTE

Aprovado em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Mércia Rodrigues Barros
Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE

Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota
Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE

Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Júnior
Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE

Profa. Dra. Maria Aparecida Juliano
Universidade Federal de São Paulo-UNIFESP

Profa. Dra. Érica Chaves Lúcio
Universidade Federal da Bahia-UFBA

Aos meus pais e irmã, a quem agradeço o apoio e incentivo, **dedico.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela dádiva da vida, saúde, uma família e amigos que sempre me apoiaram e incentivaram na incansável busca pela concretização dos meus objetivos. Obrigada Bom Jesus por me fortalecer nos momentos difíceis e de insegurança.

Aos meus pais, Geraldo e Zeneide, agradeço de todo o coração, pois não foram poucos os esforços, tempo e investimento para que eu e minha irmã tivéssemos a oportunidade de ingressarmos em uma universidade. Essa caminhada foi iniciada por vocês primeiramente. Esse título é tão meu quanto de vocês.

À minha irmã, Sayanne, pela união, amor, incentivo e apoio em todas as minhas escolhas. Sei o quanto está feliz por esta conquista.

Ao meu namorado Victor Hugo, pelo companheirismo, apoio e compreensão, durante todo este período, sei que não foi fácil abdicar de muitos momentos para alcançar este objetivo.

À minha orientadora professora Dra. Mércia Rodrigues Barros, agradeço à ajuda, amizade e esforço em lutar por nosso objetivo, pois tivemos que enfrentar uma série de obstáculos, que em meio a um período de crise política sem recursos financeiros e vivenciando uma pandemia, a qual passamos diante de tantas perdas, conseguir concluir este trabalho de pesquisa é uma vitória para todos que lutam pela educação e ensino nesse país. Minha eterna gratidão.

Ao meu amigo e parceiro de trabalho, Samuel Santos, por todas as noites dedicadas à execução deste projeto, auxílio durante coletas de campo e por compartilhar o conhecimento ao longo desse tempo, saiba que tornou tudo mais leve, uma pessoa a quem tenho plena confiança.

Aos colegas Marcos Thulio, Afrânio Nunes, Hallan Thomaz e ao meu primo Sazuki Leal, fundamentais durante o processo de coletas de amostras de campo, sem vocês não seria possível a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Rinaldo por contribuir e possibilitar a execução de parte do projeto no Laboratório de Doenças Infectocontagiosas dos Animais Domésticos (LDIC) e aos colegas de trabalho pela contribuição, auxílio e apoio. Especialmente a Professora Dra.

Renata Pimentel, pois esteve presente e disponível para prestar auxílio sempre que necessário da melhor maneira possível, minha gratidão.

Ao Laboratório de Inspeção de Carne e Leite (LICAL) da UFRPE, que me possibilitou a execução de grande parte do projeto de pesquisa. Aproveito também para agradecer aos colegas de trabalho, Órion, Nataly, Webert e Mika, por toda ajuda, cumplicidade e amizade; à técnica Goretti Varejao e as professoras Dra. Andrea Paiva, Dra. Elizabeth Sampaio e Dra. Maria Betânia, as quais prestaram todo auxílio necessário com sábios conselhos.

À professora Dra. Taciana Soares e a Priscila Calaça, que foram essenciais para o desenvolvimento e elaboração da pesquisa, com contribuições importantes e de aprendizado enriquecedor.

À Professora Dra. Érica Lúcio, a quem tenho grande estima e admiração como amiga e colega de profissão, por todos os conselhos e apoio desde que iniciei a vida acadêmica.

Ao professor Dr. Wilton Júnior, que me conduziu desde a graduação, sempre com sábios conselhos, alguém que tenho profunda admiração e apreço.

À Dra. Sineide Vilela, pela confiança e oportunidade de iniciar minha vida profissional, sempre me incentivando à pós-graduação, minha gratidão.

À Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e a professora Dra. Maria Aparecida Juliano que tornou possível esta parceria, meu agradecimento também à Doutoranda Karolina Fernandes, pela contribuição e participação no processo para que tivéssemos os resultados obtidos.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), que me acolheu enquanto instituição de ensino e que por muitos momentos foi minha segunda casa.

Ao Centro de Apoio à Pesquisa da UFRPE (CENAPESQ) e ao Laboratório de Tecnologia de Bioativos (LABTECBIO) da UFRPE, locais os quais desenvolvi parte da pesquisa e aos técnicos e funcionários, que foram sempre solícitos e responsáveis.

Ao Programa de Pós Graduação Biociência Animal (PPGBA), por promover a competência científica na formação de profissionais para os setores de ensino, pesquisa e extensão.

À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.

Na vida toda conquista é resultado da ajuda de pessoas especiais que nos cercam, gratidão à todos vocês.

“Tudo posso naquele que me fortalece”
Filipenses 4:13

RESUMO

Campylobacter spp. é considerado um importante patógeno bacteriano gastrointestinal devido às implicações na avicultura industrial e no âmbito da Saúde Pública. Objetivou-se pesquisar *Campylobacter* spp. em carcaças e suabes de cloaca de frangos de corte, detectar as espécies *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari* de importância para saúde pública, os genes relacionados à virulência, avaliar a ação de enterocinas e determinar o perfil de resistência antimicrobiana. Foram avaliadas amostras de pele de diferentes regiões da carcaça (resfriada e congelada), fígado e moela e suabes de cloaca de frangos de corte. Os isolados foram submetidos à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para identificação do gênero e espécies, genes de virulência e resistência. A concentração inibitória mínima (MIC) foi utilizada para determinar a atividade antimicrobiana de enterocinas. A avaliação da suscetibilidade aos antibióticos foi realizada pelo método de disco difusão. Todos os isolados foram submetidos a PCR e os isolados provenientes de suabes de cloaca de frangos de corte que foram submetidos ao Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Light (MALDI-TOF MS). Um questionário investigativo foi aplicado aos médicos veterinários e zootecnistas sobre o tema. Nas amostras de carcaças, foram obtidos 376 isolados de *Campylobacter* spp. e 26 (7%) *C. jejuni*, não foram detectados *C. coli* e *C. lari*. A maior frequência de *C. jejuni* foi em carcaças resfriadas com (88,5%) ($p < 0,0001$) e em carcaças congeladas (11,5%). A localização mais frequente de *C. jejuni* foi pele do peito (27,0%), seguida da pele da asa (23,0%), pele da cloaca (19,0%) e pele do pescoço (8,0%), moela (15,0%) e fígado (8,0%). A frequência gênica foi *cdtA* (11,5%), *cdtB* (11,5%), *cdtC* (19,0%), *sodB* (34,5%), *dnaJ* (11,5%), *cmeA* (15,0%), *cmeB* (15,0%) e *cmeC* (15,0%). Em frangos de corte foram encontradas amostras positivas para *C. jejuni* (90,0%) e *C. lari* (30,0%), porém *C. coli* não foi detectado. A frequência gênica das amostras positivas para *C. jejuni* revelou que em todas as amostras foram detectados os genes *cdtB*, *dnaJ*, *cmeA*, *cmeB* e *cmeC*, seguido dos genes *cdtA* (92,6%), *cdtC* (66,6%) e *sodB* (51,8%). Em todas as amostras positivas para *C. lari* foram detectados os genes *cdtB*, *dnaJ*, *sodB*, *cmeB* e *cmeC*, seguido dos genes *cdtA* (85,7%), *cmeA* (85,7%) e *cdtC* (28,5%). Os isolados provenientes dos suabes de cloaca, negativos na PCR para *Campylobacter* spp., foram identificados por MALDI-TOF MS, sendo *Proteus mirabilis* (79,0%) e *Providencia stuartii* (21,0%). A atividade antimicrobiana das enterocinas inibiu o crescimento de (98,5%) de *C. jejuni*. Verificou-se multirresistência em *C. jejuni* (100,0%)

proveniente de carcaças. Este estudo revelou que participantes (80,7%) afirmaram ter pouco conhecimento sobre *Campylobacter*. Diante o exposto conclui-se que carcaças de frango contaminadas por *C. jejuni* multirresistente, representam um risco para Saúde Pública. Assim, frangos de corte infectados podem ser considerados uma fonte de infecção para *Campylobacter* spp. na cadeia avícola. Novas investigações devem ser realizadas para explorar o uso de enterocinas no controle deste patógeno, pois os resultados são promissores.

Palavras-chave: Avicultura. Campilobacteriose. Enterocinas. Multirresistência. Saúde Pública

ABSTRACT

Campylobacter spp. it is considered an important gastrointestinal bacterial pathogen due to its implications for industrial poultry farming and public health. The objective was to research *Campylobacter* spp. in carcasses and cloacal swabs of broiler chickens, detect the species *C. jejuni*, *C. coli* and *C. lari* of importance for public health, the genes related to virulence, evaluate the action of enterocins and determine the antimicrobial resistance profile. Skin samples from different regions of the carcass (chilled and frozen), liver and gizzard and cloacal swabs of broiler chickens were evaluated. The isolates were subjected to Polymerase Chain Reaction (PCR) to identify the genus and species, virulence and resistance genes. The minimum inhibitory concentration (MIC) was used to determine the antimicrobial activity of enterocins. Assessment of susceptibility to antibiotics was performed using the disk diffusion method. All isolates were subjected to PCR and isolates from broiler cloacal swabs were subjected to Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Light (MALDI-TOF MS). An investigative questionnaire was applied to veterinarians and zootechnicians on the topic. In carcass samples, 376 isolates of *Campylobacter* spp. and 26 (7%) *C. jejuni* were obtained, *C. coli* and *C. lari* were not detected. The highest frequency of *C. jejuni* was in chilled carcasses (88.5%) ($p < 0.0001$) and in frozen carcasses (11.5%). The most frequent location of *C. jejuni* was the skin of the chest (27.0%), followed by the skin of the wing (23.0%), skin of the cloaca (19.0%) and skin of the neck (8.0%), gizzard (15.0%) and liver (8.0%). The gene frequency was *cdtA* (11.5%), *cdtB* (11.5%), *cdtC* (19.0%), *sodB* (34.5%), *dnaJ* (11.5%), *cmeA* (15.0%), *cmeB* (15.0%) and *cmeC* (15.0%). In broiler chickens, positive samples were found for *C. jejuni* (90.0%) and *C. lari* (30.0%), but *C. coli* was not detected. The gene frequency of samples positive for *C. jejuni* revealed that the genes *cdtB*, *dnaJ*, *cmeA*, *cmeB* and *cmeC* were detected in all samples, followed by the genes *cdtA* (92.6%), *cdtC* (66.6%) and *sodB* (51.8%). In all samples positive for *C. lari*, the genes *cdtB*, *dnaJ*, *sodB*, *cmeB* and *cmeC* were detected, followed by the genes *cdtA* (85.7%), *cmeA* (85.7%) and *cdtC* (28.5%). The isolates from cloacal swabs, negative in PCR for *Campylobacter* spp., were identified by MALDI-TOF MS, being *Proteus mirabilis* (79.0%) and *Providencia stuartii* (21.0%). The antimicrobial activity of enterocins inhibited the growth of (98.5%) *C. jejuni*. Multidrug resistance was found in *C. jejuni* (100.0%) from carcasses. This study revealed that participants (80.7%) said they had little knowledge about *Campylobacter*. In view of the above, it is concluded that

chicken carcasses contaminated by multidrug-resistant *C. jejuni* represent a risk to Public Health. Thus, infected broiler chickens can be considered a source of infection for *Campylobacter* spp. in the poultry chain. Further investigations should be carried out to explore the use of enterocins in controlling this pathogen, as the results are promising.

Keywords: Poultry. Campylobacteriosis. Enterocins. Multidrug Resistance. Public Health.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	16
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1.	Histórico.....	18
2.2.	<i>Campylobacter</i> spp.....	18
2.3.	Mecanismos de virulência de <i>Campylobacter</i> spp.....	20
2.4.	Aspectos epidemiológicos	21
2.5.	Campilobacteriose e impacto na saúde pública	22
2.6.	Resistência bacteriana	24
2.7.	Estratégias de controle e profilaxia.....	26
2.8.	Probióticos e bacteriocinas na produção animal	28
2.9.	Métodos de diagnóstico.....	30
2.9.1.	Isolamento microbiológico.....	30
2.9.2.	Métodos moleculares	31
2.9.3.	Matrix Associated Laser Desorption-Ionization – Time of Flight.....	32
2.9.4.	Inovações metodológicas.....	33
2.9.4.1.	Amplificação Isotérmica Mediada por Loop (LAMP).....	33
3.	OBJETIVOS	35
3.1.	Geral.....	35
3.2.	Específicos	35
	REFERÊNCIAS.....	36
4.	ARTIGO 1.....	47
5.	ARTIGO 2.....	80
6.	ARTIGO 3.....	105
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	125
	APÊNDICE 1.....	127
	APÊNDICE 2.....	129

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

- Figure 1.** *Campylobacter* spp. and *C. jejuni* in chicken carcasses from different companies 76
- Figure 2.** Antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* 77
- Figure 3.** Frequency of virulence and resistance genes in multidrug resistant *C. jejuni* 78
- Figure 4.** Inhibitory action of enterocins against *C. jejuni* 79

ARTIGO 2

- Figure 1.** Venn diagram showing the distribution of *Campylobacter* species in 30 positive samples from broiler feces in northeastern Brazil. 104

ARTIGO 3

- Figura 1.** Classificação dos participantes por áreas de atuação profissional 121
- Figura 2.** Percepção dos entrevistados em relação ao risco de *Campylobacter* spp. para saúde pública, medidas de controle e legislação aplicadas à indústria avícola 122
- Figura 3.** Perguntas e respostas em relação ao conhecimento dos entrevistados sobre *Campylobacter* na indústria avícola 123

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Table 1. Primer sequences used for the uniplex PCR assay and predicted sizes of PCR products	68
Table 2. Breakpoints used for antimicrobial susceptibility testing by disk diffusion method	70
Table 3. Frequency of <i>Campylobacter</i> species in chilled and frozen carcasses sold in Brazil	71
Table 4. Multi-resistant profiles of <i>C. jejuni</i> from chilled and frozen carcasses	72
Table 5. Description of the index of multiple antimicrobial drug resistance (IRMA) found in <i>Campylobacter jejuni</i> from broiler chicken carcasses	73
Table 6. Association of virulence genes in <i>C. jejuni</i> from chicken carcasses	74
Table 7. Genetic profile of multidrug resistance (MDR) <i>C. jejuni</i>	75

ARTIGO 2

Table 1. Primer sequences used for the uniplex PCR assay and predicted sizes of PCR products	100
Table 2. Distribution of virulence genes in samples positive for <i>Campylobacter</i> species from broiler chicken feces in northeastern Brazil	102
Table 3. Virulence profiles concerning the genes detected in the species <i>C. jejuni</i> and <i>C. lari</i>	103

ARTIGO 3

Tabela 1. Classificação das respostas de médicos veterinários e zootecnistas sobre <i>Campylobacter</i> na indústria avícola	124
---	------------

1. INTRODUÇÃO

A cadeia produtiva de frango de corte ocupa uma posição de destaque no cenário mundial, esta atividade possui um vasto acervo tecnológico dentre o setor agropecuário brasileiro, incluindo os avanços em genética, manejo, nutrição e sanidade, o que resultou em uma grande indústria de produção de proteína de origem animal. O último relatório anual revelou o Brasil como o maior exportador e o segundo maior produtor de carne de frango. No Nordeste, o estado de Pernambuco possui o maior percentual de abate de carne de frango, correspondendo a 1,12% do abate nacional, considerada uma importante atividade na geração de renda e emprego (ABPA, 2023).

Associado ao crescente consumo da carne de frango, alguns patógenos, como *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes* e *Echerichia coli*, tem merecido destaque, uma vez que a principal rota da infecção em humanos está associada ao consumo de produtos de origem animal contaminados (HEREDIA; GARCÍA, 2018; THOMAS et al., 2020; BHARDWAJ et al., 2022; WANG et al., 2022). Estima-se que 600 milhões, quase 1 em cada 10 pessoas no mundo, adoecem após ingerir alimentos contaminados e aproximadamente US\$ 110 bilhões são perdidos a cada ano em produtividade e despesas médicas resultantes de alimentos inseguros, em países de baixa e média renda (OMS, 2022). A campilobacteriose foi confirmada como a zoonose mais comumente relatada na Europa, responsável por mais de 62% de todos os casos humanos confirmados em 2021, seguido por salmonelose e yersiniose (EFSA, 2022).

Considerado um patógeno entérico de origem alimentar desde 1970, *Campylobacter* spp. têm sido muito estudado devido as suas implicações à avicultura industrial no âmbito da saúde pública (ZBRUN et al., 2020, ASUMING-BEDIAKO et al., 2022; NAUTA et al., 2022; TANG et al., 2022). A enfermidade infecciosa causada por membros do gênero *Campylobacter* é denominada campilobacteriose, os sintomas mais comuns em seres humanos são: gastroenterite, diarreia, dor abdominal, cólicas e febre (BLASER, 1997).

A infecção por *Campylobacter jejuni*, é uma das causas mais comuns da síndrome de Guillain-Barré, estima-se que 1 em cada 1.000 pessoas com infecção por *Campylobacter* nos Estados Unidos é diagnosticada com essa síndrome (CDC,

2022) e ainda pode estar relacionado a síndrome hemolítico-urêmica (KEENSWIJK et al., 2019, KARPOVICH et al., 2020).

Na cadeia produtiva, frangos de corte infectados por *Campylobacter* spp. são apontados como os principais responsáveis pela contaminação de carcaças durante o processamento, uma vez que a colonização da carne por essa bactéria pode ser aumentada no abate devido à contaminação cruzada em larga escala, principalmente durante evisceração (SELIWIORSTOW et al., 2016; RASSCHAERT et al., 2020). No entanto, o controle da contaminação externa de frangos de corte que entram no processo de abate, pode resultar em menor contaminação da carcaça (SELIWIORSTOW et al., 2015).

Com uma tendência crescente de resistência de *Campylobacter* spp. em todo o mundo (ALABOUDI et al., 2020; NAFARRATE et al., 2021; RANGARAJU et al., 2022; SCHREYER et al., 2022) associado a detecção de importantes genes de virulência em isolados de origem tanto humana quanto animal (ERYILDIZ et al., 2020; GHARBI et al., 2022; YANG et al., 2022) indica um risco para saúde pública. Diante disso, o interesse pela pesquisa com probióticos e bacteriocinas tem sido impulsionado pela baixa taxa de desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas e a resistência bacteriana frente aos antimicrobianos existentes, apontados como possíveis alternativas de controle biológico, uma vez que não causam danos à saúde animal, humana e ambiental (DENG et al., 2020; LIU et al., 2022; MOTA-GUTIERREZ et al., 2022).

Apesar do potencial zoonótico, a legislação brasileira não preconiza o controle de *Campylobacter* spp., além disso, a subnotificação dos quadros de campilobacteriose, representa um importante fator de risco à população. Portanto, há necessidade do conhecimento sobre a identificação de espécies de *Campylobacter* e fatores de virulência relacionados às infecções humanas. Bem como, avaliar a efetividade da ação antimicrobiana de enterocinas frente às espécies de *Campylobacter*, assim como, constatar a percepção do setor avícola em relação a esse patógeno, a fim de subsidiar ações preventivas, minimizar os prejuízos da cadeia produtiva e garantir a inocuidade do produto final ofertado ao consumidor.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Histórico

Acredita-se que o primeiro relato sobre *Campylobacter* ocorreu em 1886 por Theodore Escherich, o qual relatou e descreveu bactérias em forma helicoidal, isoladas de fezes (VANDAMME, 2000; VANDAMME et al., 2010).

Em 1906, espécies foram cultivadas pela primeira vez a partir de amostras de ovelhas abortadas, isso ocorreu no Reino Unido durante um estudo que abrangeu vários anos de aborto epizootico em bovinos e ovinos (SKIRROW, 2006). Mais tarde, em 1927, Smith e Orcutt nomearam um grupo de bactérias, isoladas das fezes de bovinos com diarreia, como *Vibrio jejuni* e em 1944, Doyle isolou *Vibrio coli* em fezes de porcos com diarreia (VANDAMME, 2000; VANDAMME et al., 2010).

O gênero *Campylobacter*, foi estabelecido apenas em 1963, após a renomeação de *Vibrio foetus* para *Campylobacter foetus*, assim como os “related vibrios” foram classificados como *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*, provavelmente devido à sua baixa composição de bases de DNA, seu metabolismo não fermentativo e suas necessidades de crescimento microaerofílico (ON, 2001).

Em seguida, o estudo de Butzler et al. (1973) aumentou o interesse por esse gênero ao observar sua alta incidência na diarreia humana, uma vez que *C. fetus* já era reconhecido como um importante patógeno animal como causa de aborto e infertilidade infecciosa, e a identificação de *Campylobacter* como causa de doença entérica em humanos garantiu a atenção tanto de médicos quanto de veterinários (ON, 2001).

2.2. *Campylobacter* spp.

O nome de *Campylobacter* veio originalmente do grego antigo que significa haste curvada, onde kampylos significa curvado e baktron significa haste (HENRY, 2013). O gênero *Campylobacter* pertence à ordem Campylobacterales, família *Campylobacteraceae* e atualmente, existem 59 espécies e 16 subespécies (PARTE et al. 2020)

Espécies termofílicas de *Campylobacter* são capazes de crescer entre 37°C e 42°C, mas incapazes de crescer abaixo de 30°C, devido à ausência de genes de proteínas de choque frio que desempenham papel na adaptação às baixas

temperaturas, sendo a temperatura ótima de 41,5°C, representam o grupo denominado termofílico: *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari* e *C. upsaliensis* (SILVA et al., 2011; LOPES et al., 2021).

Bactérias deste gênero requerem um ambiente de microaerofilia, apresentando multiplicação máxima em atmosfera contendo aproximadamente 5% de O₂, 10% de CO₂ e 85% de N₂ (GARÉNAUX et al., 2008). Possuem metabolismo fastidioso, produzem a enzima oxidase (exceto para *C. gracilis*), possuem a capacidade de reduzir nitrato, podendo sintetizar, ou não, a enzima catalase, além da maioria das espécies não hidrolisar o hipurato (SANDSTEDT et al., 1983; ROOP et al., 1985).

Quanto à caracterização microscópica, trata-se de bastonete Gram-negativo móvel, em forma de saca-rolhas, o tamanho varia entre 0,5 a 5 por 0,2 a 0,8 µm, e são quimiorganotróficos, que obtêm suas fontes de energia de aminoácidos ou intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (VANDAMME, 2005). Todas as espécies do gênero *Campylobacter*, com exceção de *C. gracilis* (não móvel) e *Campylobacter showae* (flagelos peritríquios), possuem um flagelo único, polar e sem bainha em um ou ambos os lados da célula (MAN, 2011), que é usado para o movimento através de soluções viscosas, incluindo a camada de muco do trato gastrointestinal (LERTSEHTAKARN et al., 2011). Caracterizado pela incapacidade de formar endósporos e sob condições de estresse pode mudar a morfologia para a forma esférica ou cocoide (LASTOVICA et al., 2014).

Espécies de *Campylobacter* são capazes de colonizar a cavidade oral, intestino, estômago ou trato reprodutivo de humanos, animais de produção (como ovelhas, gado e veados), pássaros e répteis (LASTOVICA et al., 2014). O principal reservatório natural de espécies de *Campylobacter* termofílicos tem sido relatado em animais de sangue quente, incluindo a maioria dos mamíferos e aves (SILVA et al., 2011).

As aves são consideradas reservatórios importantes, possivelmente por propiciarem uma temperatura ótima de multiplicação, principalmente para as espécies termofílicas (HALD et al., 2016). Apesar do grande número de espécies, *C. jejuni* e *C. coli* possuem maior importância para saúde pública, sendo *C. jejuni* a espécie mais envolvida em casos de infecções humanas e também a mais prevalente em aves (KAAKOUSH, 2015; LIU, 2017). Entretanto, as aves também são consideradas reservatório de outras espécies, incluindo *C. lari*, *C. upsaliensis* e *C. concisus* (KAAKOUSH et al., 2014).

Anteriormente, *Campylobacter* spp. era considerado um comensal não patogênico no intestino de aves, mas esse conceito tem sido questionado (HUMPHREY et al., 2014; AWAD et al., 2018; CONNERTON et al., 2018). Diferentes linhagens de frango de corte produziram sinais inflamatórios na resposta imune inata à colonização bacteriana, o que levou a inflamação prolongada e diarreia (HUMPHREY et al., 2014). Além disso, foram relatadas mudanças na permeabilidade intestinal e histomorfologia, incluindo a diminuição da profundidade da cripta, altura das vilosidades e área de superfície em galinhas colonizadas por *Campylobacter* spp. (AWAD et al., 2015).

2.3. Mecanismos de virulência de *Campylobacter* spp.

Os mecanismos de virulência de *Campylobacter* spp. não são totalmente compreendidos, porém alguns fatores como: motilidade mediada por flagelos, adesão da bactéria à mucosa intestinal, capacidade de invasão, produção de toxinas e fatores quimiotáticos, estão relacionados à capacidade de virulência (KETLEY, 1997; VAN VLIET; KETLEY, 2001; WIECZOREK; OSEK, 2008; SILVA et al., 2011; BOLTON, 2015).

Um fator de importância para a virulência de *Campylobacter* spp. é a produção da Toxina Citoletal Distensora (do inglês cytolethal distending toxin, CDT) (YOUNG; DAVIS; DIRITA, 2007; SILVA et al., 2011). Composta por três subunidades codificadas pelos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*, as subunidades CDTA e CDTC são responsáveis pela ligação aos receptores da membrana celular, permitindo a entrada da subunidade enzimática ativa da toxina na célula, a subunidade CDTB, desse modo, quando combinadas, interagem entre si para formar uma holotoxina tripartida ativa que exibe toxicidade celular total (LARA-TEJERO e GALAN, 2001). Na célula hospedeira, a toxina age como a enzima desoxirribonuclease, bloqueando a quinase CDC2, essencial na transição para a fase G2 da mitose, e isso leva ao rompimento da dupla fita de DNA, fragmentação do núcleo e distensão celular, acarretando na apoptose da célula hospedeira (DASTI et al., 2010; SILVA et al., 2011; BOLTON, 2015; LAI et al., 2016).

Há uma maior atividade citotóxica quando há presença dos três genes, podendo levar à morte celular em até quatro dias após a infecção (GE et al., 2008). CDT está intimamente envolvido no processo de desenvolvimento da diarreia, uma

vez que, as toxinas promovem um distúrbio celular e nas vilosidades das células intestinais, causando uma erosão temporária com subsequente perda da absorção de nutrientes (KETLEY, 1997; VAN VLIET; KETLEY, 2001).

Mecanismo envolvido com a sobrevivência bacteriana em condições adversas, a produção da enzima superóxido desmutase, é codificada pelo gene *sodB* e confere proteção contra o ânion superóxido, dessa forma, bactérias microaerófilas, como *Campylobacter* spp., conseguem resistir ao estresse oxidativo, causado pela presença de oxigênio (BOLTON, 2015). Uma vez que mutação no gene *sodB* diminui a aerotolerância em *C. jejuni* (OH et al., 2015).

Quanto a adesão de *C. jejuni* aos enterócitos do hospedeiro, esta consiste em uma importante etapa para a colonização bacteriana, mediada por várias adesinas na superfície bacteriana que podem ser expressas pelos genes *cadF*, *racR*, *dnaJ* e *docA* (KETLEY, 1997; MULLER et al., 2006; POLY; GUERRY, 2008). O gene *dnaJ*, é responsável por codificar uma proteína de choque térmico (*heat shock*) e está intimamente ligado à adesão e colonização na célula hospedeira, pois mutações nesse gene provocaram uma severa redução no processo de colonização (KONKEL et al. 1998). Este mecanismo garante a sobrevivência do microrganismo às variações abruptas de temperatura (STINTZI, 2003).

Relacionados com a capacidade de resistência a antimicrobianos, a bomba de efluxo, codificada pelos genes *cmeA*, *cmeB* e *cmeC*, é um fator importante na infecção de *Campylobacter* spp (POOLE 2005; IOVINE, 2013, WIECZOREK; OSEK 2013). As três proteínas são codificadas por um operon de três genes (*cmeABC*), trabalhando em conjunto para expulsar substratos tóxicos de o interior da célula bacteriana (LIN et al. 2002).

O grupamento *cmeABC* também é um participante importante no efluxo de ácidos biliares e desempenha um papel crítico na facilitação da colonização do trato intestinal por *Campylobacter* spp. diminuindo a suscetibilidade ao ácido cólico (LIN et al. 2003). Pesquisas tem evidenciado que a inibição do sistema de efluxo CmeABC aumenta a suscetibilidade de *C. jejuni* a diferentes antibióticos, incluindo macrolídeos e quinolonas, que são drogas importantes para o tratamento da campilobacteriose humana (MAMELLI et al. 2003; NASCIMENTO et al. 2019).

2.4. Aspectos epidemiológicos

Um estudo de metanálise constatou uma alta prevalência de *Campylobacter* spp. termotolerante em alimentos de origem animal, especialmente em fígado e carcaças, leite e produtos lácteos, ovos e carnes processadas, podem ser fontes importantes de *Campylobacter* termotolerante. A carne de frango foi o alimento cru com maior prevalência de *C. jejuni* ($P < 0,001$) com níveis superiores a 27,6% em comparação com outros produtos de origem animal (ZBRUN et al., 2020).

Em humanos, um estudo realizado na Etiópia, verificou a prevalência combinada de espécies de *Campylobacter* entre crianças menores de 5 anos de idade e constatou uma prevalência de 10%, alguns fatores como o contato com animais domésticos, mães analfabetas, consumo de produtos de origem animal e o estado de higiene pessoal das mães, foram significativamente associados à prevalência encontrada (DIRIBA et al., 2021).

Estudos epidemiológicos encontraram altos índices de infecções assintomáticas, sendo comuns em crianças nos dois primeiros anos de vida, sendo associada com a excreção prolongada do microrganismo nas fezes (LEE et al., 2013; ROGAWSKI et al., 2018). Infecções ocasionadas por espécies como *C. jejuni* foram relacionadas com a diminuição do crescimento linear de crianças (VERAS et al., 2016; ROGAWSKI et al., 2018) e *C. jejuni* apresentou um maior índice de inflamação intestinal em crianças até dois anos de idade (HAQUE et al., 2019).

Casos de campilobacteriose tem apresentado uma sazonalidade característica com casos aumentando acentuadamente no verão (EFSA, 2022). Os casos de campilobacteriose têm sido positivamente associados à temperatura e em menor grau à precipitação de chuvas (LAKE et al., 2019). Estudos recentes têm inclusive evidenciado uma possível associação entre campilobacteriose e mudança climática global (KUHN et al., 2020).

2.5. Campilobacteriose e impacto na saúde pública

Os sintomas clássicos de infecções por *Campylobacter* (denominado campilobacteriose) incluem febre, diarreia aquosa ou sanguinolenta intensa, cólicas e perda de peso por 6 dias em média em humanos (VÉRON; CHATELAIN, 1973; KAAKOUSH et al., 2015). Em 2021, o número de casos confirmados de campilobacteriose humana teve um aumento de 2,1% em relação a 2020, correspondendo a uma taxa de notificação na União Europeia (EU) de 41,1 por 100.000 habitantes, além disso, mais de 10.000 casos de pessoas com

campilobacteriose e que precisaram ser hospitalizadas, tornando-se o segundo agente de transmissão alimentar mais comum associado ao número de hospitalizações, após salmonelose (EFSA, 2022). Os custos da campilobacteriose para os sistemas de saúde pública e para a perda de produtividade na UE é estimado pela EFSA em cerca de € 2,4 bilhões por ano (EFSA, 2014).

Campylobacter, são microrganismos responsáveis por zoonoses e a transmissão ocorre comumente pela via fecal-oral, através da ingestão de alimentos e água contaminados (GRZYBOWSKACHLEBOWCZYK et al., 2013; ROSNER et al., 2017). Os principais alimentos frequentemente contaminados são: leite cru, carne e derivados, frutas e vegetais (FACCIOLA et al., 2017; IGWARAN; OKOH, 2019; EFSA, 2022). A transmissão também pode ocorrer através do contato sexual (KUHN et al., 2021), mas principalmente por contato direto com animais, sejam de criação ou domésticos (EFSA, 2022), além da transmissão realizada por vetores, como moscas, que podem ter contato com alimentos contaminados (EVERS et al., 2016).

A dose infectante de *C. jejuni* em humanos pode ser tão baixa quanto 500 organismos e o período médio de incubação é de cerca de 3 dias (BLACK et al., 1988). A maioria das infecções é autolimitada e não requer terapia médica além de hidratação e equilíbrio eletrolítico (ACHESON; ALLOS, 2001). Algumas pessoas com risco de desenvolverem um quadro grave da doença, indica-se o tratamento com a utilização de antibióticos, fazem parte deste grupo: idosos com 65 anos ou mais, mulheres grávidas e pessoas com sistema imunológico comprometido, como pacientes portadores do vírus HIV ou recebendo quimioterapia (CDC, 2019). Portanto, *C. jejuni* e *C. coli* foram as principais causas de campilobacteriose em humanos em 2021 (EFSA, 2022).

A campilobacteriose também tem sido associada a uma variedade de condições gastrointestinais, como doenças inflamatórias intestinais (DII), periodontite, doença esofágica, distúrbios gastrointestinais funcionais, doença celíaca e câncer de cólon em humanos (VÉRON; CHATELAIN, 1973; KAAKOUSH et al., 2015). A síndrome do intestino irritável pós-infecciosa (PI-IBS) é uma sequela importante da infecção por *Campylobacter* spp., verificou-se que indivíduos infectados têm um risco muito maior de desenvolver esta síndrome em comparação com aqueles não diagnosticados com infecção (WALTER et al., 2019).

Além disso, infecções por *C. jejuni* podem levar a distúrbios autoimunes conhecidos como síndrome de Guillain-Barré (GBS) e síndrome de Miller Fisher (HEIKEMA et al., 2013). Os subtipos mais comuns de GBS são polineuropatia desmielinizante inflamatória aguda (AIDP) e neuropatia axonal motora aguda (AMAN) e *C. jejuni* é responsável por cerca de um terço dos casos de GBS com apresentação de quadros mais graves quando comparado a outras causas (FINSTERER, 2022). A Síndrome Hemolítico Urêmica (SHU), também pode estar relacionada com infecções por *Campylobacter* spp., entretanto, os mecanismos relacionados a toxina Shiga (Stx) ou neuraminidase, no desenvolvimento de SHU em infecções por este patógeno, precisam ser melhor estudados (KARPOVICH et al., 2020).

2.6. Resistência bacteriana

O uso indiscriminado de antibióticos para combater doenças infecciosas tem levado ao surgimento de muitas bactérias resistentes a antibióticos, que se tornaram um problema mundial de saúde pública. Nos últimos anos, vários estudos relataram a resistência de cepas de *C. jejuni* (MELO et al., 2019; ELHADIDY et al., 2020). Dados da EU revelaram uma estreita associação entre os antibióticos administrados aos animais e o desenvolvimento e disseminação da resistência antimicrobiana (AMR) em humanos (EFSA, 2019).

No Brasil, uma pesquisa relatou que 62,8% dos isolados de *Campylobacter* spp. foram classificados como multirresistentes (MDR), com resistência a amoxicilina-clavulanato (49,4%), tetraciclina (51,8%) e ciprofloxacino (50,6%) e co-resistência a macrolídeos e fluoroquinolonas (37,1%), perfis multivirulentos foram identificados principalmente em isolados de carcaças de frango (84,8%), e a emergência de estirpes MDR/virulentas foi determinada em isolados de porco e para carcaças de frango, a virulência geral foi maior em *C. jejuni* (54,3%), seguido por *C. coli* (24%) e *Campylobacter* spp. (21,7%), as altas taxas de resistência e virulência reforçam a existência de pressão de seleção de cepas no país, além do risco potencial de cepas isoladas não só de carcaças de frango, mas também de outras matrizes cárneas (TAKEUCHI et al., 2022).

O alto nível de resistência antimicrobiana em isolados de *Campylobacter*, representa uma ameaça à saúde pública, devido ao potencial de transmissão para os seres humanos (POUDEL et al., 2022). Estima-se que em 2019, houveram 448.400

infecções e 70 mortes foram causadas por *Campylobacter* spp. multirresistente, responsável por 270 milhões de dólares em custos médicos diretos todos os anos e infecções por isolados resistentes são mais comuns em países de baixa e média renda, com infecções que podem ser mais difíceis tratar (CDC, 2019). Aves infectadas podem explicar a maioria das infecções humanas e a multirresistência apresentada por isolados de *Campylobacter* spp. é preocupante, pois isolados são resistentes aos antibióticos considerados drogas de primeira escolha para infecções humanas (KANAAN; MOHAMMED, 2020).

A resistência às fluoroquinolonas é especialmente preocupante, pois em muitos países a maioria dos isolados de *Campylobacter* spp. não é suscetível a essa classe de antibióticos (GHARBI et al., 2018; GARCIA-FERNANDEZ et al., 2018; KAYMAN et al., 2019; SCHIAFFINO et al., 2019). Uma característica única da resistência às fluoroquinolonas, é sua persistência contínua ou mesmo prevalência aumentada mesmo na ausência de uso de antibióticos (LUANGTONGKUM et al., 2009). Esse fato foi evidenciado em um estudo publicado na Austrália, onde as fluoroquinolonas nunca foram usadas em aves, mas a taxa de resistência às fluoroquinolonas em isolados de *C. jejuni* de origem avícola aumentou recentemente em aproximadamente 15% (ABRAHAM et al., 2020).

Com relação à resistência a macrolídeos, nos Estados Unidos (EUA) apenas 29% apresenta suscetibilidade diminuída a fluoroquinolonas (por exemplo, ciprofloxacina) ou macrolídeos (por exemplo, azitromicina), os antibióticos usados para tratar infecções graves por *Campylobacter* spp. (CDC, 2019), enquanto que em países em desenvolvimento tem sido relatada alta prevalência de isolados resistentes a macrolídeos (SHOBO et al., 2016; WANG et al., 2016; LI et al., 2017).

Nas regiões onde se sabe que a resistência às fluoroquinolonas é altamente prevalente, os antibióticos macrolídeos (por exemplo, azitromicina) devem ser considerados como a primeira linha de antibióticos para o tratamento terapêutico da campilobacteriose (TRIBBLE, 2017). Para infecção sistêmica, os antibióticos aminoglicosídeos, como a gentamicina, continuam sendo a opção terapêutica, uma vez que isolados de *Campylobacter* spp. são geralmente suscetíveis a essa classe de antibióticos; no entanto, o surgimento de genes de resistência a aminoglicosídeos e ilhas genômicas de resistência a múltiplas drogas, representam uma ameaça à utilidade clínica dos aminoglicosídeos (QIN et al., 2012; ZHAO et al., 2015).

Desse modo, a antibioticoterapia em pacientes humanos, deve considerar antibióticos alternativos, quando os antibióticos de primeira linha não forem eficazes, porém, estudos adicionais em ambientes clínicos são necessários para identificar as alternativas ideais, além disso, esforços adicionais devem ser direcionados para desenvolver adjuvantes antibióticos que possam melhorar a utilidade dos antibióticos existentes e desenvolver novas abordagens para o controle de infecções por *Campylobacter* spp. (DAI et al., 2020).

2.7. Estratégias de controle e profilaxia

As medidas mais eficazes para mitigar *Campylobacter* spp. concentram-se na fase de produção primária, no entanto, as medidas aplicadas durante o abate e processamento complementam as abordagens gerais de higiene da carne, reduzindo a contaminação fecal durante o abate e processamento e, como consequência, auxiliam na redução deste patógeno na carne de frango, tais medidas de intervenção ao nível do abate e processamento incluem melhorias higiênicas gerais, inovações tecnológicas e/ou medidas de descontaminação que são aplicadas em fases únicas de abate ou processamento (ALTER; REICH, 2021). Uma redução de $3 \log^{10}$ nas concentrações cecais de frangos, é capaz de reduzir em 58% o risco relativo de campilobacteriose humana atribuível à carne de frango na EU (BIOHAZ et al., 2020)

Em 2018, a Comissão Europeia (CE) implantou um Critério de Higiene de Processo (PHC) para *Campylobacter* spp. em frangos de corte exigindo intervenção se um nível limite de 1000 UFC/g para amostras de pele do pescoço após o resfriamento de carcaças na planta de processamento for excedido (EC, 2017). O limite PHC se aplica a 50 amostras de 10 sessões de amostragem consecutivas e inicialmente um máximo de 15 amostras foi permitido para exceder 1000 CFU/g, o número de amostras permitidas para exceder o limite do PHC será reduzido de 15 para 10 amostras em 2025 (EFSA, 2022).

Contagens elevadas de *Campylobacter* de até 10^9 CFU/g podem estar presentes em cecos de frangos de corte (IJAZ et al., 2018). Durante a evisceração, pode ocorrer ruptura ou vazamento de vísceras, resultando na contaminação do conteúdo cecal das carcaças e do ambiente de processamento (EFSA, 2011). Tal contaminação em carcaças pode resultar na sobrevivência desse patógeno em produtos de aves crus durante sua vida útil, potencialmente infectando humanos (LI

et al., 2019). No entanto, sabe-se que bactérias do gênero *Campylobacter* são bem adaptadas para sobreviver em ambientes de processamento de alimentos (YAHARA et al., 2017). A adaptação para persistir na cadeia alimentar é facilitada pela alta diversidade genotípica (HANSSON et al., 2018) e diversos fatores de virulência (CANTERO et al., 2018).

A associação de três medidas de controle pode ser utilizada como estratégia eficaz: 1) a implementação de medidas de biossegurança como a desinfecção de equipamentos e a obrigatoriedade da utilização de medidas de higiene da equipe de trabalhadores (mãos, botas, roupas), para evitar a contaminação do lote e a transmissão do agente infeccioso entre os diferentes lotes; 2) cuidados com a alimentação dos animais com o uso de substâncias inibidoras como óleos essenciais, ácidos orgânicos, produtos derivados de plantas, prebióticos, probióticos, bacteriocinas e bacteriófagos; e 3) estratégias de imunização passiva ou vacinação (MEUNIER et al., 2016). Essas medidas de prevenção e controle, como o uso de simbióticos, combinados com estratégias de biossegurança no nível de fazendas, controle de vetores invertebrados e medidas higiênicas no abate de animais, pode reduzir de forma significativa a carga de infecções por espécies como *C. jejuni* (BAFFONI et al., 2017).

Desta forma, uma redução da colonização intestinal de *Campylobacter* spp. em frango é uma importante estratégia para reduzir o patógeno em abatedouros e o risco para desencadeamento da doença pelo consumo de carne contaminada (MEUNIER et al., 2016). Entretanto, as abordagens não se concentram em uma única medida de intervenção e a educação de todas as partes interessadas (incluindo varejistas, manipuladores de alimentos e consumidores), é fundamental a conscientização sobre a presença de patógenos transmitidos por alimentos em carne crua e produtos à base de carne (ALTER; REICH, 2021).

A carne de frango contaminada pode atuar como um veículo para *Campylobacter* spp., que pode se disseminar facilmente para equipamentos de cozinha, como tábuas de corte, pratos e facas (ERIKSSON et al., 2023). Dados da Europa, relatam que 40% dos surtos de doenças transmitidas por alimentos ocorrem em casa (EFSA, 2019). Todavia, o risco pode variar de acordo com a carga de contaminação do frango e práticas do consumidor, que podem sofrer modificações ao longo do tempo, entre países ou em um mesmo país, devido as diferenças de cultura gastronômica, economia, educação sanitária, produtos alimentares disponíveis e

clima (MORETRO et al., 2021). Portanto, evitar a contaminação cruzada de aves cruas, trocando as tábuas de corte e realizando a lavagem das mãos adequadamente, é frequentemente incluído nas mensagens de segurança alimentar (ANSES, 2020; CDC, 2020; OMS, 2020).

Uma abordagem mais recente tem demonstrado a possibilidade em determinar o melhor local para as ações de controle de *Campylobacter* spp. utilizando o conceito da Saúde Única, observando populações e integrando dados de diferentes componentes de vigilância ao longo da cadeia alimentar, principalmente para patógenos transmitidos por alimentos, essa abordagem integrada com base no risco pode facilitar a alocação otimizada de recursos e pode melhorar a relação custo-benefício dos programas nacionais destinados a reduzir o risco de infecção/doença em humanos (FODDAI et al., 2022).

2.8. Probióticos e bacteriocinas na produção animal

A crescente preocupação com a resistência a antibióticos em *Campylobacter* spp. aumentou os esforços de pesquisa no desenvolvimento de estratégias para controle deste patógeno, diante dos casos de campilobacteriose humana que ocorrem principalmente devido a ingestão de alimentos contaminados, e o controle dessa doença requer mitigação nos reservatórios animais e no hospedeiro humano (DAI et al., 2020). Há uma necessidade particular de novos agentes antimicrobianos, especificamente aqueles direcionados contra bactérias resistentes a antibióticos (FAIR; TOR, 2014).

Dentre as várias estratégias que estão sendo desenvolvidas para o controle de *Campylobacter* spp. em animais de produção, destaca-se o uso de probióticos e bacteriocinas, os probióticos são culturas microbianas viáveis que podem se estabelecer no trato gastrointestinal (TGI) do animal hospedeiro e provocar benefícios de saúde e nutrição, além disso, o estabelecimento precoce de probióticos no TGI pode servir como uma barreira à colonização de patógenos de origem alimentar, desse modo são um potencial aditivo alimentar para reduzir e eliminar a colonização de *Campylobacter* spp. no TGI de aves (DENG et al., 2020).

Os principais efeitos benéficos dos probióticos relacionam-se principalmente com o aumento da digestibilidade e biodisponibilidade dos alimentos, estimulação do sistema imunológico, melhoria da saúde e composição química das carcaças (ALKHALF et al., 2010; DHAMA et al., 2011; KIM et al., 2016).

Ao longo dos anos, estudos verificaram que a utilização de probióticos na produção avícola tem efeitos promissores na redução da colonização intestinal por *Campylobacter* spp. em frangos de corte (MORISHITA et al., 1997; ARSI et al., 2015; SMIAŁEK et al., 2021). As bactérias probióticas são capazes de inibir o crescimento da microflora patogênica no trato gastrointestinal das aves, devido ao esgotamento de nutrientes no ambiente, ao bloqueio de receptores-alvo para patógenos na superfície das células epiteliais ou à produção de agentes antibacterianos naturais conhecidos como bacteriocinas (SAINT-CYR et al., 2017).

Bacteriocinas, são pequenos peptídeos de origem bacteriana que exibem atividades antibacterianas ao lisar a membrana da bactéria (COTTER et al., 2005). E são consideradas uma alternativa potencial para antibióticos tradicionais, esses peptídeos, que são produzidos por muitas bactérias, podem ter alta potência e baixa toxicidade, podem ser produzidos *in situ* por probióticos e podem ser modificados por bioengenharia, apresentando amplo ou estreito espectro de atuação (COTTER et al., 2013). Ao contrário dos antibióticos, as bacteriocinas podem ser projetadas para se fixar em qualquer lugar na membrana celular externa, pois não possuem um receptor específico (BONHI; IMRAN, 2019) e podem ser produzidas *in situ* por probióticos (DOBSON et al., 2012; O' SHEA et al., 2012).

Os ensaios de atividade antimicrobiana *in vitro* são o primeiro passo para avaliar a capacidade biológica das bacteriocinas contra patógenos bacterianos clinicamente relevantes (ANSARI et al., 2018; PENG et al., 2019), conseqüentemente, isso representa um novo caminho na pesquisa de bacteriocinas que, sem dúvida, levará ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas com aplicações clínicas de grande relevância (CHIKINDAS et al., 2018).

Constituinte de uma classe de bacteriocinas, as enterocinas são substâncias produzidas por *Enterococcus* spp. e que apresentam eficiência contra bactérias gram-negativas e gram-positivas; eles são resistentes a uma grande variedade de temperaturas e níveis de pH, além de serem facilmente destruídos por proteases digestivas (MARTÍNEZ-BUENO; GÁLVEZ, 2017).

Algumas espécies de *Enterococcus* como: *E. faecium* e *E. faecalis* são conhecidos produtores de enterocinas, *E. hirae*, *E. mundtii* e *E. durans* foram identificados como potenciais produtores (JAOUANI et al., 2014; TOSONI et al., 2019). Pesquisas tem demonstrado a eficiência de enterocinas no controle de bactérias

patogênicas (ERGİNKAYA et al., 2019; TOSONI et al., 2019; FATHIZADEH et al., 2020).

Em geral, a utilidade das bacteriocinas como agente terapêutico para o tratamento de *Campylobacter* spp. requer mais investigação, particularmente, a eficácia *in vivo* de várias bacteriocinas precisa ser verificada e reproduzida em condições naturais na produção avícola, apesar de comprovadamente seguros e eficazes, o uso comercial requer produção econômica de bacteriocinas em grandes quantidades (DAI et al., 2020).

2.9. Métodos de diagnóstico

2.9.1. Isolamento microbiológico

O isolamento microbiológico de *Campylobacter* spp., em amostras com menor contaminação bacteriana e baixo nível de microflora de fundo e/ou com células bacterianas estressadas, requer uma etapa inicial de enriquecimento, que pode ser o caldo Bolton, em seguida a amostra deve ser incubada em atmosfera microaeróbica a 37°C por 4h a 6h e depois a 41,5°C por 44h, a partir da cultura de enriquecimento, devem ser utilizados dois meios sólidos seletivos: Ágar Carvão-Cefoperazona-Desoxicolato Modificado (ágar mCCD) e qualquer outro meio sólido seletivo para *Campylobacter* usando princípios seletivos diferentes daqueles do ágar mCCD, para confirmação das colônias, as espécies de *Campylobacter* podem ser identificadas por testes bioquímicos específicos e/ou métodos moleculares (ISO 10272-1:2017).

Uma pesquisa que avaliou diferentes métodos de isolamento, utilizou 25g de carne de frango moída contaminadas com 0,25 mL de inóculo contendo *C. jejuni* ATCC 33291 e verificou um melhor resultado utilizando uma temperatura de 42°C por 48 horas; os caldos de enriquecimento testados foram o caldo Brucella e caldo Bolton suplementado com antimicrobianos (10mg de cefoperazona, 10mg de vancomicina, 10mg de trimetoprim e 5mg de anfotericina), sendo que o caldo Bolton apresentou uma melhor recuperação de células bacterianas viáveis (TEJADA; TIMM, 2019).

Existe uma variedade de meios seletivos, embora numerosas formulações de meios tenham sido descritas na literatura, ressalta-se aquelas que tenham sido usadas recente ou frequentemente: meios que incluem sangue como Skirrow, Campy-Cefex, Butzler (ou butzler modificado), Preston e Exeter e meios livres de sangue

como Ágar Karmali, mCCDA – Modified Charcoal, Cefoperazone, Deoxicolato Ágar ou Ágar base Columbia (BRASIL, 2011; TEJADA; TIMM, 2019).

Colônias de *Campylobacter* não são hemolíticas, podem ser: lisas, convexas, brilhantes e com bordas perfeitas; ou ainda planas, translúcidas e lustrosas, com bordas irregulares e espalhadas. As características macroscópicas são intimamente relacionadas ao ágar utilizado, mas geralmente são incolores, com tonalidades creme ou acinzentada, e diâmetro de 1-2 mm, podendo ainda ser puntiformes com 4-5 mm (VOSS-RECH; VAZ, 2012). As colônias características nos ágares são analisadas morfológica e bioquimicamente pela coloração de Gram. O gênero *Campylobacter* é constituído de bactérias Gram negativas com formato de bastonetes delgados espiralados ou em forma de “asa de gaivota” ou “S”, podendo apresentar forma filamentosa ou cocóide nos cultivos de longos períodos. Provas de produção das enzimas oxidases e catalase são utilizadas, sendo a espécie *C. jejuni* oxidase e catalase positivas (BRASIL, 2011).

2.9.2. Métodos moleculares

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica de biologia molecular que consiste na síntese enzimática *in vitro* de cópias de fragmentos específicos de ácidos nucleicos, onde a partir de uma única molécula de DNA molde, é possível gerar até 100 bilhões de moléculas similares em uma reação, a técnica consiste basicamente em três etapas: a dupla fita de DNA é desnaturada pelo calor; em seguida, cada primer (senso e anti-senso) anela a uma das fitas simples do DNA e após, ocorre o processo de extensão e polimerização da fita, a partir da adição de nucleotídeos e ação da Taq DNA polimerase (HASS; TORRES, 2016).

Os iniciadores ou primers são fitas de DNA geralmente com 18-22 nucleotídeos (A, T, C, G) sintetizados *in vitro*, tendo como base uma sequência de nucleotídeos complementares às sequências que delimitam o fragmento de ácido nucléico a ser amplificado, o resultado é evidenciado em gel de agarose submetido à eletroforese e as bandas são visualizadas posteriormente sob luz ultravioleta, através do equipamento chamado de transiluminador (HASS; TORRES, 2016).

As atuais tecnologias de tipagem molecular, como Multi-Locus Sequence Typing (MLST), Comparative Genomic Fingerprinting (CGF) ou, mais recentemente, sequenciamento de todo o genoma, nos permitem atribuir grupos de subtipos e

relacionar aos hospedeiros mais comuns (SHEPPARD et al., 2009; CLARK et al., 2012; ON, 2013).

A tipagem metagenômica combinada com o sequenciamento isolado, fornece maior resolução da diversidade genética de *Campylobacter jejuni* em aves, esta técnica pode ser implementada em abordagens de vigilância clínica e ambiental, potencialmente com uma etapa adicional de enriquecimento para amostras de baixa biomassa, uma das principais vantagens dos dados metagenômicos, é que permitem a detecção de combinações de cepas e com isso permite-se descobrir ligações entre amostras e, portanto, identificar hospedeiros ou reservatórios de *C. jejuni* (HEROLD et al., 2023).

2.9.3. Matrix Associated Laser Desorption-Ionization – Time of Flight (MALDI-TOF)

Matrix Associated Laser Desorption-Ionization – Time of Flight (MALDI-TOF), se caracteriza por um tipo de espectrometria de massas, que é utilizada no estudo das massas de átomos, moléculas ou fragmentos de moléculas. De uma forma geral, a espectrometria de massas baseia-se em propriedades físicas do analito de forma a determinar a relação entre a massa e a carga (m/z) de espécies ionizadas em fase gasosa (AEBERSOLD; MANN, 2003). Os espectrômetros de massas são constituídos pelos seguintes componentes: fonte de ionização para a obtenção de íons, analisador de massas, para a separa os íons formados; detector desses íons e sistema de aquisição dos dados (ASSIS et al., 2011).

As fontes de ionização empregadas são ESI (Electrospray Ionization) e MALDI (Matrix Assisted Lazer Desorption Ionization) e os analisadores são os quadrupolos, íon-traps, time of flight (TOF), orbitrap, entre outros (GLISH; VACHET, 2003).

A técnica MALDI, normalmente usa um ácido orgânico como matriz. A matriz além de fornece um próton para o processo de ionização da amostra também absorve a energia emitida pelo laser (light amplification stimulated energy radiation) e desencadear um processo de dessorção, que possibilita a passagem da amostra em estado sólido para o estado gasoso (ASSIS et al., 2011).

Essa técnica aplicada à identificação de microrganismos realiza a análise da bactéria como uma mistura de biomoléculas como proteínas, carboidratos, lipídios, DNA, RNA, entre outros, que apresentam massas moleculares diferentes. A mistura de moléculas gera um espectro de massas que é característico de cada espécie.

Diferentes microrganismos apresentam diferentes espectros de massas e mesmos microrganismo apresenta o mesmo perfil de espectro de massas independente da condição de cultivo (ASSIS et al., 2011).

Os resultados do processo padrão de correspondência são expressos como proposto pelo fabricante, com valores de log(score) variando de 0 (sem similaridade) a 3 (identidade absoluta). Para cada isolado, o valor de log(score) mais alto de uma correspondência em relação ao espectro em o banco de dados será usado para identificação. Valores de registro (pontuação) $\geq 2,0$ são classificados como identificação no nível de espécie, enquanto valores $\leq 1,7$ e $< 2,0$ são classificados como identificação pelo menos ao nível de gênero. Resultados baseados em valores de log (pontuação) de $< 1,7$ são classificados como não adequados para identificação pelo MALDI (ASSIS et al., 2011).

2.9.4. Inovações metodológicas

2.9.4.1. Amplificação Isotérmica Mediada por Loop (LAMP)

Uma nova tecnologia empregada para detecção de *C. jejuni* e *C. coli* em amostras de enxaguadura de carcaças frango, obteve bons resultados, essa metodologia basea-se em sete conjuntos de iniciadores direcionados aos genes *hipO* e *ceuE* e cinco conjuntos de iniciadores de amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP), as reações LAMP foram realizadas por 100 minutos a 65°C usando um dispositivo personalizado “Diagnostic Droid” que monitora as reações e interpreta os resultados para o usuário (MASON et al., 2019).

Observou-se uma forte correlação entre contagens de células baseadas em cultura e detecção de *C. jejuni* ou *C. coli* por amplificação isotérmica mediada por loop das mesmas amostras. Este ensaio foi considerado altamente específico e capaz de distinguir entre amostras que estão dentro ou acima da meta estabelecida pela indústria de 6.000 unidades formadoras de colônias (UFC) por carcaça (equivalente a 12 UFC por ml de enxágue de frango) com precisão $> 90\%$ em relação aos métodos baseados em cultura (MASON et al., 2019).

Outro estudo obteve bons resultados para detecção de *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari* em meio de enriquecimento primário de amostras de espinafre frescas contaminadas artificialmente, indicando que o método pode ser utilizado como triagem em vigilância de campo, aplicado também em outras matrizes alimentares, por permitir rastrear

rapidamente a presença de *Campylobacter* spp. (BABU et al., 2020). Diferentes métodos rápidos de diagnóstico foram testados e verificou-se que aproximadamente 70% dos lotes positivos de frango de corte para *Campylobacter* foram detectados usando uma amplificação isotérmica de DNA, portanto o emprego desta metodologia deve ser avaliada, pois apesar de ser mais acessível a baixa sensibilidade apresentada deve ser considerada (LLARENA et al., 2022).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Pesquisar espécies de *Campylobacter*, genes de virulência, resposta à ação de enterocinas e antimicrobiana *in vitro*, em carcaças e frangos de corte.

3.2. Específicos

- Pesquisar *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari* em carcaças de frangos de corte resfriadas e congeladas, comercializadas nas grandes redes de supermercados localizados em Recife-PE;
- Pesquisar *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari* em suabes de cloaca de frangos de corte provenientes de granjas localizadas no estado de Pernambuco;
- Detectar por meio da PCR o gênero e as espécies de *Campylobacter* provenientes de carcaças e suabes de cloaca de frangos de corte;
- Identificar diferentes espécies de *Campylobacter* por meio da técnica MALDI-TOF, provenientes dos isolados de suabes de cloaca de frangos de corte;
- Identificar em quais locais da carcaça apresentam maior ocorrência de contaminação por espécies de *Campylobacter*;
- Detectar em espécies de *Campylobacter* por meio da PCR os genes de virulência: *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*, *sodB*, *dnaJ*, *cmeA*, *cmeB*, *cmeC*;
- Avaliar a resposta antagonista *in vitro* de enterocinas frente as espécies de *Campylobacter*;
- Avaliar a resistência antimicrobiana frente as espécies de *Campylobacter*;
- Verificar a percepção dos profissionais do setor avícola sobre *Campylobacter* spp., e o impacto para saúde pública, mediante aplicação de questionário investigativo.

REFERÊNCIAS

- ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual 2023**. Disponível em: <https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2023/04/Relatorio-Anual-2023.pdf>. Acesso em: 03 jul. 2023.
- ABRAHAM, S. et al. Emergence of fluoroquinolone resistant *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* among Australian chickens in the absence of fluoroquinolone use. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 86, n. 8, p. e02765-e02719, 2020.
- ACHESON D., ALLOS B. M. *Campylobacter jejuni* infections: update on emerging issues and trends. **Doenças Infecciosas Clínicas**, v. 32, n. 8, p. 1201-1206, 2001.
- AEBERSOLD, R., MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 42, p. 198-207, 2003.
- ALABOUDI, A. R. et al. Prevalence, antibiotic resistance and genotypes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from chickens in Irbid governorate, Jordan. **International Journal of Food Microbiology**, v. 327, p. 108656, 2020.
- ALKHALF, A.; ALHAJ, M.; AL-HOMIDAN, I. Influence of probiotic supplementation on immune response of broiler chicks. **Egyptian Poultry Science Journal**, v. 30, n. 1, p. 271-280, 2010.
- ALTER, T.; REICH, F. Management strategies for prevention of *Campylobacter* infections through the poultry food chain: A european perspective. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 431, p. 79-102, 2021.
- ANSARI, A. et al. Screening, purification and characterization of thermostable, protease resistant Bacteriocin active against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **BMC Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 192, 2018.
- ANSES. Agência Francesa para a Saúde e Segurança Alimentar, Ambiental e Ocupacional, 2020. **Kitchen hygiene tips**. Disponível em: <https://www.anses.fr/en/content/kitchen-hygiene-tips>. Acesso em: 12 dez. 2022.
- ARSI, K. et al. The efficacy of selected probiotic and prebiotic combinations in reducing *Campylobacter* colonization in broiler chickens. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 24, n. 3, p. 327-334, 2015.
- ASSIS, D. M., JULIANO, M.A., JULIANO, L. Espectrometria de massas aplicada na classificação e identificação de microorganismos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações**, v. 9, n. 2, p. 344-355, 2011.
- ASUMING-BEDIAKO, N. et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of *Campylobacter jejuni* in raw retail chicken meat in metropolitan Accra, Ghana. **International Journal of Food Microbiology**, v. 376, p. 109760, 2022.
- AWAD, W. A. et al. *Campylobacter* infection in chickens modulates the intestinal epithelial barrier function. **Imunidade Inata**, v. 21, n. 2, p. 151-160, 2015.
- AWAD, W. A.; HESS, C.; HESS, M. Re-thinking the chicken–*Campylobacter jejuni* interaction: A review. **Avian Pathology**, v. 47, n. 4, p. 352-363, 2018.
- BABU, U. S. et al. A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the consensus detection of human pathogenic *Campylobacter* species. **Journal of Microbiological Methods**, v. 176, p. 106009, 2020.

- BAFFONI, L., et al. Evidence of *Campylobacter jejuni* reduction in broilers with early synbiotic administration. **International Journal of Food Microbiology**, v. 251, p. 41-47, 2017.
- BHARDWAJ, D. K., Taneja, N. K., Taneja P., Patel. P. Phenotypic and genotypic characterization of multi-drug resistant, biofilm forming, human invasive strain of *Salmonella* Typhimurium SMC25 isolated from poultry meat in Índia. **Building and Environment**, v. 173, p. 105830, 2022.
- BIOHAZ. EFSA Panel on Biological Hazards, et al. Update and review of control options for *Campylobacter* in broilers at primary production. **EFSA Journal**, v. 18, n. 4, p. 6090, 2020.
- BLACK, R. E. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. **Journal of Infectious Diseases**, v. 157, n. 3, p. 472-479, 1988.
- BLASER, M. J. Epidemiologic and clinical features of *Campylobacter jejuni* infections. **Journal of Infectious Diseases**, v. 176, n. 6, p. 103-105, 1997.
- BOLTON, D. J. *Campylobacter* virulence and survival factors. **Food Microbiology**, v. 48, p. 99-108, 2015.
- BONHI, K. L. R.; IMRAN, S. Role of bacteriocin in tackling the global problem of multi-drug resistance: an updated review. **Bioscience Biotechnology Research Communications**, v. 12, n. 3, p. 601-608, 2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Campylobacter***. Secretaria de Vigilância em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolfo Lutz. Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 40 p.
- BUTZLER, J. P.; DEKEYSER, P.; DETRAIN, M.; DEHAEN, F. Related vibrios in stools. **The Journal of Pediatrics**, v. 82, n. 3, p. 493-495, 1973.
- CANTERO, G. et al. Characterization of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* broiler isolates by whole-genome sequencing. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 15, n. 3, p. 145-152, 2018.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Antibiotic Resistance Threats in the United States**. 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf>. Acesso em: 02 jan. 2023.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Four steps to food safety: Clean, separate, cook, chill**. 2020. Disponível em: <https://www.cdc.gov/foodsafety/keep-food-safe.html>. Acesso em: 06 dez. 2022.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Guillain-Barré Syndrome**. Acesso em: <https://www.cdc.gov/campylobacter/guillain-barre.html#:~:text=About%20%20in%20every%20%2C000had%20a%20recent%20Campylobacter%20infectio>. Acesso em: 23 out. 2022.
- CHIKINDAS, M. L. et al. Functions and emerging applications of bacteriocins. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 49, p. 23-28, 2018.
- CLARK, C. G. et al. Comparison of molecular typing methods useful for detecting clusters of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolates through routine surveillance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 798-809, 2012.

Commission Regulation (EU). The European Commission Commission Regulation (EU) 2017/1495 of 23 August 2017 amending Regulation (EC) No 2073/2005 as regards *Campylobacter* in broiler carcasses. **Official Journal of the European Union**, p. 1-6, 2017.

CONNERTON, P. L., et al. The effect of the timing of exposure to *Campylobacter jejuni* on the gut microbiome and inflammatory responses of broiler chickens. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 88, 2018.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 777-788, 2005.

COTTER, P. D.; ROSS, R.; HILL, C. Bacteriocins — A viable alternative to antibiotics? **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, p. 95-105, 2013.

DAI, L.; SAHIN, O.; GROVER, M.; ZHANG, Q. New and alternative strategies for the prevention, control, and treatment of antibiotic-resistant *Campylobacter*. **Translational Research**, v. 223, p. 76-88, 2020.

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

DENG, W. et al. Current perspectives and potential of probiotics to limit foodborne *Campylobacter* in poultry. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 583429, 2020.

DHAMA, K.; et al. Applications of probiotics in poultry: Enhancing immunity and beneficial effects on production performances and health—A review. **Journal of Immunology and Immunopathology**, v. 13, n. 1, p. 1-19, 2011.

DIRIBA, K.; AWULACHEW, E.; ANJA, A. Prevalence and associated factor of *Campylobacter* species among less than 5-year-old children in Ethiopia: a systematic review and meta-analysis. **European Journal of Medical Research**, v. 26, n. 1, p. 2, 2021.

DOBSON, A.; COTTER, P. D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Bacteriocin production: a probiotic trait? **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 1, p. 1-6, 2012.

EFSA. European Food Safety Authority. **EFSA explains zoonotic diseases** (2014). Disponível em: https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate_publications/files/factsheetcampylobacter.pdf. Acesso em: 05 mar. 2023.

EFSA. European Union one health 2021 zoonoses report. **EFSA Journal**, v. 20, n. 12, p. 7666, 2022.

EFSA. Scientific Opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. **EFSA Journal**, v. 9, n. 4, p. 2105, 2011.

EFSA. The European Union one health 2018 zoonoses report. **EFSA Journal**, v. 17, n. 12, p. e05926, 2019.

EFSA. The European Union one health 2018 zoonoses report. **EFSA Journal**, v. 17, p. e05926, 2019.

ELHADIDY, M. et al. Antimicrobial resistance patterns and molecular resistance markers of *Campylobacter jejuni* isolates from human diarrheal cases. **PloS One**, v. 15, n. 1, p. e0227833, 2020.

- ERGİNKAYA, Z.; ULUDAĞ, H.; TURHAN, E. Ü. Antibacterial activity of partially purified enterocins from foodborne and clinical enterococci against some pathogenic bacteria. **Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, v. 66, p. 373-378, 2019.
- ERIKSSON, D. et al., Survival of *Campylobacter jejuni* in frozen chicken meat and risks associated with handling contaminated chicken in the kitchen. **Food Control**, v. 145, p. 109471, 2023.
- ERYILDIZ, C. et al. Investigation of antimicrobial resistance and virulence genes of *Campylobacter* isolates from patients in a tertiary hospital in Edirne, Turkey. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 157-161, 2020.
- EVERS, E. G. et al. Transmission of ESBL-Producing *Escherichia coli* and *Campylobacter* from poultry farms to humans through flies. **Risk Analysis**, v. 36, n. 2, p. 215-27, 2016.
- FACCIOLÀ, A. et al. *Campylobacter*: from microbiology to prevention. **Journal of Preventive Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 2, p. 79-92, 2017.
- FAIR, R. J.; TOR, Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. **Perspectives in Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 25-64, 2014.
- FATHIZADEH, H. et al. Evaluation of antibacterial activity of enterocin A-colicin E1 fusion peptide. Iran. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 23, n. 11, p. 1471-1479, 2020.
- FINSTERER J. Triggers of Guillain–Barré Syndrome: *Campylobacter jejuni* predominates. **Jornal Internacional de Ciências Moleculares**, v. 23, n. 22, p. 14222, 2022.
- FODDAI, A.; NAUTA, M.; ELLIS-IVERSEN, J. Risk-based control of *Campylobacter* spp. in broiler farms and slaughtered flocks to mitigate risk of human campylobacteriosis – A One Health approach. **Microbial Risk Analysis**, v. 21, p. 100190, 2022.
- GARCIA-FERNANDEZ, A. et al. Human campylobacteriosis in Italy: emergence of multi-drug resistance to ciprofloxacin, tetracycline, and erythromycin. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1906, 2018.
- GARÉNAUX, A.; et al. *Campylobacter jejuni* strains from different origins under oxidative stress conditions: effect of temperature. **Current Microbiology**, v. 56, n.4, p. 293-297, 2008.
- GE, Z; SCHAUER, D; FOX, J. In vivo virulence properties of bacterial cytolethal-distending toxin. **Cellular Microbiology**, v. 10, p. 8, p. 1599-1607, 2008.
- GHARBI M. et al. Distribution of virulence and antibiotic resistance genes in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from broiler chickens in Tunisia. **Journal of Microbiology**, v. 55, p. 1273-1282, 2022.
- GHARBI, M. et al. Prevalence and antibiotic resistance patterns of *Campylobacter* spp. isolated from broiler chickens in the north of Tunisia. **BioMed Research International**, v. 2018 p. 1-7, 2018.
- GLISH, G.L., VACHET, R.W., The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 2, p. 140-150, 2003.
- GRZYBOWSKA-CHLEBOWCZYK, U. et al. Clinical course of *Campylobacter* infections in children. **Pediatrics Polska**, v. 88, p. 329-334, 2013.

- HALD, B. et al. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in wild birds on Danish livestock farms. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 58, n. 11, 2016.
- HANSSON, M. et al. Knowledge gaps in control of *Campylobacter* for prevention of campylobacteriosis. **Transbound Emerging Diseases**, v. 65, p. 30-48, 2018.
- HAQUE, M.A. et al. Determinants of *Campylobacter* infection and association with growth and enteric inflammation in children under 2 years of age in low-resource settings. **Scientific Reports**, v.9, n. 1, p. 17124, 2019.
- HASS, D. J; TORRES, A. C. D. Aplicações das técnicas de PCR no diagnóstico de doenças infecciosas dos animais. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, n. 26, 2016.
- HEIKEMA, A. P. et al. Siglec-7 specifically recognizes *Campylobacter jejuni* strains associated with oculomotor weakness in Guillain–Barré syndrome and Miller Fisher syndrome. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 2, p. E106-E112, 2013.
- HENRY R. Etymology: *Campylobacter*. **Emerging infectious diseases**, v.19, n. 8, p. 1313, 2013.
- HEREDIA, N.; GARCÍA, S. Animals as sources of food-borne pathogens: a review. **Animal Nutrition**, v. 4, n. 3, p. 250-255, 2018.
- HEROLD, M. et al. Metagenomic strain-typing combined with isolate sequencing provides increased resolution of the genetic diversity of *Campylobacter jejuni* carriage in wild birds. **Microorganisms**, v. 11, n. 1, p. 121, 2023.
- HUMPHREY, S. et al. *Campylobacter jejuni* is not merely a commensal in commercial broiler chickens and affects bird welfare. **mBio**, v. 5, n. 4, p. e01364-14, 2014.
- IGWARAN A.; OKOH A. I. Human campylobacteriosis: A public health concern of global importance. **Heliyon**, v. 5, n. 11, p. e02814, 2019.
- IJAZ, U. Z. et al. Comprehensive longitudinal microbiome analysis of the chicken cecum reveals a shift from competitive to environmental drivers and a window of opportunity for *Campylobacter*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2452, 2018.
- INTERNATIONAL STANDARD. ISO 10272-2 (2017): **Microbiology of the food chain — Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp.** Suíça. 2017.
- IOVINE E. N. M. Resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni*. **Virulence**, v. 4, n. 3, p. 230-240, 2013.
- JAOUANI, I. et al. High inhibition of *Paenibacillus larvae* and *Listeria monocytogenes* by *Enterococcus* isolated from different sources in Tunisia and identification of their bacteriocin genes. **Letters in Applied Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 17-25, 2014.
- KAAKOUSH N. O.; CASTAÑO-RODRÍGUEZ, N.; MITCHELL, H. M.; MAN, S. M. Global epidemiology of *Campylobacter* infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 687-720, 2015.
- KANAAN, M. H. G.; MOHAMMED F. A. Antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* from poultry meat in local markets of Iraq. **Plant Archives**, v. 20, n. 1, p. 410-415, 2020.

- KARPOVICH, G. S. et al. The hemolytic uremic syndrome: a possible etiological role of *Campylobacter* infection. **Almanac of Clinical Medicine**, v. 48, n. 4, p. 246-253, 2020.
- KAYMAN, T.; ABAY, S.; AYDIN, F.; SAHIN, O. Antibiotic resistance of *Campylobacter jejuni* isolates recovered from humans with diarrhoea in Turkey. **Journal of medical microbiology**, v. 68, n. 2, p. 136-142, 2019.
- KEENSWIJK, W. et al. Hemolytic Uremic Syndrome associated with non-shigatoxin-producing infectious agents: expanding the shigatoxin theory. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 41, n. 3, p. e179-e181, 2019.
- KEENSWIJK, W. et al. Hemolytic Uremic Syndrome associated with non-shigatoxin-producing infectious agents: expanding the shigatoxin theory. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 41, n. 3, p. e179-e181, 2019.
- KETLEY, J. M. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. **Microbiology**, v. 143, p. 5-21, 1997.
- KIM, H. W. et al. Effects of probiotics feeding on meat quality of chicken breast during postmortem storage. **Poultry Science**, v. 95, p. 1457-1464, 2016.
- KONKEL, M. E. et al. Characterization of thermal stress response of *Campylobacter jejuni*. **Infectious and Immunology**, v. 66, p. 362-366, 1998.
- KUHN, K. G. et al. *Campylobacter* infections expected to increase due to climate change in Northern Europe. **Scientific Reports**, v. 10, p. 13874, 2020.
- LAI, C. K.; et al. Molecular mechanisms and potential clinical applications of *Campylobacter jejuni* Cytolethal Distending Toxin. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, p. 1-9, 2016.
- LAKE, I. R. et al. Exploring *Campylobacter* seasonality across Europe using the European Surveillance System (TESSy), 2008 to 2016. **Euro Surveillance**, v. 24, n. 13, p. 1800028, 2019.
- LARA-TEJERO, M.; GALAN, J. E. *CdtA*, *CdtB*, and *CdtC* form a tripartite complex that is required for cytolethal distending toxin activity. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 4358-4365, 2001.
- LASTOVICA, A. J.; ON, S. L. W.; ZHANG, L. **The Family *Campylobacteraceae***. In: ROSENBERG, E.; DELONG, E. F.; LORY, S.; STACKEBRANDT, E.; THOMPSON, F. (eds). *The Prokaryotes*. Berlin: Springer, 2014.
- LEE, G. et al. Symptomatic and asymptomatic *Campylobacter* infections associated with reduced growth in Peruvian children. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n.1, p. e2036, 2013.
- LERTSEHTAKARN, P.; OTTEMANN, K. M.; HENDRIXSON, D. R. Motility and chemotaxis in *Campylobacter* and *Helicobacter*. **Annual Review of Microbiology**, v. 65, p. 389-410, 2011.
- LI, B. et al. Antimicrobial resistance of *Campylobacter* species isolated from broilers in live bird markets in Shanghai, China. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 14, n. 2, p. 96-102, 2017.
- LI, M. et al. Global disease burden of pathogens in animal source food. **PloS One**, v. 14, n. 6, p. e0216545, 2019.

- LIN J.; MICHEL L. O.; ZHANG Q. CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, p. 2124-2131, 2002.
- LIN J.; SAHIN O.; MICHEL L. O.; ZHANG Q. Critical role of multidrug efflux pump CmeABC in bile resistance and in vivo colonization of *Campylobacter jejuni*. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 4250-425, 2003.
- LIU, G.; NIE, R.; LIU, Y.; MEHMOOD, A. Combined antimicrobial effect of bacteriocins with other hurdles of physicochemical and microbiome to prolong shelf life of food: A review. **Science of the Total Environment**, v. 825, p. 154058, 2022.
- LLARENA, A. K., et al. Rapid detection of *Campylobacter* spp. in chickens before slaughter. **Food Microbiology**, v. 103, p. 103949, 2022.
- LOPES, G. V. et al. Virulence factors of foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. **Microbial Pathogenesis**, v. 161, p. 105265, 2021.
- LUANGTONGKUM, T. et al. Antibiotic resistance in *Campylobacter*: emergence, transmission and persistence. **Future Microbiology**, v. 4, n. 2, p. 189-200, 2009.
- MAMELLI L., AMOROS J. P., PAGÈS J. M.; BOLLA J. M. A phenylalaninearginine β -naphthylamide sensitive multidrug efflux pump involved in intrinsic and acquired resistance of *Campylobacter* to macrolides. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 22, n. 3, p. 237-241, 2003.
- MAN, S. M. The clinical importance of emerging *Campylobacter* species. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 8, n. 12, p. 669-685, 2011.
- MARTÍNEZ-BUENO, M.; GÁLVEZ, A. Effect of combined physico-chemical treatments based on enterocin AS-48 on the control of *Listeria*. **Food Control**, v.21, n. 4, p. 478-486, 2017.
- MASON, M. G.; BLACKALL, P. J.; BOTELLA, J. R.; TEMPLETON, J. M. Na easy-to-perform, culture-free *Campylobacter* point-of-management assay for processing plant applications. **Journal of Applied Microbiology**, v.128, n. 3, p. 620-629, 2019.
- MELO, R. T. et al. Evolution of *Campylobacter jejuni* of poultry origin in Brazil. **Food Microbiology**, v. 82, p. 489-496, 2019.
- MEUNIER, M.; GUYARD-NICODÈME, M. DORY, D.; CHEMALY, M. Control strategies against *Campylobacter* at the poultry production level: biosecurity measures, feed additives and vaccination. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, n. 5, p. 1139-1173, 2016.
- MORETRO, T. et al. Consumer practices and prevalence of *Campylobacter*, *Salmonella* and norovirus in kitchens from six European countries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 347, p. 109172, 2021.
- MORISHITA, T. Y. et al. Evaluation of an avian-specific probiotic to reduce the colonization and shedding of *Campylobacter jejuni* in broilers. **Avian Diseases**, v. 41, n. 4, p. 850-855, 1997.
- MOTA-GUTIERREZ, J. et al. *Campylobacter* spp. prevalence and mitigation strategies in the broiler production chain. **Food Microbiology**, v. 104, p. 103998, 2022.
- MÜLLER, J.; SCHULZE, F.; MÜLLER, W.; HÄNEL, I. PCR detection of virulence associated genes in *Campylobacter jejuni* strains with differential ability to invade Caco-2 cells and to colonize the chick gut. **Veterinary Microbiology**, v. 113, p.123-129, 2006.

- NAFARRATE, I., LASAGABASTER, A.; SEVILLANO, E.; MATEO, E. Prevalence, molecular typing and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* spp. isolates in northern Spain. **Journal of Applied Microbiology**, v. 130, n. 4, p. 1368-1379, 2021.
- NASCIMENTO R. J. et al. Detection of efflux pump CmeABC in enrofloxacin resistant *Campylobacter* spp. strains isolated from broiler chickens (*Gallus gallus domesticus*) in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 39, n. 9, p. 728-733, 2019.
- NAUTA, M. et al. An updated assessment of the effect of control options to reduce *Campylobacter* concentrations in broiler caeca on human health risk in the European Union. **Microbial Risk Analysis**, v. 21, p. 100197, 2022.
- O'SHEA, E. F. et al. Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: bacteriocins and conjugated linoleic acid. **International Journal of Food Microbiology**, v. 152, n. 3, p. 189-205, 2012.
- OH, E.; MCMULLEN, L.; JEON, B. Impact of oxidative stress defense on bacterial survival and morphological change in *Campylobacter jejuni* under aerobic conditions. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 29, 2015.
- OMS, 2020. **Five keys to safer food**. Disponível em: https://www.who.int/foodsafety/publications/consumer/en/5keys_en.pdf?ua=1. Acesso em: 12 dez. 2022.
- OMS. Organização Mundial da Saúde. **Food safety**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>. Acesso em 21 out. 2022.
- ON S. L. W. Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 1S-15S, 2001.
- PARTE, A. C., et al. List of prokaryotic names with standing in nomenclature (Ipsn) moves to the DSMZ. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, p. 5607-5612, 2020. Disponível em: <https://lpsn.dsmz.de/search?word=campylobacter>. Acesso em 22 fev. 2023.
- PENG, J. et al. Antibacterial mechanism of peptide Cec4 against *Acinetobacter baumannii*. **Infection and Drug Resistance**, v. 12, p. 2417-2428, 2019.
- POLY, F.; GUERRY, P. Pathogenesis of *Campylobacter*. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 24, p. 27-31, 2008.
- POOLE K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 1, p. 20-51, 2005.
- POUDEL, S. et al. Prevalence, antimicrobial resistance, and molecular characterization of *Campylobacter* isolated from broilers and broiler meat raised without antibiotics. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 3, p. e00251-22, 2022.
- QIN, S. et al. Identification of a novel genomic island conferring resistance to multiple aminoglycoside antibiotics in *Campylobacter coli*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 10, p. 5332-5339, 2012.
- RANGARAJU, V. et al. Occurrence, antimicrobial resistance and virulence properties of thermophilic *Campylobacter coli* originating from two different poultry settings. **Gene Reports**, v. 27, p. 101618, 2022.

RASSCHAERT, G.; ZUTTER, L.; HERMAN, L.; HEYNDRICKX M. *Campylobacter* contamination of broilers: the role of transport and slaughterhouse. **International Journal of Food Microbiology**, v. 322, p. 108564, 2020.

ROGAWSKI, E.T. et al. Use of quantitative molecular diagnostic methods to investigate the effect of enteropathogen infections on linear growth in children in low-resource settings: longitudinal analysis of results from the MAL-ED cohort study. **The Lancet. Global health**, v. 6, n.12, p. 1319-1328, 2018.

ROOP, R. M.; SMIBERT R. M.; JOHNSON J. L.; KRIEG N. R. DNA homology studies of the catalase-negative *Campylobacters* and "*Campylobacter fecalis*," an emended description of *Campylobacter sputorum*, and proposal of the neotype strain of *Campylobacter sputorum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 9, p. 823-831, 1985.

ROSNER, B. M. et al. A combined case-control and molecular source attribution study of human *Campylobacter* infections in Germany, 2011-2014. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-12, 2017.

SAINT-CYR, M. J.; et al. Use of the potential probiotic strain *Lactobacillus salivarius* SMXD51 to control *Campylobacter jejuni* in broilers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 247, p. 9-17, 2017.

SANDSTEDT, K.; URSING, J.; WALDER, M. Thermotolerant *Campylobacter* with no or weak catalase activity isolated from dogs. **Current Microbiology**, v. 8, p. 209-213, 1983.

SCHIAFFINO, F. et al. Antibiotic resistance of *Campylobacter* species in a pediatric cohort study. **Antimicrob Agents and Chemother**, v. 63, n. 2, p. e01911-e01918, 2019.

SCHREYER, M. E. et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* identified in a slaughterhouse in Argentina. **Current Research in Food Science**, v. 5, p. 590-597, 2022.

SELIWIORSTOW, T. et al. *Campylobacter* carcass contamination throughout the slaughter process of *Campylobacter*-positive broiler batches. **International Journal of Food Microbiology**, v. 194, p. 25-31, 2015.

SELIWIORSTOW, T. et al. Identification of risk factors for *Campylobacter* contamination levels on broiler carcasses during the slaughter process. **International Journal of Food Microbiology**, v. 226, p. 26-32, 2016.

SHEPPARD, S. K. et al. *Campylobacter* genotyping to determine the source of human infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 8, p. 1072–1078, 2009.

SHOBO, C. O. et al. Antibiotic resistance profiles of *Campylobacter* species in the South Africa private health care sector. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 10 n. 11, p. 1214-1221, 2016.

SILVA, J. et al. *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: A review. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, p. 200, 2011.

SKIRROW, M. B. John McFadyean and the centenary of the first isolation of *Campylobacter* species. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. 9, p. 1213-1217, 2006.

- SMIAŁEK, M.; KOWALCZYK, J.; KONCICKI A. The use of probiotics in the reduction of *Campylobacter* spp. prevalence in poultry. **Animals**, v. 11, p. 1-13, 2021.
- STINTZI, A. Gene expression profile of *Campylobacter jejuni* in response to growth temperature variation. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 6, p. 2009-2016, 2003.
- TAKEUCHI, M. G. et al. Agents of Campylobacteriosis in Different Meat Matrices in Brazil. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 10, p. 6087, 2022.
- TANG, B. et al. 2022. Prevalence of the phenicol resistance gene *fexA* in *Campylobacter* isolated from the poultry supply chain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 381, p. 109912.
- TEJADA, T. S.; TIMM, C. D. Eficiência de diferentes protocolos para isolamento de *Campylobacter jejuni* de carne de frango. **Ciência Animal Brasileira**, v. 20, p. 1-7, 2019.
- THOMAS, K. M. et al. 2020. Prevalence of *Campylobacter* and *Salmonella* in african food animals and meat: a systematic review and meta-analysis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 315, p. 108382, 2020.
- TOSONI, N. F. et al. Antimicrobial activity of enterocin obtained from *Enterococcus durans* on Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. **Ciência Rural**, v. 49, n. 9, p. e20190297, 2019.
- TRIBBLE, D. R. Resistant pathogens as causes of traveller's diarrhea globally and impact(s) on treatment failure and recommendations. **Journal of Travel Medicine**, v. 24, p. S6-S12, 2017.
- VAN VLIET, A. H. M.; KETLEY, J. M. Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 45-56, 2001.
- VANDAMME, P. **Taxonomy of the family Campylobacteraceae**. In: NAMCHAMKIN, I.; BLASER, M. J. (eds). *Campylobacter*, Washington: ASM, 2000. p. 3-27.
- VANDAMME, P.; DEBRUYNE, L.; BRANDT, E.; FALSEN, E. Reclassification of bacteroides ureolyticus as *Campylobacter ureolyticus* comb. nov., and emended description of the genus *Campylobacter*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. (Pt9), p. 2016-2022, 2010.
- VANDAMME, P.; DEWHIRST, F. E.; PASTER, B. J.; ON, S. L. W. *Campylobacteraceae*. In: GARRITY, G. M.; BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. (eds). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, vol 2. New York: Springer Science, 2005. p. 1147-1160.
- VERAS, H. N. et al. Combination of different methods for detection of *Campylobacter* spp. in young children with moderate to severe diarrhea. **Journal of Microbiological Methods**, v. 128, p. 7-9, 2016.
- VÉRON, M.; CHATELAIN, R. Taxonomic study of the genus *Campylobacter* Sebald and Véron and designation of the neotype strain for the type species, *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and Véron. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 23, n. 2, p. 122-134, 1973.
- VOSS-RECH, D.; VAZ, C. S. L. Técnicas laboratoriais para isolamento de *Campylobacter* em material avícola. In: **Workshop de Diagnóstico Microbiológico**

de Campylobacter Aplicado à Avicultura. Anais [...]. Santa Catarina: Embrapa Suínos e Aves, 2012. p. 21-28.

WALTER, E. J. S.; CRIM, S. M.; BRUCE, B. B.; GRIFFIN, P. M. Postinfectious irritable bowel syndrome after *Campylobacter* infection. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 114, n. 10, p. 1649-1656, 2019.

WANG, T. et al. Characterization of erm(B)-carrying *Campylobacter* spp. of retail chicken meat origin. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 30, p.173-177, 2022.

WANG, Y. et al. Species shift and multidrug resistance of *Campylobacter* from chicken and swine, China, 2008-14. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, p. 666-669, 2016.

WIECZOREK K.; OSEK J. Antimicrobial resistance mechanisms among *Campylobacter*. **BioMed Research**, 2013.

WIECZOREK, K.; OSEK, J. Identification of virulence genes in *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolates by PCR. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 52, n. 2, p. 211-216, 2008.

YAHARA, K. et al. Genome-wide association of functional traits linked with *Campylobacter jejuni* survival from farm to fork. **Environmental Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 361-380, 2017.

YANG, H. Prevalence, drug resistance spectrum and virulence gene analysis of *Campylobacter jejuni* in broiler farms in central Shanxi, China. **Poultry Science**, v. 102, n. 3, p. 102419, 2013.

YOUNG, K. T.; et al. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 665–679, 2007.

ZBRUN, M. V. et al. Worldwide meta-analysis of the prevalence of *Campylobacter* in animal food products. **Research in Veterinary Science**, v. 132, p. 69-77.

ZHAO, S. et al. Novel gentamicin resistance genes in *Campylobacter* isolated from humans and retail meats in the USA. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 5, p. 1314-1321, 2015.

4. ARTIGO 1

Perfil de genes de virulência, ação de enterocinas e resistência antimicrobiana de espécies de *Campylobacter* isoladas de carcaças de frangos de corte

(Artigo formatado para o periódico Brazilian Journal of Microbiology)

**Virulence gene profile, enterocin action and antimicrobial resistance of
Campylobacter species isolated from broiler chicken carcasses**

Saruanna Millena dos Santos Clemente^a, Samuel Fernando dos Santos^a, Priscilla Régia de Andrade Calaça^b, Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares^b, Webert Aurino da Silva^c, Renata Pimentel Bandeira de Melo^a, Rinaldo Aparecido Mota^a, Mércia Rodrigues Barros^a

^a Federal Rural University of Pernambuco, (Department of Veterinary Medicine), Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CP 52171-900, Recife, (Pernambuco), Brazil.

^b Federal Rural University of Pernambuco, (Department of Animal Morphology and Physiology), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CP 52171-900, Recife, (Pernambuco), Brazil.

^c Federal Rural University of Pernambuco, (Zootechnics Department), Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CP 52171-900, Recife, (Pernambuco), Brazil.

*Corresponding author. Tel.: +55 81 3320 6427/6425. E-mail address: saruannam@gmail.com.

Abstract

Campylobacteriosis is among the most reported zoonoses in the world, caused by species of *Campylobacter*, this disease is characterized by gastroenteritis in humans. The main species involved is *Campylobacter jejuni*, followed by *Campylobacter coli*. Contaminated chicken meat is often identified as an important factor related to human cases and Brazil is the largest exporter of chicken meat in the world, which makes the characterization of brazilian isolates crucial for the establishment of control measures. Samples of chicken carcasses were analyzed following ISO 10272-2 guidelines for the isolation of *Campylobacter* spp. The isolates were tested by PCR to identify genus, species *C. jejuni*, *C. coli* and *C. lari* and genes *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*, *sodB*, *dnaJ*, *cmeA*, *cmeB*, *cmeC*. The assessment of antibiotic susceptibility was performed by the standard disc diffusion method. The antimicrobial activity was determined using the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) method of enterocins, according to CLSI. A total of 376 positive isolates were obtained for *Campylobacter* spp., with 26 (7.0%) positive isolates for *C. jejuni*. The highest frequency of *C. jejuni* was obtained in chilled carcasses with 88.5% ($p < 0.0001$), in frozen carcasses a frequency of 11.5% was found. The most frequent site of *C. jejuni* was the chest skin (27.0%), skin wing (23.0%), skin cloaca (19.0%) and skin neck (8.0%), gizzard (15.0%) and liver (8.0%), and no significant differences were found between the sites sampled. *C. coli* and *C. lari* isolates were not found. The gene frequency was determined in: *cdtA* (11.5%),

cdtB (11.5%), *cdtC* (19.0%), *sodB* (34.5%), *dnaJ* (11.5%), *cmeA* (15.0%), *cmeB* (15.0%) and *cmeC* (15.0%). The presence of the three efflux pump genes was detected in four isolates (15.3%) and three (11.5%) isolates were positive for all evaluated genes. In 100% (n = 26) of the *C. jejuni* isolates, multidrug resistance to three or more classes of antimicrobials was found. The index of multiple resistance to antimicrobial drugs (IRMA) ranged from 0.4 to 1.0 among isolates of *C. jejuni*. The antimicrobial activity of enterocins was able to inhibit at least 98.5% of the growth of all *C. jejuni* isolates. Therefore, chilled chicken carcasses present a greater risk of contamination than frozen carcasses, however, despite the risk reduction after freezing, the consumption of frozen animal products cannot be considered a unique method for the prevention of campylobacteriosis. The adoption of antimicrobial consumption monitoring systems in animal production is necessary and new investigations must be carried out to explore the use of probiotic strains in the control of *Campylobacter*, as their use has shown promising results.

Keywords: animal products; antibiotics; campylobacteriosis; poultry; probiotics; public health

1. Introduction

The most reported zoonosis in the EU, campylobacteriosis is caused by species of *Campylobacter* sp. characterized by gastroenteritis in humans, with *Campylobacter jejuni* being the main species involved, followed by *Campylobacter coli*. According to EFSA's Biological Hazards Panel (BIOHAZ) [1], the handling, preparation and consumption of chicken meat may be responsible for 20% to 30% of human cases of campylobacteriosis [2]. In 2021, the number of confirmed cases of human campylobacteriosis increased by 2.1% compared to 2020, with an EU notification rate of 41.1 per 100,000 population [3].

Poultry is widely recognized as the natural host of *Campylobacter* species. Colonization rates in broiler flocks range from 3% to 90%, with the highest rates found in flocks older than 3 weeks [4,5]. The colonization of the GIT of poultry usually proceeds without any distinct clinical manifestations and affects the small intestine, the cecum, and the cloaca, however, the extent of the appearance of clinical signs can be attributed to the immune system's responsiveness to *Campylobacter* spp infection [6].

Campylobacter may still be related to Hemolytic Uremic Syndrome [7, 8] and it is estimated that 1 in every 1,000 people infected with *Campylobacter* is diagnosed with Guillain-Barré Syndrome in the United States [9]. In addition to the damage generated to human health, the occurrence of this disease causes a series of losses to the sectors involved, in low- and middle- income countries, approximately 600 million people get sick and with that are lost in productivity and medical expenses, around US\$ 110 billion each year resulting from the consumption of unsafe food [10].

Brazil occupies a prominent place on the world stage in food production, as the largest exporter and second largest producer of chicken meat in the world [11]. Despite the zoonotic potential, Brazilian legislation does not recommend the control of *Campylobacter* spp., in addition, the underreporting of Campylobacteriosis cases represents an important risk factor for the world population. Therefore, interest in this pathogen in developing countries has been driven by the increasing resistance trend of *Campylobacter* spp. all around the world [12-15]. In this sense, there is a need for research to support preventive actions in the production chain and guarantee the safety of the final product offered to the consumer.

The objective of this study to identify *Campylobacter* species and virulence genes related to human infections. As well as evaluating the response of these isolates to antimicrobial action and the effectiveness of using enterocins as biological control.

2. Material and methods

2.1. Sample Location and Collection

The study analyzed broiler carcasses sold in three large supermarket chains, located in Recife-PE. The samples were packed in isothermal boxes (2–8°C) with recyclable ice and sent to the Meat and Milk Inspection Laboratory (LICAL) of the Department of Veterinary Medicine (DMV) of the Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE). Carcasses from six companies were evaluated and all carcasses had the Federal Inspection Seal (SIF) or State Inspection Seal (SIE). In this study, 12 chilled carcasses and 12 frozen carcasses were collected, totaling 24 carcasses, the following samples were collected from each carcass: chest skin, wing skin, cloaca skin, neck skin, gizzard and liver, totaling 144 samples.

2.2. Isolation de *Campylobacter* spp. and phenotypic identification

Samples were analyzed following ISO 10272-2 [16] guidelines for the isolation of *Campylobacter* spp. Initially, 10g of each sample was kept in Bolton Broth (Acumedia®) supplemented with vancomycin (10mg) and amphotericin (10mg), and stirred for 1 minute in a Stomacher (Matoli® Model: 100M048). For the recovery of injured cells, the samples were kept at $41.5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ for 48h, under microaerobic conditions. After enrichment, the samples were seeded on Charcoal Cefoperozone Desoxycholate - CCDA (Acumedia®) and Campy Cefex agar (Acumedia®), both supplemented with vancomycin (10mg) and amphotericin (10mg) and subsequently incubated under the same conditions of time and temperature already mentioned. Suspected colonies of *Campylobacter* spp., based on the colony morphology for each medium used, were selected and replicated for new cultures in Columbia Blood Agar (Himedia®) supplemented with defibrinated sheep blood, following the same incubation pattern. All isolates with typical colony morphology were submitted to the Gram staining procedure and catalase test for further identification by polymerase chain reaction (PCR).

2.3. DNA extraction

Genomic DNA from all isolates was extracted using a thermal extraction protocol [17]. The DNA obtained was quantified in a spectrophotometer with absorbance readings of 260 nm. Samples were stored in a freezer at -20°C until PCR analysis.

2.4. Molecular identification

The identification of *Campylobacter* spp., *C. jejuni*, *C. coli* and *C. lari* was performed by PCR through the identification of the 16S rDNA, *mapA*, *ceuE* and *glyA* genes, respectively, the following virulence genes were also detected: *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*, *sodB*, *dnaJ* and genes related to antimicrobial resistance: *cmeA*, *cmeB*, *cmeC*, the sequence of primers and references are described below (Table 1). The PCR thermal profile used for detection of the *Campylobacter* genus was as follows: 94°C for 6 min for initial denaturation followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 50 s, annealing temperature at 57°C for 40 s, primer extension step at 72°C for 50 s, and final extension step at 72°C for 3 min. For detection of *C. jejuni* and *C. coli*, the following were used: 95°C for 5 min for initial denaturation followed by 30 cycles of denaturation at 95°C for 1 min, annealing temperature at 54°C for 1 min, primer extension step at 72°C for 1 min and final extension step at 72°C for 10 min. The detection of *C. lari* was according to the thermal profile contained in the reference used for primer. For detection of virulence and resistance genes, the thermal profile used was: 95°C for 1 min for initial denaturation followed by 35 cycles of denaturation at 95°C for 1 min, annealing temperature at 55°C for 1 min, primer extension at 72°C for 1 min and final extension step at 72°C for 5 min. Reference strains were used as positive controls and milli-q water as a negative control. The PCR products were subjected to electrophoresis in 1.5% agarose gel for 60 minutes at 80 V. At the end of the run, BlueGreen stained gels (LGC biotechnology) were visualized under ultraviolet light and photographed.

2.5. Reference Strains

The reference strains *C. jejuni* (ATCC 29428), *C. coli* (CCAMP 1068), *C. lari* (CCAMP 1012) and for the *cmeA*, *cmeB*, *cmeC*, *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*, *dnaJ*, *sodB* genes (CCAMP1064 and CCAMP 1065), were kindly provided by the Bacterial Zoonoses Laboratory of Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz. The *Enterococcus faecium* EF141V strain belongs to a bacteriotheque at the Bioactive Products Technology Laboratory (LABTECBIO) at UFRPE.

2.6. Antibiotic Susceptibility Profile

Antibiotic susceptibility assessment was performed for ten antibiotics by the standard disk diffusion method, according to [18]. Isolates were recovered and bacterial cells were removed from Columbia agar (Himedia®) to prepare suspensions adjusted to 0.5 MacFarland scale. Each suspension was inoculated onto Mueller-Hinton agar (Himedia®) supplemented with 5% defibrinated horse blood, incubated at $41.5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ for 48h in a microaerobic atmosphere.

Antimicrobial susceptibility testing was performed for ampicillin (AMP), ciprofloxacin (CIP), clindamycin (CLI), doxycycline (DOX), erythromycin (ERY), fosfomicin (FOS), gentamicin (GEN), norfloxacin (NOR) and tetracycline (TET), the cutoff points recommended by the European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing [18] were used. For enrofloxacin (ENR) the breakpoints recommended by the Institute of Clinical and Laboratory Standards for Veterinary Antimicrobial Susceptibility Testing [19] were used (Table 2).

The multiple antimicrobial resistance index (IRMA) was calculated according to the methodology described by Kruperman [20]. This index is determined by the ratio between the number of antimicrobials that the sample is resistant to and the total number of antimicrobials tested.

2.7. Antimicrobial activity of enterocins

The antimicrobial activity was determined using the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) method of enterocins against *C. jejuni* isolates, according to CLSI [21]. To carry out the test, an *Enterococcus faecium* EF141V strain was used at an initial concentration of 500mg/mL, filtered at $0.22\mu\text{m}$ (Milipore Milllex®). Each suspension was performed in triplicate, with repetitions for counterproofs, using Muller Hinton broth medium (Himedia®). Then, the enterocins were added in microdilution plates, and the following concentrations were obtained: 500, 250, 125, 100, 62.5, 50, 31.25, 25, 15.25, 12.5 and 6.25 mg/mL. Then, the isolates were added at a concentration of 0.5 on the McFarland scale (equivalent to 10^8 cells/mL), and incubated at $41.5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ for 48 hours. After incubation the plates were read in a spectrophotometer (iMark™ Bio-Rad®) with a 595 nm filter.

The percentages of growth inhibition and different concentrations of enterocins for each microorganism were calculated according to Gudiña et al [22], as described in the following equation: Growth Inhibition: $[1-(Ac/A0)] \times 100$. Where, Ac represents the absorbance of the well with a concentration of enterocins and A0 the absorbance

of the control well (without enterocins). The result represents the percentage of microbial cells that the tested substance was able to inhibit by 90.0%. To confirm the quantitative findings, readings were performed with Resazurin developer at a concentration of 100 µg/mL, in which 30 µL were added to each well of the microplate with the MIC. After 2 hours of incubation in a dark chamber, the absence of microbial growth was evaluated, represented by the blue color and the presence of growth by the pink color [23].

2.8. Statistical analysis

The statistical analysis used was the chi-square test and Fisher's Exact Test using the SAS 9.4 statistical program. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1 Frequency of *Campylobacter* species in chilled and frozen carcasses

A total of 376 positive isolates were obtained for *Campylobacter* spp., with 26 (7.0%) positive isolates for *C. jejuni*. The highest frequency of *C. jejuni* was obtained in chilled carcasses with 88.5% ($p < 0.0001$), in frozen carcasses a frequency of 11.5% was found. The most frequency site of *C. jejuni* was the skin of the breast (27.0%), followed by skin of the wing (23.0%), skin of the cloaca (19.0%) and skin of the neck (8.0%), gizzard (15.0%), liver (8.0%) no significant differences were found between the sites sampled. *C. coli* and *C. lari* isolates were not found (Table 3). All evaluated carcasses from different companies showed positive isolates for *Campylobacter* spp. and three companies had positive isolates for *C. jejuni* (Figure 1).

3.2 Antimicrobial resistance and multidrug profiles of *C. jejuni*

The analysis of *C. jejuni* antimicrobial resistance shows isolates having higher resistance to clindamycin (100%), doxycycline (100%), erythromycin (100%), tetracycline (100%), ciprofloxacin (88.5%), enrofloxacin (88.5%) and norfloxacin (88.5%). Moreover, part of the isolates showed resistance to ampicillin (57.7%) and gentamicin (50.0%). The smallest number of isolates (7.7%) were resistant to fosfomicin (Figure 2).

Multidrug resistance to three or more classes of antimicrobials was found in 100% ($n = 26$) of *C. jejuni* isolates. All isolates were resistant to clindamycin, erythromycin, doxycycline and tetracycline, referring to the classes: lincosamides,

macrolides and tetracyclines, respectively. The most frequent pattern of antimicrobial resistance was CLI-DOX-ERY-TET-AMP-CIP-GEN-NOR-ENR, present in 31.0% of the isolates. Furthermore, one isolate was resistant to all tested antimicrobials (Table 4). In the present study, the index of multiple resistance to antimicrobial drugs (IRMA) ranged from 0.4 to 1.0 among isolates of *C. jejuni*, with most isolates (34.6%) presenting an index of 0.9 (Table 5).

3.3 Frequency of virulence and resistance genes of *C. jejuni*

C. jejuni isolates showed a higher frequency of *sodB*, responsible for encoding a response to stress and survival, was detected in 10 isolates (34.5%). The genes encoding the cytolethal distending toxin showed different frequencies, *cdtA* and *cdtB* were detected in three isolates (11.5%), while *cdtC* was detected in five isolates (19.0%). With similar frequency to *cdtA* and *cdtB*, the *dnaJ* gene, involved in the adhesion mechanism, was detected in three isolates (11.5%).

Related to antimicrobial resistance, the presence of the three efflux pump genes was detected in four isolates (15.3%). Furthermore, three (11.5%) isolates were positive for all evaluated genes (Figure 3). Virulence profiles were determined through association of virulence genes (Table 6).

3.4 Resistance and virulence genes related to antimicrobial resistance of *C. Jejuni*

Only one (3.8%) isolate showed resistance to all antimicrobial groups tested and the *cmeA*, *cmeB* and *cmeC* genes were detected. In three (11.5%) isolates that presented all investigated genes, they also showed resistance to most antimicrobials, of these, two (7.7%) isolates were resistant to ampicillin, ciprofloxacin, clindamycin, doxycycline, erythromycin, enrofloxacin, gentamicin, norfloxacin and tetracycline and one (3.8%) isolate was resistant to ampicillin, clindamycin, doxycycline, erythromycin, enrofloxacin, norfloxacin and tetracycline.

Most isolates that showed virulence and/or resistance genes were resistant to seven or eight groups of antimicrobials. The frequency of isolates resistant to seven or eight groups of antimicrobials in isolates that had the *cmeA*, *cmeB* and *cmeC* genes simultaneously, was (75.0%), followed by 80.0% in isolates with the *cdtC* gene, (66.5%) in isolates with the *cdtA*, *cdtB* and *dnaJ* genes and 44.5% in isolates with the *sodB* gene (Table 7).

3.5 Response to the antimicrobial action of enterocins

The antimicrobial activity of enterocins was able to inhibit at least 98.5% of the growth of all *C. jejuni* isolates at a concentration of 250 mg/mL. Results were confirmed by qualitative data using Resazurin chemical developer. The lowest concentration obtained with inhibition capacity was 125 mg/mL, between 83-97% of inhibition presented by six isolates (Figure 4).

4. Discussion

C. jejuni is, in general, the most prevalent species of thermotolerant *Campylobacter* in industrial poultry [24, 25]. In the present study, the presence of cultivable *C. jejuni* was verified in chilled and frozen carcasses, in three chicken companies (50.0%). The same did not occur with *C. coli* and *C. lari*, as the presence of cultivable cells was not found in any sample. Recent studies have shown that contamination of carcasses in the slaughterhouse is mainly by *C. jejuni*, have observed that contamination by *C. coli* decreases considerably after cooling the carcass and suggest a greater vulnerability of *C. coli* to the stress conditions found in poultry slaughterhouses [15, 26, 27].

Different strategies may be involved in the survival and persistence of *C. jejuni* along the poultry food chain, but in the slaughterhouse, which is the last step in the poultry meat production chain, before retail sale, it has been associated with the ability to form biofilms [28-30]. In addition, cryopreservation methods can influence the survival of *C. jejuni*, the results demonstrated a greater probability of contamination in cooled carcasses than in frozen carcasses ($p < 0.001$), this suggests that freezing can inactivate cultivable cells. Possibly due to the formation of ice crystals, ice nucleation and dehydration during freezing, as these are factors that damage the bacterial cell [31].

Studies that evaluated *C. jejuni* in carcasses and other poultry products in different cryopreservation methods, obtained similar results and indicated that freezing stress could induce the formation of the viable but non-culturable stage (VBNC), resulting in a decrease in the bacterial count viable during isolation, but despite the reduction, freezing did not completely eliminate the presence of *C. jejuni* [32,33]. A study carried out in Brazil with chilled and frozen carcasses found similar results and concluded that chilled chicken carcasses represent a greater risk to public health in

relation to the transmission of *Campylobacter*, in addition, it revealed a high contamination of the tested samples, which can be justified due to the collection site, since the samples were obtained from slaughterhouses, differing from the present study, whose samples were collected at consumer points of sale, subjecting the bacterial cell to a longer freezing time and consequent cell injury [34].

The breast skin was the site with the highest number of *C. jejuni* isolates and the sites with the least contamination were the liver and neck skin, even without obtaining significant values between the sampled carcass sites, the contamination of the breast area can be justified by greater area of exposure to cross-contamination. Studies that evaluated the bacterial load in carcasses during the slaughter stages point to cross-contamination by *Campylobacter* as an important factor to be considered in the slaughter process [35,36].

The high rate of MDR isolates found revealed alarming data regarding the use of antimicrobials in Brazilian industrial poultry, in this study all isolates (100%) were resistant to the three classes of antimicrobials: lincosamides, tetracyclines and macrolides. Often, the emergence of resistant strains has been associated with the use of antimicrobials in production animals [37-40]. A systematic survey in low- and middle-income countries (LMICs) between the years 2010 to 2021 found an overall mean multiple antibiotic resistance index of 0.34 ± 0.16 , which is above the high-risk threshold, from 0.2 [41].

Similar results were found in India, with 92.3% of MDR isolates, including *C. jejuni* and *C. coli*, with highest reported resistance against tetracyclines with 84.61%, followed by macrolides with 61.53% of resistant isolates [14]. In China, *C. jejuni* isolates were mainly resistant to ciprofloxacin (88.1%), followed by resistance to tetracycline (79.4%) and levofloxacin (78.1%), with 91.3% of MDR isolates [42]. In the same country, another study verified an infection rate of 10.8% (35/324) of *C. jejuni*, with greater resistance to ampicillin (85.7%) and (88.6%) of MDR isolates [43]. In contrast, in Costa Rica, *Campylobacter* spp. isolates showed resistance to quinolones (64.9%), followed by resistance to quinolones with tetracyclines (24.3%) and none of the analyzed isolates showed a multiresistant profile [44]. Different results in relation to the levels of resistance found, perhaps reflect the adoption of different national and regional policies on the use of antimicrobial agents for animal feed, mainly in industrial poultry.

In southern Brazil, MDR isolates of *C. jejuni* obtained from chicken meat in products sold at retail, showed similar results, with greater resistance to tetracyclines: TET (71%) and DOX (61.9%); however, they showed low resistance to macrolides (38%) and justified this by the low use of this antimicrobial in poultry in the region, avoiding selective pressure [45]. Brazil has an extensive territorial area and this brings great differences in industrial poultry farming, some socioeconomic factors, production systems, relief, rainfall and meteorological indices, determine the challenges faced in the studied region and justify the small variations found in relation to the multiresistance of isolates of *C. jejuni* in the same country.

In this study, the most frequent pattern of antimicrobial resistance was CLI-DOX-ERY-TET-AMP-CIP-GEN-NOR-ENR, present in 31.0%, and the second most frequent was CLI-DOX-ERY-TET-CIP-NOR -ENR present in 19.0% of *C. jejuni* isolates. A similar study revealed the resistance profile CIP-LEV-GEN-TET-CLI-EM present in 32.8%, and to a lesser extent, CIP-LEV-TET-CLI present in 8.3% of *Campylobacter* spp. isolates [43].

Despite the variations found, resistance to tetracyclines and macrolides is worrying, since they are important antimicrobials for animal and human health because they exhibit broad-spectrum activity against gram-negative and gram-positive bacteria [46]. One study demonstrated that the mean prevalence of antibiotic resistance (M50) of tetracyclines was higher in *Campylobacter* spp. (above 70%) among Gram-negative bacteria [41]. Macrolides, in turn, are one of the few available therapies for severe *Campylobacter* infections, particularly in children, for whom quinolones are not recommended for treatment [46].

Another worrying factor for public health is the ability of MDR strains to remain cultivable after heat stress. One study found that antimicrobial resistance could give bacteria a better response to cold stress, and demonstrated a longer survival of *Campylobacter* (ATCC 33560) resistant to ciprofloxacin and present in water at 4°C than susceptible strains [47]. In addition, resistant bacteria in animals can directly or indirectly infect humans through food, water, mud and manure, which are used as fertilizers [39].

The frequent use of antimicrobials in food production provides selective pressure and favors the horizontal transfer of antimicrobial resistance genes, leading to the emergence of resistant strains [48,49]. In 2030, it is estimated that the top 10 animal protein producing countries will use 72% of the total antimicrobials consumed

worldwide and Brazil occupies second place in this ranking, with an individual consumption level estimated at (7.9%), ranking after China (43%), followed by the United States (6.5%), Thailand (4.0%), India (2.1%), Spain (1.9%), Russia (1.9%) , Mexico (1.8%), Iran (1.5%) and Argentina (1.5%), this is the world ranking of countries that will use antimicrobials the most [50].

The presence of MDR isolates carrying virulence and resistance genes observed in this study is worrying and revealed the highest frequency of the *sodB* gene (34.0%) among the *C. jejuni*. Under atmospheric conditions, *Campylobacter* is exposed to oxidative stress with the production of several toxic reactive oxygen species (ROS) and among the common defense enzymes against oxidative stress, the enzyme superoxide dismutase (*sodB*) stands out, which is directly involved in the degradation and removal of ROS [51]. Thus, a microaerophilic pathogen such as *Campylobacter* could survive under aerobic conditions depending on the expression of related virulence genes [52].

Another aspect related to virulence is the ability of *Campylobacter* strains to produce toxins [53]. In this study, the second highest frequency was for the *cdtC* gene (19.0%), followed by *cdtA* (11.5%) and *cdtB* (11.5%). Called cytolethal distending toxin (CDT), it is composed of three subunits *cdtA*, *cdtB* and *cdtC*, all of which are necessary for cytotoxin expression, regardless of the origin and species of isolation [54]. Despite the low frequency found, 11.5% of the MDR isolates had the three genes necessary for expression of the cytotoxin, characterizing potentially virulent strains resistant to different classes of antimicrobials.

In contrast, a study carried out in a slaughterhouse found that (80.0%) of the *C. jejuni* isolates had the *cdt* gene, however, it mentioned that the presence of genetic virulence factors is not direct evidence that such strains are pathogenic for humans; but strongly suggests that they may potentially be capable of inducing disease [55]. *Campylobacter* has complex multifactorial systems for multiplication in broilers, survival during food processing, and virulence in humans, including motility, chemotaxis, adhesion, invasion, antioxidant defense, heat shock, and the ability to enter the VBNC state [56].

In our study, a frequency of the *dnaJ* gene was observed in 11.5% of the *C. jejuni* isolates. When evaluating isolates from broiler chickens in Tunisia, there was a frequency of 100% for the *cdtA*, *cdtB* and *cdtC* genes, while the *dnaJ* gene showed a frequency of 50% among the isolates of *C. jejuni* [57]. The *dnaJ* gene, which encodes

a heat shock protein, is closely linked to adhesion and colonization in the host cell, as it was found that mutations in this gene caused a severe reduction in the colonization process [58]. The low prevalence of the *dnaJ* gene in our study was similar to other studies, detected in 12% of *C. coli* isolates [59]. In Brazil, 20% of human and animal samples showed the *dnaJ* gene [60], but a 100% occurrence in *C. jejuni* has been mentioned in human isolates from Chile [61].

Resistance genes were detected in 15.0% of the *C. jejuni* isolates and it is noteworthy that in these isolates all three genes were detected (*cmeA*, *cmeB* and *cmeC*). However, no significant relationship was found between MDR isolates and gene detection. Thus, the presence of resistance genes related to the efflux pump is not the only factor involved in bacterial resistance capacity, as we found a low frequency of these genes in MDR isolates, which suggests the presence of more genes that confer other resistance mechanisms.

Our data also revealed an important antimicrobial activity of enterocins (*Enterococcus faecium*) against *C. jejuni* isolates, the concentration of 250 mg/mL was effective in all isolates, inhibiting their growth; the highest concentration evaluated (500 mg/mL) was not effective in all isolates, this can be explained by a possible interference of other components, as no purification process was used, however, these results demonstrate the possibility of its use for *Campylobacter* control in the productive sector, as an alternative to the use of antimicrobials. Other studies have also demonstrated the application of probiotic strains in the control of *Campylobacter* [62]. However, the antimicrobial activity of probiotic bacteria can be attributed to the production of bacteriocins, OA, hydrogen peroxide, carbon dioxide and diacetyl [63]. A similar study found the bacterial inhibition potential of the postbiotic produced by a strain of *Enterococcus faecium*, by inhibiting the growth of reference strains of *C. jejuni* and *C. coli*, with satisfactory results at concentrations from 500 mg/mL to 25 mg/mL [64].

Therefore, the use of probiotic strains can be considered a promising alternative in the control of *Campylobacter*, since poultry carcasses contaminated with *C. jejuni* MDR isolates pose a risk for campylobacteriosis in humans due to the antimicrobial resistance presented by these isolates. However, the absence of an effective surveillance system in low- and middle-income countries is concerning and therefore deserves more attention [41].

A study that evaluated reports of antimicrobial sales data found that 38 countries reported through official government channels, while one country reported through scientific publications and two used a combination of both, however, non-reporting countries included notable meat exporters and consumers such as Brazil, which is one of the top 10 users of antimicrobials in 2017 and 2030 [51]. To solve this problem, an approach was proposed for the implementation of systems that provide data on the consumption of standardized and globally comparable antimicrobials, to support the adoption of practices that seek to optimize the use of antimicrobials in the production of animal feed [65].

The present study revealed the presence of cultivable isolates of *C. jejuni* both in chilled carcasses and in frozen carcasses, however Brazil still does not have a *Campylobacter* control system in industrial poultry farming, in addition, the resistance presented by the isolates to different antimicrobial classes used both in veterinary medicine and in human medicine, highlights the need for improvements in the production of animal protein, however, the use of probiotic strains can be considered an alternative to control this pathogen.

4 Conclusion

Therefore, from the point of view of food safety, chilled chicken carcasses present a greater risk of contamination by *C. jejuni* than frozen carcasses, however, despite the risk reduction after freezing, the consumption of frozen animal products does not can be considered a single method for the prevention of campylobacteriosis. The detection of important virulence genes in multidrug-resistant *C. jejuni* emphasizes the risk to public health. Thus, we propose the establishment of national *Campylobacter* control programs in all segments of industrial poultry, as well as the adoption of monitoring systems for the consumption of antimicrobials in animal production. In addition, further investigations must be conducted to explore the use of probiotic strains in the control of *Campylobacter*, as their use has shown promising results.

5 References

1. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) (2020) Update and review of control options for *Campylobacter* in broilers at primary production. EFSA J 18(4):6090.

2. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) (2010) Scientific Opinion on Quantification of the risk posed by broiler meat to human campylobacteriosis in the EU. *EFSA J* 8(1):1437.
3. EFSA (2022) European Union one health 2021 zoonoses report. *EFSA J* 20(12):7666.
4. Marotta F, Garofolo G, Di Donato G, et al (2015) Population diversity of *Campylobacter jejuni* in poultry and its dynamic of contamination in chicken meat. *Biomed. Res. Int.* 859845. <https://doi.org/10.1155/2015/859845>
5. Tangkham W, Janes M, LeMieux F (2016) Prevalence and distribution of *Campylobacter jejuni* in small-scale broiler operations. *J. Food Prot.* 79:75-81. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-331>
6. Humphrey S, Chaloner G, Kemmett K et al (2014) *Campylobacter jejuni* is not merely a commensal in commercial broiler chickens and affects bird welfare. *mBio* <https://doi.org/10.1128/mBio.01364-14>
7. Keenswijk W, Degraeuwe E, Dhont E et al (2019) Hemolytic uremic syndrome associated with non-shigatoxin-producing infectious agents: expanding the shigatoxin theory. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* <https://doi.org/10.1097/MPH.0000000000001196>
8. KARPOVICH GS et al (2020) The hemolytic uremic syndrome: a possible etiological role of *Campylobacter* infection. *Almanac of Clinical Medicine* <https://doi.org/10.18786/2072-0505-2020-48-017>
9. CDC Centers for Disease Control and Prevention. Guillain-Barré Syndrome. <https://www.cdc.gov/campylobacter/guillainbarre.html#:~:text=About%20in%20every%20had%20a%20recent%20Campylobacter%20infecti.> Accessed 23 October 2022.
10. WHO World Health Organization. Food safety. https://www.who.int/health-topics/food-safety#tab=tab_1. Accessed 12 december 2022.
11. ABPA (2023) Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual. <https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2023/04/Relatorio-Anual-2023.pdf>. Accessed 01 August 2023.
12. Alaboudi AR, Malkawi IM, Osaili TM et al. (2020) Prevalence, Antibiotic Resistance and Genotypes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Isolated from chickens in irbid governorate, Jordan. *Int J Food Microbiol.* <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108656>.
13. Nafarrate I, Lasagabaster A, Sevillano E, Mateo E (2021) Prevalence, molecular typing and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* spp. isolates in Northern Spain. *J. Appl. Microbiol.* <https://doi.org/10.1111/jam.14842>
14. Rangaraju V, Malla BA, Milton AAP et al (2022) Occurrence, antimicrobial resistance and virulence properties of thermophilic *Campylobacter coli* originating from two different poultry settings. *Gene Rep.* <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2022.101618>.
15. Schreyer ME, Olivero CR, Rossler E et al (2022) Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* identified in a slaughterhouse in Argentina. *Curr. Res. Nutr. Food Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.crfcs.2022.03.005>.

16. INTERNATIONAL STANDARD ISO 10272-2 (2017) Microbiology of the food chain — Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp.
17. Fan HH, Kleven SH, Jackwood MW (1995) Application of polymerase chain reaction with arbitrary primers to strain identification of *Mycoplasma gallisepticum*. Avian Dis. 39(4): 729–35.
18. EUCAST (2023) Antimicrobial Susceptibility Testing EUCAST Disk Diffusion Method. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documdocu/2022_manuals/Manual_v_10.0_EUCAST_Disk_Test_2022.pdf. Accessed 23 January 2023.
19. CLSI (2020) Performance standards for antimicrobial disc and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, 5th ed.:1–25. <http://clsivet.org/GetDoc.aspx?doc=CLSI%20VET01S%20ED5:2020&sbssok=CLSI%20VET01S%20ED5:2020%20TABLE%20A&format=HTML#CLSI%20VET01S%20ED5:2020%20TABLE%20A>. Accessed 12 January 2023.
20. Krumperman PH. (1983) Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. Appl. Environ. Microbiol. <https://doi.org/10.1128/aem.46.1.165-170.1983>
21. CLSI (2013) Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard (8th ed.).
22. Gudiña EJ, Rocha V, Teixeira JA, Rodrigues LR. (2010) Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* A20. Lett Appl Microbiol. <https://doi.org/10.1111/j.1472765X.2010.02818.x>
23. Palomino JC, Martin A, Camacho M et al (2002) Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.8.2720-2722.2002>
24. Rossler E, Signorini ML, Romero-Scharpen A et al (2019) Meta-Analysis of the prevalence of thermotolerant *Campylobacter* in food-producing animals worldwide. Zoonoses Public Health.
25. Zbrun MV, Rossler E, Romero-Scharpen A et al (2020) Worldwide meta-analysis of the prevalence of *Campylobacter* in animal food products. Res Vet Sci. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.05.017>.
26. Peyrat MB, Soumet C, Maris P, Sanders P (2008) Recovery of *Campylobacter jejuni* from surfaces of poultry slaughterhouses after cleaning and disinfection procedures: analysis of a potential source of carcass contamination. Int J Food Microbiol. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.030>
27. Stella S, Tirloni E, Bernardi C, Grilli G (2021) Evaluation of effect of chilling steps during slaughtering on the *Campylobacter* sp. counts on broiler carcasses. Poult. Sci. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.11.043>.
28. Araújo PM, Batista E, Fernandes MH et al (2022) Assessment of biofilm formation by *Campylobacter* spp. isolates mimicking poultry slaughterhouse conditions. Poult. Sci. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101586>
29. Efimochkina NR, Bykova IB, Markova YM et al (2017) Formation of biofilms by foodborne pathogens and development of laboratory in vitro model for the study of

- Campylobacter* genus bacteria based on these biofilms. Bull Exp Biol Med. <https://doi.org/10.1007/s10517-017-3643-z>
30. García-Sánchez L, Melero B, Jaime I et al (2019) Biofilm formation, virulence and antimicrobial resistance of different *Campylobacter jejuni* isolates from a poultry slaughterhouse. Food Microbiol. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.05.016>.
 31. Alter T, Reich F (2021) Management strategies for prevention of *Campylobacter* infections through the poultry food chain: A european perspective. Curr Top Microbiol Immunol.
 32. Eriksson D, Rahlén E, Bergenkvist et al (2023) Survival of *Campylobacter jejuni* in frozen chicken meat and risks associated with handling contaminated chicken in the kitchen. Food Control. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109471>
 33. Yu Z, Joossens M, Kerkhof PJ, Houf K (2021) Bacterial shifts on broiler carcasses at retail upon frozen storage. Int J Food Microbiol. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109051>.
 34. Castro AGSA, Dorneles SEM, Santos ELS et al (2018) Viability of *Campylobacter* spp. in frozen and chilled broiler carcasses according to real-time pcr with propidium monoazide pretreatment. Poult. Sci. <https://doi.org/10.3382/ps/pey020>
 35. Emanowicz M, Meade J, Bolton D et al (2021) The impact of key processing stages and flock variables on the prevalence and levels of *Campylobacter* on broiler carcasses. Food Microbiol. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103688>
 36. Hutchison ML, Harrison D, Tchòrzewska MA et al (2022) Quantitative determination of *Campylobacter* on broilers along 22 uk processing lines, to identify potential process control points and cross-contamination from colonized to uncolonized flocks. J Food Prot. <https://doi.org/10.4315/JFP-22-204>
 37. DANMAP (2018) Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark. Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme (Danmap): 1–174. <https://www.danmap.org/reports/2020>. Accessed 14 december 2022.
 38. Hedman, HD, Vasco KA, Zhang L (2020) A review of antimicrobial resistance in poultry farming within low-resource settings. Animals. <https://doi.org/10.3390/ani10081264>
 39. Ma, F, Xu S, Tang Z et al (2021) Use of antimicrobials in food animals and impact of transmission of antimicrobial resistance on humans. Biosafety and Health. <https://doi.org/10.1016/j.bsheal.2020.09.004>.
 40. McCormick BP, Quiroga MP, Álvarez VE et al (2022) Antimicrobial resistance dissemination associated with intensive animal production practices in argentina: A systematic review and meta-analysis. Rev Argent Microbiol. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2022.07.001>.
 41. Ikhimiukor OO, Iruka NO (2023) A snapshot survey of antimicrobial resistance in food-animals in low and middle-income countries. One Health. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2023.100489>.
 42. Han X, Zhu D, Lai H et al (2016) Prevalence, antimicrobial resistance profiling and genetic diversity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from

- broilers at slaughter in China. Food Control. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.04.051>
43. Yang H, Li Y, Zhang Y et al (2023) Prevalence, drug resistance spectrum and virulence gene analysis of *Campylobacter jejuni* in broiler farms in central Shanxi, China. Poult. Sci. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102419>
 44. Lazo-Lascarez S, Gutiérrez LZ, Duarte-Martínez F et al (2021) Antimicrobial resistance and genetic diversity of *Campylobacter* spp. isolated from broiler chicken at three levels of the poultry production chain in Costa Rica. J Food Prot. <https://doi.org/10.4315/JFP-21-111>
 45. Würfel SFR, Prates DF, Kleinubing NR et al (2021) Comprehensive characterization reveals antimicrobial-resistant and potentially virulent *Campylobacter* isolates from poultry meat products in southern Brazil. Lwt. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111831>
 46. WHO (2018) WHO List of Critically Important Antimicrobials (CIA). http://www.who.int/foodborne_disease/resistance/cia/en/#.UiMEZ7zmSDA.mendel ey. Accessed 8 december 2022.
 47. González M, Hänninen ML (2012) Effect of temperature and antimicrobial resistance on survival of *Campylobacter jejuni* in well water: application of the weibull model. J Appl Microbiol. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05342.x>
 48. Oniciuc EA, Likotrafiti E, Alvarez-Molina A et al (2019) Food processing as a risk factor for antimicrobial resistance spread along the food chain. Curr. Opin. Food Sci. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.09.002>.
 49. Vinayamohan PG, Abraham JP, Venkitanarayanan K (2022) Role of horizontal gene transfer in the dissemination of antimicrobial resistance in food animal production. Curr Opin Food Sci. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.100882>.
 50. Tiseo K, Huber L, Gilbert M et al (2020) Global Trends in Antimicrobial Use in Food Animals from 2017 to 2030. Antibiotics. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9120918>
 51. Atack JM, Kelly DJ (2009) Oxidative stress in *Campylobacter jejuni*: Responses, resistance and regulation. Future Microbiol. <https://doi.org/10.2217/fmb.09.44>
 52. Guk J, Woo J, Song H et al (2022) Hyper-aerotolerant *Campylobacter coli*, an emerging foodborne pathogen, shows differential expressions of oxidative stress-related genes. Vet Microbiol. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.10.9308>
 53. AbuOun M, Manning G, Cawthraw SA et al. (2005) Cytolethal distending toxin (cdt)-negative campylobacter jejuni strains and anti-cdt neutralizing antibodies are induced during human infection but not during colonization in chickens. Infect Immun. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.5.3053-3062.2005>
 54. Koolman L, Whyte P, Burgess C, Bolton D (2015) Distribution of virulence-associated genes in a selection of *Campylobacter* isolates. Foodborne Pathog Dis. <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1883>
 55. Rossler E, Olivero C, Soto LP (2020) Prevalence, genotypic diversity and detection of virulence genes in thermotolerant *Campylobacter* at different stages of the poultry meat supply chain. Int. J. Food Microbiol. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108641>.

56. Bolton DJ (2015) *Campylobacter* virulence and survival factors. Food Microbiol. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.017>.
57. Gharbi M, Béjaoui A, Hamda CB et al (2022) Distribution of virulence and antibiotic resistance genes in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from broiler chickens in Tunisia. J Microbiol Immunol Infect. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2021.07.001>
58. Konkel ME, Kim BJ, Klena JD et al (1998) Characterization of the Thermal Stress Response of *Campylobacter jejuni*. Infect Immun. <https://doi.org/10.1128/IAI.66.8.3666-3672.1998>
59. Buiatte ABG, Melo RT, Peres PABM et al. (2023) Virulence, antimicrobial resistance, and dissemination of *Campylobacter coli* isolated from chicken carcasses in Brazil. Food Control <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.109613>.
60. Gomes CN, Passaglia J, Vilela, FP et al (2018) High survival rates of *Campylobacter coli* under different stress conditions suggest that more rigorous food control measures might be needed in Brazil. Food Microbiol. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.02.014>
61. Bravo V, Katz A, Porte L et al (2021) Genomic Analysis of the diversity, antimicrobial resistance and virulence potential of clinical *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains from Chile. PLOS Negl. Trop. Dis. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0009207>.
62. Mortada MDE, Shanmugasundaram CR, Selvaraj RK (2020) In vivo and in vitro assessment of commercial probiotic and organic acid feed additives in broilers challenged with *Campylobacter coli*. J Appl Poult Res. <https://doi.org/10.1016/j.japr.2020.02.001>.
63. Šušković J, Kos B, Beganovic J et al (2010) Antimicrobial activity - The most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. Food Technology and Biotechnology 48(3): 296–307.
64. Calaça PRA, Silva EC, Melo FP et al (2020) *Enterococcus faecium* EF137V: uma nova fonte estratégica para o controle da saúde humana e animal contra espécies de *Campylobacter*. Res Soc Dev. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i10.8853>
65. Schar D, Sommanustweechai A, Laxminarayan R, Tangcharoensathien V (2018) Surveillance of antimicrobial consumption in animal production sectors of low- and middle-income countries: optimizing use and addressing antimicrobial resistance. PLoS Med. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002521>
66. Saiyudthong S, Phusri K, Buates S (2015) Rapid detection of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Campylobacter lari* in fresh chicken meat and by-products in bangkok, Thailand, using modified multiplex PCR. J Food Prot. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-415>
67. Casaril KBPB (2010) Padronização de PCR tradicional e em tempo real para detecção de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* em alimentos, State University of Londrina
68. Wang G, Clark CG, Taylor TM et al (2002) Colony multiplex pcr assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*. J Clin Microbiol. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.12.4744-4747.2002>

69. Hickey TE, McVeigh AL, Scott DA (2000) *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin mediates release of interleukin-8 from intestinal epithelial cells. Infect Immun. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.12.6535-6541.2000>
70. 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. J Med Microbiol. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05056-0>

Table 1. Primer sequences used for the uniplex PCR assay and predicted sizes of PCR products

Target genes	Primer*	Sequence (5'-3')	Size (bp)	Reference
<i>Campylobacter</i> spp. 16S rDNA	16S rDNA F	GGAGGCAGCAGTAGGGAAA	1.062	[66]
	16S rDNA R	TGACGGGGCGGTGAGTACAG		
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>mapA</i> R	AGTCCTGGTGGTTTGAAGC	202	[67]
	<i>mapA</i> F	CCGCATTAATAATTCACATCG		
<i>Campylobacter coli</i>	<i>ceuE</i> F	ATGAAAAAATCTTTAGTTTTTGCA	889	[67]
	<i>ceuE</i> R	ATTTTATTATTTGTAGCAGCG		
<i>Campylobacter lari</i>	<i>glyA</i> F	TAGAGAGATAGCAAAAAGAGA	251	[68]
	<i>glyA</i> R	TACACATAATAATCCCACCC		
Toxin production				
<i>cdtA</i>	<i>cdtA</i> F	CCTTGTGATGCAAGCAATC	370	[69]
	<i>cdtA</i> R	ACACTCCATTTGCTTTCTG		
<i>cdtB</i>	<i>cdtB</i> F	CAGAAAGCAAATGGAGTGTT	620	[70]
	<i>cdtB</i> R	AGCTAAAAGCGGTGGAGTAT		
<i>cdtC</i>	<i>cdtC</i> F	CGATGAGTTAAAACAAAAAGATA	182	[70]
	<i>cdtC</i> R	TTGGCATTATAGAAAATACAGTT		
Stress response and survival				
<i>sodB</i>	<i>sodB</i> F	AAGTACAGGCTGTGGCTGTG	300	[54]
	<i>sodB</i> R	AAATAAGCAGGGCGTGCATTG		
Adhesion				
<i>dnaJ</i>	<i>dnaJ</i> F	CCGCGTATGGTGGGTACTTT	646	[54]
	<i>dnaJ</i> R	AAGGCGGTGGATTTGGTTCT		

Multidrug resistance genes (Efflux pump)

<i>cmeA</i>	<i>cmeA F</i>	TGTGCATCAGCTCCTGTGTAA	957	
	<i>cmeA R</i>	ACGGACAAGCTTTGATGGCT		
<i>cmeB</i>	<i>cmeB F</i>	TGCGGGTTGACCTTGA ACTT	993	[54]
	<i>cmeB R</i>	TGTGCACTCTTTTTGCGACG		
<i>cmeC</i>	<i>cmeC F</i>	CAACCGCAGCATTAAAGCCAA	364	
	<i>cmeC R</i>	TTGGGATTTGAAAGCGGGGA		

* F= Forward, R= Reverse.

Table 2. Breakpoints used for antimicrobial susceptibility testing by disk diffusion method

Antimicrobial groups	Antimicrobial agent	Zone diameter breakpoints (mm) – EUCAST 2023 ¹		
		Susceptible ≥	Susceptible, increased exposure	Resistant <
Penicillins	Ampicillin 10µg ³	14	-	14
Fluoroquinolones	Ciprofloxacin 5µg ²	50	26-49	26
	Norfloxacin 10µg ³	24	-	24
Lincosamides	Clindamycin 2µg ⁴	19	-	19
Tetracyclines	Doxycycline 30µg ²	30	-	30
	Tetracycline 30µg ²	30	-	30
Macrolides	Erythromycin 15µg ²	20	-	20
Fosfomycin	Fosfomycin 200µg ³	21	-	21
Aminoglycosides	Gentamicin 10µg ³	17	-	17
		Zone diameter breakpoints (mm) CLSI-VET 2020 ¹		
		Susceptible ≥	Intermediary	Resistant ≤
Fluoroquinolones	Enrofloxacin 5µg ⁵	23	17-22	16

¹ CLSI-VET = CLSI breakpoints used in veterinary medicine (CLSI, 2020); EUCAST = European antimicrobial susceptibility testing (EUCAST, 2023).

² Antibiotic with interpretative breakpoint based on *Campylobacter jejuni* data in EUCAST (EUCAST, 2023).

³ Antibiotic with interpretative breakpoint based on *Enterobacterales* data in EUCAST (EUCAST, 2023).

⁴ Antibiotic with interpretative breakpoint based on anaerobic bacteria data in EUCAST (EUCAST, 2023).

⁵ Antibiotic with interpretative breakpoint based on *Enterobacterales* data in CLSI-VET (CLSI,2020).

Table 3. Frequency of *Campylobacter* species in chilled and frozen carcasses sold in Brazil

	Sampling location	N positive samples (%)*			
		<i>Campylobacter</i> spp.	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>
Chilled carcasses	Chest skin	31	6	0	0
	Wing skin	31	5	0	0
	Cloaca skin	36	5	0	0
	Neck skin	34	2	0	0
	Gizzard	29	3	0	0
	Liver	33	2	0	0
	Total in chilled carcasses	194 (51.5%)	23 (88.5%)	-	-
Frozen carcasses	Chest skin	31	1	0	0
	Wing skin	32	1	0	0
	Cloaca skin	30	0	0	0
	Neck skin	32	0	0	0
	Gizzard	26	1	0	0
	Liver	31	0	0	0
	Total in frozen carcasses	182 (48.5%)	3 (11.5%)	-	-
Total	376 (100%)	26 (7%)	-	-	

*Values in approximate percentages

Table 4. Multi-resistant profiles of *C. jejuni* from chilled and frozen carcasses

Antimicrobial resistance profile*	N° of resistant isolates (%)
CLI-DOX-ERY-TET-AMP-CIP-GEN-NOR-ENR	8 (31%)
CLI-DOX-ERY-TET-CIP-NOR-ENR	5 (19%)
CLI-DOX-ERY-TET-AMP-CIP-NOR-ENR	4 (15%)
CLI-DOX-ERY-TET-CIP-GEN-NOR-ENR	3 (11%)
CLI-DOX-ERY-TET-AMP-CIP-GEN-FOS-NOR-ENR	1 (4%)
CLI-DOX-ERY-TET-CIP-GEN-FOS-NOR-ENR	1 (4%)
CLI-DOX-ERY-TET-AMP	1 (4%)
CLI-DOX-ERY-TET-AMP-CIP-ENR	1 (4%)
CLI-DOX-ERY-TET-NOR	1 (4%)
CLI-DOX-ERY-TET	1 (4%)

* Acronyms: AMP = Ampicillin, CIP = Ciprofloxacin, CLI = Clindamycin, DOX = Doxycycline, ENR = Enrofloxacin, ERY = Erythromycin, FOS = Fosfomicin, GEN = Gentamicin, NOR = Norfloxacin, TET = Tetracycline

Table 5. Description of the index of multiple antimicrobial drug resistance (IRMA) found in *Campylobacter jejuni* from broiler chicken carcasses

IRMA	<i>C. jejuni</i>	
	Absolute value	Relative value (%)
0.4	1	3.8
0.5	2	7.7
0.7	6	23.1
0.8	7	27.0
0.9	9	34.6
1.0	1	3.8
Total	26	100.0

Table 6. Association of virulence genes in *C. jejuni* from chicken carcasses

<i>C. jejuni</i>	Virulence profile
3 (11.5%)	<i>cdtA, cdtB, cdtC, dnaJ, sodB, cmeA, cmeB, cmeC</i>
2 (7.7%)	<i>cdtC, sodB</i>
1 (3.8%)	<i>cmeA, cmeB, cmeC</i>

Table 7. Genetic profile of multidrug resistance (MDR) *C. jejuni*

Gene presence	MDR (%)			Total
	3-4 groups	5-6 groups	7-8 groups	
<i>sodB</i>	2 (22.0%)	3 (33.5%)	4 (44.5%)	9
<i>cdtA</i>	1 (33.5%)	0	2 (66.5%)	3
<i>cdtB</i>	1 (33.5%)	0	2 (66.5%)	3
<i>cdtC</i>	1 (20.0%)	0	4 (80.0%)	5
<i>dnaJ</i>	1 (33.5%)	0	2 (66.5%)	3
<i>cmeA</i>	1 (25.0%)	0	3 (75.0%)	4
<i>cmeB</i>	1 (25.0%)	0	3 (75.0%)	4
<i>cmeC</i>	1 (25.0%)	0	3 (75.0%)	4

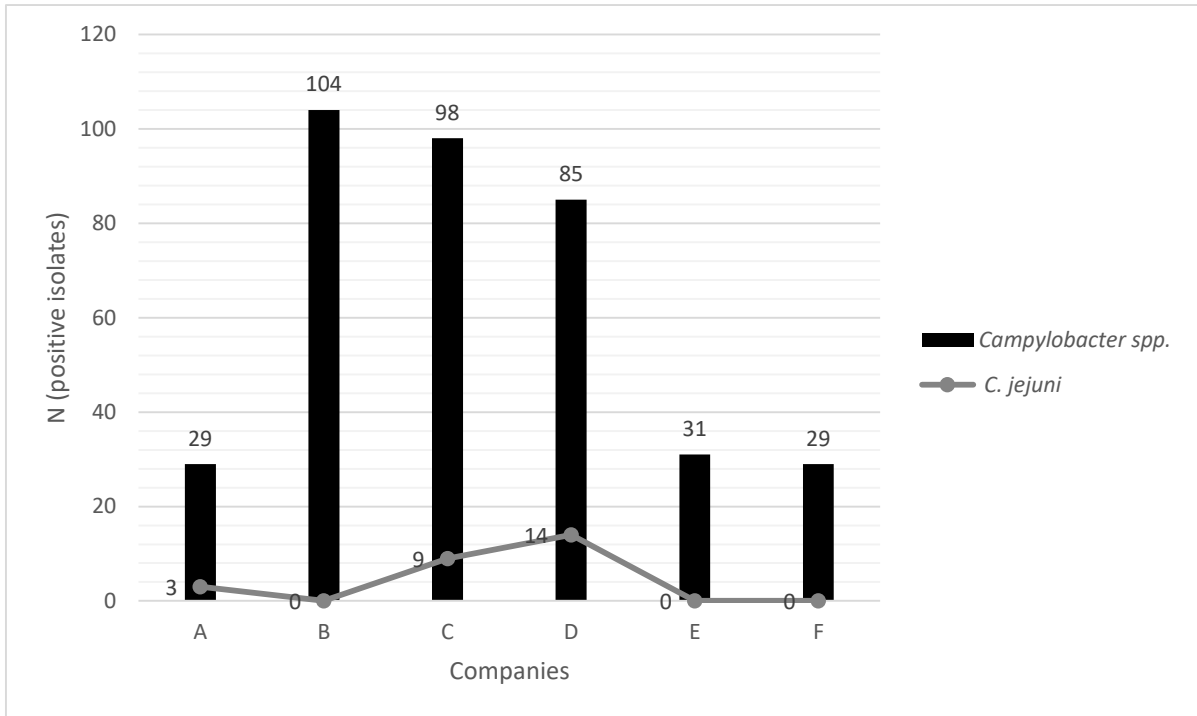


Figure 1. *Campylobacter* spp. and *C. jejuni* in chicken carcasses from different companies

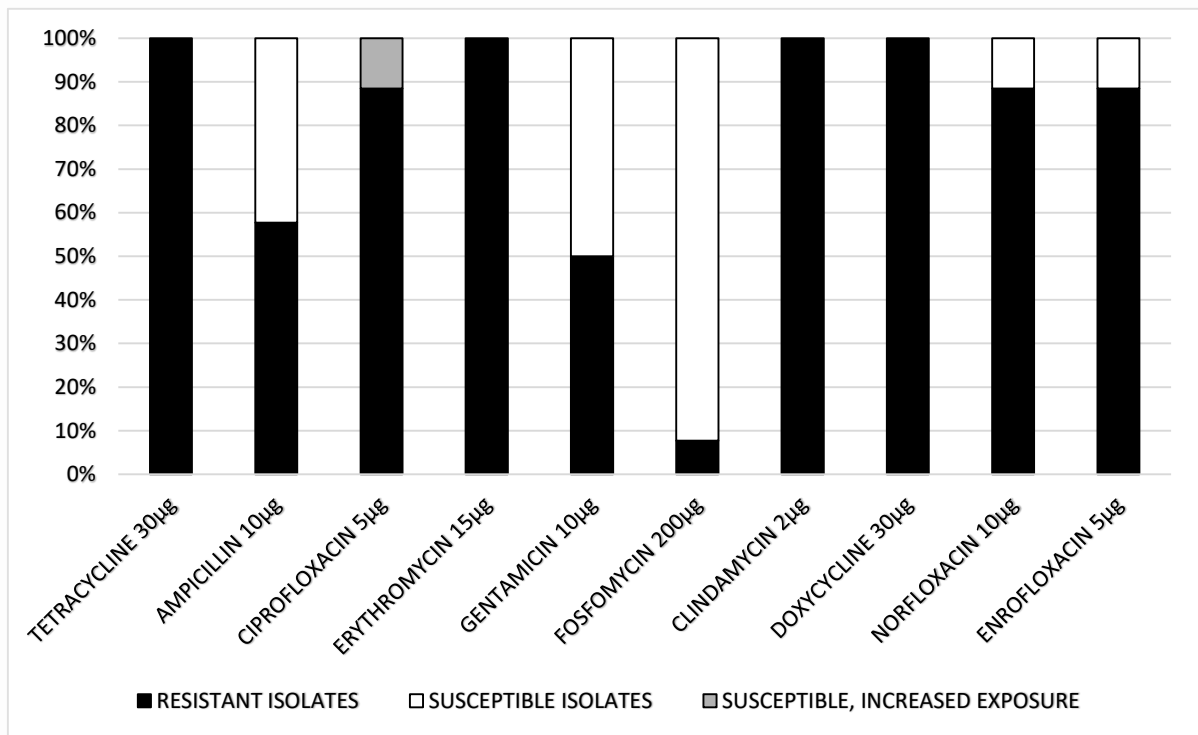


Figure 2. Antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni*

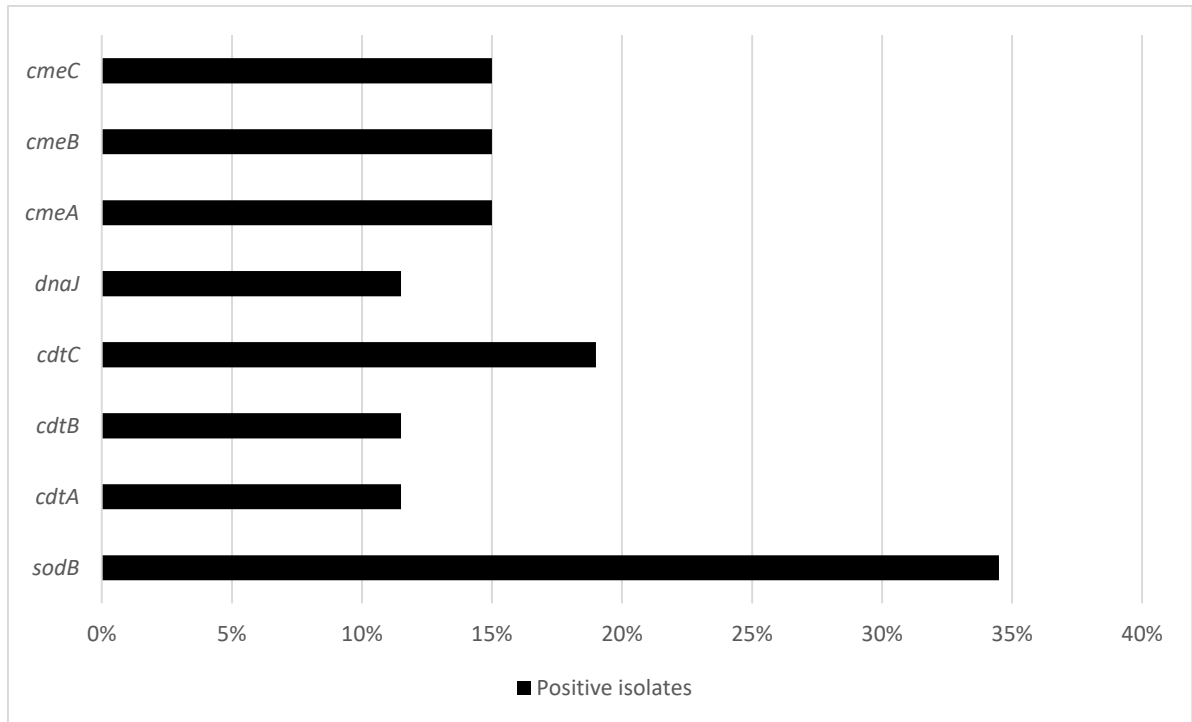


Figure 3. Frequency of virulence and resistance genes in multidrug resistant *C. jejuni*

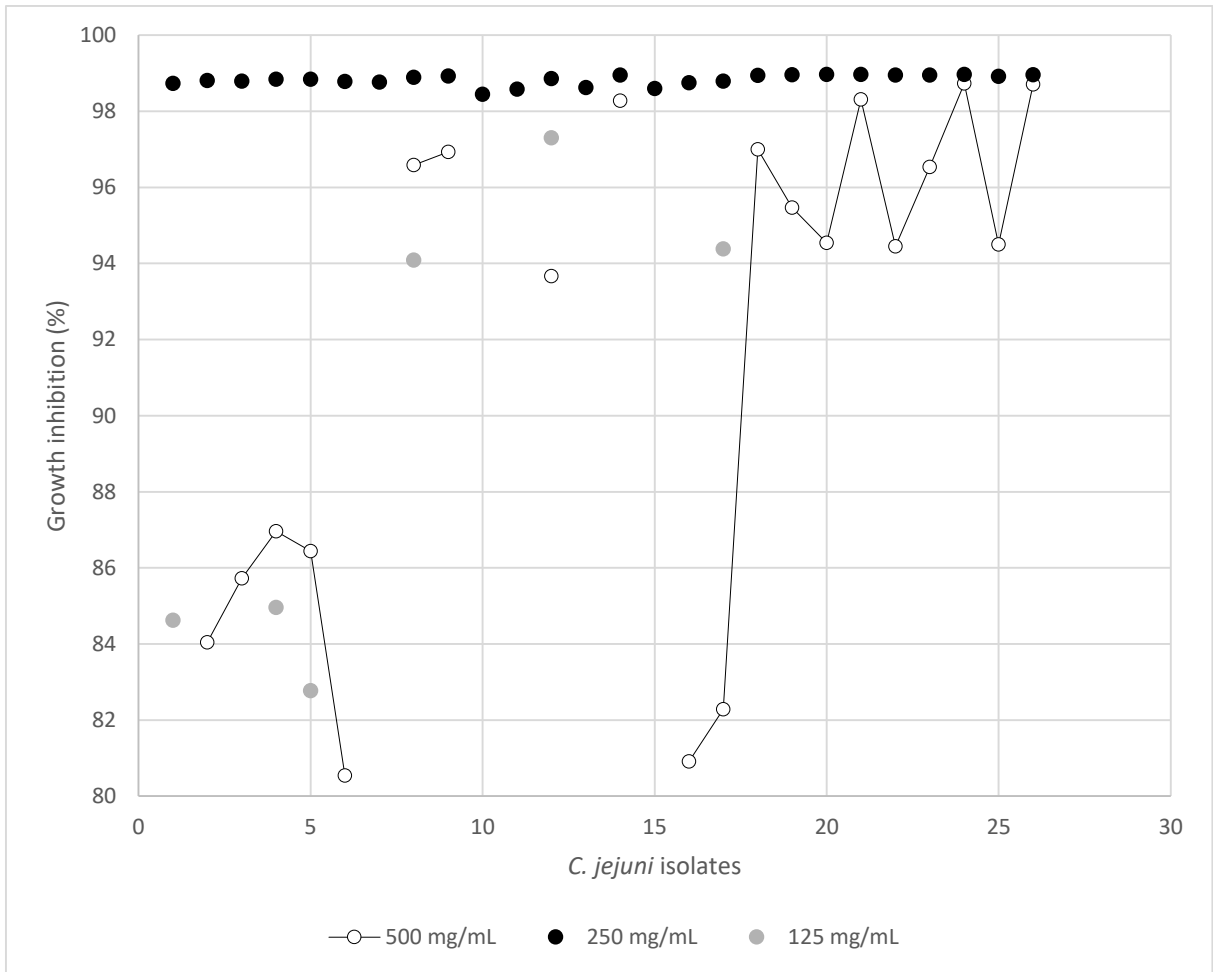


Figure 4. Inhibitory action of enterocins against *C. jejuni*

5. ARTIGO 2

Virulence profile of *Campylobacter* species detected in broiler fecal samples in northeastern Brazil

(Artigo formatado para o periódico Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases)

Title: Virulence profile of *Campylobacter* species detected in broiler fecal samples in northeastern Brazil

Saruanna Millena dos Santos Clemente^a, Samuel Fernando dos Santos^a, Afrânio Henrique de Brito Nunes^a, Karolina Rosa Fernandes^b, Maria Aparecida Juliano^b, Andrea Paiva Botelho Lapenda de Moura^a, Rinaldo Aparecido Mota^a, Mércia Rodrigues Barros^a

^a Department of Veterinary Medicine, Federal Rural University of Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE, Brazil.

^b Federal University of São Paulo, Rua Três de Maio, 100, 04044-020, São Paulo, SP, Brazil

*Corresponding author. E-mail address: saruannamillena@hotmail.com (S.M.S. Clemente).

Resumo: The objective with the study to identify the occurrence of *Campylobacter jejuni*, *C. coli* and *C. lari* in broilers in northeastern Brazil and to determine the virulence profile. The samples were evaluated by the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique and the isolates obtained were identified by MALDI-TOF MS. In this study, 90.0% of the batches were positive for *C. jejuni* while 30.0% were positive for *C. lari*. The analysis of virulence genes revealed that all positive samples for *C. jejuni* presented the genes *cdtB*, *dnaJ*, *cmeA*, *cmeB* and *cmeC*, followed by the genes *cdtA* (92.6%), *cdtC* (66.6%) and *sodB* (51.8%). Among the positive samples for *C. lari*, all showed the *cdtB*, *dnaJ*, *sodB*, *cmeB* and *cmeC* genes, followed by the *cdtA* (85.7%), *cmeA* (85.7%) and *cdtC* (28.5%) genes. The isolates obtained were identified as *Proteus mirabilis* and *Providencia stuartii*. It is concluded that *C. jejuni* and *C. lari* are present in broiler flocks in northeastern Brazil.

Keywords: Animal Health. Broiler. Campylobacteriosis. *Campylobacter jejuni*. *Campylobacter lari*. Poultry. Public Health.

1. Introduction

The global chicken meat market has been promising, characterized by exponential growth currently reaching 32 kg per capita in 2022, in high-income countries, there is a growing preference for white meat, which is easy to prepare and is perceived as a better food choice, while in low- and middle-income countries, the upward trend is additionally due to the lower price of chicken meat in compared to other meats [1]. It is estimated that by 2031, poultry meat will constitute 47% of the protein consumed from meat sources, followed by pork, sheep and beef [1].

Campylobacter incidence data vary widely across the world, depending largely on the performance of local surveillance systems and reporting procedures [2]. In the European Union (EU), campylobacteriosis remains the most commonly reported disease of origin in humans since 2007 and, in 2021, accounted for more than 62% of all reported cases of zoonoses [3]. Among the numerous *Campylobacter* species described to date, two thermotolerant species, *C. jejuni* and *C. coli*, were the main species reported and *C. fetus*, *C. upsaliensis* and *C. lari* were reported in minor occurrence [3].

Recent molecular studies have determined the main virulence factors involved in the pathogenesis of *Campylobacter* spp. strains, among these, the ability to adhere, encoded by the genes *cadF*, *racR*, *virB11*, *wlaN*, *pIdA* and *dnaJ*, invasion of intestinal epithelial cells, through the *ciaB* gene, toxin production, mainly through the expression of genes *cdtA*, *cdtB*, *cdtC* and response to oxidative stress related to the *sodB* gene, are the main virulence factors identified [4–7]. Activation of the CmeABC efflux pump, encoded by the *cmeA*, *cmeB* and *cmeC* genes, confers resistance to several antimicrobials [8,9].

Often related to the development of autoimmune diseases, *C. jejuni* is the main species identified as a predisposing factor for peripheral neuropathies, Guillain-Barré and Miller-Fisher syndromes [10,11]. Gastrointestinal manifestations of campylobacteriosis in healthy individuals usually resolve completely without the use of antibiotics, however, administration of antibiotics to treat these infections is reserved for patients with moderate or severe disease, signs of systemic infection or underlying immunodeficiency [12].

Campylobacteriosis cases in humans originate mainly from poultry and cattle [13]. It is estimated that a 3 log₁₀ reduction in cecal concentrations in chickens would

reduce the relative risk of human campylobacteriosis in the EU attributable to chicken meat by 58% [14]. This is because intestinal contamination is the main source of contamination of the chicken carcass at the slaughterhouse, and can persist in the intestine until slaughter age, increasing subsequent dissemination during slaughter [15,16]. Thus, the *Campylobacter* load is likely to increase along the different stages of the production chain [17].

Important factors that influence the occurrence of *Campylobacter* in broiler chickens are mainly related to the intestinal health of the host, the production chain or farm practices [18–22]. Contamination does not result from a single factor, but from a combination of multiple factors both on farms and in slaughterhouses [23]. Therefore, the objective was to determine the occurrence of *Campylobacter* spp. on chicken farms, the results obtained will support control strategies in the production of broiler chickens, in order to promote food security.

Material and Methods

2.1 Ethics Committee

This study was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the University Federal Rural of Pernambuco (CEUA/UFRPE), Recife, Brazil (license number n° 7403040122).

2.2 Sampling and sample collection

Fecal samples were collected through swabs in the cloaca region, in 20 batches of broiler chickens, aged 35 days or more, located in the state of Pernambuco, Brazil. Three regions of the state of Pernambuco were sampled: Zona da Mata, Agreste and Sertão. Two samples were taken from each lot, each sample consisting of a pool of 10 cloaca swabs, totaling 20 cloacal swabs collected per lot. The swabs were placed in tubes containing 5 ml of sterile thioglycolate broth (pH 7.2) and transported to the Meat and Milk Inspection Laboratory (LICAL) of the Department of Veterinary Medicine (DMV) of the Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE) in boxes isotherms (2–8°C) containing recyclable ice.

2.3 Bacterial Isolation

Upon arrival at the laboratory, due to the high contamination of the material, the samples were immediately sown on charcoal agar Cefoperazone Desoxycholate - CCDA (Acumedia®) and Campy Cefex (Acumedia®), both supplemented with vancomycin (10mg) and amphotericin (10mg) and kept at $41.5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ for 48 hours under microaerobic conditions. Suspected colonies of *Campylobacter* spp., based on the macroscopic characteristics and catalase test, were sown on Columbia Blood Agar (Himedia®) supplemented with vancomycin (10mg) and amphotericin (10mg) and conditioned under the same conditions of time and temperature already mentioned. All isolates were subjected to Polymerase Chain Reaction (PCR) for molecular identification of *C. jejuni*, *C. coli* and *C. lari*. The negative isolates for *C. jejuni*, *C. coli* and *C. lari* were identified by the laser desorption-ionization technique associated with the matrix-time of flight (MALDI-TOF MS) (Bruker Daltonics®).

2.3 DNA extraction from isolates

Genomic DNA from all isolates was extracted using a thermal extraction protocol [17]. The DNA obtained was quantified in a spectrophotometer with absorbance readings of 260 nm. The extracted DNA was kept at -20°C until PCR was performed.

2.4 DNA extraction from stool samples

DNA extraction was also performed from the stool samples contained in the bolton broth, according to the recommendations of the commercial kit Quiagen QIAamp Fast DNA Stool. The extracted DNA was kept at -20°C until PCR was performed.

2.5 Molecular identification

Molecular identification of *C. jejuni*, *C. coli* and *C. lari* was performed by PCR through the identification of the *mapA*, *ceuE* and *glyA* genes, respectively. Positive samples for *Campylobacter* species went on to identify the following virulence genes: *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*, *sodB*, *dnaJ* and antimicrobial resistance genes: *cmeA*, *cmeB*, *cmeC*, the sequence of primers and references are described below (Table 1). The PCR thermal profile used for detection of *C. jejuni* and *C. coli* was as follows: 95°C for 5 min for initial denaturation followed by 30 cycles of denaturation at 95°C for 1 min,

annealing temperature at 54°C for 1 min, primer extension step at 72°C for 1 min, and final extension step at 72°C for 10 min. The detection of *C. lari* was according to the thermal profile contained in the reference used for the primer. For detection of virulence and resistance genes, the thermal profile used was: 95°C for 1 min for initial denaturation followed by 35 cycles of denaturation at 95°C for 1 min, annealing temperature at 55°C for 1 min, extension primer at 72°C for 1 min and final extension step at 72°C for 5 min. As a positive control, a reference strain was used for each reaction and as a negative control, milli-q water. The PCR products were submitted to electrophoresis in a 1.5% agarose gel for 60 minutes at 80 V. At the end of the run, the gels stained with BlueGreen (biotechnology LGC) were visualized under ultraviolet light and photographed.

2.6 Reference strains

The reference strains *C. jejuni* (ATCC 29428), *C. coli* (CCAMP 1068), *C. lari* (CCAMP 1012) and for the *cmeA*, *cmeB*, *cmeC*, *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*, *dnaJ*, *sodB* genes (CCAMP1064 and CCAMP 1065), were kindly provided by the Bacterial Zoonoses Laboratory of Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz.

2.7 Investigative questionnaire

An investigative questionnaire was applied at the sample collection site, consisting of questions referring to the identification of the farm, lot, sanitary management adopted and technical assistance.

2.8 Statistical analysis

The results of microbiological analysis, polymerase chain reaction and disk diffusion technique were expressed in absolute and relative frequencies [24].

2. Results

Of the 20 batches of broiler chickens evaluated, 90.0% (18/20) batches were positive for *C. jejuni*, 30.0 % (6/20) batches were positive for *C. lari* and no batch was positive for *C. coli*. In four batches *C. jejuni* and *C. lari* were detected simultaneously (Figure 1). In total, 40 stool samples were evaluated, of which 65.5% (27/40) were positive for *C. jejuni* and 17.5% (7/40) samples positive for *C. lari*. When classifying

the positive batches by region, *C. jejuni* was detected in all regions and *C. lari* was detected in three batches in the Agreste region and in only one batch in the Zona da Mata region.

The distribution of virulence genes in samples positive for *Campylobacter* species are shown in Table 2. When evaluating the positive samples that had the presence of all the genes researched, it was verified that they were present in 22.2% (6/27) of the positive samples for *C. jejuni* and 28.57% (2/7) of the samples positive for *C. lari*. As for the simultaneous presentation of the *cdtA*, *cdtB* and *cdtC* genes, they were detected in 63.0% (17/27) of the positive samples for *C. jejuni* and 28.5% (2/7) of the positive samples for *C. lari* and for the association of genes *cmeA*, *cmeB* and *cmeC* were detected in 100.0% (27/27) of *C. jejuni* positive samples and in 85.7% (6/7) of *C. lari* positive samples. Different virulence profiles were found, according to the association of the studied genes, described in table 3.

With regard to bacterial isolation, 81 isolates were obtained, which were negative in PCR for the *Campylobacter* species investigated in this study. These isolates were identified by MALDI-TOF MS, being 79.0% (64/81) *Proteus mirabilis* and 21.0% (17/81) *Providencia stuartii*.

Based on the results of the investigative questionnaire, it was found that all lots had technical assistance provided by a veterinarian and as for the facilities, all lots were kept in positive pressure aviaries. With regard to the biosecurity measures evaluated in this study, there was uniformity in relation to the use of a vaccination program, carrying out a sanitary vacuum, cleaning and disinfection between batches, insect control, water treatment and non-reuse of litter. However, in 90.0% (18/20) of the lots there is no control over visits and in 100.0% (20/20) it is not required to change clothes when entering the aviaries, only requiring the placement of pads in 65.0% (13/20) of the sampled lots.

Regarding the effective use of arcoluvium and rodoluvium, 90.0% (18/20) do not use or use it inefficiently (use without proper cleaning and renewal of the disinfectant). All batches made use of performance enhancers (Figure 1). As for the facilities, all sampled aviaries are positive pressure, with natural ventilation through the management of curtains.

3. Discussion

The results of this study revealed the first report of *C. lari* (30.0%) in the poultry production chain in the northeast region of Brazil and a high occurrence of *C. jejuni* (90.0%) among the studied flocks. In the southern region of Brazil, a study detected 78.8% of *C. jejuni* and 21.2% of *C. coli* in isolates from feces and a higher occurrence of *C. jejuni* in different types of poultry products analyzed [25]. Industrial poultry has an outstanding trajectory among the agro-industrial production chains in the world, especially in Brazil, which ranks as the world's largest exporter of chicken meat and the second largest producer [26].

It is worth noting that several studies have linked *C. jejuni* with cases of campylobacteriosis in humans [27–29]. And due to the mimicry with human nerve cells, presented by *C. jejuni*, infections by this pathogen can be considered a predisposing factor for autoimmune diseases, such as Guillan-Barré Syndrome and Miller Fischer Syndrome [10,11,30].

In our study, no batch was positive for *C. coli*. However, in birds, both *C. jejuni* and *C. coli* are commonly considered normal inhabitants of the gut microflora; however, the relationship between *Campylobacter* and its avian host following exposure is not fully understood [31], since episodes of enteritis and intestinal damage in broiler chickens have already been observed [32–34]. Furthermore, the coexistence of *C. coli* and *C. jejuni* under the same environmental pressures within the animal feed production system offers a great opportunity for interspecies genomic exchange [28].

Similarly, the simultaneous presence of *C. jejuni* and *C. lari* evidenced in this study suggests the possibility of genomic transfer between different *Campylobacter* species and this should be evaluated in food production systems, as species continue to evolve together under the same environmental pressures. A phylogenetic analysis of *C. jejuni* strains isolated from different sources, locations and years, were highly related to each other, suggesting the potential for transmission between clinical and non-clinical sources and between humans and animals over the years, in the Southeast and South of Brazil [35]. It is known that the transfer of large DNA segments can introduce a large number of polymorphisms and create new phenotypes quickly [36]. And with that, altering the pathogen's ability to survive, resistance trends and consequently may pose a greater risk to public health [28].

Although rare, *C. lari* has caused bacteremia in immunocompromised humans. [37]. Since the colonization and pathogenicity of *Campylobacter* are linked to virulence factors such as adhesion, invasiveness and toxin generation factors [5]. In the present

study, the evaluation of virulence genes showed a high occurrence of genes responsible for the production of cytolethal distending toxin (CDT), with greater simultaneous detection of genes (*cdtA*, *cdtB* and *cdtC*) among positive samples for *C. jejuni* (63.0%) when compared to positive samples for *C. lari* (28.5%).

One of the main virulence factors related to *Campylobacter* spp. in animals and humans is cytolethal distending toxin (CDT), encoded by three adjacent genes (*cdtA*, *cdtB*, *cdtC*), these three clustering genes are all required for these toxins to be active [38]. CDT contributes to the pathogenesis of campylobacteriosis by inhibiting cellular and humoral immunity via apoptosis of immune cells and generating necrosis of epithelial cells and fibroblasts, which results in slow wound healing and the occurrence of clinical signs [39].

A study carried out in commercial broilers and laying hens identified the presence of *cdtA*, *cdtB* and *cdtC* genes in 13.3%, 6.6% and 100.0% of *Campylobacter* spp. isolates, respectively [40]. Another study carried out in conventional broiler farms, with fecal and environmental samples, reported that virulence genes were present in all *C. jejuni* isolates, while *cdtA* and *cdtC* were absent in *C. coli* [41]. Similar to the results found in our study, in Brazil, *C. jejuni* isolates showed high occurrence, with detection of *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*, *dnaJ* and *sodB* genes in all isolates [42]. In a research that compared isolates of *C. jejuni* from different origins, it also detected a high occurrence for the cluster of *cdtABC* genes, present in 89.8% of isolates from humans and 100.0% of isolates from poultry origin [43].

As for the research of the *dnaJ* and *sodB* genes, the present study showed the highest occurrence of the *dnaJ* gene (100.0%) among the positive samples for *C. jejuni* and *C. lari*, while the *sodB* gene showed the highest occurrence among the positive samples for *C. lari* (100.0%) and less frequent among positive samples for *C. jejuni* (51.8%). The *dnaJ* gene, it encodes a protein related to heat shock and intimately involved in the bacterial adhesion and colonization process, since mutations in this gene reduce the colonization process [44]. The high occurrence of this gene was also reported in a study carried out in China, in 97.1% of the isolates of *C. jejuni* [5].

Encoded by the *sodB* gene, the enzyme superoxide dismutase, confers protection against the effects of oxidative stress, therefore, the presence of this gene is important for the survival of the bacteria in adverse conditions, such as, for example, the stress caused by the presence of oxygen [45].

It is important to emphasize the high occurrence found in this study for the *cmeA*, *cmeB* and *cmeC* genes, the association of these genes was detected in all positive samples for *C. jejuni* (100.0%) and in most of the positive samples for *C. lari* (85.7%), this fact is worrying and deserves attention, since they are responsible for the mechanisms of pump efflux, conferring mechanisms of antimicrobial resistance. CmeABC efflux pumps have often been described as the main drug efflux mechanism for *Campylobacter* and confer resistance to a number of antimicrobial agents [28,46]. In Brazil, equivalent data were found between isolates of *C. jejuni* and *C. coli*, with detection of the *cmeA*, *cmeB* and *cmeC* genes in 94.3% of the isolates and related the presence of these genes to resistance to enrofloxacin [47]. In addition, it is essential for the colonization of *Campylobacter* in the animal intestine by mediating biliary resistance [48].

Worldwide, outbreaks of campylobacteriosis have been increasing and it is believed that the main routes of transmission of these bacteria to humans are through consumption of contaminated food [49]. Chicken carcasses are easily contaminated during slaughter, causing infection in humans [5]. A study carried out in Brazil suggested that infected broiler chicken batches may be an important source of contamination of poultry products, mainly by *C. jejuni* [25].

In view of the results obtained in this study, we can state that *C. jejuni* is present in all regions studied and *C. lari* was detected in greater occurrence in the Agreste region, responsible for the largest poultry production in the state. This fact is worrying, as some birds are not only positive for *Campylobacter* spp, but also the levels of contamination can be extremely high, for this reason there is an urgent need to reduce the prevalence and levels of contamination of carcasses to reduce the risk of infection in humans. According to Vohra and collaborators, the control of *C. jejuni* in birds is essential to reduce human campylobacteriosis [50].

It was found that intestinal contamination is the main source of contamination of the chicken carcass at the slaughterhouse, since pathogenic bacteria accumulate in large numbers in broiler chickens, and may persist in the intestine until the age of slaughter, increasing dissemination during the slaughter [16,51]. Thus, the load of this pathogen is likely to increase along the different stages of the production chain. [17]. It is estimated that a 3 log₁₀ reduction in cecal concentrations in chickens would reduce the relative risk of human campylobacteriosis in the EU attributable to chicken meat by

58% [14]. In the Netherlands, broiler chickens and turkeys were the main source of human campylobacteriosis accounting for about half of cases. [13].

A study that evaluated possible risk factors for the higher prevalence of *Campylobacter* spp. in certain farms, revealed that the types of ventilation system influence the probability of colonization in broiler flocks, since natural ventilation presented a greater risk than those with forced ventilation [52]. This factor, associated with poor biosecurity, could explain the high occurrence of *C. jejuni* found in the studied lots, since all lots were kept in aviaries with natural ventilation.

Natural air systems favor the entry of this pathogen by wind [53] or by vectors [54,55]. Given the importance of airborne transmission, studies bring air sampling as a surveillance tool that can be integrated into monitoring programs [56,57]. In addition, high air temperature and humidity promote colonization in broiler chickens [58].

Due to heat stress, birds express higher levels of catecholamines (norepinephrine) in the blood, affecting the animal's immune status by increasing susceptibility to infections [59]. Research has shown that welfare and health indicators can be used to identify positive flocks and concluded that by controlling the welfare and health indicators of broiler chickens, the prevalence of human campylobacteriosis can potentially be reduced [60].

In this study, there was uniformity in relation to water treatment. Since water disinfection, mainly with sodium hypochlorite, is a practice used to inhibit all potential pathogens present in water, interactions between sodium hypochlorite and antimicrobials must be considered during batch medication, as they may decrease antimicrobial activity depending on the drug and disinfectant concentration [61]. A study conducted in Spain found that water was not considered a source of *Campylobacter* for broiler chickens [52].

In all sampled batches, the existence of a vaccination program was verified, however, in Brazil there is no specific legislation and there are no official data on the prevalence of this pathogen in the production chain of broiler chickens. Some initial studies were performed to evaluate the effectiveness of vaccination as a method of control [50,62,63], including in ovo vaccination [64,65], however, the effectiveness of vaccination in reducing colonization or protection against *Campylobacter* spp. has not been proven.

The best way to reduce contamination in chicken carcasses is to prevent colonization in the house [51]. Thus, proper cleaning and disinfection during downtime

is important to ensure complete removal of *Campylobacter* spp. in broiler aviaries if the flock is colonized, in addition, strict biosecurity measures are critical in order to prevent colonization and streaming [52]. However, a combination of measures that can act synergistically is needed, with greater biosecurity and hygiene as pillars of interventions on the farm [66,67].

C. jejuni is present in all regions studied and *C. lari* was detected mainly in the Agreste region, a worrying fact since this region holds a large part of the state's poultry production. With regard to the evaluation of some biosecurity measures applied by the poultry production sector in the regions studied, the need for improvements to be implemented in the broiler chicken industry was highlighted, such as changing clothes when entering the aviaries, controlling visits, effective use of a disinfection facility for wheels and vehicles, among other practices that can minimize the presence not only of *Campylobacter* spp., but also of other pathogens, in the rearing environment.

The detection of positive samples compared to failure in bacterial isolation can be justified due to the high contamination of the evaluated material, since the presence of contaminants impair bacterial isolation, in addition, under adverse conditions, they can acquire the status of viable cells but not cultivable (VBNC). It is known that the reference method based on bacterial culture underestimates the number of *Campylobacter*, due to the presence of VBNC stages of the bacteria [68].

Interestingly, *Proteus mirabilis* is pointed out in this study as the main contaminant, identified in most of the isolates (79.0%), by the MALDI-TOF MS technique. Considered an emerging and often overlooked pathogen, *Proteus mirabilis*, is a common cause of Urinary Tract Infections (UTIs) and sepsis in humans [69,70]. In Brazil, studies have demonstrated the presence of important resistance and virulence factors in isolates [71,72]. Thus, the high occurrence of this pathogen in chicken carcasses suggests a potential risk to human health [73,74]. Less frequently, *Providencia stuartii* (21.0%) was also identified among the isolates. Despite being an opportunistic pathogen, this bacterium can cause infections in humans. [75].

Although *Campylobacter* species were not detected among those isolated by the MALDI-TOF MS technique, the identification of contaminants provides important information for improving the bacterial isolation method, such as the inclusion of antimicrobials, more effective against *Proteus* and *Providencia*, in the diagnosis microbiological. However, molecular diagnostic techniques are recommended to identify this pathogen in highly contaminated samples.

4. Conclusion

In conclusion, *C. jejuni* and *C. lari*, carriers of genes that confer virulence and antimicrobial resistance, are present in broiler flocks in northeastern Brazil. In this way, batches of infected broiler chickens can be identified as sources of contamination, especially during slaughter, establishing a food risk for consumption of the final product, since they are pathogens of importance to public health. Therefore, reducing contamination during production, processing and preparation of food of animal origin, will require a broader implementation of known prevention measures and new strategies that target specific pathogens, as well as the adoption of practices related to biosecurity, are essential to interrupt the cycle of *Campylobacter* spp., between lots and farms.

5. References

- [1] OECD, FAO, OECD-FAO Agricultural Outlook 2022-2031, 2022.
- [2] P. Fravalo, P. Kooh, L. Mughini-Gras, J. David, A. Thébault, V. Cadavez, U. Gonzales-Barron, Risk factors for sporadic campylobacteriosis: A systematic review and meta-analysis, *Microb. Risk Anal.* 17 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.mran.2020.100118>.
- [3] EFSA, ECDC, The European Union One Health 2021 Zoonoses Report, *EFSA J.* 20 (2022). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7666>.
- [4] M. Gharbi, A. Béjaoui, C. Ben Hamda, K. Ghedira, A. Ghram, A. Maaroufi, Distribution of virulence and antibiotic resistance genes in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from broiler chickens in Tunisia, *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 55 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2021.07.001>.
- [5] H. Yang, Y. Li, Y. Zhang, B. Dong, B. Duan, L. Guo, T. Wang, X. Lv, M. Zheng, X. Cui, R. Bai, Prevalence, drug resistance spectrum and virulence gene analysis of *Campylobacter jejuni* in broiler farms in central Shanxi, China, *Poult. Sci.* 102 (2023) 102419. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102419>.
- [6] A.B.G. Buiatte, R.T. de Melo, P.A.B.M. Peres, C.M. Bastos, A.L. Graziotin, P.M. Armendaris Rodriguez, F. Barreto, D.A. Rossi, Virulence, antimicrobial resistance, and dissemination of *Campylobacter coli* isolated from chicken carcasses in Brazil, *Food Control.* 147 (2023) 109613. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.109613>.
- [7] T. Kayman, S. Abay, F. Aydin, O. Şahin, Antibiotic resistance of *Campylobacter jejuni* isolates recovered from humans with diarrhoea in Turkey, *J. Med. Microbiol.* 68 (2019) 136–142. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000890>.
- [8] K. Wieczorek, J. Osek, Antimicrobial Resistance Mechanisms among *Campylobacter*, *Biomed Res. Int.* 2013 (2013) 340605. <https://doi.org/10.1155/2013/340605>.
- [9] N.M. Iovine, Resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni*, *Vilurence.* 4 (2013) 230–240.
- [10] A.P. Heikema, B.C. Jacobs, D. Horst-Kreft, R. Huizinga, M.L. Kuijf, H.P. Endtz, J.N. Samsom, W.J.B. van Wamel, Siglec-7 specifically recognizes *Campylobacter jejuni* strains associated with oculomotor weakness in Guillain-Barré syndrome and Miller Fisher syndrome, *Clin. Microbiol. Infect.* 19 (2013) E106–E112. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12073>.
- [11] S. Hayat, M.A. Nayeem, A. Asad, S. Faruque, M.G. Mostafa, R. Begum, I. Jahan, Z. Islam, Genomic characterization of *Campylobacter jejuni* bd-67: a highly pathogenic strain associated with severe form of Guillain- Barré Syndrome, *Int. J. Infect. Dis.* 130 (2023) S73–S74. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2023.04.183>.
- [12] C. García-Sánchez, J. García-Rodríguez, G. Ruiz-Carrascoso, Clinical and microbiological findings of recurrent *Campylobacter* spp. gastroenteritis in a tertiary care hospital, *Enfermedades Infecc. y Microbiol. Clin. (English Ed.)*. (2023). <https://doi.org/10.1016/j.eimce.2022.09.013>.
- [13] L. Mughini-Gras, R. Pijnacker, C. Coipan, A.C. Mulder, A. Fernandes Veludo, S. de Rijk, A.H.A.M. van Hoek, R. Buij, G. Muskens, M. Koene, K. Veldman, B. Duim, L. van der Graaf-van Bloois, C. van der Weijden, S. Kuiling, A. Verbruggen, J. van der Giessen, M. Opsteegh, M. van der Voort, G.A.A. Castelijin, F.M. Schets, H. Blaak, J.A. Wagenaar, A.L. Zomer, E. Franz,

- Sources and transmission routes of campylobacteriosis: A combined analysis of genome and exposure data, *J. Infect.* 82 (2021) 216–226. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.09.039>.
- [14] EFSA, BIOHAZ, Update and review of control options for *Campylobacter* in broilers at primary production, *EFSA J.* 18 (2020) 1–89. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6090>.
- [15] R.B. Morgan, Y.M. Sierra–Arguello, G. Perdoncini, K.A. Borges, T.Q. Furian, M.J.P. Gomes, D. Lima, C.T.P. Salle, H.L.S. Moraes, V.P. Nascimento, Comparison of transport crates contamination with *Campylobacter* spp. before and after the cleaning and disinfection procedure in broiler slaughterhouses, *Poult. Sci.* 101 (2022) 101909. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101909>.
- [16] S. Sevilla-Navarro, C. Marin, V. Cortés, C. García, P. Catalá-Gregori, *Campylobacter* prevalence and risk factors associated with exceeding allowable limits in poultry slaughterhouses in Spain, *Vet. Rec.* (2020). <https://doi.org/10.1136/vr.105558>.
- [17] J. Mota-Gutierrez, L. Lis, A. Lasagabaster, I. Nafarrate, I. Ferrocino, L. Cocolin, K. Rantsiou, *Campylobacter* spp. prevalence and mitigation strategies in the broiler production chain, *Food Microbiol.* 104 (2022) 103998. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.103998>.
- [18] C.R. Barker, A. Painset, C. Swift, C. Jenkins, G. Godbole, M.C.J. Maiden, T.J. Dallman, Microevolution of *Campylobacter jejuni* during long-term infection in an immunocompromised host, *Sci. Rep.* 10 (2020) 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66771-7>.
- [19] A. McKenna, U.Z. Ijaz, C. Kelly, M. Linton, W.T. Sloan, B.D. Green, U. Lavery, N. Dorrell, B.W. Wren, A. Richmond, N. Corcionivoschi, O. Gundogdu, Impact of industrial production system parameters on chicken microbiomes: Mechanisms to improve performance and reduce *Campylobacter*, *Microbiome.* 8 (2020) 1–13. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00908-8>.
- [20] I. Perez-Arnedo, E. Gonzalez-Fandos, Prevalence of *Campylobacter* spp. In poultry in three Spanish farms, a slaughterhouse and a further processing plant, *Foods.* 8 (2020) 1–12. <https://doi.org/10.3390/foods8030111>.
- [21] N. Sibanda, A. McKenna, A. Richmond, S.C. Ricke, T. Callaway, A.C. Stratakos, O. Gundogdu, N. Corcionivoschi, A review of the effect of management practices on *Campylobacter* prevalence in poultry farms, *Front. Microbiol.* 9 (2018). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02002>.
- [22] Y. Tang, Q. Jiang, H. Tang, Z. Wang, Y. Yin, F. Ren, L. Kong, X. Jiao, J. Huang, Characterization and Prevalence of *Campylobacter* spp. From Broiler Chicken Rearing Period to the Slaughtering Process in Eastern China, *Front. Vet. Sci.* 7 (2020) 1–9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00227>.
- [23] A. Horvat, P.A. Luning, C. DiGennaro, E. Rommens, E. van Daalen, M. Koene, M.S. Jalali, The impacts of biosecurity measures on *Campylobacter* contamination in broiler houses and slaughterhouses in the Netherlands: A simulation modelling approach, *Food Control.* 141 (2022) 109151. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109151>.
- [24] A. Field, *Discovering Statistics Using IBM SPSS Statistics*, 4th ed., 2013.
- [25] D.T. da Silva, T.S. Tejada, D. Blum-Menezes, P.A. Dias, C.D. Timm, *Campylobacter* species isolated from poultry and humans, and their analysis using PFGE in southern Brazil, *Int. J. Food Microbiol.* 217 (2016) 189–194. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.025>.
- [26] ABPA, Relatório Anual, Assoc. Bras. Proteína Anim. (2023) 248.

- [27] V. Bravo, A. Katz, L. Porte, T. Weitzel, C. Varela, N. Gonzalez-Escalona, C.J. Blondel, Genomic analysis of the diversity, antimicrobial resistance and virulence potential of clinical *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains from Chile, PLoS Negl. Trop. Dis. 15 (2021) 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009207>.
- [28] D.M. Hull, E. Harrell, A.H.M. van Vliet, M. Correa, S. Thakur, Antimicrobial resistance and interspecies gene transfer in *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* isolated from food animals, poultry processing, and retail meat in North Carolina, 2018–2019, PLoS One. 16 (2021) 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246571>.
- [29] E. Rossler, C. Olivero, L.P. Soto, L.S. Frizzo, J. Zimmermann, M.R. Rosmini, G.J. Sequeira, M.L. Signorini, M. V. Zbrun, Prevalence, genotypic diversity and detection of virulence genes in thermotolerant *Campylobacter* at different stages of the poultry meat supply chain, Int. J. Food Microbiol. 326 (2020) 108641. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108641>.
- [30] A.P. Heikema, Z. Islam, D. Horst-Kreft, R. Huizinga, B.C. Jacobs, J.A. Wagenaar, F. Poly, P. Guerry, A. van Belkum, C.T. Parker, H.P. Endtz, *Campylobacter jejuni* capsular genotypes are related to Guillain-Barré syndrome, Clin. Microbiol. Infect. 21 (2015) 852.e1–852.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.05.031>.
- [31] R.A. Bailey, A. Kranis, A. Psifidi, K.A. Watson, L. Rothwell, P.M. Hocking, P. Kaiser, M.P. Stevens, S. Avendano, Colonization of a commercial broiler line by *Campylobacter* is under limited genetic control and does not significantly impair performance or intestinal health, Poult. Sci. 97 (2018) 4167–4176. <https://doi.org/10.3382/ps/pey295>.
- [32] S. Humphrey, G. Chaloner, K. Kemmett, N. Davidson, N. Williams, A. Kipar, T. Humphrey, P. Wigley, *Campylobacter jejuni* is not merely a commensal in commercial broiler chickens and affects bird welfare, MBio. 5 (2014) 1–7. <https://doi.org/10.1128/mBio.01364-14>.
- [33] Z. Han, L. Li, T. Willer, W. Baumgärtner, S. Rautenschlein, Adhesion and invasion of *Campylobacter jejuni* in chickens with a modified gut microbiota due to antibiotic treatment, Vet. Microbiol. 240 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.108504>.
- [34] W.A. Awad, C. Hess, M. Hess, Re-thinking the chicken–*Campylobacter jejuni* interaction: a review, Avian Pathol. 47 (2018) 352–363. <https://doi.org/10.1080/03079457.2018.1475724>.
- [35] M.R. Frazão, G. Cao, M.I.C. Medeiros, S.D.S. Duque, M.W. Allard, J.P. Falcão, Antimicrobial Resistance Profiles and Phylogenetic Analysis of *Campylobacter jejuni* Strains Isolated in Brazil by Whole Genome Sequencing, Microb. Drug Resist. 27 (2021) 660–669. <https://doi.org/10.1089/mdr.2020.0184>.
- [36] S.K. Sheppard, M.C.J. Maiden, The evolution of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*, Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 7 (2015) 1–14. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018119>.
- [37] Y. Miyamatsu, R. Tanizaki, S. Yamada, I. Tsujimura, H. Wakabayashi, Cellulitis with persistent bacteremia caused by *Campylobacter lari* in a patient with mantle-cell lymphoma, IDCases. 23 (2021) e01053. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2021.e01053>.
- [38] S. Yamasaki, M. Asakura, T. Tsukamoto, S.M. Faruque, R. Deb, T. Ramamurthy, Cytotoxic distending toxin (CDT): Genetic diversity, structure and role in diarrheal disease, Toxin Rev. 25 (2006) 61–88.

- <https://doi.org/10.1080/15569540500320938>.
- [39] J.L. Smith, D.O. Bayles, The contribution of cytolethal distending toxin to bacterial pathogenesis, *Crit. Rev. Microbiol.* 32 (2006) 227–248. <https://doi.org/10.1080/10408410601023557>.
- [40] V. Rangaraju, B.A. Malla, A.A.P. Milton, A. Madesh, K.B. Madhukar, A. Kadwalia, O.R. Vinodhkumar, M.S. Kumar, Z.B. Dubal, Occurrence, antimicrobial resistance and virulence properties of thermophilic *Campylobacter coli* originating from two different poultry settings, *Gene Reports.* 27 (2022) 101618. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2022.101618>.
- [41] L. García-Sánchez, B. Melero, A.M. Diez, I. Jaime, A. Canepa, J. Rovira, Genotyping, virulence genes and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. isolated during two seasonal periods in Spanish poultry farms, *Prev. Vet. Med.* 176 (2020) 104935. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.104935>.
- [42] S. de F.R. Würfel, D. da F. Prates, N.R. Kleinubing, J.D. Vecchia, C. Vaniel, L. Haubert, O.A. Dellagostin, W.P. da Silva, Comprehensive characterization reveals antimicrobial-resistant and potentially virulent *Campylobacter* isolates from poultry meat products in Southern Brazil, *Lwt.* 149 (2021) 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111831>.
- [43] B. Wysok, J. Wojtacka, R. Kivistö, Pathogenicity of *Campylobacter* strains of poultry and human origin from Poland, *Int. J. Food Microbiol.* 334 (2020) 108830. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108830>.
- [44] M.E. Konkel, B.J. Kim, J.D. Klena, C.R. Young, R. Ziprin, Characterization of the thermal stress response of *Campylobacter jejuni*, *Infect. Immun.* 66 (1998) 3666–3672. <https://doi.org/10.1128/iai.66.8.3666-3672.1998>.
- [45] D.J. Bolton, *Campylobacter* virulence and survival factors, *Food Microbiol.* 48 (2015) 99–108. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.017>.
- [46] S. de F.R. Würfel, S. Jorge, N.R. Oliveira, F.S. Kremer, C.D. Sanchez, V.F. Campos, L. da S. Pinto, W.P. Silva, O.A. Dellagostin, *Campylobacter jejuni* isolated from poultry meat in Brazil: in silico analysis and genomic features of two strains with different phenotypes of antimicrobial susceptibility, *Mol. Biol. Rep.* 47 (2020) 671–681. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05174-y>.
- [47] R.J. Nascimento, B.S. Frasão, T.S. Dias, E.R. Nascimento, L.S.B. Tavares, V.L. Almeida, M.H.C. Aquino, Detection of efflux pump CmeABC in enrofloxacin resistant *Campylobacter* spp. strains isolated from broiler chickens (*Gallus gallus domesticus*) in the state of Rio de Janeiro, Brazil, *Pesqui. Vet. Bras.* 39 (2019) 728–733. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-6004>.
- [48] J. Lin, C. Cagliero, B. Guo, Y.W. Barton, M.C. Maurel, S. Payot, Q. Zhang, Bile salts modulate expression of the CmeABC multidrug efflux pump in *Campylobacter jejuni*, *J. Bacteriol.* 187 (2005) 7417–7424. <https://doi.org/10.1128/JB.187.21.7417-7424.2005>.
- [49] A. Igwaran, A.I. Okoh, Human campylobacteriosis: A public health concern of global importance, *Heliyon.* 5 (2019) e02814. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02814>.
- [50] P. Vohra, C. Chintoan-Uta, A. Bremner, M. Mauri, V.S. Terra, J. Cuccui, B.W. Wren, L. Vervelde, M.P. Stevens, Evaluation of a *Campylobacter jejuni* N-glycan-ExoA glycoconjugate vaccine to reduce *C. jejuni* colonisation in chickens, *Vaccine.* 39 (2021) 7413–7420. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.10.085>.
- [51] G. Rasschaert, L. De Zutter, L. Herman, M. Heyndrickx, *Campylobacter* contamination of broilers: the role of transport and slaughterhouse, *Int. J. Food*

- Microbiol. 322 (2020) 108564.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108564>.
- [52] S. Urdaneta, C. Lorca-Oró, R. Dolz, S. López-Soria, M. Cerdà-Cuéllar, In a warm climate, ventilation, indoor temperature and outdoor relative humidity have significant effects on *Campylobacter* spp. colonization in chicken broiler farms which can occur in only 2 days, Food Microbiol. 109 (2023).
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104118>.
- [53] K.N. Olsen, M. Lund, J. Skov, L.S. Christensen, J. Hoorfar, Detection of *Campylobacter* bacteria in air samples for continuous real-time monitoring of *Campylobacter* colonization in broiler flocks, Appl. Environ. Microbiol. 75 (2009) 2074–2078. <https://doi.org/10.1128/AEM.02182-08>.
- [54] J.M. Templeton, A.J. De Jong, P.J. Blackall, J.K. Mifflin, Survival of *Campylobacter* spp. in darkling beetles (*Alphitobius diaperinus*) and their larvae in Australia, Appl. Environ. Microbiol. 72 (2006) 7909–7911.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01471-06>.
- [55] B. Hald, H. Skovgård, K. Pedersen, H. Bunkenborg, Influxed insects as vectors for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Danish broiler houses, Poult. Sci. 87 (2008) 1428–1434. <https://doi.org/10.3382/ps.2007-00301>.
- [56] K.B. Andersen, R.M. Engberg, J. Skov, A new tool for air sample-based surveillance of *Campylobacter* and *Salmonella* in poultry flocks, J. Appl. Poult. Res. 31 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.japr.2022.100236>.
- [57] G.S. Johannessen, G. Garofolo, G. Di Serafino, I. Koláčková, R. Karpíšková, K. Wiczorek, J. Osek, J. Christensen, M. Torp, J. Hoorfar, *Campylobacter* in chicken – Critical parameters for international, multicentre evaluation of air sampling and detection methods, Food Microbiol. 90 (2020) 103455.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103455>.
- [58] K. Ishihara, T. Chuma, M. Andoh, M. Yamashita, H. Asakura, S. Yamamoto, Effect of climatic elements on *Campylobacter* colonization in broiler flocks reared in southern Japan from 2008 to 2012, Poult. Sci. 96 (2017) 931–937.
<https://doi.org/10.3382/ps/pew354>.
- [59] T.A. Cogan, A.O. Thomas, L.E.N. Rees, A.H. Taylor, M.A. Jepson, P.H. Williams, J. Ketley, T.J. Humphrey, Norepinephrine increases the pathogenic potential of *Campylobacter jejuni*, Gut. 56 (2007) 1060–1065.
<https://doi.org/10.1136/gut.2006.114926>.
- [60] I. Alpigliani, J.C. Abrahantes, V. Michel, A. Huneau-Salaün, M. Chemaly, L.J. Keeling, A. Gervelmeyer, C. Bacci, F. Brindani, S. Bonardi, F. Berthe, Associations between animal welfare indicators and *Campylobacter* spp. in broiler chickens under commercial settings: A case study, Prev. Vet. Med. 147 (2017) 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.09.005>.
- [61] C. Ledesma, C. Rosario, J. Gracia-Mora, G. Tapia, H. Sumano, L. Gutiérrez, Influence of chlorine, iodine, and citrate-based water sanitizers on the oral bioavailability of enrofloxacin in broiler chickens, J. Appl. Poult. Res. 27 (2018) 71–80. <https://doi.org/10.3382/japr/pfx044>.
- [62] N. Gloanec, D. Dory, S. Quesne, V. Béven, T. Poezevara, M. Amelot, M. Chemaly, M. Guyard-Nicodème, Research Note: Analysis of immune responses in broilers after vaccination against *Campylobacter jejuni*, Poult. Sci. 102 (2023) 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102510>.
- [63] N. Gloanec, M. Guyard, S. Quesne, V. Béven, T. Poezevara, A. Keita, M. Chemaly, D. Dory, Evaluation of immune responses to vaccination against *Campylobacter* in two different poultry breeds, Anim. - Sci. Proc. 13 (2022)

668. <https://doi.org/10.1016/j.anscip.2022.05.119>.
- [64] X. Liu, L.J. Adams, X. Zeng, J. Lin, Evaluation of in ovo vaccination of DNA vaccines for *Campylobacter* control in broiler chickens, *Vaccine*. 37 (2019) 3785–3792. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.05.082>.
- [65] J. Vandeputte, A. Martel, N. Van Rysselberghe, G. Antonissen, M. Verlinden, L. De Zutter, M. Heyndrickx, F. Haesebrouck, F. Pasmans, A. Garmyn, In ovo vaccination of broilers against *Campylobacter jejuni* using a bacterin and subunit vaccine, *Poult. Sci.* 98 (2019) 5999–6004. <https://doi.org/10.3382/ps/pez402>.
- [66] A.D. Wales, A.B. Vidal, R.H. Davies, J.D. Rodgers, Field Interventions Against Colonization of Broilers by *Campylobacter*, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 18 (2019) 167–188. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12397>.
- [67] T. Lu, M. Marmion, M. Ferone, P. Wall, A.G.M. Scannell, On farm interventions to minimise *Campylobacter* spp. contamination in chicken, *Br. Poult. Sci.* 62 (2021) 53–67. <https://doi.org/10.1080/00071668.2020.1813253>.
- [68] O. Dubovitskaya, D. Seinige, A. Valero, F. Reich, C. Kehrenberg, Quantitative assessment of *Campylobacter* spp. levels with real-time PCR methods at different stages of the broiler food chain, *Food Microbiol.* 110 (2023) 104152. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104152>.
- [69] W.D. Oliveira, M.G.L. Barboza, G. Faustino, W.T.Y. Inagaki, M.S. Sanches, R.K.T. Kobayashi, E.C. Vespero, S.P.D. Rocha, Virulence, resistance and clonality of *Proteus mirabilis* isolated from patients with community-acquired urinary tract infection (CA-UTI) in Brazil, *Microb. Pathog.* 152 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104642>.
- [70] J. Yang, G. Shan, G. Yu, J. Wei, Q. Zhang, W. Su, Q. Lin, Z. Zheng, G. Wu, G. Li, Q. Chang, H. Yuan, Y. He, Y. Chen, Y. Zhang, H. Huang, W. Hu, R. Song, Y. Weng, X. Li, S. Liu, Whole genome sequencing of multidrug-resistant *Proteus mirabilis* strain PM1162 recovered from a urinary tract infection in China, *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 33 (2023) 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2023.02.014>.
- [71] E.F. Firmo, E.M.B. Beltrão, F.R.F. da Silva, L.C. Alves, F.A. Brayner, D.L. Veras, A.C.S. Lopes, Association of blaNDM-1 with blaKPC-2 and aminoglycoside-modifying enzyme genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Serratia marcescens* clinical isolates in Brazil, *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 21 (2020) 255–261. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.08.026>.
- [72] E.M.B. Beltrão, É.M. de Oliveira, A.M.L. Scavuzzi, E.F. Firmo, A.C. de S. Lopes, Virulence factors of *Proteus mirabilis* clinical isolates carrying blaKPC-2 and blaNDM-1 and first report blaOXA-10 in Brazil, *J. Infect. Chemother.* 28 (2022) 363–372. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2021.11.001>.
- [73] Z. Yu, M. Joossens, A.M. Van den Abeele, P.J. Kerkhof, K. Houf, Isolation, characterization and antibiotic resistance of *Proteus mirabilis* from Belgian broiler carcasses at retail and human stool, *Food Microbiol.* 96 (2021) 103724. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103724>.
- [74] M.S. Sanches, C. Rodrigues da Silva, L.C. Silva, V.H. Montini, M.G. Lopes Barboza, G.H. Migliorini Guidone, B.H. Dias de Oliva, E.K. Nishio, L.C. Faccin Galhardi, E.C. Vespero, M.C. Lelles Nogueira, S.P. Dejato Rocha, *Proteus mirabilis* from community-acquired urinary tract infections (UTI-CA) shares genetic similarity and virulence factors with isolates from chicken, beef and pork meat, *Microb. Pathog.* 158 (2021) 1–8.

- <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105098>.
- [75] S. Molnár, M.M.M. Flonta, A. Almaş, M. Buzea, M. Licker, M. Rus, A. Földes, E. Székely, Dissemination of NDM-1 carbapenemase-producer *Providencia stuartii* strains in Romanian hospitals: a multicentre study, *J. Hosp. Infect.* 103 (2019) 165–169. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2019.04.015>.
- [76] S. Saiyudthong, K. Phusri, S. Buates, Rapid detection of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Campylobacter lari* in fresh chicken meat and by-products in Bangkok, Thailand, using modified multiplex PCR, *J. Food Prot.* 78 (2015) 1363–1369. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-415>.
- [77] K.B.P.B. Casaril, Padronização de PCR tradicional e em tempo real para detecção de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* em alimentos, 2010.
- [78] G. Wang, C.G. Clark, T.M. Taylor, C. Pucknell, C. Barton, L. Price, D.L. Woodward, F.G. Rodgers, Colony Multiplex PCR Assay for Identification and Differentiation of, *Society.* 40 (2002) 4744–4747. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.12.4744>.
- [79] T.E. Hickey, A.L. McVeigh, D.A. Scott, R.E. Michielutti, A. Bixby, S.A. Carroll, A.L. Bourgeois, P. Guerry, *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin mediates release of interleukin-8 from intestinal epithelial cells, *Infect. Immun.* 68 (2000) 6535–6541. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.12.6535-6541.2000>.
- [80] S. Datta, H. Niwa, K. Itoh, Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler and bovine faeces, *J. Med. Microbiol.* 52 (2003) 345–348. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05056-0>.
- [81] L. Koolman, P. Whyte, C. Burgess, D. Bolton, Distribution of virulence-associated genes in a selection of *Campylobacter* isolates, *Foodborne Pathog. Dis.* 12 (2015) 424–432. <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1883>.

Table 1. Primer sequences used for the uniplex PCR assay and predicted sizes of PCR products

Target genes	Primer*	Sequence (5'-3')	Size (bp)	Reference
<i>Campylobacter</i> spp. 16S rDNA	16S rDNA F	GGAGGCAGCAGTAGGGAAA	1.062	[76]
	16S rDNA R	TGACGGGCGGTGAGTACAG		
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>mapA</i> R	AGTCCTGGTGGTTTGAAGC	202	[77]
	<i>mapA</i> F	CCGCATTAATAATTCACATCG		
<i>Campylobacter coli</i>	<i>ceuE</i> F	ATGAAAAAATCTTTAGTTTTTGC A	889	[77]
	<i>ceuE</i> R	ATTTTATTATTTGTAGCAGCG		
<i>Campylobacter lari</i>	<i>glyA</i> F	TAGAGAGATAGCAAAAGAGA	251	[78]
	<i>glyA</i> R	TACACATAATAATCCCACCC		
Toxin production				
<i>cdtA</i>	<i>cdtA</i> F	CCTTGTGATGCAAGCAATC	370	[79]
	<i>cdtA</i> R	ACACTCCATTTGCTTTCTG		
<i>cdtB</i>	<i>cdtB</i> F	CAGAAAGCAAATGGAGTGTT	620	[80]
	<i>cdtB</i> R	AGCTAAAAGCGGTGGAGTAT		
<i>cdtC</i>	<i>cdtC</i> F	CGATGAGTTAAAACAAAAAGAT A	182	[80]
	<i>cdtC</i> R	TTGGCATTATAGAAAATACAGTT		
Stress response and survival				
<i>sodB</i>	<i>sodB</i> F	AAGTACAGGCTGTGGCTGTG	300	[81]
	<i>sodB</i> R	AAATAAGCAGGGCGTGCATTG		
Adhesion				
<i>dnaJ</i>	<i>dnaJ</i> F	CCGCGTATGGTGGGTACTTT	646	

dnaJ R AAGGCGGTGGATTTGGTTCT

Multidrug resistance genes (Efflux pump)

<i>cmeA</i>	<i>cmeA</i> F	TGTGCATCAGCTCCTGTGTAA	957	(Koolman <i>et al.</i> , 2015)
	<i>cmeA</i> R	ACGGACAAGCTTTGATGGCT		
<i>cmeB</i>	<i>cmeB</i> F	TGCGGGTTGACCTTGA ACTT	993	
	<i>cmeB</i> R	TGTGCACTCTTTTTGCGACG		
<i>cmeC</i>	<i>cmeC</i> F	CAACCGCAGCATTAAAGCCAA	364	
	<i>cmeC</i> R	TTGGGATTTGAAAGCGGGGA		

* F= Forward, R= Reverse.

Table 2. Distribution of virulence genes in samples positive for *Campylobacter* species from broiler chicken feces in northeastern Brazil

Genes	<i>Campylobacter</i> species	
	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Campylobacter lari</i>
<i>cdtA</i>	92.6% (25/27)	85.7% (6/7)
<i>cdtB</i>	100.0% (27/27)	100.0% (7/7)
<i>cdtC</i>	66.6% (18/27)	28.5% (2/7)
<i>dnaJ</i>	100.0% (27/27)	100.0% (7/7)
<i>sodB</i>	51.8% (14/27)	100.0% (7/7)
<i>cmeA</i>	100.0% (27/27)	85.7% (6/7)
<i>cmeB</i>	100.0% (27/27)	100.0% (7/7)
<i>cmeC</i>	100.0% (27/27)	100.0% (7/7)

Table 3. Virulence profiles concerning the genes detected in the species *C. jejuni* and *C. lari*

Species	Virulence profile
<i>C. jejuni</i>	
11 (40.7%)	<i>cdtA, cdtB, cdtC, dnaJ, cmeA, cmeB, cmeC</i>
7 (26.0%)	<i>cdtA, cdtB, dnaJ, sodB, cmeA, cmeB, cmeC</i>
6 (22.2%)	<i>cdtA, cdtB, cdtC, dnaJ, sodB, cmeA, cmeB, cmeC</i>
1 (3.7%)	<i>cdtB, dnaJ, sodB, cmeA, cmeB, cmeC</i>
1 (3.7%)	<i>cdtA, cdtB, dnaJ, cmeA, cmeB, cmeC</i>
1 (3.7%)	<i>cdtB, cdtC, dnaJ, cmeA, cmeB, cmeC</i>
<i>C. lari</i>	
4 (57.1%)	<i>cdtA, cdtB, dnaJ, sodB, cmeA, cmeB, cmeC</i>
2 (28.6%)	<i>cdtA, cdtB, cdtC, dnaJ, sodB, cmeA, cmeB, cmeC</i>
1 (14.3%)	<i>cdtB, dnaJ, sodB, cmeB, cmeC</i>

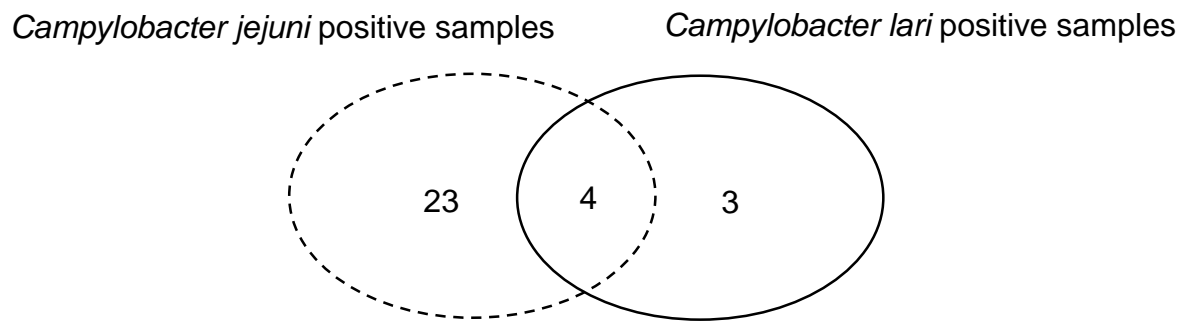


Figure 1. Venn diagram showing the distribution of *Campylobacter* species in 30 positive samples from broiler feces in northeastern Brazil.

6. ARTIGO 3

Percepção de médicos veterinários e zootecnistas sobre *Campylobacter* no contexto da avicultura industrial e saúde pública

(Artigo formatado para o periódico Pesquisa Veterinária Brasileira)

TÍTULO: Percepção de médicos veterinários e zootecnistas sobre *Campylobacter* no contexto da avicultura industrial e saúde pública

ABSTRACT.- Clemente S.M.S., Santos S.F., Pinheiro Júnior J.W. & Barros M.R. 2023. **Perception by veterinarians and zotechnicians about *Campylobacter* in the context of industrial poultry and public health.** Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Avenida Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brazil. E-mail: saruannamillena@hotmail.com

The objective with the present study to evaluate the perception of veterinarians and zotechnicians in relation to the risks, control measures and prophylaxis of *Campylobacter* spp. in the production chain, as well as its relevance to public health. An investigative virtual questionnaire was applied, sent via communication platforms, exclusively to veterinarians and zotechnicians. For implementation, all participants had access to the Free and Informed Consent Form. A total of 109 participations were obtained, of which 96 (88.1%) were veterinarians and 13 (11.9%) zotechnicians. Just over 90.0% of correct answers recognize the risk of *Campylobacter* spp. for public health and above 60.0% state that there are control measures in the productive sector. Regarding the existence of specific national legislation for this pathogen, 49.0% of veterinarians and 61.5% of zotechnicians were unable to give an opinion. As for the importance of scientific research for the poultry production chain, 83.5% considered it to be of great importance, 11.0% could not answer and 5.5% considered it to be of reasonable importance. It is concluded that both veterinarians and zotechnicians have little understanding of *Campylobacter*, this fact, associated with the lack of national legislation to control this pathogen, in the different links of the production chain, are worrying factors for public health. Therefore, education programs and continuous training of professionals involved in the process must be applied to improve knowledge about this pathogen.

INDEX TERMS: *Campylobacter*, poultry, campylobacteriosis, food safety

Resumo.- [Percepção de médicos veterinários e zootecnistas sobre *Campylobacter* no contexto da avicultura industrial e saúde pública]. Objetivou-se com o presente estudo avaliar a percepção de médicos veterinários e zootecnistas em relação aos riscos, medidas de controle e profilaxia de *Campylobacter* spp. na cadeia produtiva, assim como, sua relevância para a saúde pública. Foi aplicado um questionário virtual investigativo, enviado via plataforma de comunicação, exclusivamente aos médicos veterinários e zootecnistas. Para execução, todos os participantes tiveram acesso ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Foram obtidas 109 participações, sendo 96 (88,1%) médicos veterinários e 13 (11,9%) zootecnistas. Pouco mais de 90,0% de acertos, reconhecem o risco de *Campylobacter* spp. para saúde pública e acima de 60,0% afirmam que existem medidas de controle no setor produtivo. Sobre a existência de legislação nacional específica para este patógeno, 49,0% dos veterinários e 61,5% dos zootecnistas não souberam opinar. Quanto a importância das pesquisas científicas para cadeia produtiva avícola, 83,5% consideram de grande importância, 11,0% não souberam responder e 5,5% avaliam de razoável importância. Conclui-se que tanto médicos veterinários quanto zootecnistas possuem pouco entendimento sobre *Campylobacter*, este fato, associado a inexistência de legislação nacional para controle deste patógeno, nos diferentes elos da cadeia produtiva, são fatores preocupantes para saúde pública. Portanto, programas de educação e capacitação contínua dos profissionais envolvidos no processo, devem ser aplicados para aprimorar os conhecimentos sobre este patógeno.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Campylobacter*, avicultura, campilobacteriose, segurança dos alimentos

INTRODUÇÃO

Associada principalmente ao consumo de produtos de origem animal, a campilobacteriose foi a zoonose mais comumente relatada na Europa, responsável por mais de 62% de todos os casos humanos confirmados em 2021 (EFSA & ECDC 2022). Além de quadros diarreicos em humanos, a infecção por *Campylobacter jejuni* é uma das causas mais comuns da síndrome de Guillain-Barré, estima-se que 1 em cada 1.000 pessoas nos Estados Unidos é diagnosticada com essa síndrome (CDC 2022) e ainda pode estar relacionada com a síndrome hemolítico-urêmica (Karpovich et al. 2020, Keenswijk et al. 2019).

O Brasil é uma potência mundial na produção avícola, ocupando a posição de segundo maior produtor de carne de frango e maior exportador no mesmo seguimento (ABPA 2023). Contudo, apesar do potencial zoonótico, a legislação brasileira não preconiza o controle de *Campylobacter* spp., além disso, a subnotificação dos quadros de campilobacteriose, representa um importante fator de risco à população. O aumento do movimento de animais vivos e produtos de origem animal, bem como a diversificação e expansão das cadeias de abastecimento alimentar, representa um risco para a saúde pública devido à possível emergência e propagação de agentes de origem alimentar (Bellet & Rushton 2019, Gilbert et al. 2021 Jones et al. 2013).

Outro fator preocupante é a tendência crescente de isolados resistentes à antimicrobianos em todo o mundo (Alaboudi et al. 2020, Nafarrate et al. 2021, Rangaraju et al. 2022, Schreyer et al. 2022). O uso indevido e excessivo de antimicrobianos promove um aumento da pressão de seleção, o que contribui para o surgimento de bactérias resistentes e favorece a transferência de genes de resistência dentro da microbiota patogênica e comensal (Ma et al. 2021).

A promoção da saúde pública, saúde e bem-estar animal é de responsabilidade do médico veterinário, através da aplicação de métodos adequados de criação de animais, procedimentos de higiene, biossegurança e estratégias de vacinação pode-se minimizar a necessidade de uso de antimicrobianos em animais produtores de alimentos (OIE 2020). Portanto, médicos veterinários exercem um papel central no fornecimento de informações relacionadas à implementação de medidas de biossegurança na produção animal (Chomyn et al. 2023). Entretanto, até o momento, nenhum estudo foi realizado sobre a percepção destes profissionais em relação a *Campylobacter* spp. no cenário brasileiro.

Nesse contexto, objetivou-se avaliar a percepção de médicos veterinários e zootecnistas em relação aos riscos, medidas de controle e profilaxia de *Campylobacter* spp. na cadeia produtiva, assim como, sua relevância para a saúde pública, com intuito de colher informações para subsidiar políticas públicas que garantam à sociedade a inocuidade dos alimentos de origem animal.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho do estudo, população alvo e procedimento de amostragem. Foi aplicado um questionário virtual investigativo (Apêndice II), elaborado na língua nativa da população-alvo (português), um link para pesquisa on-line foi enviado via plataforma de comunicação, exclusivamente aos médicos veterinários e zootecnistas. Foram considerados os seguintes critérios de Inclusão: graduados em medicina veterinária e/ou zootecnia, profissionais que residam no Brasil e os seguintes critérios de exclusão: recusa em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido, desacordo com algum dos critérios de inclusão.

Desenho do questionário e coleta de dados. O questionário foi constituído por 10 questões objetivas as quais avaliaram a percepção dos profissionais sobre o conhecimento sobre *Campylobacter* spp. na indústria avícola, impacto para saúde pública e necessidade do Brasil em elaborar normas para controle no setor produtivo (granjas e abatedouros). O convite encaminhado por conveniência para participação da pesquisa foi enviado na forma de lista oculta, não permitindo a identificação dos convidados nem a visualização dos seus dados de contato (e-mail, telefone, etc) por terceiros. Os participantes tiveram acesso ao questionário somente depois do seu consentimento. Para execução, todos os participantes tiveram acesso ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice I), neste termo de consentimento, eles foram informados sobre sua participação voluntária, confidencialidade das respostas e a possibilidade de desistir do estudo a qualquer momento. Esta pesquisa foi submetida à Plataforma Brasil, tem aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) e Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) e obedece ao Termo de Confidencialidade e Declaração de Autorização de Uso de Dados.

Gerenciamento e análise de dados. As respostas dos participantes foram inseridas e avaliadas em planilhas do Microsoft Excel versão Office 2013. E os dados foram submetidos à análise estatística descritiva, com ênfase na distribuição de frequências relativas das respostas.

RESULTADOS

Foram obtidas 109 participações, sendo 96 (88,1%) médicos veterinários e 13 (11,9%) zootecnistas. Também foi avaliada a área de atuação profissional dos participantes, 30,3% dos entrevistados atuam na avicultura industrial, enquanto 69,7% em outras áreas de atuação profissional (Figura 1). Um total de três perguntas de múltipla escolha, com as alternativas: “Sim”, “Não” ou “Não sei responder”, foram utilizadas para avaliar a percepção dos profissionais sobre o risco deste patógeno para saúde pública, medidas de controle na cadeia produtiva e legislação vigente no Brasil (Figura 2). As respostas obtidas foram classificadas em: “Corretas”, “Incorretas” ou “Não souberam opinar”, com pouco mais de 90,0% de acertos, tanto veterinários quanto zootecnistas, reconhecem o risco de *Campylobacter* para saúde pública e acima de 60,0% afirmam que existem medidas de controle no setor produtivo. Entretanto, no quesito sobre a existência de legislação nacional específica para este patógeno, 49,0% dos veterinários e 61,5% dos zootecnistas não souberam opinar (Tabela 1).

No que se refere ao nível de conhecimento dos entrevistados sobre *Campylobacter*, 80,7% dos entrevistados alegaram ter pouco conhecimento sobre o tema, 12,8% afirmaram ter amplo conhecimento, enquanto 7,3% alegaram não possuir conhecimento. Em relação às medidas de controle na cadeia produtiva, 65,1% alegaram ter pouco conhecimento, seguido de 28,4% dos participantes que alegaram não ter conhecimento e 7,3% com amplo conhecimento. Quanto a importância de *Campylobacter* para saúde pública, 68,8% alegaram ter pouco conhecimento, 23,9% com amplo conhecimento e 7,3% não possuem conhecimento (Figura 3).

Também foi avaliada a percepção dos entrevistados em relação as pesquisas científicas no Brasil e dados sobre prevalência de *Campylobacter* na cadeia produtiva avícola, 50,5% afirmaram que existem poucos dados científicos, 42,0% não souberam responder, 6,5% afirmaram que existem muitos dados científicos e 1% alegaram não existir dados científicos. Quanto a importância das pesquisas científicas para cadeia produtiva avícola, 83,5% consideram de grande importância, 11,0% não souberam

responder e 5,5% avaliam de razoável importância, nenhum dos entrevistados consideraram pouca ou nenhuma importância.

DISCUSSÃO

Esta pesquisa foi elaborada para avaliar a percepção de médicos veterinários e zootecnistas em relação a *Campylobacter* na cadeia produtiva avícola e sua importância para saúde humana. No geral, os profissionais reconhecem os riscos inerentes a este patógeno no contexto da saúde pública, entretanto, grande parte alegaram ter pouco conhecimento sobre o tema. A maior adesão por médicos veterinários, é justificada em detrimento ao maior acesso por esse grupo ao questionário, uma vez que o envio dos questionários foi por conveniência. Quanto às medidas de controle no setor produtivo, grande parte dos participantes afirmaram que existem medidas de controle no setor produtivo, porém, o estudo não levou em consideração a implementação destas práticas de biossegurança, pois algumas medidas apesar de existirem, não são aplicadas ou quando são aplicadas, em alguns casos não fazem de modo satisfatório.

Nos EUA, uma pesquisa analisou tais práticas durante pré e pós-colheita destinadas a mitigar a contaminação por *Campylobacter* em produtos de frango de corte e constataram que os esforços de controle de patógenos de origem alimentar estão mais focados no controle de *Salmonella* do que no controle de *Campylobacter*, embora ambos serem importantes patógenos bacterianos de origem alimentar (Hwang & Singer 2020). Fato que se assemelha ao Brasil, visto que o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), contempla o controle dos sorovares de *Salmonella* Gallinarum (biovars Gallinarum e Pullorum) e ainda Enteritidis, Typhimurium e salmonelas monofásicas (BRASIL 1994).

No entanto, apesar da campilobacteriose ser a infecção alimentar mais relatada em países desenvolvidos, no Brasil, os dados relacionados a ocorrência desta enfermidade, são escassos, inexistindo, até o momento, dados oficiais de ocorrência e prevalência de campilobacteriose em humanos. Segundo Mendonça e colaboradores, a escassez de dados nacionais, se deve, principalmente, pela ausência de programas nacionais de vigilância e ressalta sobre a importância da análise de *Campylobacter* spp. em alimentos ser estabelecida e regulamentada pelas autoridades competentes (Mendonça et al. 2015).

Na União Europeia (EU), o Regulamento da Comissão (UE) 2017/1495 prevê um limite de 15 a cada 50 amostras de carcaças, com contagens superiores a 1.000 UFC/g, após o resfriamento, com redução para 10 carcaças a partir de 2025 (EU 2017). Reduzir a contaminação por *Campylobacter* em produtos aviários é visto como uma técnica eficaz para reduzir casos campilobacteriose em seres humanos, já que o frango é a principal fonte de campilobacteriose esporádica (Hankel et al. 2022). Estima-se que a redução de 3 log₁₀ nas concentrações cecais é capaz de reduzir em 58% o risco relativo da UE de campilobacteriose humana atribuível à carne de frangos (EFSA & BIOHAZ 2020).

No que se refere aos riscos inerentes à *Campylobacter*, o manuseio e o consumo de produtos avícolas são considerados os principais fatores de risco para campilobacteriose (Al-Sakkaf et al. 2021), sendo *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* as espécies mais notificadas na EU (EFSA & ECDC 2022). Ocasionalmente, este patógeno também pode desencadear o desenvolvimento de sequelas além da gastroenterite, como artrite reativa, síndrome de Guillain-Barré e síndrome do intestino irritável (Heikema et al. 2013, Kutsuna et al. 2023, Pogreba-Brown et al. 2020).

Em nosso estudo, a maioria dos participantes afirmaram ter pouco conhecimento sobre *Campylobacter* (80,7%) e pouco mais da metade com pouco conhecimento em relação às medidas de controle (65,1%) e sua importância para saúde pública (68,8%), importante destacar que uma parcela dos entrevistados atuam na avicultura industrial (30,3%). Este fato é preocupante, pois enquanto sociedade, tanto médicos veterinários quanto zootecnistas, são responsáveis por questões relacionadas as interfaces da saúde humana, animal e ambiental. Uma pesquisa que avaliou as percepções, atitudes e práticas em relação à prevenção de riscos na cadeia alimentar, revelou que 60% dos participantes apontaram os microrganismos patogênicos como o principal perigo na cadeia alimentar e um importante risco a ser prevenido (Lupo et al. 2016).

Entre os entrevistados, veterinários (92,7%) e zootecnistas (92,3%) reconhecem o risco deste patógeno para saúde pública. Além das implicações já mencionadas, isolados tem apresentado alta resistência a antimicrobianos (Emanowicz et al. 2022, García-Sánchez et al. 2019, Khan et al. 2018), fato que representa uma grave ameaça à eficácia das terapias antibióticas. Embora a campilobacteriose em humanos, seja uma doença autolimitante na maioria dos casos,

o tratamento com antimicrobianos pode ser necessário principalmente em indivíduos imunocomprometidos, e dentre os medicamentos de escolha destacam-se as fluoroquinolonas ou macrolídeos (Dai et al. 2020).

Entretanto, a resistência a antimicrobianos tem sido frequentemente relatada em isolados provenientes de animais de produção como aves (Lazo-Lascarez et al. 2021, Rangaraju et al. 2022, Tang et al. 2022), ruminantes e pequenos ruminantes (Obaidat & Alshdaifat 2023, Ocejo et al. 2019). Contudo, isolados provenientes de espécies silvestres como javalis e abutres-grifos da Eurásia, também tem apresentado resistência a antimicrobianos, sendo justificado devido a aproximação destes com áreas de produção animal (Castillo-Contreras et al. 2022, Espunyes et al. 2022).

No Brasil, um trabalho realizado por Würfel e colaboradores, constatou uma multirresistência em 35,4% dos isolados de *Campylobacter* spp. provenientes de produtos à base de carne de frango, com os maiores níveis de resistência observados para a tetraciclina (Würfel et al. 2021). Em isolados de *C. coli*, verificou-se resistência especialmente a β -lactâmicos e quinolonas, associados a presença de genes relacionados à resistência, fato que pode representar um problema de saúde pública para infecções por *Campylobacter* spp. em humanos quando o tratamento é necessário (Gomes et al. 2023).

Conforme os Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), 29% das infecções diminuíram a suscetibilidade a fluoroquinolonas (ciprofloxacina) ou macrolídeos (azitromicina), além disso, este patógeno é responsável por cerca de 1,5 milhão de infecções e \$ 270 milhões em custos médicos diretos todos os anos nos EUA (CDC 2019). Diferentemente, na maioria dos países em desenvolvimento, existem poucos estudos e escassos dados epidemiológicos sobre a prevalência de *Campylobacter* spp. na cadeia produtiva e número de casos de campilobacteriose em humanos. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), é provável que a epidemiologia da Campilobacteriose seja diferente em países de alta renda comparada a países de baixa e média renda e embora escassos, os dados nesses países, sugerem que a infecção por *Campylobacter* é considerável (WHO 2012).

Este estudo demonstrou que parte dos entrevistados (50,5%) afirmaram ter poucos dados científicos no Brasil sobre prevalência de *Campylobacter* na cadeia produtiva avícola, no entanto a maioria (83,5%) considera de grande importância o desenvolvimento de pesquisas científicas para cadeia produtiva avícola. Estes dados sugerem, que o pouco conhecimento relatado pelos médicos veterinários e

zootecnistas sobre este tema, pode ser devido à escassez de dados nacionais por ausência de políticas, programas de vigilância, relatórios de ocorrência e quantificação desse patógeno em alimentos no âmbito nacional. Um pesquisa relatou que apenas 37 casos de campilobacteriose foram notificados no Brasil, sugerindo que há uma subnotificação de dados epidemiológicos (Silva et al. 2018). Entende-se que a implementação de programas nacionais de vigilância alimentar iria incentivar a busca por informações por parte dos profissionais, principalmente por aqueles que são responsáveis pela indústria avícola nacional.

CONCLUSÃO

Conclui-se que tanto médicos veterinários quanto zootecnistas possuem pouco entendimento sobre *Campylobacter*. Este fato, associado a inexistência de legislação nacional para controle deste patógeno, nos diferentes elos da cadeia produtiva avícola, são fatores preocupantes para saúde pública, uma vez que a falta de normas que regulamentem medidas de biossegurança e a ausência de um padrão mínimo aceitável para contagem bacteriana em carcaças de frangos, fragiliza a segurança dos alimentos de origem animal. É importante enfatizar, que a ausência de dados oficiais é um problema multifacetado e que requer esforços em todas as competências. Portanto, programas de educação e capacitação contínua dos profissionais envolvidos no processo, devem ser aplicados para melhorar a compreensão de *Campylobacter* spp. no contexto da produção de frangos de corte. Contudo, o desenvolvimento de pesquisas semelhantes a esta, são necessárias, pois permitem avaliar possíveis mudanças de percepções ao decorrer do tempo, identificar prováveis falhas e subsidiar estratégias essenciais para mitigar *Campylobacter* spp. na cadeia produtiva avícola.

REFERÊNCIAS

ABPA. (2023). Relatório Anual. Associação Brasileira de Proteína Animal, 248p. Available in <<https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2023/04/Relatorio-Anual-2023.pdf>>. Accessed on May. 10, 2023.

Al-Sakkaf A., Redmond E., Brennan C. & Gooneratne R. 2021. Survey of new zealand poultry consumers' handling of raw poultry and food safety awareness to provide insight into risk factors for campylobacteriosis. J. Food Prot., 84(9):1640-1647. <https://doi.org/10.4315/JFP-21-034>

Alaboudi A.R., Malkawi I.M., Osaili T.M., Abu-Basha E.A. & Guitian, J. 2020. Prevalence, antibiotic resistance and genotypes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from chickens in Irbid governorate, Jordan. Int. J. Food Microbiol., 327:108656. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108656>

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. Portaria nº 193, de 19 de setembro de 1994. Plano Nacional de Sanidade Avícola. Available in <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/pnsa/programa-nacional-de-sanidade-avicola-pnsa>>. Accessed on Apr. 17, 2023.

Bellet C., & Rushton J. 2019. World food security, globalisation and animal farming: unlocking dominant paradigms of animal health science. Rev. sci. tech. (Off. int. épizoot.), 38(2):383-393. <https://doi.org/10.20506/rst.38.2.2993>

Castillo-Contreras R., Marín M., López-Olvera J.R., Ayats T., Aguilar X.F., Lavín S., Mentaberre G. & Cerdà-Cuéllar M. 2022. Zoonotic *Campylobacter* spp. and *Salmonella* spp. carried by wild boars in a metropolitan area: occurrence, antimicrobial susceptibility and public health relevance. Sci. Total Environ. 822: 153444. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153444>

CDC. 2019. Antibiotic Resistance Threats in The United States 2019. U.S. Centers for Disease Control and Prevention. <https://doi.org/10.1186/s13756-020-00872-w>

CDC. 2022. Guillain-Barré Syndrome. Available at <<https://www.cdc.gov/campylobacter/guillain-barre.html>> Accessed on Mar. 21, 2023.

Chomyn O., Wapenaar W., Richens I.F., Reyneke R.A., Shortall O., Kaler J. & Brennan M.L. 2023. Assessment of a joint farmer-veterinarian discussion about biosecurity using novel social interaction analyses. *Prev. Vet. Med.* 212:105831. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2022.105831>

EU. Regulamento (UE) 2017/1495. Available in <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32017R1495>. Accessed on Apr. 04, 2023.

Dai L., Sahin O., Grover M. & Zhang Q. 2020. New and alternative strategies for the prevention, control, and treatment of antibiotic-resistant *Campylobacter*. *Transl. Res.* 223:76-88. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2020.04.009>

EFSA & BIOHAZ. 2020. Update and review of control options for *Campylobacter* in broilers at primary production. *EFSA Journal.* 18(4):1-89. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6090>

EFSA & ECDC. 2022. The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. *EFSA Journal.* 20(12):7666. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7666>

Emanowicz M., Meade J., Burgess C., Bolton D., Egan J., Lynch H., O'Connor L., Coffey A., Lucey B., Gutierrez M., Byrne W., Slowey R. & Whyte P. 2022. Antimicrobial resistance and genomic diversity of *Campylobacter jejuni* isolates from broiler caeca and neck skin samples collected at key stages during processing. *Food Control.* 135:108664.

Espunyes J., Illera L., Dias-Alves A., Lobato L., Ribas M.P., Manzanares A., Ayats T., Marco I. & Cerdà-Cuéllar M. 2022. Eurasian griffon vultures carry widespread antimicrobial resistant *Salmonella* and *Campylobacter* of public health concern. *Sci. Total Environ.*, 844:2-7. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157189>

García-Sánchez L., Melero B., Jaime I., Rossi M., Ortega I. & Rovira, J. 2019. Biofilm formation, virulence and antimicrobial resistance of different *Campylobacter jejuni* isolates from a poultry slaughterhouse. *Food Microbiol.* 83: 193-199. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.05.016>

Gilbert W., Thomas L.F., Coyne L. & Rushton J. 2021. Review: Mitigating the risks posed by intensification in livestock production: the examples of antimicrobial

resistance and zoonoses. *Animal*, 15(2):100123.
<https://doi.org/10.1016/j.animal.2020.100123>

Gomes C.N., Campioni F., Barker D.O.R., Che E.V., Duque S.S., Taboada E. N. & Falcão J.P. 2023. Antimicrobial resistance genotypes and phenotypes of *Campylobacter coli* isolated from different sources over a 16-year period in Brazil. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 33:109-113. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2023.03.004>

Hankel J., Gibson T., Skov J., Andersen K.B., Dargatz M., Kappel A., Thiemann F., Curtis B., Chuppava B. & Visscher C. 2022. Monitoring of *Campylobacter jejuni* in a chicken infection model by measuring specific volatile organic compounds and by qPCR. *Sci. Rep.* 12(1):1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15863-7>

Heikema A.P., Jacobs B.C., Horst-Kreft D., Huizinga R., Kuijf M.L., Endtz H.P., Samsom J.N. & van Wamel W.J.B. 2013. Siglec-7 specifically recognizes *Campylobacter jejuni* strains associated with oculomotor weakness in Guillain-Barré syndrome and Miller Fisher syndrome. *Clin. Microbiol. Infect.* 19(2):E106-E112. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12073>

Hwang H. & Singer R.S. 2020. Survey of the U.S. broiler industry regarding pre- and postharvest interventions targeted to mitigate *Campylobacter* contamination on broiler chicken products. *J. Food Prot.* 83(7):1137-1148. <https://doi.org/10.4315/JFP-19-527>

Jones B.A., Grace D., Kock R., Alonso S., Rushton J., Said M.Y., McKeever D., Mutua F., Young J., McDermott J. & Pfeiffer D.U. 2013. Zoonosis emergence linked to agricultural intensification and environmental change. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110(21):8399-8404. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208059110>

Karpovich G.S., Krasnova E.I., Vasyunin A.V., Komissarova T.V., Enivatova L. I. & Gaynts O.V. 2020. The hemolytic uremic syndrome: a possible etiological role of *Campylobacter* infection. *Almanac of Clinical Medicine.* 48(4), 246–253. <https://doi.org/10.18786/2072-0505-2020-48-017>

Keenswijk W., Degraeuwe E., Dhont E., Raes A. & Walle J.V. 2019. Hemolytic uremic syndrome associated with non-shigatoxin-producing infectious agents: Expanding the shigatoxin theory. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 41(3):E179-E181. <https://doi.org/10.1097/MPH.0000000000001196>

Khan J.A., Rathore R.S., Abulreesh H.H., Qais F.A. & Ahma Di. 2018. Prevalence and antibiotic resistance profiles of *Campylobacter jejuni* isolated from poultry meat and related samples at retail shops in northern India. *Foodborne Pathog. Dis.* 218-225.

Kutsuna F., Soeda M., Hibino A., Tokuda M., Miura S. & Iwanaga H. 2023. Fulminant Guillain–Barré syndrome secondary to *Campylobacter coli* infection: An autopsy case report. *eNeurologicalSci.* 31:100454. <https://doi.org/10.1016/j.ensci.2023.100454>

Lazo-Lascarez S., Gutierrez L.Z., Duarte-Martínez F., Zuniga J.J.R., Echandi M. L.A. & Munoz-Vargas L. 2021. Antimicrobial resistance and genetic diversity of *Campylobacter* spp. isolated from broiler chicken at three levels of the poultry production chain in Costa Rica. *J. Food Prot.* 84(12):2143-2150. <https://doi.org/10.4315/JFP-21-111>

Lupo C., Wilmart O., Van Huffel X., Dal Pozzo F. & Saegerman, C. 2016. Stakeholders' perceptions, attitudes and practices towards risk prevention in the food chain. *Food Control.* 66:158-165. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.02.003>

Ma F., Xu, S. Tang Z., Li Z. & Zhang L. 2021. Use of antimicrobials in food animals and impact of transmission of antimicrobial resistance on humans. *Biosaf. Health.* 3(1):32-38. <https://doi.org/10.1016/j.bsheat.2020.09.004>

Mendonça E.P., Melo R.T., Prado R.R., Monteiro G.P., Brasão S.C., Timoteo M.F. & Rossi D.A. 2015. Campylobacteriosis: an emerging zoonosis, underdiagnosed and underreported by public health agencies in Brazil. *Bioscience Journal.* 31(5):1458-1474. <https://doi.org/10.14393/bj-v31n1a2015-27524>

Nafarrate I., Lasagabaster A., Sevillano E. & Mateo E. 2021. Prevalence, molecular typing and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* spp. isolates in northern Spain. *J. Appl. Microbiol.* 130(4), 1368–1379. <https://doi.org/10.1111/jam.14842>

Obaidat M.M. & Alshdaifat R.M. 2023. High prevalence of multidrug-resistant *Campylobacter jejuni* in sheep and goats milk in Jordan. *Int. Dairy J.* 143:105676. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2023.105676>

Ocejo M., Oporto B. & Hurtado A. 2019. Occurrence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in cattle and sheep in northern Spain and changes in antimicrobial

resistance in two studies 10-years apart. *Pathogens*, 8(3):98. <https://doi.org/10.3390/pathogens8030098>

WHO. 2012. World Health Organization. The global view of Campylobacteriosis. Available in <www.who.int/iris/bitstream/10665/80751/1/9789241564601_eng.pdf> Accessed on Apr. 21, 2023.

Pogreba-Brown K., Austhof E., Armstrong A., Schaefer K., Villa Zapata L., McClelland D.J., Batz M.B., Kuecken M., Riddle M., Porter C.K. & Bazaco M.C. 2020. Chronic Gastrointestinal and Joint-Related Sequelae Associated with Common Foodborne Illnesses: A Scoping Review. *Foodborne Pathog. Dis.* 17(2):67-86. <https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2692>

Rangaraju V., Malla B.A., Milton A.A.P., Madesh A., Madhukar K.B., Kadwalia A., Vinodhkumar O.R., Kumar M.S. & Dubal Z.B. 2022. Occurrence, antimicrobial resistance and virulence properties of thermophilic *Campylobacter coli* originating from two different poultry settings. *Gene Rep.* 27:101618. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2022.101618>

Schreyer M.E., Olivero C.R., Rossler E., Soto L.P., Frizzo L.S., Zimmermann J.A., Signorini M.L. & Virginia Z.M. 2022. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* identified in a slaughterhouse in Argentina. *Curr. Res. Nutr. Food Sci.* 5:590-597. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.03.005>

Silva W.C., Targino B.N., Mendonça R.S., Sant'Ana A.S. & Hungaro H.M. 2018. *Campylobacter*: An overview of cases, occurrence in food, contamination sources, and antimicrobial resistance in Brazil. *Food Rev. Int.*, 34(4):364-389. <https://doi.org/10.1080/87559129.2017.1298125>

Tang B., Zheng X., Lin J., Wu J., Lin R., Jiang H., Ji X., Yang H., Shen, Z. & Xia F. 2022. Prevalence of the phenicol resistance gene *fexA* in *Campylobacter* isolated from the poultry supply chain. *Int. J. Food Microbiol.* 381:109912. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109912>

Würfel S.F.R., Prates D.F., Kleinubing N.R., Vecchia J.D., Vaniel C., Haubert L., Dellagostin O.A. & Silva W.P. 2021. Comprehensive characterization reveals antimicrobial-resistant and potentially virulent *Campylobacter* isolates from poultry

meat products in Southern Brazil. Mol. Biol. Rep. 149:1-7.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111831>

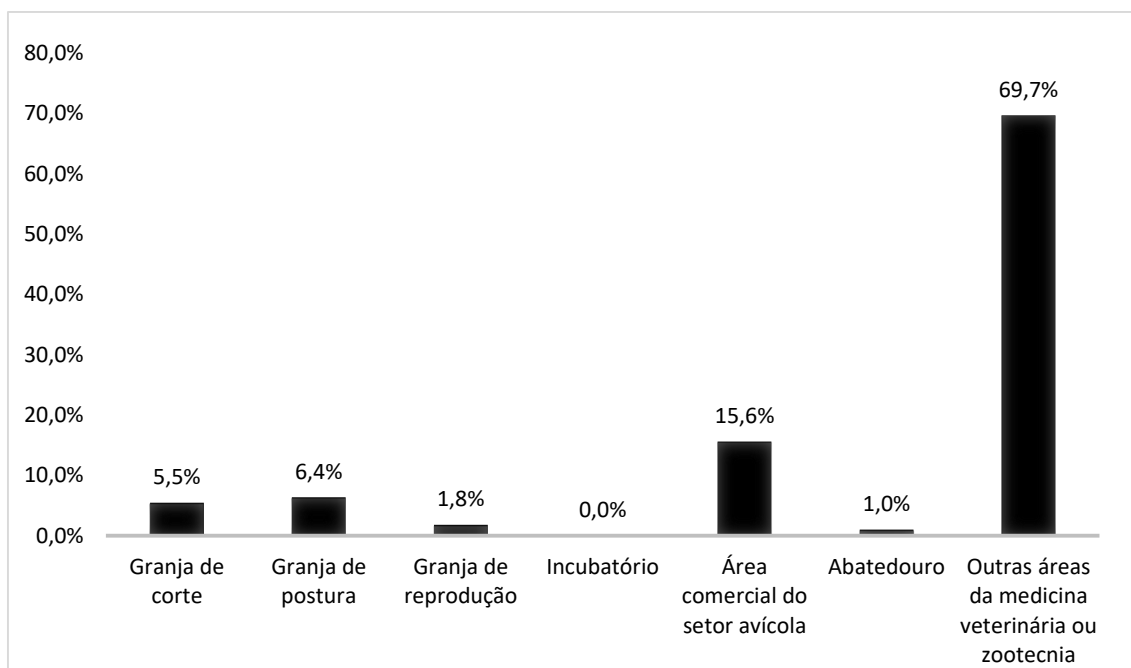


Figura 1. Classificação dos participantes por áreas de atuação profissional

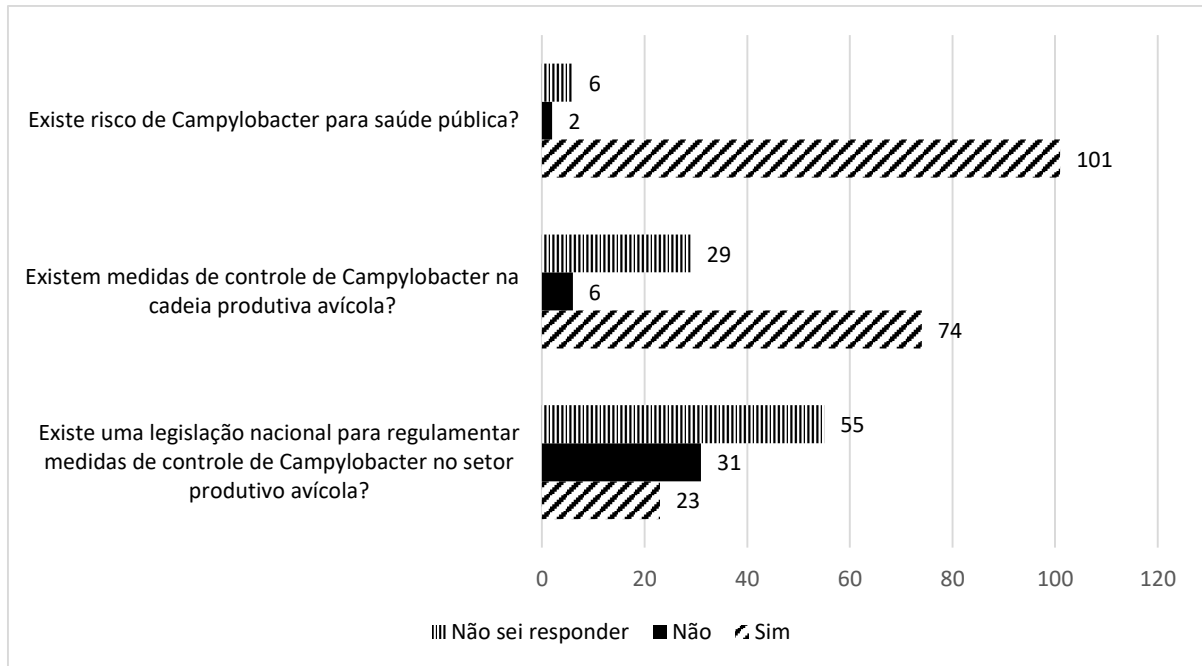


Figura 2. Percepção dos entrevistados em relação ao risco de *Campylobacter* spp. para saúde pública, medidas de controle e legislação aplicadas à indústria avícola

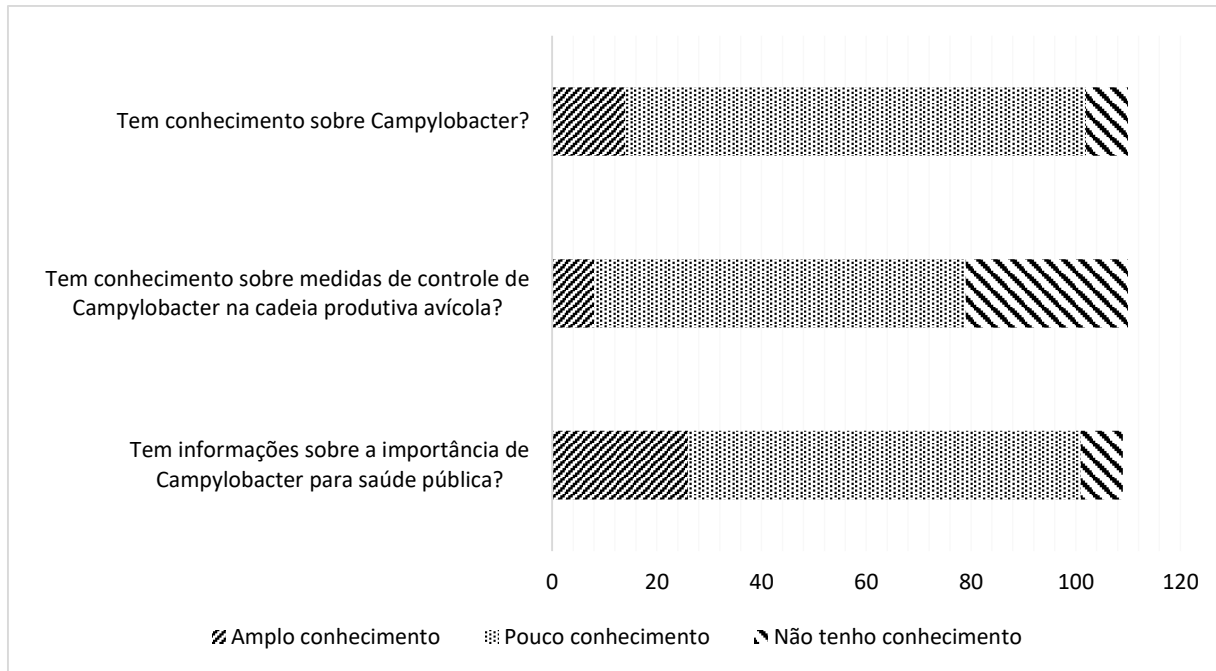


Figura 3. Perguntas e respostas em relação ao conhecimento dos entrevistados sobre *Campylobacter*

Tabela 1. Classificação das respostas de médicos veterinários e zootecnistas em sobre *Campylobacter* na indústria avícola

Perguntas	Profissionais	Nº de respostas (%)		
		Corretas	Incorretas	Não souberam opinar
Existe risco de <i>Campylobacter</i> para saúde pública?	Médicos Veterinários	89 (92,7%)*	1 (1%)**	6 (6,3%)
	Zootecnistas	12 (92,3%)*	1 (7,7%)**	0
Existem medidas de controle de <i>Campylobacter</i> na cadeia produtiva avícola?	Médicos Veterinários	66 (68,8%)*	6 (6,3%)**	24 (1,0%)
	Zootecnistas	8 (61,5%)*	0**	5 (38,5%)
Existe uma legislação nacional para regulamentar medidas de controle de <i>Campylobacter</i> no setor produtivo avícola?	Médicos Veterinários	27 (28,0%)**	22 (23,0%)*	47 (49,0%)
	Zootecnistas	4 (30,8%)**	1 (7,7%)*	8 (61,5%)

Legenda: *Sim, **Não.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Foram detectados isolados cultiváveis de *C. jejuni* tanto em carcaças resfriadas quanto em carcaças congeladas comercializadas em supermercados localizados em Recife-PE.
- Carcaças de frangos de corte resfriadas apresentam maior risco de contaminação por *C. jejuni* do que carcaças congeladas, porém, apesar da redução do risco após o congelamento, este não pode ser considerado um método para a prevenção da campilobacteriose em humanos;
- *C. jejuni* é a espécie de maior ocorrência em frangos de corte em Pernambuco. Porém, detectamos *C. lari* em frangos de corte, sendo este o primeiro relato;
- A resistência apresentada por *C. jejuni* à diferentes classes antimicrobianas utilizado tanto na medicina veterinária quanto na medicina humana, evidencia a necessidade da redução de antimicrobianos e melhorias na produção de proteína animal;
- Presença do risco aos consumidores, devido a contaminação de carcaças de frangos de corte por *C. jejuni* multirresistente;
- O uso de enterocinas pode ser considerado uma alternativa para o controle de *C. jejuni*, contudo, novas investigações devem ser realizadas para explorar o uso de cepas probióticas no controle de *Campylobacter*, pois seu uso tem mostrado resultados promissores;
- Em amostras altamente contaminadas recomenda-se a utilização de técnicas de biologia molecular.
- *Proteus mirabilis* e *Providencia stuartii* são importantes contaminantes em amostras de fezes, no isolamento microbiológico de *Campylobacter* spp.
- Evidencia-se a necessidade do estabelecimento de programas nacionais de controle de *Campylobacter* spp. em todos os segmentos da avicultura industrial, bem como a adoção de sistemas de monitoramento do consumo de antimicrobianos na produção animal.

- Destaca-se a importância da conscientização dos profissionais que atuam na cadeia produtiva avícola, bem como da população no que diz respeito aos cuidados na manipulação e higiene de alimentos de origem animal.

APÊNDICE 1

APRESENTAÇÃO

Desde já gostaríamos de agradecer por sua participação em nossa pesquisa. Esta pesquisa tem objetivo acadêmico, ou seja, todas as informações contidas são sigilosas e sua participação é anônima. Este questionário compõe a pesquisa da doutoranda Saruanna Millena dos S. Clemente, com supervisão da Prof^a Dra. Mércia Rodrigues Barros, intitulada "Pesquisa de espécies de *Campylobacter*, genes de virulência, resposta à ação de enterocinas e antimicrobiana *in vitro*, em carcaças e frangos de corte".

* Indica uma pergunta obrigatória

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa de espécies de *Campylobacter*, genes de virulência, resposta à ação de enterocinas e antimicrobiana *in vitro*, em carcaças e suabes de cloaca de frangos de corte, que está sob a responsabilidade da pesquisadora Saruanna Millena dos Santos Clemente, rua Félix Cavalcante Albuquerque, n 191, apartamento 02, Prado, Recife – PE, CEP 50.720-330 – Telefone (081) 9 96866138, e-mail: saruannamillena@hotmail.com, sob a orientação da Profa. Dra. Mércia Rodrigues Barros, Telefone: (081) 9 9694-6634, e-mail: mercia.barros@ufrpe.br. Todas as suas dúvidas podem ser esclarecidas com o responsável por esta pesquisa. Apenas quando todos os esclarecimentos forem dados e você concorde com a realização do estudo. Você estará livre para decidir participar ou recusar-se. Caso não aceite participar, não haverá nenhum problema, desistir é um direito seu, bem como será possível retirar o consentimento em qualquer fase da pesquisa, também sem nenhuma penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA: □ Descrição da pesquisa: A avicultura industrial brasileira possui destaque no cenário mundial, devido ao fornecimento de proteína de origem animal de qualidade e baixo custo. Tal posição é inerente aos cuidados sanitários adotados pelo setor, presando pela segurança alimentar. No entanto, na cadeia produtiva deste produto são encontrados patógenos que afetam tanto a produção animal quanto a saúde pública, tais como *Campylobacter* spp. apesar da relevância deste microrganismo para o setor, a sua detecção em alimentos não é exigida pela legislação brasileira. Portanto, objetiva-se pesquisar espécies de *Campylobacter* e genes de virulência em carcaças (resfriadas e congeladas) e suabes de cloaca de frangos de corte, localizadas em granjas no estado de Pernambuco, avaliar a resposta dos isolados à ação probiótica e antimicrobiana *in vitro*. A técnica empregada para cultivo e isolamento será de acordo com as diretrizes da International Organization for Standardization - ISO 10272-1 para isolamento e identificação de espécies de *Campylobacter*. A Reação Cadeia de Polimerase (PCR) será empregada para determinação das espécies e detecção dos seguintes genes: *cdtABC*, envolvidos na codificação da toxina tripartida CDT (cytolethal distending toxin); *cgtB* e *wlaN*, ambos envolvidos na biosíntese dos lipooligosacáridos (LOS) e implicados na síndrome de Guillain-Barré (SGB); *cmeABC*, relacionados à resistência antimicrobiana; *dnaJ* e *sodB* envolvidos na capacidade de adesão e resposta ao estresse oxidativo, respectivamente. A resposta à ação probiótica *in vitro* será avaliada mediante a capacidade antagonista de bactérias ácido-lácticas (BAL) frente as espécies de *Campylobacter* e a resistência antimicrobiana será analisada por disco difusão. Será aplicado um questionário virtual investigativo, aos profissionais do setor avícola, constituído por 10 questões objetivas as quais permitirão avaliar a percepção dos profissionais sobre o conhecimento sobre *Campylobacter* spp. na indústria avícola, impacto para saúde pública e necessidade em elaborar normas para prevenção e controle no setor produtivo (granja e abatedouros) do Brasil. Os resultados obtidos serão analisados estatisticamente com o auxílio de um programa computacional (Bioestat 5.0 ®). Sendo assim, pretendemos avaliar a ocorrência de diferentes espécies de *Campylobacter* em carcaças de frango, assim como, traçar o perfil de virulência e o conseqüente risco para saúde pública por meio da identificação de genes de virulência em espécies de *Campylobacter* relacionados à infecções

em humanos, com o intuito de orientar e sugerir medidas sanitárias mais eficientes, visando à prevenção e controle deste patógeno, minimizando os riscos para a saúde pública. Além disso, serão avaliados a efetividade da ação de enterocinas e a resposta antimicrobiana frente as espécies de *Campylobacter*, para avaliar a utilização da primeira como medida alternativa para o controle sanitário.

☐ Esclarecimento do período de participação do voluntário na pesquisa, início, término e número de visitas para a pesquisa. Será aplicado um questionário virtual investigativo, aos profissionais do setor avícola, médicos veterinários e zootecnistas, constituído por 10 questões objetivas, mediante plataformas virtuais, cada participante deverá responder todas as perguntas e apenas uma única vez. Todos os questionários serão aplicados exclusivamente aos profissionais graduados em Medicina Veterinária e Zootecnia.

☐ RISCOS diretos para o voluntário: A aplicação do questionário não exerce nenhum risco direto ou indireto ao participante, todas as informações nele contidas serão utilizadas apenas para fins científicos e a identidade do participante será preservada.

☐ BENEFÍCIOS diretos e indiretos para os voluntários: Obter o entendimento científico, após conclusão da pesquisa, em relação à percepção dos profissionais sobre o conhecimento sobre *Campylobacter* spp., na indústria avícola, impacto desse microrganismo para saúde pública e avaliar a necessidade em elaborar normas para prevenção e controle no setor produtivo (granja e abatedouros) do Brasil, o que trará subsídios para tomadas decisões em benefícios para o setor.

Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa em forma de questionário virtual, ficarão armazenados na forma de planilhas no computador pessoal, sob a responsabilidade da pesquisadora orientadora Profa. dra. Mércia Rodrigues Barros, no endereço Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos – CEP: 52.171-900, Recife-PE, pelo período mínimo 5 anos.

Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação).

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFRPE no endereço: Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos – CEP: 52171-900, Recife-PE, Telefone: (81) 3320-6638/e-mail: cep@ufrpe.br (1º andar do Prédio Central da Reitoria da UFRPE, ao lado da Secretaria Geral dos Conselhos Superiores). Site: www.cep.ufrpe.br

Após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar como voluntário (a) do estudo intitulado “Pesquisa de espécies de *Campylobacter*, genes de virulência, resposta à ação de enterocinas e antimicrobiana *in vitro*, em carcaças e suabes de cloaca de frangos de corte”. Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo (a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

APÊNDICE 2

QUESTIONÁRIO VIRTUAL INVESTIGATIVO

QUESTIONÁRIO VIRTUAL INVESTIGATIVO

1. VOCÊ CONCORDA COM TERMO ACIMA? *

Marque todas que se aplicam.

Li e concordo

Li e discordo

2. Nome do participante *

3. Formação acadêmica: *

Marcar apenas uma oval.

Medicina Veterinária

Zootecnia

4. Área de atuação profissional: *

Marcar apenas uma oval.

Granja de corte

Granja de postura

Granja de reprodução

Incubatório

Área comercial no setor avícola

Abatedouro

Outras áreas da medicina veterinária ou zootecnia

5. Tem conhecimento sobre *Campylobacter*? *

Marque todas que se aplicam.

- Tenho amplo conhecimento
- Tenho pouco conhecimento
- Não tenho conhecimento

6. Tem informações sobre a importância de *Campylobacter* para saúde pública? *

Marque todas que se aplicam.

- Tenho ampla informação
- Tenho pouca informação
- Não tenho informações

7. No seu entendimento existe risco de *Campylobacter* para saúde pública? *

Marque todas que se aplicam.

- Sim
- Não
- Não sei responder

8. Existem medidas de controle de *Campylobacter* na cadeia produtiva avícola?

Marque todas que se aplicam.

- Sim
- Não
- Não sei responder

9. Tem conhecimento sobre medidas de controle de *Campylobacter* na cadeia produtiva avícola?

Marque todas que se aplicam.

- Tenho amplo conhecimento
- Tenho pouco conhecimento
- Não tenho conhecimento

10. Existe uma Legislação Nacional para regulamentar medidas de controle de *Campylobacter* no setor produtivo avícola?

Marque todas que se aplicam.

- Sim
- Não
- Não sei responder

11. Há pesquisas científicas no Brasil e dados sobre prevalência de *Campylobacter* na cadeia produtiva avícola?

Marque todas que se aplicam.

- Existem muitos dados científicos
- Existem poucos dados científicos
- Não existem dados científicos Não
- sei responder

12. Qual a importância de pesquisas científicas sobre *Campylobacter* na cadeia produtiva avícola?

Marque todas que se aplicam.

- Grande importância
- Razoável importância
- Pouca importância
- Nenhuma importância Não
- sei responder