

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
VETERINÁRIAS**

**CARACTERIZAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE RESISTÊNCIA  
ANTIMICROBIANA DE *CAMPYLOBACTER JEJUNI* ISOLADOS DE  
FRANGOS DE CORTE**

**Dissertação de Mestrado**

**Mariana Paravisi**

**PORTO ALEGRE  
2017**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
VETERINÁRIAS**

**CARACTERIZAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE RESISTÊNCIA  
ANTIMICROBIANA DE *CAMPYLOBACTER JEJUNI* ISOLADOS DE  
FRANGOS DE CORTE**

**Autora: Mariana Paravisi**

**Dissertação apresentada como  
requisito parcial para a obtenção do  
grau de Mestre em Ciências  
Veterinárias na área de Medicina  
Veterinária, com ênfase em Sanidade  
Avícola.**

**Orientador: Prof. Dr. Vladimir  
Pinheiro do Nascimento**

**PORTO ALEGRE  
2017**

Mariana Paravisi

**CARACTERIZAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE RESISTÊNCIA  
ANTIMICROBIANA DE *CAMPYLOBACTER JEJUNI* ISOLADOS DE  
FRANGOS DE CORTE**

Aprovada em: 21 MAR. 2017

APROVADA POR:

---

Prof. Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento  
Orientador e Presidente da Comissão

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Luciana Ruschel dos Santos  
Membro da Comissão

---

Dr. Thales Quedi Furian  
Membro da Comissão

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Franciele Maboni Siqueira  
Membro da Comissão

## AGRADECIMENTOS

Durante esses dois anos só tenho a agradecer a todos que cruzaram meu caminho e que de alguma forma me auxiliaram nessa jornada. Nunca nos podemos esquecer de dar louvor a quem nos deu oportunidade de vencermos. Agradeço ao meu Deus por todas as coisas boas e ruins que vivi, por cada momento, pois eles me ensinaram a tolerância, a simpatia, o autocontrole, a perseverança e outras qualidades que, sem essas adversidades, eu jamais conheceria.

Primeiramente, agradeço ao meu orientador Vladimir Pinheiro do Nascimento, por me dar uma chance e por acreditar que eu era capaz. Mesmo chegando sem me conhecer direito, me acolheu nessa trajetória. Aos demais colegas e amigos que fiz durante esses dois anos de dedicação no CDPA, agradeço pela força e incentivo que me deram quando era necessário seguir em frente e não desistir. Sempre me lembrarei com carinho de vocês e das nossas conversas na histologia e na salinha da pós graduação, regado a café e bolachas. Sou muita grata pelo extraordinário conjunto de amigos que somos.

Agradeço também meu amigo e companheiro, Luiz Tiago Coelho, que mesmo aparecendo no final desta etapa, ajudou com suas palavras de incentivo, carinho e amor. Mostrou-me que a vida é um presente e que cada momento deve ser aproveitado.

Aos meus pais, Wladimir e Tânia, e meu irmão Nicolás, fica minha eterna gratidão. As minhas vitórias serão sempre as vitórias de vocês também. A maior benção da minha vida está na família que eu amo. Sem cada um de vocês nada do que sou hoje seria possível, foram vocês que me deram asas e me ensinaram a voar. Ensinaram-me tudo sobre o amor, sobre escolhas, dedicação, responsabilidades, generosidade e respeito. Vocês sempre serão meus melhores amigos e exemplos, muito obrigada.

## RESUMO

O uso de antimicrobianos de forma terapêutica, preventiva e promotora de crescimento trouxe inúmeras vantagens para a avicultura mundial, entretanto a utilização excessiva dos antimicrobianos e de maneira indevida tem estimulado um aumento no número de micro-organismos resistentes. Entre eles, destaca-se o *Campylobacter jejuni*, bactéria frequentemente associada a enterites em humanos, sendo o frango a principal reservatório e fonte de transmissão deste patógeno para o homem. A transmissão de bactérias resistentes entre animais e seres humanos pode resultar em infecções multirresistentes e insucesso no tratamento terapêutico, sendo a exposição contínua destes micro-organismos a esses medicamentos o fator mais importante na origem da resistência. Diante desse cenário, objetivou-se nesse trabalho investigar e caracterizar, através de métodos fenotípico e genotípico, a susceptibilidade antimicrobiana de 54 isolados de *C. jejuni* coletados em diferentes etapas do processamento da carne de frango de matadouro-frigoríficos da região do Rio Grande do Sul. Para a determinação do MIC, os isolados foram testados frente aos seguintes antimicrobianos: ácido nalidíxico, ciprofloxacina, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina e tetraciclina. Dos 54 isolados de *C. jejuni*, 94,4% foram resistentes a ciprofloxacina, 83,3% ao ácido nalidíxico, 51,8% a tetraciclina e 48% a eritromicina. Todos os isolados foram sensíveis a gentamicina e ao cloranfenicol. Doze isolados foram resistentes a três classes diferentes de antibióticos, sendo assim considerados multi-resistentes. Para verificar a presença da mutação gênica da Região Determinante de Resistência à Quinolona (RDRQ) no gene *gyrA*, foi realizado sequenciamento gênico de 31 isolados considerados resistentes por métodos fenotípicos. Todos os isolados possuíam a mutação Tre-86-Ile na RDRQ do gene *gyrA*, que confere resistência às fluoroquinolonas, confirmando a predominância dessa mutação em *Campylobacter* spp. resistentes a esses antimicrobianos. A ocorrência do gene de resistência à tetraciclina foi verificada por PCR. Dos 28 isolados considerados resistentes por métodos fenotípicos, 42,8% possuíam o gene *tet(O)*, que confere resistência as tetraciclinas. Os resultados mostram um alto nível de resistência antimicrobiana em *C. jejuni* evidenciando a necessidade da implementação de políticas de uso prudente de antimicrobianos na medicina veterinária.

Palavras-chave: *Campylobacter jejuni*; avicultura; resistência antimicrobiana; genes de resistência.

## ABSTRACT

*The use of antimicrobials in a therapeutic, preventive and growth promoting way has brought numerous advantages to the world poultry industry; however, the excessive and undue use of antimicrobials has stimulated an increase in the number of resistant microorganisms. Among them, we highlight *Campylobacter jejuni*, a bacterium frequently associated with enteritis in humans, with chicken being the main reservoir and source of transmission of this pathogen to man. The transmission of resistant bacteria between animals and humans can result in multi resistant infections and failure in therapeutic treatment, and the continued exposure of these microorganisms to these drugs is the most important factor in the source of resistance. Therefore, the aim of this study was to investigate and characterize, through phenotypic and genotypic methods, the antimicrobial susceptibility of 54 *C. jejuni* isolates collected at different stages of the processing of chicken meat from slaughterhouse in Rio Grande do Sul. For MIC determination, strains were tested against the following antimicrobials: nalidixic acid, ciprofloxacin, chloramphenicol, erythromycin, gentamicin and tetracycline. Of the 54 isolates of *C. jejuni*, 94.4% were resistant to ciprofloxacin, 83.3% to nalidixic acid, 51.8% to tetracycline and 48% to erythromycin. All isolates were sensitive to gentamicin and chloramphenicol. Twelve strains were resistant to three different classes of antibiotics, thus being considered multi resistant. To verify the presence of the gene mutation of the Quinolone Resistance Determinant Region (QRDR) in the gene *gyrA*, gene sequencing of 31 strains considered resistant by phenotypic methods was performed. All strains had the Tre-86-Ile mutation in the QRDR of the *gyrA* gene, which confers resistance to fluoroquinolones, confirming the predominance of this mutation in *Campylobacter* spp. resistant to these antimicrobials. The occurrence of tetracycline resistance gene was verified by PCR. Of the 28 strains considered resistant by phenotypic methods, 42.8% had the *tet(O)* gene. The results show a high level of antimicrobial resistance in *C. jejuni* that evidences the need for implementation of policies in the prudent use of antimicrobials in veterinary medicine.*

*Keywords: *Campylobacter jejuni*; poultry industry; antimicrobial resistance; resistance genes.*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Representação do processo de conjugação entre duas bactérias.....	23
<b>Figura 2</b> - Estrutura química das quinolonas e fluoroquinolonas. Adição de flúor na posição 6, conferindo maior atividade antibacteriana às fluoroquinolonas. 30	
<b>Figura 3</b> - Mecanismos de ação dos antimicrobianos que atuam inibindo a síntese proteica.....	32
<b>Figura 4</b> - Esquema utilizado para a determinação da MIC para isolados de <i>Campylobacter jejuni</i> .....	39
<b>Figura 5</b> - Isolado resistentes a ciprofloxacina apresentando a mutação Thr-86-Ile na RDRQ do gene <i>gyrA</i> . .....	46
<b>Figura 6</b> - Diagrama de Venn pelas propriedades físico-químicas dos aminoácidos de acordo com Taylor (1986).....	47

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Antimicrobianos testados, intervalo das concentrações utilizadas e valores de breakpoints e ECOFFs. ....	38
<b>Tabela 2</b> - Genes e Primers selecionados e tamanho dos produtos de PCR.....	42
<b>Tabela 3</b> - Resultado da concentração inibitória mínima (MICs) de isolados de <i>Campylobacter jejuni</i> frente aos antimicrobianos testados.....	44
<b>Tabela 4</b> - Resultados do teste de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados de <i>Campylobacter jejuni</i> baseado nos breakpoints.....	44
<b>Tabela 5</b> - Perfil de resistência antimicrobiana entre os isolados de <i>Campylobacter jejuni</i> .....	45
<b>Tabela 6</b> - Amostras de <i>Campylobacter jejuni</i> com suas MIC para ciprofloxacina, mutações e mutações silenciosas.....	46



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ABPA</b>	Associação Brasileira de Proteína Animal
<b>Ala</b>	Alanina
<b>APPCC</b>	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
<b>Asn</b>	Asparagina
<b>Asp</b>	Ácido Asparato
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>BSAC</b>	<i>British Society for Antimicrobial Chemotherapy</i>
<b>CAMHB</b>	<i>Cation Adjusted Muller Hinton Broth</i>
<b>CDC</b>	<i>Centre of Disease Control</i>
<b>CDNA</b>	<i>Communicable Diseases Network Australia</i>
<b>CDPA</b>	Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária
<b>CIP</b>	Ciprofloxacina
<b>CLO</b>	Cloranfenicol
<b>CLSI</b>	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
<b>DANMAP</b>	<i>Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme</i>
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
<b>DTAs</b>	Doenças Transmitidas por Alimentos
<b>ECDC</b>	European Centre of Diseases Control
<b>ECOFF</b>	<i>Epidemiological Cut-off</i>
<b>EFSA</b>	<i>European Food Safety Authority</i>
<b>ERI</b>	Eritromicina
<b>UE</b>	União Européia
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>EUCAST</b>	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>FQs</b>	Fluoroquinolonas
<b>GBS</b>	Síndrome de Guillian-Barré
<b>GEN</b>	Gentamicina
<b>Gly</b>	Glicina

<b>His</b>	Histidina
<b>I</b>	Intermediário
<b>Lanagro-RS</b>	Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul
<b>mCCDA</b>	<i>Modified Charcoal-Cefoperazone-Deoxycholate Agar</i>
<b>MIC</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b>MLST</b>	<i>Multi-locus Sequence Type</i>
<b>mRNA</b>	Ácido Ribonucleico Mensageiro
<b>NA</b>	Ácido Nalidíxico
<b>NARMS</b>	<i>National Antimicrobial Resistance Monitoring System</i>
<b>nWT</b>	<i>Non-Wild Type</i>
<b>OD</b>	Densidade Óptica
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>Pb</b>	Pares de base
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>PFGE</b>	Eletroforese em Campo Pulsado
<b>Pro</b>	Prolina
<b>R</b>	Resistente
<b>RDRQ</b>	Região Determinante da Resistência às Quinolonas
<b>rRNA</b>	Ácido Ribonucleico Ribossomal
<b>S</b>	Sensível
<b>Ser</b>	Serina
<b>SINDAN</b>	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal
<b>TET</b>	Tetraciclina
<b>Thr</b>	Treonina
<b>tRNA</b>	Ácido Ribonucleico Transportador
<b>UFC</b>	Unidade Formadora de Colônia
<b>UFRGS</b>	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
<b>USDA</b>	<i>United State Department of Agriculture</i>
<b>Val</b>	Valina
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i>
<b>WT</b>	<i>Wild Type</i>

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	13
<b>2.</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	14
<b>2.1</b>	<b>Histórico</b>	14
<b>2.2</b>	<b>Características do gênero <i>Campylobacter</i> spp.</b>	14
<b>2.3</b>	<b>Epidemiologia de <i>C. jejuni</i></b>	16
<b>2.4</b>	<b>Campilobacteriose em humanos</b>	17
<b>2.5</b>	<b><i>Campylobacter</i> spp. na avicultura</b>	18
<b>2.6</b>	<b>Resistência aos antimicrobianos</b>	20
2.6.1	Resistência em <i>Campylobacter</i> spp.	25
2.6.2	Resistência em <i>Campylobacter</i> spp. às fluoroquinolonas	29
2.6.3	Resistência em <i>Campylobacter</i> spp. aos macrolídeos	31
2.6.4	Resistência em <i>Campylobacter</i> spp. à tetraciclina	33
2.6.5	Resistência em <i>Campylobacter</i> spp. aos aminoglicosídeos	34
2.6.6	Resistência em <i>Campylobacter</i> spp. ao cloranfenicol	35
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	36
<b>3.1</b>	<b>Objetivo Geral</b>	36
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos</b>	36
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	37
<b>4.1</b>	<b>Amostra</b>	37
<b>4.2</b>	<b>Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos</b>	37
4.2.1	Antimicrobianos	37
4.2.2	Preparação do inóculo	38
4.2.3	Preparo das microplacas	39
4.2.4	Leitura e interpretação	39
<b>4.3</b>	<b>Pesquisa de genes de resistência</b>	40
4.3.1	Extração do DNA das amostras	40
4.3.2	Resistência à ciprofloxacina	40
4.3.3	Resistência à Tetraciclina	41
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b>	43
<b>5.1</b>	<b>Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos</b>	43
<b>5.2</b>	<b>Detecção de genes de resistência</b>	45
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	48
<b>6.1</b>	<b>Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos</b>	48
<b>6.2</b>	<b>Detecção de genes de resistência</b>	50
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	52
<b>8.</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	53

<b>REFERÊNCIAS</b> .....	54
APÊNDICE A – Amostras de <i>Campylobacter jejuni</i> classificadas de acordo com o número e a matriz de isolamento. ....	68

## 1. INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira é considerada uma das mais desenvolvidas do mundo. O país vem atingindo posição de destaque no mercado mundial, conquistando cada vez mais novos mercados importadores. No ano de 2015 a produção brasileira totalizou 13,14 milhões de toneladas, um aumento de 3,4% em relação à 2014, consolidando o país como o segundo maior produtor de carne de frango do mundo, ultrapassando a China. As exportações brasileiras chegaram ao valor de 4,3 milhões de toneladas, representando um aumento de 3% comparado com o ano anterior e fechou com um consumo de 43,2 Kg per capita, aproximadamente 28 kg a mais do que o consumo de carne suína (ABPA, 2016).

O uso de antimicrobianos na cadeia de produção de forma terapêutica, preventiva e promotora de crescimento contribuiu em muito para esse avanço da avicultura mundial, trazendo inúmeras vantagens para o setor, como o aumento da produtividade, melhora na conversão alimentar, redução no período de criação e diminuição na incidência de patologias nos animais. Entretanto, o uso excessivo ou impróprio destes produtos tem estimulado um aumento no número de micro-organismos resistentes, dentre eles, destaca-se o *Campylobacter* spp. (FRASÃO, 2015<sup>2</sup>). Esta bactéria é apontada como uma das principais causas de enterocolites em humanos na Europa (EFSA, 2015) e nos Estados Unidos da América (EUA), principalmente a espécie *C. jejuni* (CDC, 2016), sendo o preparo e consumo da carne de frango crua ou mal cozida a principal fonte de transmissão deste patógeno para o homem (FDA, 2012). Por essa razão, a resistência antimicrobiana observada em amostras isoladas de animais e carcaças têm sérias implicações para o tratamento de campilobacteriose humana, podendo resultar em infecções multirresistentes e insucesso no tratamento terapêutico (MOORE *et al.*, 2006).

No Brasil, existem poucos estudos sobre resistência antimicrobiana de *Campylobacter* spp. e sua disseminação na cadeia de produção avícola. Tendo em vista a importância desta bactéria para a avicultura e para o âmbito da saúde coletiva, objetivou-se com esse trabalho determinar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados de *C. jejuni* originários de diferentes etapas do processamento da carne de frango de matadouros-frigoríficos do Rio Grande do Sul, através da técnica de concentração inibitória mínima (MIC), e investigar a presença dos principais genes de resistência associados aos fenótipos de resistência encontrados nos isolados, pelo método de reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento de DNA.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Histórico

O primeiro relato do gênero *Campylobacter* spp. foi descrito em 1886 por Escherich, que observou micro-organismos espiralados no cólon de crianças com diarreia, denominando de *Cholera infantum* (BUTZLER, 2004). Em 1913, McFadyean e Stockman, também identificaram um micro-organismo em formato de espirilo associado a vários casos de aborto em ovelhas (SKIRROW, 2006). Nos anos seguintes, em 1919, Smith e Taylor isolaram a mesma bactéria em casos de aborto em bovinos e nomearam-na de *Vibrio fetus* (BUTZLER, 2004). Posteriormente, micro-organismos muito semelhantes foram descritos como *V. jejuni* e *V. coli* de casos de enterite em bovinos e suínos respectivamente (JONES *et al.*, 1931; DOYLEY, 1944). Em humanos, Levy (1946) associou um surto de gastroenterite ocorrido em dois presídios no Estado americano de Illinois com este micro-organismo.

Na década de 70, um estudo taxonômico feito por Véron e Chatelain (1973) comprovou diferenças entre esta bactéria e o gênero *Vibrio* na composição das bases do DNA. Por análises bioquímicas e sorológicas, foi proposto um novo gênero denominado *Campylobacter* spp., o qual foi classificado em três grupos: *Campylobacter* catalase positiva e H<sub>2</sub>S negativa (*Campylobacter fetus* subsp. *fetus* e *Campylobacter fetus* subsp. *veneralis*), *Campylobacter* catalase e H<sub>2</sub>S positivos (*C. jejuni* e *C. coli*), e *Campylobacter* catalase negativa (*C. sputorum* subsp. *bubulus* e *C. sputorum* subsp. *sputorum*). Também nesta década foi desenvolvido meios e técnicas apropriadas que possibilitaram o isolamento destes micro-organismos a partir de fezes, permitindo uma maior compreensão desta bactéria e introduzindo-a na rotina microbiológica. (BUTZLER, 2004). Atualmente o gênero *Campylobacter* spp. compreende 36 espécies e 14 subespécies (EUZÉBY, 2015).

### 2.2 Características do gênero *Campylobacter* spp.

O gênero *Campylobacter* spp. pertence à família *Campilobacteriaceae*, sendo um bacilo curvo espiralado, semelhante à asa de gaivota. São considerados micro-organismos pequenos, medindo entre 0,2 a 0,9 µm de largura e 0,5 a 5 µm de comprimento. São bactérias Gram-negativas e móveis por um único flagelo polar, o que

lhe confere uma motilidade característica semelhante à saca-rolha. Não fermentam nem oxidam açúcares, obtendo energia a partir de aminoácidos. A grande maioria produz a enzima oxidase e podem ou não produzir a enzima catalase. As espécies catalase positiva estão mais associadas a doença em humanos (MEDEIROS, 2011).

Este gênero é de difícil cultivo laboratorial, pois são bactérias microaerófilas estritas, incapazes de crescer na presença de ar atmosférico ou em anaerobiose, exigindo uma condição ideal para a sua proliferação de 5% de O<sub>2</sub>, 10% de CO<sub>2</sub> e 85% de N<sub>2</sub>. As espécies de *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* e *C. upsaliensis* pertencem ao grupo das bactérias termofílicas e seu crescimento ocorre em temperaturas entre 41 °C a 43 °C por um período de 48 horas, sendo o *C. jejuni* e o *C. coli* as espécies mais comumente isoladas em casos de gastroenterites em humanos (ROSSI JÚNIOR *et al.*, 2009; MEDEIROS, 2011).

Estes micro-organismos são altamente sensíveis a dessecação, ao calor e a desinfetantes e não formam esporos (FDA, 2012), porém, quando as condições de crescimento não são favoráveis ou quando ocorre mudanças bruscas de temperatura ou ainda quando as culturas são muito antigas, as células de *Campylobacter* spp. assumem uma forma cocóide degenerativa, considerada infectante, porém não cultivável (HAZELEGER *et al.*, 1995; LOPEZ, 2009). Esta forma não cultivável pode ser revertida após sucessivas passagens em animais, podendo assim ser novamente detectada (ROLLINS; COLWEL, 1986; STERN *et al.*, 1994).

O primeiro meio seletivo criado para o isolamento de *C. jejuni* e *C. coli* foi desenvolvido em 1977 por Skirrow (SKIRROW, 1977). Neste meio era adicionado três antibióticos, Vancomicina, Trimetropim e Polimixina, para melhorar a seletividade do mesmo. A partir deste, vários outros meios foram sendo divulgados e atualmente os mais utilizados são: Skirrow, Preston, Karmali, *modified charcoal cefoperazone deoxycholate agar* (mCCDA) e ágar Campy-CEFEX (ZHANG *et al.*, 2008). Além do isolamento em meios seletivos, pode-se realizar outros métodos para a detecção e diferenciação das espécies de *Campylobacter* spp., dentre eles, os testes que utilizam as técnicas de biologia molecular, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) e *Multilocus Sequency Typing* (MLST) (LUND *et al.*, 2004; NOORMOHAMED; FAKHR, 2014).

### 2.3 Epidemiologia de *C. jejuni*

*Campylobacter* spp. é considerado como a primeira e segunda causa mais frequente de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) na Europa e Estados Unidos da América (EUA) respectivamente, sendo a espécie *C. jejuni* a mais isolada (EFSA, 2015; CDC, 2016). Nos EUA a taxa de notificação é de 12,68 para cada 100.000 habitantes, no entanto, estima-se que mais de 1,3 milhões de pessoas por ano são afetadas por este agente (FDA, 2012). Na Europa, onde *Campylobacter* spp. é mais reportado em casos de gastroenterites em humanos, a taxa de notificação é de 64,8 para cada 100.000 habitantes, tendo ocorrido, no ano de 2013, 214.779 casos (EFSA, 2015). Na Austrália, *Campylobacter* spp. também destaca-se como uma das causas mais frequentes de enterocolites em humanos. No ano de 2014, foi a infecção entérica mais reportada, com 19.931 casos notificados, apresentando uma taxa de 124,9 casos para cada 100.000 habitantes (CDNA, 2014).

Em um estudo realizado por Quetz e colaboradores (2010) para reportar a prevalência de *Campylobacter* spp. em crianças com diarreia no nordeste do Brasil *C. jejuni* e *C. coli* foram detectados em 9,6% (8/83) e 6,0% (5/83) no grupo com diarreia e em 7,2% (6/83) e 1,2% (1/83) no grupo sem diarreia, respectivamente.

A maioria dos casos são eventos isolados e geralmente estão associados com o consumo de frango cru, leite ou queijo proveniente de leite não pasteurizado e água não tratada. A transmissão também pode ocorrer através do contato com animais contaminados e de pessoa para pessoa pela rota fecal-oral. Não é necessário uma grande quantidade de *Campylobacter* spp. para que a doença se instale, menos de 500 células já são capazes de causar um quadro de infecção (CDC, 2016). Na Europa, 50% a 80% dos casos de campilobacteriose em humanos estão relacionados com o consumo da carne contaminada ou com a produção de frangos e poedeiras (EFSA, 2011). Em 2013, a nível de varejo, 25% das 3.102 amostras de carne de frango refrigeradas testadas para *Campylobacter* spp. deram positivas. No abatedouro-frigorífico, 50% das amostras deram positivas, de um total de 3.013 carcaças testadas (EFSA, 2015). Em um estudo conduzido no Japão por Suzuki e colaboradores (2009), conclui-se que aproximadamente 58% da carne de frango pronta para o consumo e 60% dos seus derivados estavam contaminados com *Campylobacter* spp. Embora este micro-organismo esteja mais associado a infecções em humanos, ele pode ser comumente encontrado no trato gastrointestinal de outros



animais sem causar a doença, como cães, gatos, aves, bovinos, suínos, roedores, macacos e aves silvestres (USDA, 2013).

#### 2.4 Campilobacteriose em humanos

Normalmente infecções por *Campylobacter* spp. em humanos são auto limitantes, podendo durar um dia a uma semana. Pessoas que apresentam imunodeficiência, crianças e idosos são considerados mais susceptíveis a desenvolver a doença. Os sintomas variam de leves a moderados e se caracterizam por uma gastroenterite típica com desconforto abdominal, diarreia, febre e raramente vômito. O tratamento normalmente é feito com o aumento da ingestão de fluídos, no entanto, o uso de antibiótico pode ser necessário em alguns casos mais graves e, se administrado cedo, reduz a duração dos sintomas. Normalmente utiliza-se azitromicina (macrolídeo) e ciprofloxacina (fluoroquinolona) como fármaco de eleição para o tratamento, porém resistência às fluoroquinolonas vem sendo frequentemente reportado, sendo altamente recomendado que seja realizado um teste de susceptibilidade antimicrobiana antes da prescrição (CDC, 2016). Vários estudos identificaram outros fatores de riscos para a contaminação por *Campylobacter* spp. além da carne de frango, entre eles a convivência com cães e gatos, o consumo de leite cru e de água não tratada (CORRY; ATTABAY, 2001; HOPIKINS *et al.*, 1984; KAPPERUD *et al.*, 1992).

Em casos raros, a infecção por *C. jejuni* pode levar a complicações mais sérias, como artrites ou paralisia temporária, conhecida como Síndrome de Guillian-Barré (GBS), uma polineuropatia aguda imunomediada que causa lesões na bainha de mielina, podendo levar à óbito (ALLOS *et al.*, 1998; CORTEZ, 2006; EFSA, 2011). O CDC (2016) estima que um em cada 1.000 casos de infecções por *C. jejuni* é seguido da GBS, e desses; destacando que mais de 40% dos casos nos EUA estão associados com campilobacteriose. Os sintomas tipicamente iniciam com distúrbios sensoriais que evoluem para uma fraqueza simétrica, iniciando nos membros inferiores e progredindo em poucas semanas para os membros superiores e nervos craniais (HADDEN; GREGSON, 2001). A taxa de mortalidade é baixa, entre 2 a 3%, e o tratamento consiste em plasmaferese e administração intravenosa de imunoglobulinas humana (NACHANKIN *et al.*, 1998).

## 2.5 *Campylobacter* spp. na avicultura

Desde o primeiro dia na granja até o seu transporte para o abatedouro-frigorífico, o frango depara-se com vários fatores de risco que contribuem para a sua colonização intestinal por *Campylobacter* spp. (HERMANS *et al.*, 2012). É de extrema importância que medidas de controle deste patógeno sejam tomadas em todas as etapas da cadeia de produção, pois os métodos utilizados para redução de *Campylobacter* spp. apenas nos abatedouros-frigoríficos são bastante limitados as legislações (LAWES *et al.*, 2012; USDA, 2013). Identificar as fontes de transmissão e desenvolver estratégias de intervenção estão entre as principais maneiras de evitar que lotes negativos tornem-se positivos ou que futuramente haja uma maior contaminação das carcaças no abatedouro (BULL *et al.*, 2006).

As possíveis portas de entrada deste patógeno na granja ainda não estão bem elucidadas e as suas fontes de contaminação são muito variáveis (NEWELL *et al.*, 2011), porém, quando ocorre sua entrada, espalha-se rapidamente, acometendo quase 100% dos animais (BULL *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2011; WAGENAAR *et al.*, 2013). A camada mucoide das criptas do ceco é o principal local de colonização deste micro-organismo e várias aves e mamíferos podem ser portadores, porém a presença de sinais clínicos e lesões nas aves são raras. As fezes de frangos contaminados por *Campylobacter* spp. podem conter grandes quantidades desta bactéria (entre  $10^6$  e  $10^8$  UFC/ g) e são consideradas uma das principais formas de disseminação horizontal entre o lote, o qual permanece contaminado até a chegada ao frigorífico (HERMANS *et al.*, 2012; NEWELL *et al.*, 2011). A possibilidade de transmissão vertical por *Campylobacter* spp. ainda está sendo investigada (WAGENAAR *et al.*, 2013).

Muitos estudos foram desenvolvidos para identificar as condições associadas a entrada e contaminação dos lotes por *Campylobacter* spp. (BULL *et al.*, 2006; HERMAN *et al.*, 2003; LAWES *et al.*, 2012; NEWELL *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2011; WAGENAAR *et al.*, 2013). Entre os principais fatores de risco estão a qualidade da água fornecida, o tamanho do lote e o tipo de criação (criações orgânicas têm maior prevalência deste micro-organismo comparado com criações intensivas). Insetos, pássaros e funcionários podem servir de carreadores ou transmissores e introduzir este patógeno no lote (NEWELL *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2011). Poças d'água ao redor dos aviários também são consideradas de grande importância, pois servem como reservatórios de

*Campylobacter* spp., evitando sua dessecação e permitindo que o micro-organismo sobreviva por mais tempo (BULL *et al.*, 2006; NEWELL *et al.*, 2011).

Outro fator de risco que merece destaque são as caixas de transporte. Fezes presentes em caixas que foram utilizadas para transportar lotes positivos para *Campylobacter* spp. podem carrear e contaminar lotes previamente negativos (BERRANG *et al.*, 2004; CORRY; ATABAY, 2001; HUE *et al.*, 2010). Em um estudo realizado por Slader e colaboradores (2002) observou-se a presença de matéria orgânica nas caixas mesmo após o processo de limpeza e desinfecção. Neste mesmo estudo também se constatou uma redução no nível de contaminação por *Campylobacter* spp. nas caixas, quando o desinfetante era utilizado nas recomendações adequadas para o trabalho. Segundo Berghaus e colaboradores (2013), há uma significativa associação na prevalência e carga microbiana de *Campylobacter* spp. entre granja e o matadouro-frigorífico, destacando-se a importância de exercer práticas de manejo, como por exemplo: o uso de água acidificada durante o jejum pré-abate, exclusão competitiva e vacinação de matrizes para a redução deste patógenos desde o início da produção. Uma das medidas de prevenção sugeridas para evitar este tipo de contaminação cruzada seria fazer um abate logístico, no qual lotes positivos seriam abatidos ao final de cada turno, antes da sanitização do matadouro-frigorífico (BERRANG *et al.*, 2007; NEWELL *et al.*, 2001).

É comum ocorrer a entrada de *Campylobacter* spp. no matadouro-frigorífico através de lotes previamente contaminados (BERRANG *et al.*, 2007) e apesar do nível de contaminação reduzir-se durante o processamento devido a medidas como escaldagem por contra fluxo de imersão, descontaminação de equipamentos, resfriamento e congelamento rápido e a desinfecção da carcaça pelo uso de agentes bactericidas, ainda é possível encontrar *Campylobacter* spp. no produto final (ATANASSOVA *et al.*, 2007; BERRANG *et al.*, 2007; NEWELL *et al.*, 2001).

Uma das fontes de maior relevância na contaminação de carcaças de frango durante o processamento no matadouro-frigorífico ocorre pelo conteúdo intestinal de lotes positivos (HALD *et al.*, 2000). No estudo realizado por Silva e colaboradores (2016) utilizando a técnica de PFGE, foi observado 100% de similaridade genética de alguns isolados de *C. jejuni* provenientes de fezes e de carnes de frango. No Brasil, Perdoncini (2012) encontrou 70,2% de prevalência de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango refrigeradas e Franchin (2007) encontrou positividade para *Campylobacter* spp. em 71,3% das amostras isoladas de abatedouros de frango.

As etapas de remoção das penas e evisceração estão entre as principais responsáveis pelo aumento da contaminação da carcaça com fezes, provavelmente pelo fato de que durante estas etapas ocorra o extravasamento do conteúdo intestinal para o exterior da carcaça. Durante a depenagem, as pressões exercidas pelos dedos de borracha podem forçar a saída de fezes pela cloaca, bem como durante a etapa de evisceração, quando pode ocorrer ruptura de vísceras ou estas são mal ocluídas, contaminando não apenas a carcaça, como também, equipamentos, superfícies e água de processamento, o que aumenta as chances de ocorrer contaminação cruzada (BERRANG *et al.*, 2007; BERRANG *et al.*, 2011; FIGUEROA *et al.*, 2009). A ruptura de vísceras ocorre mais comumente quando o frigorífico utiliza um sistema automatizado para esta etapa, já que a máquina não é capaz de adaptar-se aos diferentes tamanhos de carcaça (FIGUEROA *et al.*, 2009; HUE *et al.*, 2010; ROSENQUIST *et al.*, 2006). Em um estudo realizado por Perdoncini (2015), onde foi avaliado 13 pontos ao longo do processo de abate, foi observado um aumento no Número Mais Provável (NMP)/ mL nos pontos 6 (carcaça após depenagem) e 8 (carcaça após evisceração) com uma importante correlação entre os suabes de cloaca com os estágios.

A prevalência de *Campylobacter* spp. diminui principalmente durante a escaldagem e resfriamento no tanque de *chiller*, etapas consideradas pontos críticos de controle pelo programa de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) (FIGUEROA *et al.*, 2009; GUERIN *et al.*, 2010). O uso de um sistema de imersão com contra fluxo de água na escaldagem auxilia na redução da contaminação, pois expõem a carcaça a um constante fluxo de água limpa a elevada temperatura (GUERIN *et al.*, 2010). A última etapa do processamento da carcaça é o resfriamento da mesma em tanque de *chiller* contendo água clorada a baixa temperatura. Este procedimento também auxilia na diminuição da carga microbiana, no entanto, o risco de ocorrer contaminação cruzada aumenta conforme mais carcaças são colocadas no tanque (FIGUEROA *et al.*, 2009; GUERIN *et al.*, 2010; HUE *et al.*, 2010).

## **2.6 Resistência aos antimicrobianos**

A resistência antimicrobiana é um desafio complexo de saúde pública global e, durante várias décadas, tem sido uma ameaça crescente para o tratamento eficaz de uma gama cada vez maior de infecções causadas por bactérias, parasitas, vírus e fungos (WHO, 2014). Os impactos causados pela resistência tornam os tratamentos difíceis,

prolongados e onerosos, podendo até, resultar no óbito do paciente. Além dos efeitos negativos no tratamento, os gastos impostos pela resistência antimicrobiana também resultam em um efeito econômico preocupante (WHO, 2014). A cada ano, cerca de 25.000 doentes morrem na União Europeia (UE) por infecção causadas por bactérias multirresistentes. As infecções devidas a estas bactérias resultam em custos adicionais de saúde e perdas de produtividade de pelo menos € 1,5 bilhões de euros por ano (ECDC, 2009). O custo anual para o sistema de saúde dos EUA sozinho foi estimado em US\$ 21 a US\$ 34 bilhões de dólares, acompanhado por mais de 8 milhões pelos dias adicionais no hospital (WHO, 2014).

A resistência aos antimicrobianos pode ser intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca resulta de características estruturais ou bioquímicas inerentes aos microorganismos. Como exemplo, pode-se citar as bactérias Gram-positivas que carecem de alvo biológico frente à polimixina (BOERLIN; WHITE, 2010). Os genes envolvidos na resistência intrínseca não podem ser transferidos horizontalmente e não estão relacionados à uma exposição anterior ao agente antimicrobiano (FAJARDO *et al.*, 2008).

O desenvolvimento da resistência adquirida é atribuído a mutações aleatórias ou a aquisição de elementos genéticos móveis. As mutações cromossômicas que contribuem para a resistência antimicrobiana tendem a produzir modificações no alvo do antibacteriano. A presença de fármacos antimicrobianos cria uma pressão para a seleção de mutantes e, apesar das mutações serem um evento de baixa frequência, elas podem ser transmitidas à progênie com um alto grau de fidelidade, persistindo por mais tempo na população. Em casos raros, uma única mutação pode ser suficiente para conferir altos níveis de resistência clínica em um organismo, como ocorre com *C. jejuni* resistentes as fluoroquinolonas e em *Staphylococcus aureus* resistentes a rifampicina (HOFFMAN, 2001; TENOVER, 2006). Contudo, a rápida disseminação de genes de resistência antimicrobiana entre bactérias é atribuído principalmente ao resultado da transferência horizontal através de elementos genéticos móveis, tais como, plasmídeos, transposons e integrons (SCHWARZ; CHASLUS-DANCLA, 2001).

Plasmídeos são pequenos fragmentos circulares de DNA de cadeia dupla, que existem em um estado super-enrolado distinto do cromossoma (HOFFMAN, 2001). Possuem um sistema de replicação próprio, conferindo-lhes a capacidade de replicação autônoma e podem integrar-se ao DNA cromossômico em parte ou no todo, podendo também, agir como vetor para transposons e integrons. Não são essenciais para a sobrevivência das bactérias, porém, em condições adversas podem ser benéficas,

codificando genes de virulência, de resistência aos antimicrobianos e/ou desinfetantes. Plasmídeos conjugativos podem mover-se por conta própria de uma célula hospedeira para outra (SCHWARZ; CHASLUS-DANCLA, 2001). Muitos dos plasmídeos conjugativos em *Campylobacter* spp. carregam genes de resistência à tetraciclina e aminoglicosídeos. Gibreel e colaboradores (2004) demonstraram a transferência de um plasmídeo conjugativo que codifica o gene *tet(O)* e *aphA-3* de *C. jejuni* para uma cepa de *E. coli*.

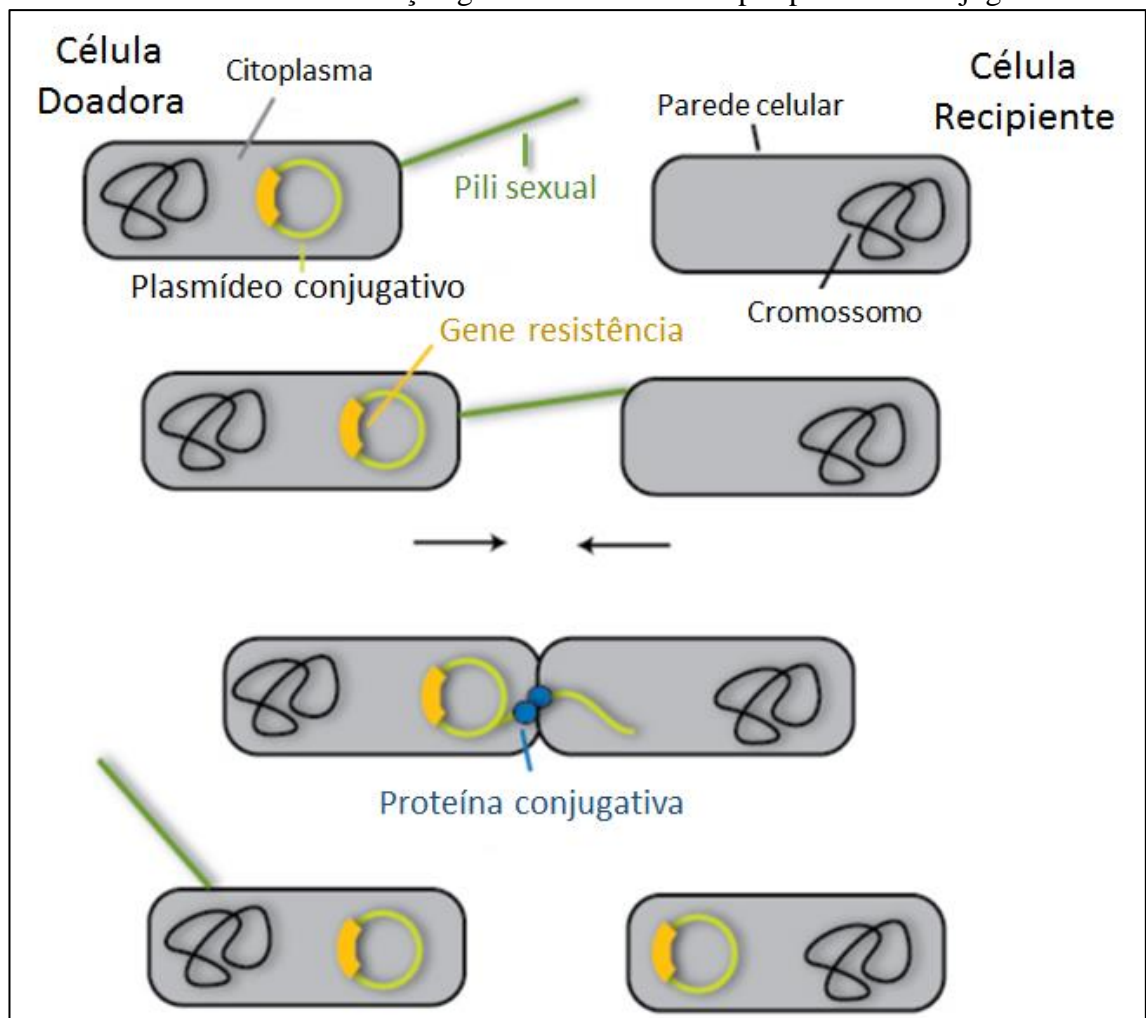
Transposons, ao contrário dos plasmídeos, não possuem sistema de replicação e precisam integrar-se ao DNA cromossômico para a sua manutenção. Eles têm pouca ou nenhuma especificidade alvo e podem inserir-se em várias posições no DNA cromossômico ou plasmídeo. Já os integrons são pequenos elementos móveis detectados apenas em bactérias Gram-negativas, os quais diferem dos plasmídeos pela falta de um sistema de replicação e, dos transposons, pela falta de um sistema de transposição, movendo-se por recombinação sítio-específica (SCHWARZ; CHASLUS-DANCLA, 2001). Embora estes elementos não serem comuns e não desempenhem papel importante na transferência horizontal de resistência aos antibacterianos em *Campylobacter* spp., os integrons de classe I, que são os integrons mais comuns associados à resistência aos antibacterianos, foram relatados em ambos *C. jejuni* e *C. coli*, transportando genes de resistência a aminoglicosídeos (*aadA2* e *aacA4*) (LEE *et al.*, 2002).

Plasmídeos, transposons e integrons podem ser transferidos horizontalmente entre bactérias, através de mecanismos como transdução, transformação e conjugação. O processo de transdução é mediado por um bacteriófago durante o ciclo lisogênico, onde genes de resistência contidos no DNA cromossômico ou em plasmídeos que estão localizados perto do sítio de inserção podem ser incorporados ao genoma do fago e propagados junto a ele para outras bactérias (SCHWARZ; CHASLUS-DANCLA, 2001). No entanto, o processo de transdução está raramente envolvido na disseminação de genes de resistência, devido a vários fatores. Entre eles, a especificidade do bacteriófago, a quantidade limitada de DNA que pode ser embalado junto ao fago e mutações que a bactéria pode sofrer para se tornar resistente, sendo incapaz de absorver o fago (DAVISON, 1999; HOFFMAN, 2001). No processo de transformação, bactérias adquirem e incorporam segmentos de DNA exógenos – oriundo de outras bactérias que sofreram lise celular – contendo genes de resistência (TENOVER, 2006). A

transformação tem um papel limitado na propagação de genes de resistência, pois o DNA livre é rapidamente degradado no ambiente (SCHWARZ; CHASLUS-DANCLA, 2001).

O processo mais eficiente na transferência de DNA é a conjugação, quando um plasmídeo conjugativo ou transposon de uma célula doadora é transferido para uma célula recipiente através do contato próximo (Figura 1) (SCHWARZ; CHASLUS-DANCLA, 2001). Para a conjugação ocorrer, o plasmídeo necessita carrear dois pares de genes: genes que permitam a mobilidade e genes que codificam proteínas que fornecem um canal de acoplamento, esses plasmídeos são conhecidos como plasmídeos conjugativos (SMILLIE *et al.*, 2010). Plasmídeos não conjugativos podem utilizar o aparato de transferência proporcionado pelo plasmídeo conjugativo para sua mobilização (DAVISON, 1999).

Figura 1 – Representação do processo de conjugação entre duas bactérias. O pili sexual faz o contato físico e a informação genética é transferida por proteínas conjugativas.



(Fonte: Adaptado de IGEM, 2008)

A mutação e seleção, juntamente com os mecanismos de troca genética, permitem que muitas espécies bacterianas adaptem-se rapidamente à introdução de agentes antimicrobianos em seu ambiente (TENOVER, 2006), tornando-se resistentes aos antimicrobianos através de vários mecanismos, os quais incluem (VAN HOEK, 2011; IOVINE, 2013):

- 1) Mudanças de permeabilidade na parede celular bacteriana, restringindo o acesso do antimicrobiano ao alvo;
- 2) Efluxo ativo do antimicrobiano do interior da célula bacteriana;
- 3) Modificação enzimática da droga;
- 4) Degradação do agente antimicrobiano;
- 5) Aquisição de vias metabólicas alternativas àquela inibida pela droga;
- 6) Modificação do alvo do antimicrobiano;
- 7) Produção excessiva da enzima alvo;

Uma variedade de testes laboratoriais podem ser usados para determinar a susceptibilidade antimicrobiana de um micro-organismo. Dentre esses, os mais utilizados são: disco difusão, Epsilometer-test (E-test), diluição em ágar e macro ou micro diluição em caldo (CLSI, 2008). Dependendo do teste escolhido, ele pode fornecer um resultado qualitativo ou quantitativo. Testes qualitativos, como por exemplo o teste de disco difusão, apenas classificam um micro-organismo como sensível, intermediário, ou resistente, sem permitir a determinação da concentração inibitória mínima (MIC do inglês: *Minimum Inhibitory Concentration*). Enquanto que, testes quantitativos são expressos como MIC, em  $\mu\text{g/mL}$  ou  $\text{mg/L}$  (E-test, diluição em ágar e em caldo) (WALKER, 2010).

Os testes devem ser realizados seguindo instruções claras e precisas e de acordo com um procedimento internacionalmente aceito e publicado por um órgão competente, como *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*, *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)*, *British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC)*, entre outros (SCHWARZ *et al.*, 2010). O CLSI e EUCAST podem ser considerados como as principais instituições focadas nos testes de susceptibilidade antimicrobiana. Enquanto que o CLSI possui comitês separados focados tanto na medicina humana quanto na veterinária, o foco do EUCAST é a criação de *breakpoints* somente para a medicina humana (SILLEY, 2012).

Atualmente, existem dois tipos diferentes de critérios interpretativos para categorizar os isolados bacterianos a cada antimicrobiano testado: *breakpoints* e valores



de *cut-off* epidemiológico (ECOFF) (SCHWARZ *et al.*, 2010). Os *breakpoints* são utilizados na previsão da eficácia clínica de um antimicrobiano  $x$  contra um micro-organismo  $y$ , baseado na  $MIC \geq z \mu\text{g/mL}$ . Esse resultado categoriza a bactéria como clinicamente susceptível, intermediário ou resistente àquele antimicrobiano testado (SILLEY, 2012). Um micro-organismo clinicamente resistente está associado a uma alta probabilidade de falha terapêutica. (EFSA, 2016). Para se determinar um *breakpoint* uma série de fatores são considerados, entre eles: os resultados dos estudos de eficácia clínica, a dosagem e a via de administração do agente antimicrobiano, os parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos do fármaco nas espécies animais estudadas (SCHWARZ *et al.*, 2010).

Os ECOFF (*cut-off* epidemiológico), formulados pelo EUCAST e utilizados para monitorar a resistência nas populações microbianas, são baseados na distribuição epidemiológica da MIC para um antimicrobiano a uma bactéria específica. Esses valores diferem um micro-organismo em dois grupos: *wild type* ( $MIC \leq z \text{ mg/L}$ ) e *non-wild type* ( $MIC > z \text{ mg/L}$ ). Os categorizados como *wild type* apresentam uma distribuição normal na população, a MIC dentro do ECOFF e não possuem mecanismos de resistência. Enquanto que os micro-organismos *non-wild type* possuem um mecanismo de resistência e a MIC maior que o ECOFF (SILLEY, 2012; EFSA, 2015). Tanto bactérias *wild types* quanto *non-wild types* podem ou não responder clinicamente a um tratamento antimicrobiano (SILLEY, 2012). Portanto, os valores ECOFF são utilizados para detectar os mecanismos de resistência e monitorar o desenvolvimento da resistência em determinada população microbiana. Os valores de ECOFF para cada micro-organismo e antimicrobiano estão disponíveis gratuitamente na internet (<http://mic.eucast.org/Eucast2/>).

### 2.6.1 Resistência em *Campylobacter* spp.

O surgimento de micro-organismo resistentes é um fenômeno natural, o qual é acelerado pela pressão seletiva exercida pelo uso e mau uso de agentes antimicrobianos em seres humanos e animais (WHO, 2014). As classes de antimicrobianos empregados na cadeia de produção animal e em humanos são, na sua maioria, as mesmas, trazendo um risco para o surgimento e disseminação de bactérias zoonóticas resistentes, como *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. (EFSA, 2016; WHO, 2014).

O uso indiscriminado destes medicamentos na população humana, bem como na produção animal, para o tratamento, para a prevenção de doenças e, principalmente como

promotores de crescimento, onde são utilizados em sub dosagens por longos períodos de tempo, favorecem a seleção de cepas de *Campylobacter* spp. resistentes, especialmente às fluoroquinolonas (FQs), antimicrobianos antes considerados de eleição para o tratamento de campilobacteriose. Atualmente os macrolídeos, como a eritromicina (ERI), são os fármacos de eleição para tratamento de casos mais graves (IOVINE, 2013; FDA, 2014).

Segundo o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal (Sindan), o setor brasileiro de saúde animal apresentou um faturamento médio de 4,9 bilhões em 2015. A participação da avicultura nesse resultado corresponde a 15% e dos antimicrobianos a 17% (SINDAN, 2015). Macrolídeos e quinolonas têm sido muito utilizados na veterinária e há uma preocupação de que o uso contínuo dessas classes de fármacos irá aumentar a prevalência de *Campylobacter* spp. resistentes a antibacterianos em produtos alimentares de origem animal, e conseqüentemente, campilobacteriose humana resistente aos antibacterianos (MCCRAKIN *et al.*, 2016).

O Programa Estadual de Controle de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal do estado do Paraná (PAMvet-PR), fez um levantamento do uso e comercialização de medicamentos veterinários em frangos de corte em 28 estabelecimentos avícolas no estado. O levantamento revelou a utilização de 126 produtos comerciais com 49 princípios ativos diferentes. Os mais citados como medicamento preventivo na fase final de produção do frango de corte foram fluoroquinolonas (34%), ionóforos (20%), macrolídeos (10%) e tetracilinas (6%). Na forma terapêutica foram ionóforos (25%), fluoroquinolonas (19%), sulfonamidas (14%) e tetracilinas (11%). O estudo também apontou irregularidades no uso de drogas indicadas para o uso terapêutico sendo utilizadas como promotores de crescimento, como a ciprofloxacina (6%), tetracilina (6%), norfloxacina (2,7%) e enrofloxacina (33%) (SESA, 2005). Atualmente, no Brasil, os aditivos autorizados como promotores de crescimento são avilamicina, bacitracina, bacitracina de zinco, cloridrato de clorexidina, enramicina, flavomicina, halquinol, lincomicina, tilosina e virginamicina (BRASIL, 2015).

No Brasil, há uma alta prevalência de *Campylobacter* spp. isolados de carcaças e frangos resistentes às FQs e às tetracilinas. Em um estudo realizado por Hungaro e colaboradores (2014) foi encontrado 95% e 40% (n=20) de resistência à ciprofloxacina e à tetraciclina, respectivamente, em *C. jejuni* isolados de carcaças de frango no estado de Minas Gerais. Moura e coautores (2013) também reportaram alta prevalência de

resistência em *C. jejuni* isolados de carcaças de frango no Distrito Federal, com 100% (16/16) de isolados resistentes à ciprofloxacina e 93,75% (15/16) resistentes à tetraciclina. Nesse mesmo estudo foi observado 68,75% (11/16) de isolados resistentes à eritromicina. No estado do Rio de Janeiro, Frasão e colegas (2015)<sup>1</sup> encontraram 100% de resistência à ciprofloxacina e 42,50% de resistência a enrofloxacin em *Campylobacter* spp. isolados do conteúdo fecal do ceco de 80 frangos de criação orgânica.

De acordo com o relatório anual de 2014 do Programa Nacional de Monitoramento da Resistência nos EUA (NARMS), 27% dos isolados de *C. jejuni* oriundos de surtos em humanos foram resistentes a ciprofloxacina, o maior valor já registrado desde o início do programa, resultando em um aumento de 5% com relação ao ano anterior. Entre 2013 e 2014, também houve um aumento na resistência entre isolados oriundos da carne de frango pronta para consumo (11% para 15%) e isolados oriundos de carcaças de frango (24% para 28%) (FDA, 2014). Apesar da descontinuação do uso de quinolonas em aves nos Estados Unidos em 2005, a NARMS não observou diminuições consistentes na resistência à ciprofloxacina entre os isolados de *C. jejuni* e *C. coli* provenientes de seres humanos ou de frangos (FDA, 2014). Na Dinamarca, de 2002 a 2011, observou-se um aumento constante da resistência à ciprofloxacina em isolados de *C. jejuni* de frangos de corte e sua carne, mesmo tendo sido proibido o uso das FQs na avicultura em 2009 (DAMNAP, 2015).

Em 2014, treze Estados membros da UE e a Noruega reportaram, no Relatório Anual em Resistência Antimicrobiana de Bactérias Indicadoras e Zoonóticas Isoladas de Humanos, Animais e Alimentos, um alto nível de resistência à ciprofloxacina (> 70%) para *C. jejuni* isolados de humanos. Também foi observado níveis altos de resistência a tetraciclina, chegando a 46,4% para *C. jejuni* e 53,3% para *C. coli*. Das amostras de *C. jejuni* isoladas de frangos, foi reportado 69,8% dos isolados resistentes a ciprofloxacina e 54,4% a tetraciclina. O mesmo acontece em amostras de *C. jejuni* isoladas de carcaças de frango, onde foi reportado altos níveis de resistência para ciprofloxacina (65,7%) e para tetraciclina (36,3%), demonstrando um paralelo muito forte na ocorrência de *C. jejuni* isolados de humanos, frangos e carcaças resistentes à ciprofloxacina e tetraciclina (EFSA, 2016).

Em países onde o uso de FQs na produção animal nunca foi permitido, como na Austrália, é incomum o aparecimento de amostras de *Campylobacter* spp. resistentes a esta classe de antibacteriano (UNICOMB *et al.*, 2003; CHENG *et al.*, 2012). Em um estudo de caso realizado por Unicomb e colaboradores (2003), todas as amostras de

*Campylobacter* spp. resistentes à ciprofloxacina foram oriundas de pacientes que adquiriram a infecção fora do país. Nenhuma amostra de *Campylobacter* spp. local foi resistente à ciprofloxacina. Segundo um estudo realizado por Nachamkin e colaboradores (2002), não foi identificada amostra de *Campylobacter* spp. resistentes a FQs isoladas de pacientes entre 1982-1992 no estado americano da Pensilvânia, porém 41% dos isolados foram resistentes em 2001, coincidindo com o fato de que apenas em 1995 o FDA liberou o uso de FQs em frangos apresentando problemas respiratórios (NELSON *et al.*, 2007). Estudos na Holanda também mostraram um aumento significativo na resistência à fluoroquinolona entre os isolados humanos e de frangos desde a introdução da enrofloxacina na medicina veterinária. Em isolados de *C. jejuni* de frangos, a resistência as FQs aumentou de 56% a 67,3% em 2006 para 2011 (ENDTZ *et al.*, 1991, GARCIA-MIGURA *et al.*, 2014). Este fenômeno suscitou a preocupação de que as espécies de *Campylobacter* spp. resistentes à fluoroquinolona podem ser transferidas para seres humanos através de produtos de aves contaminados, resultando em complicações na terapêutica com esta classe de antibacterianos.

Recentemente a Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou sua primeira lista de agentes patogênicos prioritários resistentes aos antibióticos, dividida em três prioridades: crítica, alta ou média. *Campylobacter* spp. resistentes a fluoroquinolonas encontram-se listados como prioridade alta, junto com outras bactérias que são cada vez mais resistentes aos fármacos e provocam doenças comuns (OMS, 2017).

Em relação à eritromicina, o relatório do *The Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme* (DANMAP) de 2015 divulgou que 3% dos isolados de *C. jejuni* de carne de frango na Dinamarca eram resistentes à eritromicina (DANMAP, 2015). Também no relatório, Resistência Antimicrobiana em Bactérias Zoonóticas e Indicadores em Seres Humanos, Animais e Alimentos da UE, a resistência à eritromicina foi de 3,3% em carne de frango e 5,9% em frangos (média de todos os Estados Membros), em 2014, porém houve discrepância de resultado em alguns países, como a Croácia e a Romênia, que encontraram 39,1% e 20,4% de isolados de *C. jejuni* de frangos resistentes a eritromicina, respectivamente. Estas flutuações na resistência aos antibióticos comuns diferem de país para país e são reflexos das legislações locais que regulam o uso de antimicrobianos para a produção animal (EFSA, 2016).

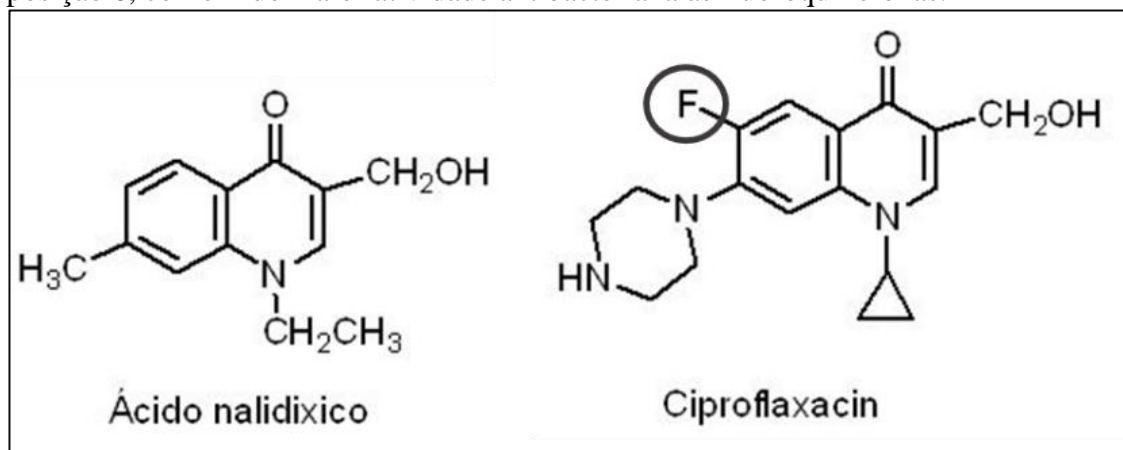
Devido à crescente preocupação com a resistência aos antibacterianos, a UE decidiu proibir, em 2006, a comercialização e utilização de antibacterianos como promotores de crescimento na produção animal. Em outros países, como os EUA, há uma

grande pressão dos consumidores para que a indústria avícola remova os promotores de crescimento da criação de aves. No entanto, a remoção dos antibacterianos tem levado a problemas de desempenho animal, aumentando a conversão alimentar e a incidência de certas doenças (HUYGHEBAERT *et al.*, 2011). O impacto na eliminação dos promotores pode ser minimizado com a utilização de alternativas aos antibacterianos na prevenção de doenças (PATTERSSON e BURKHOLDER, 2003). Algumas das alternativas para substituir os promotores de crescimento são: probióticos e prebióticos, ácidos orgânicos, óleos essenciais e fagoterapia. Em um estudo realizado por Arsi (2015) e colaboradores, foi observado uma redução de  $2 \log_{10}$  UFC/g na contagem de *Campylobacter* spp. em amostras de fezes de frangos tratados com probióticos e prebióticos. No trabalho realizado por Carvalho (2010) e coautores, também houve uma redução de  $2 \log_{10}$  UFC/g em frangos tratados com fagoterapia. Com relação aos ácidos orgânicos: fórmico, propiônico e acético, foi observado uma redução na contagem de *Campylobacter* spp. abaixo do limite de detecção dentro de 1 hora de incubação, em pH 4,0 (CHAVEERACH *et al.* 2002). Dentro de cada alternativas, muitos produtos estão no mercado, e embora alguns tenham claramente um potencial na redução de patógenos, para outros a eficácia ainda não é clara, havendo a necessidade de mais estudos para estabelecer e atender padrões para alternativas de promotores de crescimento em frangos de corte (HUYGHEBAERT *et al.*, 2011).

### 2.6.2 Resistência em *Campylobacter* spp. às fluoroquinolonas

As fluoroquinolonas são uma das classes de antimicrobianos mais usadas na medicina humana por ter um amplo espectro de ação e por estar disponível na forma oral ou intravenosa, sendo administradas uma ou duas vezes ao dia (IOVINE, 2013). O ácido nalidíxico (NA) é o composto não fluorado desta classe de antimicrobianos e é considerado uma quinolona de primeira geração. A segunda geração, as FQs, são derivadas dos primeiros compostos, porém possuem uma substituição do flúor na posição 6 (Figura 2), conferindo-lhe uma atividade antibacteriana maior. Neste grupo, incluem-se a ciprofloxacina, enrofloxacina e levofloxacina (PAYOT, 2006).

Figura 2 – Estrutura química das quinolonas e fluoroquinolonas. Adição de flúor na posição 6, conferindo maior atividade antibacteriana às fluoroquinolonas.



(Fonte: Adaptado de Wolfson; Hooper, 1989)

As FQs são drogas bactericidas, que atuam inibindo a ação da DNA girase (topoisomerase II) e da topoisomerase IV, sendo as duas enzimas essenciais ao crescimento e divisão das células bacterianas (RUIZ, 2003; SILVA; HOLLENBACH, 2010). A DNA girase é uma enzima tetraédrica composta por duas subunidades (A e B) codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB*, os quais são responsáveis pelo super-enrolamento negativo do DNA. A topoisomerase IV é uma proteína composta de duas subunidades ParC e duas subunidades ParE, responsáveis pelo desenrolamento da dupla hélice do DNA para que haja a replicação (WALKER; DOWLING, 2010). O principal alvo das FQs para as bactérias Gram-negativas é a DNA girase e, para as Gram-positivas, a topoisomerase IV (RUIZ, 2003). Sendo *Campylobacter* spp. uma bactéria Gram-negativa, as FQs têm como alvo a DNA girase, formando um complexo estável com as enzimas, reduzindo a síntese de DNA e resultando na morte celular (IOVINE, 2013). A DNA girase é um excelente alvo para FQs, porque não está presente em células eucarióticas e é essencial para o crescimento bacteriano (FABREGA *et al.*, 2009).

Existem dois mecanismos descritos na literatura que conferem resistência de *Campylobacter* spp às FQs: modificação do alvo e efluxo ativo da droga. Esses mecanismos atuam sinergicamente, conferindo elevado grau de resistência (IOVINE, 2013).

As espécies *C. jejuni* e *C. coli* não possuem os genes *parC* e *parE*, portanto a resistência nessas bactérias ocorre através de mutações pontuais na Região de Determinação de Resistência às Quinolonas (RDRQ) do gene *gyrA*, sendo a mutação com substituição do aminoácido treonina por isoleucina (Thr-86-Ile) no códon 86 a mais

comum. Esta única mutação já é capaz de conferir um elevado grau de resistência nessas espécies, diferentemente em *E. coli* ou *Salmonella* spp., que dependem de um acúmulo de várias mutações pontuais para adquirirem resistência a esta classe (IOVINE, 2013). Outra mutação menos frequente, substituindo asparagina por ácido aspartato (Asp – 90 - Asn) também foi descrita em *Campylobacter* spp. e confere resistência intermediária à ciprofloxacina (WANG *et al.*, 1993). A mutação, substituindo treonina por alanina (Thr – 86 – Ala) confere resistência apenas ao ácido nalidíxico.

O destino de uma mutação em populações de patógenos é determinado em parte pelo seu custo energético. Mutações que apresentam um alto custo de energia às bactérias são mais propensas a desaparecerem na ausência do antibiótico (MELNYK; WONG; KASSEN, 2015). Porém as mutações que conferem resistência às FQs não propiciam um gasto energético para a bactéria, sendo estáveis na ausência do antimicrobiano e persistindo nas populações (LUO *et al.*, 2005). Em um estudo realizado por Luo e colaboradores (2005), foi demonstrado que isolados de *C. jejuni* resistentes a FQs (contendo a mutação Thr-86-Ile) persistiram colonizando o trato intestinal de galinhas, mesmo na ausência do fármaco e sem perder a resistência associada à mutação, sugerindo que a mutação Thr-86-Ile não oferece gasto energético para a bactéria.

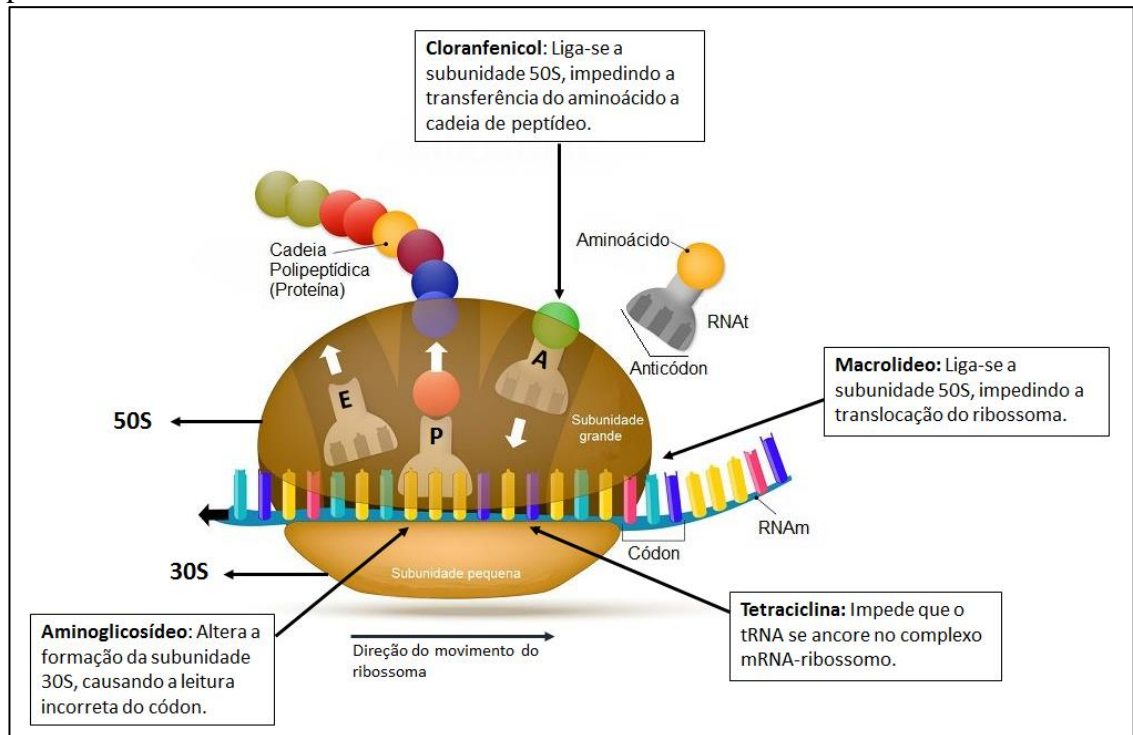
Outro mecanismo descrito em *Campylobacter* spp. que confere resistência à FQ e atua sinergicamente com a mutação na *gyrA* é o efluxo da droga através da bomba de efluxo CmeABC codificada por um *operon* que consiste em três genes *cmeA*, *cmeB* e *cmeC*. Esses genes codificam uma proteína de fusão periplásmica, um transportador de droga de membrana interna e uma proteína de membrana externa, respectivamente. A bomba de efluxo multidrogas CmeABC reduz a concentração intracelular de FQs e de outras drogas ejetando-as para fora da célula (IOVINE, 2013; WIECZOREK; OSEK, 2013).

### 2.6.3 Resistência em *Campylobacter* spp. aos macrolídeos

Macrolídeos são moléculas grandes, caracterizadas por um anel lactona central com 12 a 16 membros. Os antimicrobianos pertencentes a esta classe são classificados de acordo com a quantidade de átomos contidos no anel lactona (GIGUÈRE, 2010<sup>1</sup>). Esses antimicrobianos atuam inibindo a síntese de proteínas, ligando-se reversivelmente ao sítio P da subunidade 50S do ribossomo (Figura 3) (IOVINE, 2013). Essa ligação impossibilita

os mecanismos de transpeptidação e translocação, o que resulta na separação prematura da cadeia de polipeptídeos (GIBREEL; TAYLOR, 2006; GIGUÈRE, 2010<sup>1</sup>).

Figura 3 – Mecanismos de ação dos antimicrobianos que atuam inibindo a síntese proteica.



(Fonte: Adaptado de Duarte, 2016)

Três diferentes mecanismos estão envolvidos na resistência aos macrolídeos em *Campylobacter* spp.: modificação do alvo, bomba de efluxo e alteração na permeabilidade da membrana (IOVINE, 2013). Altos níveis de resistência em *C. jejuni* e *C. coli* são normalmente atribuídos a mutações no domínio V do gene alvo 23S RNA ribossômico (rRNA) na posição A2074C e A2075G (correspondendo a posição 2058 e 2059 em *E. coli*), sendo a última a mais comum, ou nos genes *rplD* e *rplV* que codificam as proteínas L4 e L22 da subunidade ribossomal 50S. Mutações nessas posições alteram o principal ponto de ancoragem dos macrolídeos, impedindo que a droga se ligue (GIBREEL; TAYLOR, 2006; WANG *et al.*, 2015).

Em contraste com a resistência às FQs, a frequência de mutação que confere a resistência a esta classe de antimicrobiano em *Campylobacter* spp. é baixa. Essas mutações que permitem que *C. jejuni* resista aos macrolídeos tem um alto custo energético para a bactéria, portanto não são estáveis na ausência do antibacterianos, diferentemente do que ocorre na resistência às FQs, que conferem uma vantagem a



bactéria (LUO *et al.* 2005; LUANGTONGKUM *et al.*, 2009; MACCRACKIN *et al.*, 2015).

Mutações cromossomais, como a que confere resistência à eritromicina, são consideradas como não sujeitas a transferência entre diferentes estirpes de bactérias, sendo disseminadas apenas por expansão clonal. No entanto, em um estudo realizado por Wang e colaboradores (2015), observou-se a transferência de um gene Gram-positivo *erm(B)* para um isolado de *Campylobacter coli* de suínos que não carregava nenhum tipo de mutação citada anteriormente. O gene *erm(B)* codifica uma rRNA metilase e medeia a resistência a macrolídeos de alto nível em *Campylobacter spp.*, podendo ser transferida entre *C. jejuni* e *C. coli*.

A bomba de efluxo é outro mecanismo que contribui para a resistência aos macrolídeos e trabalha sinergicamente com a mutação 23S rRNA, para atingir níveis elevados de resistência (IOVINE, 2013). No estudo realizado por Cagliero e colaboradores (2006), quando o gene *cmeB* foi geneticamente inativado, houve restauração da susceptibilidade à eritromicina em isolados de *C. coli* que apresentavam baixos níveis de resistência e não possuíam a mutação A2075G. Nos isolados positivos para a mutação A2075G, ocorreu uma redução de 4 a 8 vezes do valor do MIC.

Segundo o NARMS (FDA, 2014), a resistência à eritromicina em *C. jejuni* nos EUA permanece menor que 4%. Essa tendência é observada também na Europa, onde os níveis de resistência não são maiores que 6% (EFSA, 2015). No entanto, em países subdesenvolvidos da Ásia e da África, o nível de *Campylobacter spp.* resistentes à eritromicina é mais elevado (IOVINE, 2013). Um estudo realizado na Nigéria demonstrou praticamente 50% de *Campylobacter spp.* isolados de frangos e suínos resistentes à eritromicina (SMITH *et al.*, 1998). Carrique-Mass e colaboradores (2014), encontram 100% de resistência à eritromicina em *C. jejuni* isolados de frangos no Vietnã.

#### 2.6.4 Resistência em *Campylobacter spp.* à tetraciclina

As tetraciclinas são antimicrobianos lipofílicos, de caráter anfótero e amplo espectro de ação, tendo atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas aeróbicas e anaeróbicas. Por ser um medicamento de custo baixo e estar disponível em uma ampla variedade de formulações, de uso oral e parenteral, as tetraciclinas eram muito utilizadas na produção animal (GIGUÈRE, 2010<sup>2</sup>). No entanto, devido à disseminação da resistência adquirida que se desenvolveu em vários patógenos, tem seu uso limitado

atualmente. Os principais representantes dessa classe são a tetraciclina, a doxiciclina e a minociclina (IOVINE, 2013).

As tetraciclinas possuem ação bacteriostática e atuam ligando-se reversivelmente na subunidade 30S do ribossomo bacteriano, interferindo com a ligação do RNA transportador (tRNA) ao sítio A do complexo formado pelo RNA mensageiro (mRNA), inibindo a introdução de aminoácidos e, conseqüentemente, a síntese proteica (Figura 3) (GIGUÈRE, 2010<sup>2</sup>). Mais precisamente, a tetraciclina liga-se ao cátion  $Mg^{2+}$  para passar através das porinas da membrana externa e, em seguida, no espaço periplásmico, dissocia-se do magnésio e move-se passivamente para o citoplasma para se ligar a sítios discretos na subunidade 30S ribossomal, inibindo a acomodação de aminoacil-tRNA (aa-tRNA) e evitando a adição de novos aminoácidos ao polipéptido em crescimento (CONNEL *et al.*, 2003).

O principal mecanismo de resistência a tetraciclinas em *Campylobacter* spp. é a proteção do sítio A pela ligação de proteínas de proteção ribossomal (RPPs) codificadas pelo gene *tet(O)*, impedindo a ligação da droga neste alvo (IOVINE, 2013). Estas proteínas reconhecem um sítio A aberto no ribossomo bacteriano e ligam-se de tal maneira que induz uma alteração conformacional que resulta na liberação da molécula de tetraciclina ligada. Esta alteração persiste durante um período de tempo prolongado, permitindo assim o alongamento da cadeia polipeptídica de maneira eficiente (WIECZOREK; OSEK, 2013). Elevados níveis de resistência é normalmente associado com o gene *tet(O)*, codificado no cromossomo ou, mais comum, em um plasmídeo (pTet em *C. jejuni* e pCC31 em *C. coli*), que codifica a proteína TetO, uma RPP (PRATT; KOROLIK, 2005). A bomba de efluxo também contribui para aumentar o grau de resistência a tetraciclinas (IOVINE, 2013). Um estudo realizado por Lin e colaboradores. (2002) demonstrou que quando o gene *cmeABC*, que codifica a bomba, é geneticamente inativado pelo rompimento do *cmeB*, leva a uma diminuição de 8 vezes do valor de MIC de isolados de *C. jejuni* sem a proteína Tet(O).

#### 2.6.5 Resistência em *Campylobacter* spp. aos aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são antimicrobianos bactericidas utilizados no tratamento de infecções graves. Possuem elevada toxicidade e deixam resíduos no rim, detectáveis por longo período de tempo. Os principais representantes dessa classe de antimicrobiano

incluem a gentamicina (GEN), canamicina, amicacina, neomicina, tobramicina e estreptomicina (DOWLING, 2010).

Esses antimicrobianos atuam na subunidade 30S do ribossomo, interferindo na translocação da cadeia de peptídeos do sítio A para o sítio P, interrompendo prematuramente a síntese proteica ou interferindo na leitura correta do mRNA, levando a incorporação do aminoácido errado e, conseqüentemente, produzindo proteínas defeituosas (Figura 3) (IOVINE, 2013).

O principal mecanismo de resistência aos aminoglicosídeos é através da inativação da droga por enzimas plasmídeo específicas, classificadas como fosfotransferases, acetiltransferases e adeniltransferases (DOWLING, 2010). Em *Campylobacter* spp., o gene *aphA-3*, que codifica a enzima 3' - aminoglicosídeo fosfotransferase, é o mecanismo mais comum que confere resistência a esta classe de antimicrobianos (IOVINE, 2013). Essa enzima, presente no citoplasma, modifica os aminoglicosídeos em seus grupos hidroxil ou amino, impedindo a ligação ribossômica (DOWLING, 2010).

#### 2.6.6 Resistência em *Campylobacter* spp. ao cloranfenicol

Cloranfenicol (CLO) é um composto lipossolúvel e estável. Possui um amplo espectro de ação, contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, frente aos quais geralmente é bacteriostático. Os principais representantes dessa classe são o cloranfenicol, florfenicol e tianfenicol. Esses antimicrobianos atuam na bactéria, ligando-se irreversivelmente à subunidade 50S do ribossomo e impossibilitando a síntese proteica (Figura 3). Eles atuam inibindo a peptidil transferase, enzima responsável pela transferência do aminoácido à cadeia de peptídeos sendo formada (DOWLING, 2010).

O principal mecanismo de resistência em *Campylobacter* spp. é através da inibição enzimática por acetilação do cloranfenicol, evitando a ligação da droga ao ribossomo. A enzima acetiltransferase é codificada pelo gene *cat*, no entanto a resistência ao cloranfenicol não se generalizou entre *Campylobacter* spp. (AARESTRUP, 2001).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Este trabalho pretende caracterizar as bases fenotípicas e genotípicas da resistência aos antimicrobianos entre isolados de *C. jejuni* originários de diferentes etapas do processamento da carne de frango de matadouros-frigoríficos do Rio Grande do Sul.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- a) Determinar fenotipicamente a frequência de resistência aos antimicrobianos em *C. jejuni* isolados de diferentes etapas de matadouros- frigoríficos de frango - RS.
- b) Avaliar a presença de isolados multi-resistentes (mínimo resistente a três classes de antibióticos).
- c) Investigar a presença dos principais genes de resistência associados aos fenótipos de resistência encontrados nos isolados de *C. jejuni*.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Amostra

Foram selecionados por conveniência 54 isolados de *C. jejuni* pertencentes à coleção de culturas do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) da Faculdade de Medicina Veterinária – UFRGS. Os isolados analisados, representados no apêndice A, são provenientes de amostras coletadas durante as etapas de processamento da carne de frango de 4 matadouros-frigoríficos do Estado do Rio Grande do Sul, durante os anos de 2011 e 2012.

### 4.2 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

Para definir o perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados foi utilizado a técnica de microdiluição em caldo, conforme descrito pelo documento VET01-A4 do CLSI (CLSI, 2013) para amostras de *C. jejuni*.

#### 4.2.1 Antimicrobianos

Os antimicrobianos utilizados foram: **ácido nalidíxico** (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA); **ciprofloxacina** (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA); **cloranfenicol** (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA); **eritromicina** (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA); **gentamicina** (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e **tetraciclina** (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA).

A escolha dos antimicrobianos testados, do intervalo de concentrações e dos valores de *breakpoint* utilizados na interpretação dos resultados foi realizada de acordo com as recomendações do CLSI (CLSI, 2010; CLSI, 2013) e estão listados na TABELA1. Os valores de *breakpoint* foram adotados para estabelecer o perfil fenotípico de resistência antimicrobiana e os valores de ECOFF do EUCAST (2017) versão 5.21 foram adotados para fins de avaliação dos isolados. Os valores de *breakpoints* do ácido nalidíxico, cloranfenicol e gentamicina foram determinados de acordo com estudo prévio (EL-ADAWY *et al.*, 2015). A cepa *C. jejuni* ATCC (*American Type Culture Collection*) 55360 foi utilizada como controle de qualidade para todos os testes.

Tabela 1 – Antimicrobianos testados, intervalo das concentrações utilizadas e valores de *breakpoints* e ECOFFs.

Antimicrobianos	Concentração (mg/L)	<i>Breakpoint</i> (mg/L)	ECOFF (mg/L) <sup>b</sup>
Ácido Nalidíxico	1-256	> 16 <sup>c</sup>	> 16
Ciprofloxacina	0,007-16	≥ 4 <sup>a</sup>	> 0,5
Cloranfenicol	0,25-128	> 16 <sup>c</sup>	> 16
Eritromicina	0,064-128	≥ 32 <sup>a</sup>	> 4
Gentamicina	0,064-32	> 2 <sup>c</sup>	> 4
Tetraciclina	0,064-64	≥ 16 <sup>a</sup>	> 1

<sup>a</sup> CLSI, 2010

<sup>b</sup> Fonte: <http://mic.eucast.org/Eucast2/>

<sup>c</sup> EL-ADAWY *et al.*, 2015

As concentrações das soluções estoque foram equivalentes a dez vezes a concentração mais alta a ser testada e de pelo menos 1000 mg/L. Como solventes e diluentes, foram adotados os recomendados pelo CLSI (2013), para cada antimicrobiano. Após completa homogeneização, as soluções estoque foram fracionadas em volumes de 1,2 mL, acondicionadas em microtubos de centrífuga de 1,5 mL, embrulhados em papel alumínio e armazenadas a -20 °C até a utilização.

A solução estoque de cada antimicrobiano foi diluída em caldo Mueller-Hinton Cátion Ajustado (em inglês *Cation-Adjusted Mueller-Hinton Broth* - CAMHB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) em diluições seriadas na base 2 para obtenção das concentrações determinadas.

#### 4.2.2 Preparação do inóculo

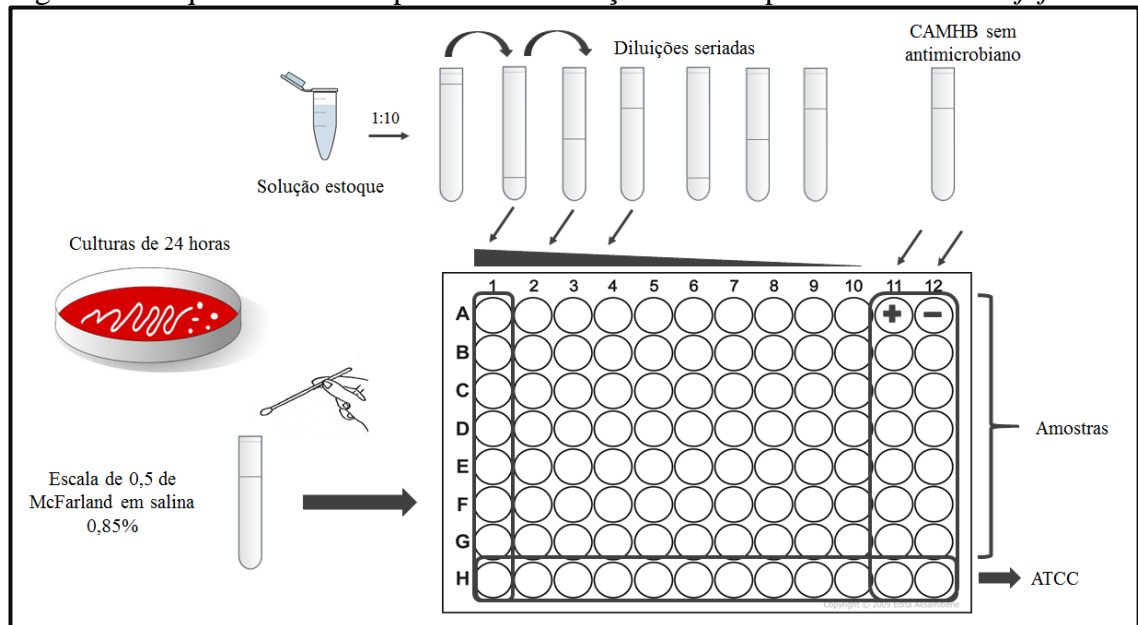
Para a obtenção do inóculo, as amostras foram repicadas em ágar Base Sangue (Oxoid, Hampshire, Reino Unido) suplementado com 5% de sangue desfibrinado de ovino e incubadas por 24 horas em condições de microaerofilia (N<sub>2</sub>: 85%, CO<sub>2</sub>: 10%, O<sub>2</sub>: 5%) a 42 °C ±1 °C. A partir desta cultura, foi preparado uma suspensão bacteriana em solução salina a 0,85%, para obtenção de uma turbidez equivalente a 0,5 na escala de MacFarland, correspondendo a uma concentração final de 1,5 x 10<sup>8</sup> UFC/mL. Esta suspensão foi ajustada em espectrofotômetro (SP 22, Biospectro, Brasil) em um comprimento de onda densidade óptica de 610 nm e OD de 0,90 (0,80 – 0,115).

#### 4.2.3 Preparo das microplacas

Para o teste, foram utilizadas placas de microtitulação de poliestireno com 96 cavidades de fundo chato estéreis e descartáveis. Em cada coluna foi distribuído nos poços 100  $\mu$ L do caldo CAMHB, com diferentes concentrações do antimicrobiano, em ordem decrescente de concentração.

Uma alíquota de 5  $\mu$ L da suspensão bacteriana foi adicionada a cada poço na linha correspondente ao número da amostra. Como demonstrado na Figura 4, as duas últimas colunas foram reservadas para controle positivo para certificar a viabilidade da bactéria (CAMHB acrescido do inóculo, porém sem o antimicrobiano) e controle negativo, para confirmar esterilidade do meio (apenas o CAMHB). A última linha da placa foi utilizada para o controle de qualidade (cepa *C. jejuni* ATCC 55360). Em seguida, a placa foi incubada por 24 horas, em condições de microaerofilia (N<sub>2</sub>: 85%, CO<sub>2</sub>: 10%, O<sub>2</sub>: 5%) a 42 °C.

Figura 4 – Esquema utilizado para a determinação da MIC para isolados de *C. jejuni*.



(Fonte: Adaptado de Simoni, 2016)

#### 4.2.4 Leitura e interpretação

Após incubação, o valor da MIC foi determinado como a menor concentração da droga que inibiu o crescimento visível bacteriano. Os isolados foram avaliados qualitativamente como susceptíveis, intermediários ou resistentes de acordo com os *breakpoints* recomendados pelo CLSI e como WT e nWT de acordo com os ECOFF.

Isolados resistentes a pelo menos três classes diferentes dos antibacterianos testados foram considerados como multirresistentes (KALLEN *et al.*, 2010).

### 4.3 Pesquisa de genes de resistência

#### 4.3.1 Extração do DNA das amostras

Os isolados utilizados foram reativados em meio de cultura não seletivo, ágar Sangue (Oxoid, Hampshire, Reino Unido) contendo 5% de sangue desfibrinado de ovino e incubadas a 42 °C por 48 horas em microaerofilia, afim de se obter colônias puras. Em seguida, utilizou-se uma colônia da bactéria cultivada e resuspendeu-se em 200 µL de água ultra pura. A extração do ácido desoxirribonucleico (DNA) foi feita por extração térmica seguindo a metodologia desenvolvida por Sambrook; Russel (1989) com adaptações. A suspensão bacteriana foi centrifugada a 17.530 x g por 2 min (Mikro 120 - Hettich, Alemanha), descartando o sobrenadante. Os *pellets* foram ressuspensos em 200 µL de água ultrapura submetidos à lise térmica a 100 °C por 10 min. Para purificação do DNA, foi utilizado ainda uma etapa com fenol-clorofórmio adaptada de Sambrook e Russel (2001). As amostras com o DNA extraído foram armazenadas a - 20 °C até sua posterior utilização.

#### 4.3.2 Resistência à ciprofloxacina

Foram selecionados 31 isolados de *C. jejuni* com MIC  $\geq$  4 mg/L para a pesquisa de genes de resistência à ciprofloxacina. Para detecção da mutação foi realizado sequenciamento direto de um fragmento de 454 pares de base (pb) da RDRQ do gene *gyrA* gerado por PCR. Os *primers* (DNAexpress Biotecnologia LTDA<sup>®</sup>, Guarulhos, Brasil) foram selecionados a partir de trabalhos já publicados (FRASÃO *et al.* 2015<sup>2</sup>) e verificados no banco de genes antes de sua confecção. Os *primers* específicos para a amplificação da RDRQ do gene *gyrA* estão listados na Tabela 2. A reação de PCR foi desenvolvida em um volume de 25 µL constituído por 1X PCR Buffer [500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8,4)], 1 mM de dNTPs, 10 pmol de cada *primer*, 1,0 U Taq DNA polimerase (Invitrogen<sup>®</sup>, Carlsbad, EUA), 2 mM de MgCl<sub>2</sub> e 5 µL de DNA molde. A reação de amplificação foi feita em termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, EUA), com desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, 35 ciclos



com desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 55 °C por 30 segundos, extensão a 72 °C por 1 minuto e extensão final por a 72 °C por 10 minutos. O produto da amplificação foi purificado por método *in house* e para sua visualização 10 µL foi utilizado na eletroforese a 90 V (Loccus Biotecnologia, Cotia, Brasil) em gel de agarose a 1% com tampão tris-borato-EDTA (TBE), corado com 1 µg/mL de brometo de etídio (Ludwig Biotec, Porto Alegre, Brasil) e comparado com peso molecular de 100 pb (Kasvi, Curitiba, Brasil).

Foi utilizado sequenciador automático *ABI-PRISM 3500® Genetic Analyzer* com capilares de 50 cm e polímero POP7 (Applied Biosystems). As sequencias obtidas nos eletroferogramas foram processadas através dos softwares Chromas Lite versão 2.1.1 (Technelysium, South Brisbane, Austrália) e Geneious versão 10 (Biomatters LTDA, Auckland, Nova Zelândia). Para confirmar a ocorrência de mutação, a sequência da cepa *C. jejuni* (L04566.1), obtida no *GenBank*, foi usada como padrão de cepa sensível à ciprofloxacina (ambas as fitas em triplicato).

#### 4.3.3 Resistência à Tetraciclina

O gene *tet(O)* foi detectado através PCR dos isolados de *C. jejuni* com MIC  $\geq 2$  mg/L, totalizando 28 isolados. Os *primers* (DNAexpress Biotecnologia LTDA®, Guarulhos, Brasil) utilizados estão listados na Tabela 2 e foram selecionados a partir de trabalho publicado (BACON *et al.* 2000) e verificados no banco de genes antes de sua confecção. A reação de PCR foi desenvolvida em um volume de 25 µL contendo 10x PCR Buffer [500 mM KCl, 200 mM Tris-HCl (pH 8.4)], 2,5 mM de dNTPs, 10 pmol de cada *primer*, 5U/ µL de Taq DNA polimerase (Invitrogen®, Carlsbad, EUA), MgCl<sub>2</sub> 25 mM e 2 µL de DNA molde. A reação de amplificação foi feita em termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, EUA), com desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, 30 ciclos com desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 54 °C por 30 segundos, extensão a 72 °C por 1 minuto e extensão final a 72 °C por 7 minutos. Para a visualização do produto da PCR, 10 µL do produto de amplificação foi utilizado na eletroforese a 90 V (Loccus Biotecnologia, Cotia, Brasil) em gel de agarose a 1% com tampão TBE, corado com 1 µg/mL de brometo de etídio (Ludwig Biotec, Porto Alegre, Brasil) e comparado com peso molecular de 100 pb (Kasvi, Curitiba, Brasil).

Tabela 2 - Genes e *Primers* selecionados e tamanho dos produtos de PCR.

Antimicrobiano	Genes	Produtos	Sequências	Referência
TET	<i>tetO</i>	559 pb	Fw: GCGTTTTGTTTATGTGCG Rv: ATGGACAACCCGACAGAAGC	Bacon <i>et al.</i> 2000
CIP	CjgryA QRDR	454 pb	Fw: GCCTGACGCAAGAGATGGTTTA Rv: TATGAGGCGGGATGTTTGTCG	Frasão <i>et al.</i> 2015 <sup>2</sup>

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

Os resultados dos testes de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados de *C. jejuni* estão listados nas Tabela 3 e 4. Os valores de *breakpoint* foram utilizados para estabelecer o perfil fenotípico de resistência antimicrobiana. Os antimicrobianos cloranfenicol e gentamicina não apresentaram isolados clinicamente resistentes. Já para os antimicrobianos ácido nalidíxico, ciprofloxacina, eritromicina e tetraciclina, os isolados de *C. jejuni* foram considerados clinicamente resistentes em 45 (83,3%), 46 (85,2%), 23 (42,6%) e 22 (40,74) isolados, respectivamente.

Os valores de ECOFF também foram utilizados para a avaliação fenotípica dos isolados. Não foi observado isolados nWT para os antimicrobianos cloranfenicol e gentamicina. No entanto, para o ácido nalidíxico, ciprofloxacina, eritromicina e tetraciclina foram classificados como nWT (microbiologicamente resistentes) 45 (83,3%), 51 (94,4%), 26 (48%) e 28 (51,8%) dos isolados, respectivamente (Tabela 3).

Apenas dois (3,7%) isolados foram sensíveis a todos os antimicrobianos e 12 (22,2%) isolados foram resistentes a três ou mais classes diferentes de antimicrobianos, sendo caracterizados como multi-resistentes (Tabela 5). Dentro dos 54 isolados, foram detectados 15 perfis de resistência (Tabela 5).

Tabela 3 – Resultado da concentração inibitória mínima (MICs) de isolados de *C. jejuni* frente aos antimicrobianos testados.

Número de isolados	Agente antimicrobiano <sup>a</sup>	Número de isolados com MIC (µg/ml) e frequência (%)															nWT <sup>b</sup> n (%)	R <sup>c</sup> n (%)	
		≤0,007	0,016	0,031	0,062	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128			≥256
54	NA								2 (3,7)	0	0	1 (1,8)	6 (11,1)	26 (48,1)	19 (35,9)	0	0	45 (83,3)	45 (83,3)
	CIP	2 (3,7)	1 (1,8)	0	0	0	0	0	0	5 (9,2)	16 (29,6)	20 (37)	10 (18,5)					51 (94,4)	46 (85,2)
	CLO				6 (11,1)	23 (42,6)	22 (40,7)	2 (3,7)	1 (1,8)	0	0	0	0	0	0			0 (0)	0 (0)
	ERI				15 (27,7)	5 (9,2)	4 (7,4)	2 (3,7)	1 (1,8)	1 (1,8)	0	1 (1,8)	2 (3,7)	4 (7,4)	9 (16,6)	10 (18,5)		26 (48)	23 (42,6)
	GEN				16 (29,6)	22 (40,7)	13 (24)	3 (5,5)	0	0	0	0	0	0	0	0		0 (0)	0 (0)
	TET					22 (40,7)	2 (3,7)	1 (1,8)	1 (1,8)	2 (3,7)	1 (1,8)	3 (5,5)	7 (13)	9 (16,6)	6 (11,1)			28 (51,8)	22 (40,7)

<sup>a</sup> Antimicrobianos avaliados: ácido nalidíxico (NA), ciprofloxacina (CIP), cloranfenicol (CLO), eritromicina (ERI), gentamicina (GEN) e tetraciclina (TET).

<sup>b</sup> Isolados *non-Wild Type* (nWT), conforme valores do ECOFF. Antimicrobianos sem linha pontilhada possuem valores ECOFFs iguais aos *Breakpoints*.

<sup>c</sup> Isolados resistentes (R), conforme valores de *Breakpoint*.

Linhas sólidas vermelhas verticais indicam os *Breakpoints* entre os isolados resistente e sensíveis. Linhas pontilhadas indicam os valores ECOFFs.

Tabela 4 – Resultados do teste de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados de *C. jejuni* baseado nos *breakpoints*.

N=	NA (%)	CIP (%)	CLO (%)	ERI (%)	GEN (%)	TET (%)
54						
R	45 (83,3)	46 (85,2)	0	23 (42,6)	0	22 (40,7)
I	6 (11,1)	5 (9,2)	0	2 (13,7)	0	3 (5,5)
S	3 (5,5)	3 (5,5)	54 (100)	29 (53,7)	54 (100)	29 (53,7)

R, resistente; I, intermediário; S, sensível; NA, ácido nalidíxico; CIP, ciprofloxacina; CLO, cloranfenicol; ERI, eritromicina; GEN, gentamicina; TET, tetraciclina.

Tabela 5 – Perfil de resistência antimicrobiana entre os isolados de *C. jejuni*.

Perfis de resistência	Classes de antibacterianos	Número/ (%) de isolados de <i>C. jejuni</i> resistentes (n = 54)
NA	1	45/(83,3)
CIP	1	46/(85,18)
ERI	1	23/(42,59)
TET	1	22/(40,7)
NA, CIP	1	41/(75,9)
NA, ERI	2	20/(37)
NA, TET	2	20/(37)
CIP, ERI	2	22/(40,74)
CIP, TET	2	20/(37)
ERI, TET	2	6/(11,11)
NA, CIP, ERI	2	22/(40,7)
NA, CIP, TET	2	19/(35,1)
NA, ERI, TET	3	6/(11,11)
CIP, ERI, TET	3	6/(11,11)
Sensíveis para todos <sup>a</sup>	0	2/(3,7)

NA, ácido nalidíxico; CIP, ciprofloxacina; ERI, eritromicina; TET, tetraciclina.

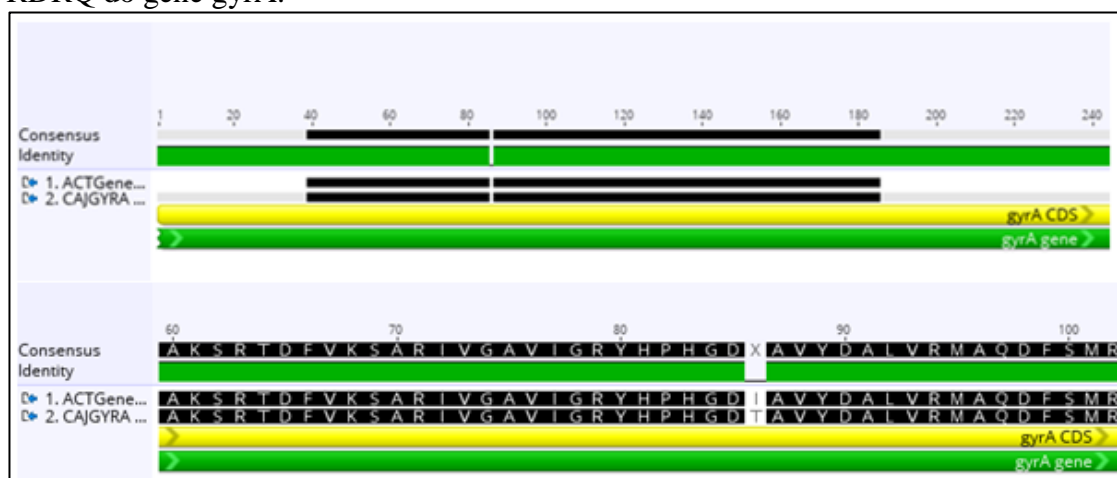
<sup>a</sup> Sensível para todos os antimicrobianos, inclusive para cloranfenicol e gentamicina.

## 5.2 Detecção de genes de resistência

Doze (42,8%), dos 28 isolados de *C. jejuni* testados, amplificaram o fragmento de 559 pb do gene *tet(O)*, que confere resistência à tetraciclina.

Todos os 31 isolados testados para a detecção da mutação na RDRQ do gene *gyrA* apresentaram mutação no códon 86 (Thr-86-Ile) (Figura 5), além de outras mutações silenciosas (Tabela 6). Em todos os isolados foram observadas as mutações silenciosas His-85-His (histidina), Ser-119-Ser (serina), Ala-120-Ala (alanina) e Val-161-Val (valina). Sete isolados apresentaram mais uma mutação silenciosa Pro-186-Pro (prolina) e quatro apresentaram mais uma mutação silenciosa Gly-110-Gly (glicina). Seis isolados apresentaram além da mutação Thr-86-Ile, a mutação Val-149-Ile, presente no códon 149. Segundo a classificação de Taylor (1986), representada no diagrama de Venn (Figura 6), os aminoácidos Isoleucina e Valina encontram-se na mesma classe dos apolares alifáticos.

Figura 5 – Isolado resistentes a ciprofloxacina apresentando a mutação Thr-86-Ile na RDRQ do gene *gyrA*.



(Fonte: Acervo pessoal)

Tabela 6 – Amostras de *C. jejuni* com suas MIC para ciprofloxacina, mutações e mutações silenciosas.

(continua)

Amostra	MIC (µg/mL)	Ter - 86 - Ile	Val - 149 - Ile	Mutações silenciosas
8	4	1	1	A; B; C; D; E
22	≥ 16	1	0	A; B; C; D; E; F
36	≥ 16	1	1	A; B; C; D; E
56	≥ 16	1	1	A; B; C; D; E
57	≥ 16	1	1	A; B; C; D; E
58	4	1	0	A; B; C; D; E; F
61	8	1	0	A; B; C; D; E
63	4	1	0	A; B; C; D; E
64	8	1	0	A; B; C; D; E
65	8	1	0	A; B; C; D; E
72	8	1	1	A; B; C; D; E
98	8	1	0	A; B; C; D; E
100	8	1	0	A; B; C; D; E; F
103	8	1	0	A; B; C; D; E
109	4	1	0	A; B; C; D; E
112	4	1	0	A; B; C; D; E
140	4	1	0	A; B; C; D; E; F; G
142	8	1	0	A; B; C; D; E; F; G
143	4	1	0	A; B; C; D; E; F; G
144	4	1	0	A; B; C; D; E; G
146	8	1	0	A; B; C; D; E
149	8	1	1	A; B; C; D; E
150	4	1	0	A; B; C; D; E
152	4	1	0	A; B; C; D; E

(conclusão)

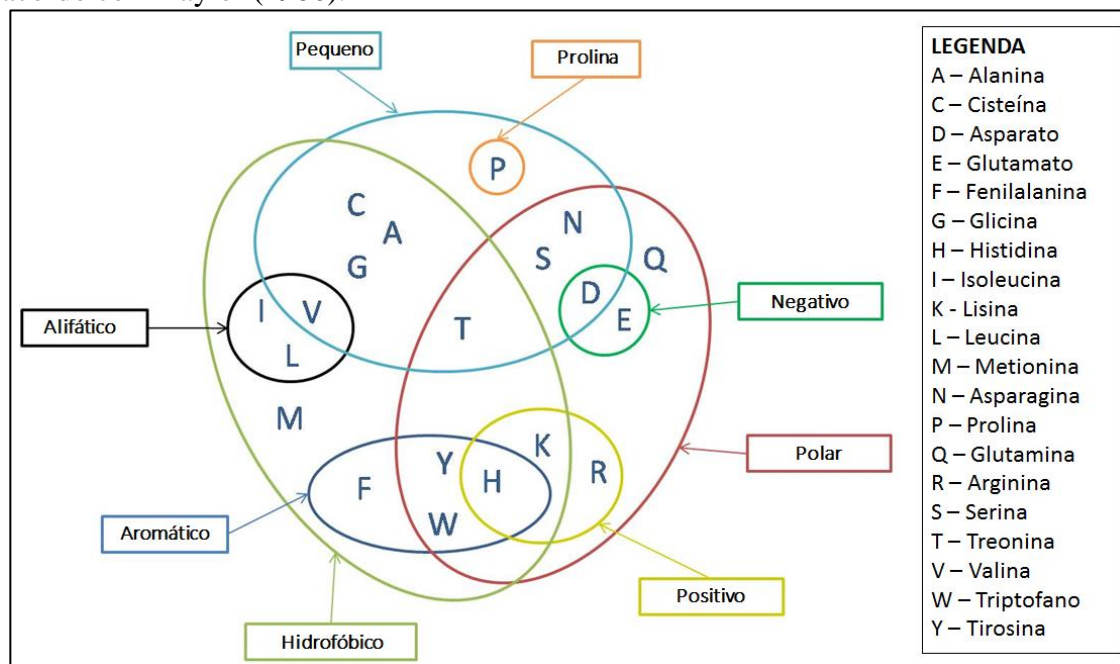
Amostra	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )	Ter - 86 - Ile	Val - 149 - Ile	Mutações silenciosas
153	8	1	0	A; B; C; D; E
156	$\geq 16$	1	0	A; B; C; D; E
168	8	1	0	A; B; C; D; E
170	4	1	0	A; B; C; D; E
175	8	1	0	A; B; C; D; E
188	4	1	0	A; B; C; D; E
191	4	1	0	A; B; C; D; E; F

**1:** positivo para a mutação.

**0:** negativo para a mutação.

**A:** His-81-His; **B:** Ser-119-Ser; **C:** Ala-120-Ala; **D:** Ser-157-Ser; **E:** Val-161-Val; **F:** Pro-186-Pro; e **G:** Gli-110-Gli.

Figura 6 – Diagrama de Venn pelas propriedades físico-químicas dos aminoácidos de acordo com Taylor (1986).



(Fonte: Adaptado de <<http://www.biomedcentral.com/content/figures/1471-2105-10-113-3-L.jpg>>)

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

No presente trabalho, utilizamos os valores de ECOFF para determinar populações nWT de 54 isolados de *C. jejuni* provenientes de fontes avícolas. Através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC), realizada em microdiluição em caldo, foi possível estabelecer que as maiores taxas de populações nWT foram observadas entre os antimicrobianos NA (83,3%) e a CIP (94,4%). Um aumento crescente na resistência as fluoroquinolonas tem sido relatado em vários países (EFSA, 2016; KOJIMA *et al.*, 2015; KOVALENKO *et al.*, 2014). Valores semelhantes também foram observados em outros trabalhos, como o de Fraqueza e colaboradores (2014), os quais encontraram 92% e 90% de resistência ao NA e a CIP em *C. jejuni* isolados de frangos em Portugal. Hungaro e colaboradores (2014) encontraram 95% de resistência a estes antimicrobianos em *C. jejuni* isolados de carcaças no Brasil e Giacomeli e colaboradores (2014) encontraram 100% de resistência em *Campylobacter* spp. isolados de frangos na Itália.

A alta frequência de *C. jejuni* resistentes as fluoroquinolonas encontrada neste estudo está possivelmente associado ao legado de um emprego exacerbado de enrofloxacin na avicultura no passado (NELSON *et al.*, 2007; FRAQUEZA *et al.*, 2014; GARCIA-MIGURA, 2014). Segundo um levantamento sobre o uso e comercialização de medicamentos veterinários em frangos de corte, realizado pela Secretaria de Estado da Saúde do Paraná no ano de 2004, foi demonstrado que as FQs foram as drogas mais utilizadas com a função preventiva e segunda mais utilizadas com a função terapêutica em frangos de corte na fase de desenvolvimento final da produção, sendo enrofloxacin o medicamento mais citado (SESA, 2004). Esse mesmo levantamento também demonstrou o uso irregular das tetraciclinas, tiamulina, ciprofloxacina, norfloxacina, enrofloxacin e olaquinox como promotores de crescimento, forma de uso proibida pelo Ministério da Agricultura (MAPA) (SESA, 2004).

No presente trabalho todos os isolados foram classificados como WT para os antimicrobianos cloranfenicol e gentamicina. Este resultado pode estar relacionado com o fato de que o uso de cloranfenicol como aditivo ser proibido desde 2003 no Brasil (BRASIL, 2003) e a gentamicina é raramente administrada em frangos (GIACOMELLI *et al.*, 2014). A baixa ocorrência de isolados resistentes a gentamicina também pode ser



explicada pela natureza microaerofílica de *Campylobacter* spp., pois a transferência de aminoglicosídeos através das membranas citoplasmáticas bacterianas requer oxigênio. A sensibilidade de *Campylobacter* spp. ao cloranfenicol e à gentamicina é amplamente documentado na literatura (GIACOMELLI *et al.*, 2014; HUNGARO *et al.*, 2014; MESSAD *et al.*, 2014; NGUYEN *et al.*, 2016; OLKKOLA *et al.*, 2016). Messad e colaboradores (2014) também encontraram 100% das amostras de *C. jejuni* sensíveis a ambos antimicrobianos. Olkkola e colegas (2016) não detectaram isolados resistentes a gentamicina. No entanto, Nguyen e coautores (2016) detectaram 25,8% de amostras de *Campylobacter* spp. isoladas de frangos resistentes ao cloranfenicol e à gentamicina.

Foi observado neste estudo alta taxa de populações nWT para a tetraciclina (51,8%). Este resultado pode estar associado com o uso deste antibacteriano para prevenção e tratamento, favorecendo o aparecimento de *Campylobacter* spp. resistentes à tetraciclina. O valor encontrado nesta pesquisa é condizente com outros trabalhos, como o de Hungaro e colaboradores (2014), os quais reportaram 50% de resistência em amostras isoladas de carcaças no estado de Minas Gerais, Brasil e o de Giacomelli e colaboradores (2014), que encontraram 65% dos isolados resistentes à tetraciclina. *Campylobacter* spp. isolados de frangos de corte na Carolina do Norte, EUA (THAKUR *et al.*, 2013) e galinhas criadas organicamente em Quebec, Canadá (THIBODEAU, *et al.*, 2011) demonstraram resistência a tetraciclina, com prevalências de 56% e 44%, respectivamente. Nobile e coautores (2013) encontraram 85,7% de amostras de *C. jejuni* isoladas de carcaças resistentes à tetraciclina, número maior do que o observado nesse estudo.

As taxas de populações nWT à eritromicina foram de 48%. Valor semelhante ao encontrado por Bester; Essack (2008), os quais reportaram 50% de resistência à eritromicina em isolados de *C. jejuni* em amostras de frangos. Cui e colaboradores (2005) encontraram 46% de resistência à eritromicina em isolados de *C. jejuni* de frangos.

Foi observada alta prevalência de isolados resistentes a eritromicina neste trabalho. Este resultado pode estar associado ao uso deste medicamento na produção animal, o qual foi proibido no Brasil como aditivo apenas em 2012 (BRASIL, 2012), condizendo com o ano de isolamento de *C. jejuni* deste estudo. Para observar se houve uma redução na resistência a esta droga, seria necessário obter isolados de *C. jejuni* mais recentes.

Os valores de multirresistência observados em 12 amostras (22,2%) representam grande preocupação para a saúde pública, em razão de que já foi demonstrado a

transferência horizontal de DNA entre estirpes de *Campylobacter* spp. em culturas e no intestino de galinha (LUANGTONGKUN *et al.*, 2009). A resistência a macrolídeos e fluoroquinolonas é altamente indesejável, uma vez que essas duas classes são geralmente utilizadas como fármacos de primeira e segunda linha para o tratamento de campilobacteriose em humanos (ENGBERG *et al.*, 2001).

## 6.2 Detecção de genes de resistência

Com o objetivo de investigar a base molecular da resistência antimicrobiana de isolados de *C. jejuni*, avaliamos a presença de resistência nos antimicrobianos que obtiveram as maiores taxas de populações nWT: ciprofloxacina e tetraciclina.

Dentre as populações nWT para a tetraciclina, 42,8% foram positivos para a presença do gene *tet(O)*. Assim como no presente trabalho, Abdi-Hachesoo e colaboradores (2014), relataram a presença do gene *tet(O)* em 83,1% (69/83) das amostras de *Campylobacter* spp. isoladas de carcaças de frango. Nos 57,2% dos isolados resistentes fenotipicamente a tetraciclina, porém sem a presença do gene *tet(O)*, outros mecanismo de resistência podem estar atuando, como a bomba de efluxo.

Apesar do uso da tetraciclina como aditivo na alimentação animal estar proibido desde 2009 (BRASIL, 2009), a resistência obtida neste trabalho pode ser associada ao fato de que este gene pode ser encontrado em plasmídeos conjugativos contendo genes de resistência para outros antimicrobianos que continuam sofrendo pressão seletiva, garantindo a transmissão entre as bactéria e a persistência da resistência. O gene *tet(o)* também pode ser encontrado como um elemento cromossomal (transposon: IS605), neste caso, a estabilidade da localização cromossômica garante a replicação do mesmo de geração para geração, inclusive na ausência do antibacteriano (AVRAIN *et al.*, 2004; CRESPO *et al.*, 2012).

No estudo realizado *in vitro* por Jeon e colaboradores. (2008), utilizando isolados de *C. jejuni* com marcadores de resistência à kanamicina ou tetraciclina, foi demonstrado o desenvolvimento de progênies resistentes a ambos os antibacterianos, indicando que a transferência horizontal ocorre ativamente em populações mistas de *Campylobacter* spp. Em outro estudo, realizado por Avrain e coautores (2004) foi observado que a transferência do gene *tet(O)* ocorre rapidamente e sem a pressão de seleção do antibiótico entre isolados de *C. jejuni* no trato digestivo de galinhas. O gene *tet(O)* pode estar presente

em outras bactérias como *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Staphylococcus* (AVRAIN *et al.*, 2004).

Todas as amostras testadas para a detecção da mutação na RDRQ do gene *gyrA* apresentaram a mutação que substitui o aminoácido treonina pela isoleucina (Thr – 86 – Ile). O mesmo foi observado por Chatur *et al.* (2014) e Duarte *et al.* (2014), que encontraram a mutação em todas os isolados fenotipicamente resistentes à ciprofloxacina. Boonmar e colaboradores (2007) encontraram 77% das amostras de *C. jejuni* resistentes à ciprofloxacina, contendo a mutação Thr – 86 – Ile. Não foi identificado neste trabalho outras mutações descritas na literatura que conferem resistência às fluoroquinolonas, como as mutações Asp – 90 – Asn ou Ala – 70 – Thr. Segundo Iovine (2013), essas mutações conferem um nível intermediário de resistência. Seis isolados apresentaram a mutação gênica que substitui uma valina por uma isoleucina no códon 149 (Val – 149 – Ile). O fato dos aminoácidos Isoleucina e Valina pertencerem a mesma classe dos apolares alifáticos (Figura 6), pode sugerir que a troca de um pelo outro acarrete em pequenas modificações na conformação da proteína produzida, sem alterar sua função, porém o significado desta mutação e suas implicações são desconhecidos e mais estudos, como modelagem da proteína, são necessários para sua compreensão.

É comum ocorrer mutações silenciosas em *Campylobacter* spp., tanto em isolados sensíveis quanto em resistentes. Elas podem aparecer em muitas combinações (FRASÃO, 2015). As mutações silenciosas His – 81 – His, Ser – 119 – Ser e Gli – 110 – Gli, encontradas neste estudo, também foram reportadas por Beckmann *et al.* (2004) e por Kinana *et al.* (2006). Griggs *et al.* (2005) e Shin *et al.* (2015) também encontraram em seus trabalhos a mutação Ala – 120 – Ala.

Por fim, os resultados obtidos neste estudo evidenciam a necessidade da implementação de políticas de uso prudente de antimicrobianos na cadeia produtiva de alimentos no Brasil, levando em consideração as hipóteses, embora não usuais, de uso de produtos adquiridos anteriormente à proibição (no caso das proibições mais recentes) e/ou a aquisição extra-oficial e uso deliberado sem indicação ou supervisão do médico veterinário.

## 7. CONCLUSÃO

No presente trabalho, foi reportada a ocorrência de resistência antimicrobiana e de genes de resistência em isolados de *C. jejuni* isoladas de fontes avícolas no estado do Rio Grande do Sul.

1. As maiores frequências de isolados nWT e clinicamente resistentes foram encontradas frente aos antimicrobianos: ciprofloxacina, ácido nalidíxico e tetraciclina.
2. Doze isolados multi-resistentes foram encontrados neste estudo, o que representa grande preocupação para a saúde pública.
3. Quase metade dos isolados de *C. jejuni* resistentes à tetraciclina, possui o gene *tet(O)*.
4. Todos os isolados testados para a mutação Thr – 86 – Ile apresentaram positividade, indicando ser este o mecanismo mais frequente de aquisição de resistência em *C. jejuni* frente às fluoroquinolonas.
5. Mutações não usuais também foram observadas, indicando a possibilidade de existência de mais mecanismos envolvidos na resistência às fluoroquinolonas.

## 8. PERSPECTIVAS FUTURAS

1. Classificar os isolados multi-resistentes com o perfil apresentado na macro-restrição do DNA total (PFGE).
2. Realizar o sequenciamento dos isolados de *C. jejuni* resistentes a eritromicina para a detecção das mutações no domínio V do gene alvo 23S RNA ribossômico (rRNA) na posição A2074C e A2075G.
3. Determinar a MIC de *C. jejuni* isolados de casos em humanos.
4. Fazer teste de susceptibilidade antimicrobiana junto a um inibidor de bomba de efluxo (Phe-Arg  $\beta$ -naphthyl-amide dihydrochloride).
5. Realizar a modelagem da estrutura da proteína formada nos isolados que apresentaram a mutação Val – 149 – Ile, utilizando ferramentas de bioinformática.

## REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F. M.; ENGBERG, J. Antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter*. **Veterinary Research**. v. 32, p. 311-321, 2001.
- ABDI-HACHESOO, B.; KHOSHBAKHT, R.; SHARIFIYAZDI, H. *et al.* Tetracycline Resistance Genes in *Campylobacter jejuni* and *C. coli* Isolated From Poultry Carcasses. **The Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 7, n. 9, 2014.
- ABPA. Relatório Anual 2016. **Associação Brasileira de Proteína Animal**. Disponível em: < <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais> >. Acesso em 27 de junho de 2016.
- ALLOS, B. M. *et al.* *Campylobacter jejuni* strains from patients with guillain-barré syndrome. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 2, p. 263-268, 1998.
- ARSI, K.; DONOGHUE, A. M.; WOO-MING, A. *et al.* The efficacy of selected probiotic and prebiotic combinations in reducing *Campylobacter* colonization in broiler chickens. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 24, p. 327-334, 2015.
- ATANASSOVA, V.; REICH, F.; BECKMANN, L.; KLEIN, G. Prevalence of *Campylobacter* spp. in turkey meat from a slaughterhouse and in turkey meat retail products. **Immunology and Medical Microbiology**, v. 49, p. 141-145, 2007.
- AVRAIN, L.; VERNIZY-ROZAND, C.; KEMPF, I. *et al.* Evidence for natural horizontal transfer of tetO gene between *Campylobacter jejuni* strains in chickens. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 134 – 140, 2004.
- BACON, D. J.; ALM, R. A.; BURR, D. H. *et al.* Involvement of a plasmid in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. **Infection and Immunity**. v. 68, n.8, p. 4384-4390, 2000.
- BECKMANN, L.; MULLER, M.; LUBER, P. *et al.* Analyses of *gyrA* mutations in quinolone resistant and susceptible *Campylobacter jejuni* isolates from retail poultry and human clinical isolates by non-radioactive single-strand conformation polymorphism analysis and DNA sequencing. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 1040-1047, 2004.
- BEHRINGER, M.; MILLER, W. G.; OYARZABAL, O. A. Typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from live broilers and retail broiler meat by flaA-RFLP, MLST, PFGE and REP-PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v. 84, p. 194-201, 2011.
- BERGHAUS, R. D. *et al.* Enumeration of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in environmental farm samples and processing plant carcass rinses from commercial broiler chicken flocks. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 13, p. 4106-4114, 2013.

BERRANG, M. E.; NORTH CUTT, J. K.; CASON, J. A. Recovery of *Campylobacter* from broiler feces during extended storage of transport cages. **Poultry Science**, v. 83, p. 1213-1217, 2004.

BERRANG, M. E.; SMITH, D. P.; MEINERSMANN, R. J. Variations on standard broiler processing in an effort to reduce *Campylobacter*. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 20, p. 197-202, 2011.

BERRANG, M. N. *et al.* Prevalence and numbers of *Campylobacter* on broiler carcasses collected at rehang and postchill in 20 U.S. processing plant. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 7, p. 1556-1560, 2007.

BESTER, L. A.; ESSACK, S. Y. Prevalence of antibiotic resistance in *Campylobacter* isolates from commercial poultry suppliers in KwaZulu-Natal, South Africa. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, p. 1298-1300, 2008.

BOERLIN, P.; WHITE, D. G. Resistência Antimicrobiana e sua Epidemiologia. In: GIGUÈRE, S. (Org.); PRESCOTT, J. F. (Org.); BAGGOT, J. D. (Org.) *et al.* **Terapia Antimicrobiana em Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca Ltda., 2010. p. 26-42.

BOONMAR, S.; MORITA, Y.; JUJITA, M. *et al.* Serotype, antimicrobial susceptibility, and *gyrA* gene mutation of *Campylobacter jejuni* isolates from humans and chicken in Thailand. **Microbiology and Immunology**, v. 51, n. 5, p. 531-537, 2007.

BRASIL. Instrução Normativa nº 14, de 17 de maio de 2012. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 18 mai. 2012. Seção 1.

BRASIL. Instrução Normativa nº 26, de 9 de julho de 2009. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 10 jul. 2009. Seção 1.

BRASIL. Instrução Normativa nº 9, de 27 de junho de 2003. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 30 jun. 2003. Seção 1, número 123, p.4.

BRASIL. Tabela de aditivos antimicrobianos, anticoccidianos e agonistas com uso autorizado na alimentação animal. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**, 2015. Disponível em < <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/aditivos> >. Acesso em: 25 fev. 2017.

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

BUTZLER, J. P. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. **Clinical Microbiology and Infection**, v.10, n.10, p. 868-876, 2004.

CAGLIERO, C.; MOULINE, C.; PAYOT, S. *et al.* Involvement of *CmeABC* efflux pump in the macrolide resistance of *Campylobacter jejuni*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, p. 948-950, 2005.

CAGLIERO, C.; MOULINE, C.; PAYOT, S. *et al.* Synergy between efflux pump *CmeABC* and modifications in ribosomal proteins L4 and L22 in conferring macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 50, n. 11, p. 3893-3896, 2006.

CARRIQUE-MAS, J. J.; BRYANT, J. E.; CUONG, N. V. *et al.* An epidemiological investigation of *Campylobacter* in pig and poultry farms in the Mekong delta of Vietnam. **Epidemiology and Infection**, v. 142, p. 1425-1436, 2014.

CARVALHO, C. M.; GANNON, B.W.; HALFHIDE, D. E. *et al.* The in vivo efficacy of two administration routes of a phage cocktail to reduce numbers of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* in chickens. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 232, p. 1-11, 2010.

CDC. *Campylobacter*. **Center for Diseases Control and Prevention**. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/foodsafety/diseases/campylobacter/index.html> >. Acesso em 27 de junho de 2016.

CDNA. Australia's notifiable disease status, 2014: Annual report of the National Notifiable Diseases Surveillance System. **Communicable Diseases Network Australia**. v. 40, n. 1, p. 71-72, 2014.

CHATUR, Y. A.; BRAHMBHATT, M. N.; MODI, S. *et al.* Fluoroquinolone resistance and detection of topoisomerase gene mutation in *Campylobacter jejuni* isolated from animal and human sources. **International Journal of Current Microbiology Applied Science**, v. 3, n. 6, p. 773-783, 2014.

CHAVEERACH, P.; KEUZENKAMP, D. A.; URLINGS, H. A. P. *et al.* In Vitro Study on the Effect of Organic Acids on *Campylobacter jejuni/coli* Populations in Mixtures of Water and Feed. **Poultry Science**, v. 81, p. 621-628, 2002.

CHENG, A. C.; TURNIDGE, J.; COLLIGNON, P. *et al.* Control of Fluoroquinolone Resistance through Successful Regulation, Australia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 9, p. 1453 – 1460, 2012.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Test of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved Guideline – Second Edition. CLSI Document M45-A2. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2010.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard – Fourth Edition. CLSI Document VET01-A4. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2013.



CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals; Second Information Supplement. CLSI Document VET01-S2. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2013.

CONNEL, S. R.; TRACZ, D. M.; NIERHAUS, K. H. *et al.* Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 12, p.3675-3681, 2003.

CORRY, J. E. L.; ATABAY, H. I. Poultry as a source of campylobacter and related organisms. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 96-114.

CORTEZ, A. L. L. **Disseminação de bactérias dos gêneros *Campylobacter* e *Salmonella* em linhas de abate de aves**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva), Universidade Estadual Paulista. 2006.

CRESPO, M. D.; OLSON, J. W.; ALTERMANN, E. *et al.* Chromosomal *tet(O)*-Harboring Regions in *Campylobacter coli* Isolates from Turkeys and Swine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 23, p. 8488 – 8491, 2012.

CUI, S.; GE, B.; ZHENG, J. *et al.* Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* Serovars in Organic Chickens from Maryland Retail Stores. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 7, p. 4108-4111, 2005.

DANMAP. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark, 2015. **National Food Institute**. Disponível em: < <http://www.danmap.org/Downloads/Reports.aspx> > Acesso em: 15 fev. 2017.

DAVISON, J. Genetic exchange between bacteria in the environment. **Plasmid**, v. 422, p. 73-91, 1999.

DOWLING, P. M. Aminoglicosídeos. In: GIGUÈRE, S. (Org.); PRESCOTT, J. F. (Org.); BAGGOT, J. D. (Org.) *et al.* **Terapia Antimicrobiana em Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca Ltda., 2010. p. 213-237.

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

DUARTE, A.; SANTOS, A.; MANAGEIRO, V. *et al.* Human, food and animal *Campylobacter* spp. isolated in Portugal: High genetic diversity and antibiotic resistance rates. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 44, p. 306 – 313, 2014.

DUARTE, M. Síntese Protéica. **Toda Matéria**. Disponível em: < <https://www.todamateria.com.br/sintese-proteica/> >. Acesso em: 25 fev. 2017.

ECDC/ EMEA. The bacterial challenge: time to react. **European Centre for Disease Prevention and Control**, 2009. Disponível em: < <http://ecdc.europa.eu/en> > Acesso em: 22 jan. 2017.

EFSA. Scientific Opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. **The European Food Safety Authority Journal**, v. 4, n. 9, 141 p, 2011.

EFSA. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014. **The European Food Safety Authority Journal**, v. 14, n. 2, 207 p, 2016.

EFSA. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013. **The European Food Safety Authority Journal**, v. 1, n. 13, 169 p, 2015.

EGAN, M. B. *et al.* A review of food safety and food hygiene training studies in the commercial sector. **Food Control**, v. 18, p.1180-1190, 2007.

EL-ADAWY, H.; AHMED, M. F. E.; HOZTEL, H. *et al.* Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* recovered from organic turkey farms in Germany. **Poultry Science**. v. 94, p. 2831-2837, 2015.

ENDTZ, H. P.; RUIJS, G. J.; VAN KLINGEREN, B. *et al.* Quinolone resistance in *Campylobacter* isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 2, n. 27, p. 199-208, 1991.

ENGBERG, J.; AARESTRUP, F. M.; TAYLOR, D. E. *et al.* Quinolone and Macrolide Resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: Resistance Mechanisms and Trends in Human Isolates. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 1, p. 24 – 34, 2001.

EUZÉBY, J. P. *List of prokaryotic names with standing in nomenclature: genus Campylobacter*. Disponível em: < <http://www.bacterio.net/campylobacter.html> >. Acesso em 13 mar. 2016.

FABREGA, A.; MADURGA, S.; GIRALT, E.; VILA, J. Mechanism of action of and resistance to quinolones. **Microbial Biotechnology**, v.2, n. 1, p. 40-61, 2009.

FAJARDO, A. *et al.* The Neglected Intrinsic Resistome of Bacterial Pathogens. **PLoS One**, v. 3, e. 1619, 2008.

FDA. 2014 NARMS Integrated Report. **Food and Drug Administration**. Disponível em: < <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/SafetyHealth/AntimicrobialResistance/NationalAntimicrobialResistanceMonitoringSystem/ucm059103.htm> >. Acesso em: 20 jan. 2017.

FDA. Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. Second Edition. *Campylobacter jejuni*. **Food and Drug Administration**. p. 14-17, 2012.

FIGUEROA, G. *et al.* Occurrence and enumeration of *Campylobacter spp.* during the processing of Chilean broilers. **Biomedcentral Microbiology**, v. 94, n. 9, p. 1471-2180, 2009.

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

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

FRAQUEZA, M. J.; MARTINS, A.; BORGES, A. C. *et al.* Antimicrobial resistance among *Campylobacter spp.* strains isolated from different poultry production systems at slaughterhouse level. **Poultry Science**, v. 93, p. 1578 – 1586, 2014.

<sup>1</sup> FRASÃO, B. S.; CÔRTEZ, L. R.; NASCIMENTO, E. R. *et al.* Detecção de resistência às fluoroquinolonas em *Campylobacter* isolados de frangos de criação orgânica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 7, p. 613-619, 2015.

<sup>2</sup> FRASÃO, B. S.; MEDEIROS, V.; BARBOSA, A. V. *et al.* Detection of fluoroquinolone resistance by mutation in *gyrA* gene of *Campylobacter spp.* isolates from broiler and laying (*Gallus gallus domesticus*) hens, from Rio de Janeiro State, Brazil. **Ciência Rural**, v. 45, n. 11, p. 2013-2018, 2015.

GARCIA-MIGURA, L.; HENDRIKSEN, R. S.; FRAILE, L. *et al.* Antimicrobial resistance of zoonotic and commensal bacteria in Europe: The missing link between consumption and resistance in veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, v. 170, p. 1-9, 2014.

GIACOMELI, M.; SALATA, C.; MARTINI, M. *et al.* Antimicrobial Resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from Poultry in Italy. **Microbial Drug Resistance**, v. 20, n. 2, p. 181-188, 2014.

GIBREEL, A.; SKOLD, O.; TAYLOR, D. E. Characterization of Plasmid-Mediated *aphA-3* Kanamycin Resistance in *Campylobacter jejuni*. **Microbial Drug Resistance**, v. 10, n. 2, p. 98-105, 2004.

GIBREEL, A.; TAYLOR, D. E. Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, p. 243-255, 2006.

GIBSON, J. R.; FITZGERALD, C.; OWEN, R. J. Comparison of PFGE, ribotyping and phage-typing in the epidemiological analysis of *Campylobacter jejuni* serotype HS2 infections. **Epidemiology and Infection**, v. 115, p. 215-225, 1995.

<sup>1</sup> GIGUÈRE, S. Macrolídeos, Azalídeos e Cetolídeos. In: GIGUÈRE, S. (Org.); PRESCOTT, J. F. (Org.); BAGGOT, J. D. (Org.) *et al.* **Terapia Antimicrobiana em Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca Ltda., 2010. p. 197-212. <sup>1</sup>

- <sup>2</sup> GIGUÈRE, S. Tetraciclina e Gliciliclinas. In: GIGUÈRE, S. (Org.); PRESCOTT, J. F. (Org.); BAGGOT, J. D. (Org.) *et al. Terapia Antimicrobiana em Medicina Veterinária*. São Paulo: Roca Ltda., 2010. p. 238-248.
- GRIGGS, D. J.; JOHNSON, M. M.; FROST, J. A. *et al.* Incidence and Mechanism of Ciprofloxacin Resistance in *Campylobacter* spp. Isolated from Commercial Poultry Flocks in the United Kingdom before, during, and after Fluoroquinolone Treatment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 699-707, 2005.
- GUERIN, M. T. *et al.* The change in prevalence of *Campylobacter* on chicken carcasses during processing: a systematic review. **Poultry Science**, v. 89, p. 1070-1084, 2010.
- HADDEN, R. D. M.; GREGSON, N. A. Guillain-barré syndrome and *Campylobacter jejuni* infection. *Journal of Applied Microbiology*, v. 90, p. 145-154, 2001.
- HALD, B.; WEDDERKOPP A.; MADSEN, M. Thermophilic *Campylobacter* spp. in Danish broiler production: a cross-sectional survey and a retrospective analysis of risk factors for occurrence in broiler flocks. *Avian Pathology*, v. 29, p.123-131, 2000.
- HAZELEGER, W. C. *et al.* Temperature-dependent membrane fatty acid and cell-physiology changes in coccoid forms of *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, n. 7, p. 2713-2719, 1995.
- HERMAN, L. *et al.* Routes for *Campylobacter* contamination of poultry meat: epidemiological study from hatchery to slaughterhouse. *Epidemiology and Infection*, v. 131, p. 1169-1180, 2003.
- HERMANS, D. *et al.* Poultry as a host for the zoonotic pathogen *Campylobacter jejuni*. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v. 12, n. 2 p. 89-98, 2012.
- HOFFMAN, S. B. Mechanisms of antibiotic resistance. **Compendium**, v. 23, n. 5, p. 464-473, 2001.
- HUE, O. *et al.* Prevalence of and risk factors for *Campylobacter* spp. contamination of broiler chicken carcasses at the slaughterhouse. **Food Microbiology**, v. 27, p. 992-999, 2010.
- HUNGARO, H. M.; MENDONÇA, R. C. S.; ROSA, V. O. *et al.* Low contamination of *Campylobacter* spp. on chicken carcasses in Minas Gerais state, Brazil: Molecular characterization and antimicrobial resistance. **Food Control**, v. 51, p. 15 – 22, 2015.
- HUYGHEBAERT, G.; DUCATELLE, R.; IMMERSSEEL, F. V. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. **The Veterinary Journal**, v. 187, p. 182-188, 2011.
- IGEM. (2008). Synthetic Biology. em iGEM. Disponível em: <[http://2008.igem.org/Team:Heidelberg/Project/General\\_information](http://2008.igem.org/Team:Heidelberg/Project/General_information)> Acesso em 09 mar. 2017.

IOVINE, N. M. Resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni*. **Virulence**, v. 4, n. 3, p. 230-240, 2013.

JEON, B.; MURAOKA, W.; SAHIN, O. *et al.* Role of Cj1211 in Natural Transformation and Transfer of Antibiotic Resistance Determinants in *Campylobacter jejuni*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 8, p. 2699 – 2708, 2008.

JONES, F.S.; ORCUTT, M.; LITTLE, R.B. Vibrios (*Vibrio jejuni* n. sp.) associated with intestinal disorders of cows and calves. **The Journal of Experimental Medicine**, v.53, p. 853-864, 1931.

JÚNIOR, Ângelo *et al.* **Doenças das Aves**. Campinas: Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícola, 2009.

KALLEN, A. J.; HIDRON, A. I.; PATEL, J. SRINIVASAN, A. Multidrug Resistance among GramNegative Pathogens That Caused Healthcare-Associated Infections Reported to the National Healthcare Safety Network, 2006–2008. **Infection control and hospital epidemiology**, v. 31, n. 5, p. 528-531, 2010.

KAPPERUD, G. *et al.* Risk factors for sporadic *Campylobacter* infections: results of a case-control study in southeastern Norway. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 12, p. 3117-3121, 1992.

KINANA, A. D.; CARDINALE, E.; TALL, F. *et al.* Genetic Diversity and Quinolone Resistance in *Campylobacter jejuni* Isolates from Poultry in Senegal. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 5, p. 3309 – 3313, 2006.

KOJIMA, C.; KISHIMOTO, M.; EZAKI, T. Distribution of Antimicrobial Resistance in *Campylobacter* Strains Isolated from Poultry at a Slaughterhouse and Supermarkets in Japan. **Biocontrol Science**, v. 20, n. 3, p. 179-184, 2015.

KOVALENKO, K.; ROASTO, M.; SANTARE, S. *et al.* *Campylobacter* species and their antimicrobial resistance in Latvian broiler chicken production. **Food Control**, v. 46, p. 86-90, 2014.

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

LEE, M. D.; SANCHEZ, S.; ZIMMER, M. *et al.* Class 1 Integron-Associated Tobramycin-Gentamicin Resistance in *Campylobacter jejuni* Isolated from the Broiler Chicken House Environment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 11, p. 3660-3664, 2002.

LEVY, A. J. A Gastro-enteritis outbreak probably due to a bovine strain of vibrio. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 18, p. 243-258, 1946.

LIN, J.; MICHEL, L. O.; ZHANG, Q. CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 46, n. 7, p. 2124-2131, 2002.

- LUANGTONGKUM, T.; JEON, B.; HAN, J. *et al.* Antibiotic resistance in *Campylobacter*: emergence, transmission and persistence. **Future Microbiology**, v. 4, n. 2, p. 189-200, 2009.
- LUND, M. *et al.* Detection of *Campylobacter* spp. in Chicken Fecal Samples by Real-Time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 11, p. 5125-5132, 2004.
- LUO, N.; PEREIRA, S.; SAHIN, O. *et al.* Enhanced in vivo fitness of fluoroquinolone resistant *Campylobacter jejuni* in the absence of antibiotic selection pressure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 102, n. 3, p. 541-546, 2005.
- MCCRACKIN, M. A.; HELKE, K. L.; GALLOWAY, A. M. *et al.* Effect of Antimicrobial Use in Agricultural Animals on Drug-resistant Foodborne *Campylobacteriosis* in Humans: A Systematic Literature Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, iss. 13, 2016.
- MEDEIROS, V. M. **Isolamento e Identificação Fenotípica e Molecular das Espécies Termofílicas de *Campylobacter* a Partir de Frango Resfriado**. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária), Fundação Oswaldo Cruz. 2011.
- MELNYK, A. H.; WONG, A.; KASSEN, R. The fitness costs of antibiotic resistance mutations. **Evolutionary Applications**, v. 8, p. 273-283, 2015.
- MESSAD, S.; HAMDI, T-M.; BOUHAMED, R. *et al.* Frequency of contamination and antimicrobial resistance of thermotolerant *Campylobacter* isolated from some broiler farms and slaughterhouses in the region of Algiers. **Food Control**, v. 40, p. 324 – 328, 2014.
- MICHAUD, S. *et al.* Comparison of *Sma*I-defined genotypes of *Campylobacter jejuni* examined by *Kpn*I: a population-based study. **Journal of Medical Microbiology**, v. 50, p. 1075-1081, 2001.
- MOORE, J. E. The epidemiology of antibiotic resistance in *Campylobacter*. **Microbes and Infection**, v. 8, p.1955-1966, 2006.
- MOURA, H. M.; SILVA, P. R.; SILVA, P. H. *et al.* Antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* isolated from chicken carcasses in the Federal District, Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 4, p. 691-693, 2013.
- NACHAMKIN, I.; UNG, H.; LI, M. *et al.* Increasing Fluoroquinolone Resistance in *Campylobacter jejuni*, Pennsylvania, USA, 1982–2001. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 12, p. 1501 – 1503, 2002.
- NACHANKIN, I.; ALLOS, B. M.; HO, T. *Campylobacter* species and Guillain-Barré Syndrome. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 555-567, 1998.

- NELSON, J. M.; CHILLER, T. M.; POWERS, J. H. *et al.* Fluoroquinolone-Resistant *Campylobacter* Species and the Withdrawal of Fluoroquinolones from Use in Poultry: A Public Health Success Story. **Food Safety**, v. 44, p. 977-980, 2007.
- NEWELL, D. G. *et al.* Biosecurity-based interventions and strategies to reduce *Campylobacter* spp. on poultry farm. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 24, p. 8605-8614, 2011.
- NEWELL, D. G. *et al.* Changes in the carriage of *Campylobacter* strains by poultry carcasses during processing in abattoirs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2636-2640, 2001.
- NGUYEN, T. N. M.; HOTZEL, H.; NJERU, J. *et al.* Antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolates from small scale and backyard chicken in Kenya. **Gut Pathogens**, v.8, n. 39, p. 1 – 9, 2016.
- NOBILE, C. G. A.; CONSTANTINO, R.; BIANCO, A. *et al.* Prevalence and pattern of antibiotic resistance of *Campylobacter* spp. in poultry meat in Southern Italy. **Food Control**, v. 32, p. 715 – 718, 2013.
- NOORMOHAMED, A.; FAKHR, M. K. Molecular Typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Isolated from Various Retail Meats by MLST and PFGE. **Foods**, n. 3, p. 82-93, 2014.
- OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1661-1669, 1999.
- OLKKOLA, S.; NYKASENOJA, S.; RAULO, S. *et al.* Antimicrobial Resistance and Multilocus Sequence Types of Finnish *Campylobacter jejuni* Isolates from Multiple Sources. **Zoonoses and Public Health**, v. 63, p. 10-19, 2016.
- OMS, OMS publica lista de bactérias para as quais se necessitam novos antibióticos urgentemente. **Organização Mundial de Saúde**. Disponível em: <  
[http://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5357%3Aoms-publica-lista-de-bacterias-para-as-quais-se-necessitam-novos-antibioticos-urgentemente&Itemid=816](http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5357%3Aoms-publica-lista-de-bacterias-para-as-quais-se-necessitam-novos-antibioticos-urgentemente&Itemid=816)>. Acesso em: 05 mar. 2017.
- PATTERSON, J. A.; BURKHOLDER, K. M. Application of Prebiotics and Probiotics in Poultry Production. **Poultry Science**, v. 82, p. 627-631, 2003.
- PAYOT, S. *et al.* Mechanisms of fluoroquinolone and macrolide resistance in *Campylobacter* spp. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 1967-1971, 2006.
- PERDONCINI, G. **Prevalência de *Campylobacter jejuni* e *C. coli* em carcaça de aves após o pré-resfriamento por imersão**. Monografia (Especialização em Produção, Tecnologia e Higiene de Produtos de Origem Animal), Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2012.

PERDONCINI, G. **Avaliação de *Campylobacter jejuni* e *C. coli* em etapas do processamento de frangos de corte.** Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2015.

PRATT, A.; KOROLIK, V. Tetracycline resistance of Australian *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 55, p. 452-460, 2005.

QUETZ, J. S.; LIMA, I. F. N.; HAVT, A. *et al.* *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in children from communities in Northeastern Brazil: molecular detection and relation to nutritional status. **Diagnostic, Microbiology and Infectious Disease**, v. 67, n. 3, p. 220-227, 2010.

ROLLINS, D. M.; COLWELL, R. R. Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environmental. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 531-538, 1986.

ROSENQUIST, H. *et al.* The effect of slaughter operations on the contamination of chicken carcasses with thermotolerant *Campylobacter*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 226-232, 2006.

ROSSI JÚNIOR, O. D.; BERCHIERI JÚNIOR, A.; FELIPE, L. M. Agentes de enfermidades de interesse em saúde pública associados a produtos de origem avícola. In: BERCHIERI

RUIZ, J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, p. 1109-1117, 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSCHI, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Nova Iorque. 1989.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. *Commonly Used Techniques in Molecular Cloning*. In: SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 3. ed. Nova Iorque: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHWARZ, S. Editorial: Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, p. 601-604, 2010.

SCHWARZ, S.; CHASLUS-DANCLA, E. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. **Veterinary Research**, v. 32, p. 201-225, 2001.

SESA. Levantamento do Uso e Comercialização de Medicamentos Veterinários em Frango de Corte. Programa Estadual de Controle de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal - PAMvet-PR. **Secretaria de Estado de Saúde do Paraná**. Disponível em: < <http://www.saude.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=2337> >. Acesso em: 20 jan. 2017.



- SHIN, E.; HONG, H.; OH, Y. *et al.* First Report and Molecular Characterization of a *Campylobacter jejuni* isolate with Extensive Drug Resistance from a Travel-Associated Human Case. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 10, p. 6670-6672, 2015.
- SILLEY, P. Susceptibility testing methods, resistance and breakpoints: what do these terms really mean? **Revue Scientifique et Technique**, v. 31, n. 1, p. 33-41, 2012.
- SILVA, D. T.; TEJADA, T. S.; BLUM-MENEZES, D. *et al.* Campylobacter species isolated from poultry and humans, and their analysis using PFGE in southern Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 217, p. 189-194, 2016.
- SILVA, J. *et al.* *Campylobacter* spp. as a food born pathogen: a review. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, 2011.
- SILVA, J. M. B.; HOLLENCACK, C. B. Fluoroquinolonas x resistência bacteriana na medicina veterinária. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 77, n. 2, p. 363-369, 2010.
- SIMONI, C. **Caracterização de *Salmonella* Derby originada da cadeia produtiva de suínos: formação de biofilme, resistência a antimicrobianos e perfil de macro-restrição (PFGE)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2016.
- SINDAN, Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal (SINDAN). Disponível em: < <http://www.sindan.org.br/sd/base.aspx?controle=8> >. Acesso em: 25 fev. 2017.
- SKIRROW, M. B. *Campylobacter* enteritis: a “new” disease. **British Medical Journal**, v. 2, p. 9-11, 1977.
- 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.
- SLADER, J. *et al.* Impact of transport crate reuse and of catching and processing on *Campylobacter* and *Salmonella* contamination of Broiler Chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 2, p. 713-719, 2002.
- SMILLIE, C. *et al.* Mobility of plasmids. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 434-452, 2010.
- SMITH, A. I.; SANSA, T. I.; COKER, A. O. Antibiotic susceptibility patterns and beta-lactamase production of animal and human isolates of *Campylobacter* in Lagos, Nigeria. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**. v. 54, p. 583-586, 1998.
- STERN, N. J. *et al.* Colonization of chicks by non-culturable *Campylobacter* spp. **Letters in Applied Microbiology**, v. 18, p. 333-335, 1994.
- SUZUKI, H.; YAMAMOTO, S. *Campylobacter* contamination in retail poultry meats and by-products in the world: A literature survey. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 71, n. 3, p. 255-261, 2009.

TAYLOR, W. R. The classification of amino acid conservation. **Journal of Theoretical Biology**, v. 119, n. 2, p. 205 – 218, 1986.

TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **The American Journal of Medicine**, v. 119, n. 6, p. 03-10, 2006.

THAKUR, S.; BRAKE, J.; KEELARA, S. *et al.* Farm and environmental distribution of *Campylobacter* and *Salmonella* in broiler flocks. **Research in Veterinary Science**, v. 94, p. 33 – 42, 2013.

THIBODEAU, A.; FRAVALO, F.; LAURENT-LEWANDOWSKI, S. *et al.* Presence and characterization of *Campylobacter jejuni* in organically raised chickens in Quebec. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 75, p. 298 – 307, 2011.

UNICOMB, L.; FERGUNSON, J.; RILEY, T. V. *et al.* Fluoroquinolone Resistance in *Campylobacter* absent from Isolates, Australia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 11, p. 1482 – 1483, 2003.

USDA. *Campylobacter* Questions and Answers. **United States Department of Agriculture**. Disponível em: < [https://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/food-safety-education/get-answers/food-safety-fact-sheets/foodborne-illness-and-disease/campylobacter-questions-and-answers/CT\\_Index](https://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/food-safety-education/get-answers/food-safety-fact-sheets/foodborne-illness-and-disease/campylobacter-questions-and-answers/CT_Index) >. Acesso em: 25 jun. 2016.

VAN-HOEK, A. H. A. M. *et al.* Acquired antibiotic resistance genes: an overview. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, p. 1-27, 2011.

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.

WAGENAAR, J. A.; FRENCH, N. P.; HAVELAAR, A. H. Preventing *Campylobacter* at the source: Why it is so difficult? **Clinical Infectious Diseases**, v. 57, n. 11, p. 1600-1606, 2013.

WALKER, R. D. Teste de Sensibilidade Antimicrobiana e Interpretação dos Resultados. In: GIGUÈRE, S. (Org.); PRESCOTT, J. F. (Org.); BAGGOT, J. D. (Org.) *et al.* **Terapia Antimicrobiana em Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca Ltda., 2010. p. 11-25.

WALKER, R. D.; DOWLING, P. M. Fluoroquinolonas. In: GIGUÈRE, S. (Org.); PRESCOTT, J. F. (Org.); BAGGOT, J. D. (Org.) *et al.* **Terapia Antimicrobiana em Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca Ltda., 2010. p. 274-295.

WANG, Y.; HUANG, W. M.; TAYLOR, D. E. Cloning and nucleotide sequence of the *Campylobacter jejuni gyrA* gene and characterization of quinolone resistance mutations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 37, n. 3, p. 457-463, 1993.

WANG, Y.; ZHANG, M.; DENG, F. *et al.* Emergence of Multidrug-Resistant *Campylobacter* Species Isolates with a Horizontally Acquired rRNA Methylase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n.8, p. 5405 – 5412, 2015.

WIECZOREK, K.; OSEK, J. Antimicrobial resistance mechanisms among *Campylobacter*. **Hindawi Publishing Corporation**, 2003. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2013/340605> > Acesso em: 01 mar. 2017.

WHO. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. **World Health Organization**, Geneva, 2014. Disponível em: < <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en> > Acesso em: 14 jan. 2017.

WOLFSON, J. S.; HOOPER, D. C. Fluoroquinolone Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 2, n. 4, p. 378-424, 1989.

ZHANG, Q. Campilobacteriosis. In: SAIF, Y. M. *et al.* **Diseases of Poultry**. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2008.

APÊNDICE A – Amostras de *Campylobacter jejuni* classificadas de acordo com o número e a matriz de isolamento.

(continua)

<b>Número da amostra</b>	<b>Matriz</b>
8	Carcaça resfriada
11	Carcaça resfriada
22	Carcaça resfriada
26	Carcaça resfriada
36	Carcaça após primeira lavagem
40	Carcaça refrigerada
43	Carcaças antes da escaldagem
51	Carcaça congelada 60 dias
53	Carcaças após a depenagem
56	Carcaça refrigerada
57	Carcaça refrigerada
58	Carcaça refrigerada
61	Carcaça refrigerada
62	Carcaça refrigerada
63	Carcaça refrigerada
64	Carcaça refrigerada
65	Carcaça refrigerada
72	Carcaça refrigerada
74	Carcaça refrigerada
75	Carcaças após <i>chiller</i>
98	Cortes
100	Cortes
103	Cortes
109	Cortes
112	Cortes
120	Suabe de cloaca
138	Cortes
140	Cortes
141	Cortes
142	Cortes
143	Cortes
144	Cortes
145	Carcaça resfriada
146	Carcaça congelada 60 dias
147	Cortes
149	Cortes
150	Carcaça após evisceração
151	Suabe de cloaca
152	Carcaça após depenagem
153	Água do <i>chiller</i>

(conclusão)

<b>Número da amostra</b>	<b>Matriz</b>
156	Suabe de cloaca
165	Água do pré- <i>chiller</i>
166	Carcaça após evisceração
167	Carcaça após <i>chiller</i>
168	Carcaça após evisceração
170	Carcaça resfriada
175	Cortes
188	Cortes
189	Cortes
190	Carcaça resfriada
191	Cortes
193	Carcaça após depenagem
194	Carcaça após depenagem
196	Água do <i>chiller</i>