

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM HIGIENE VETERINÁRIA E
PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO DE PRODUTOS DE
ORIGEM ANIMAL

BEATRIZ DA SILVA FRASÃO

RESISTÊNCIA ÀS FLUOROQUINOLONAS EM *Campylobacter jejuni* e *C. coli* ISOLADOS DE AVES (*Gallus gallus domesticus*) DE CRIAÇÃO CONVENCIONAL E ORGÂNICA NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Niterói
2014

BEATRIZ DA SILVA FRASÃO

**RESISTÊNCIA ÀS FLUOROQUINOLONAS EM *Campylobacter jejuni* e *C. coli*
ISOLADOS DE AVES (*Gallus gallus domesticus*) DE CRIAÇÃO CONVENCIONAL E
ORGÂNICA NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para aquisição do Grau de Mestre. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Orientadora:

Prof^ª. Dr^ª. Maria Helena Cosendey de Aquino

Niterói

2014

F841r Frasão, Beatriz da Silva

Resistência às fluoroquinolonas em *Campylobacter jejuni* e *C. coli* isolados de aves (*Gallus gallus domesticus*) de criação convencional e orgânica no Estado do Rio de Janeiro/Beatriz da Silva Frasão; orientadora Maria Helena Cosendey de Aquino – 2014. 63f.

Dissertação (Mestrado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal)– Universidade Federal Fluminense, 2014.
Orientadora: Maria Helena Cosendey de Aquino

1. Frango de corte. 2. Resistência microbiana a medicamento. 3. Fluoroquinolona. 4. *Campylobacter*. 5. Mutação (Genética). I. Título.

CDD 664.93

BEATRIZ DA SILVA FRASÃO

**RESISTÊNCIA ÀS FLUOROQUINOLONAS EM *Campylobacter jejuni* e *C. coli*
ISOLADOS DE AVES (*Gallus gallus domesticus*) DE CRIAÇÃO
CONVENCIONAL E ORGÂNICA NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO.**

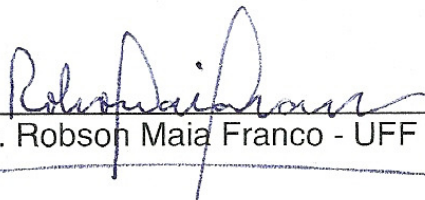
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Aprovada em 15 de dezembro de 2014.

BANCA EXAMINADORA



Prof^a Dr^a Maria Helena Cosendey de Aquino – Orientadora - UFF



Prof. Dr. Robson Maia Franco - UFF



Prof^a Dr^a Maysa Beatriz Mandetta Clementino – FIOCRUZ

Niterói – RJ
2014

Aos meus pais que nunca mediram forças e dedicação para que eu conseguisse alcançar meus objetivos. À minha irmã Isabela que foi sempre uma companheira incansável. À toda minha família que entendeu que a distância era necessária.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que é o maior responsável por tudo que consegui na vida!

Aos meus pais, Izilda Aparecida da Silva Frasão e Antonio Aparecido Ferreira Frasão, que são meu alicerce e me ensinaram a lutar com simplicidade pelos meus objetivos.

À minha irmã, Isabela da Silva Frasão, que mais que irmã é uma amiga. Que mesmo longe sempre foi o ombro e a mão, que me incentivou a nunca desistir do que eu realmente quis.

À minha avó materna, Helena, que é minha segunda mãe, sempre dedicada, atenciosa, e preocupada, obrigada por ser responsável por parte da pessoa que sou hoje.

Aos meus avos paternos, Marina e Onivaldo, pelo zelo e carinho que me dedicam sempre.

A todos os familiares que sempre me incentivaram a continuar na persistência, independente dos obstáculos que surgissem. Que sempre me deram força e me ampararam quando eu precisei. Que apesar da distância e das ausências entenderam que naquele momento era necessário.

A todas as minhas amigas da graduação, em especial, Karina, Maisa, Marcela, Ana Paula, Aline, Cecília, obrigada por sempre estarem presentes quando precisei, mesmo estando longe, e pelas longas horas no telefone.

À Prof^a Dr^a Kênia de Fátima Carrijo, que me incentivou, instruiu e apoiou na escolha da Universidade e do Programa de Pós-Graduação.

À minha orientadora Maria Helena Cosendey de Aquino, que além de mestre, foi minha mentora, sempre dedicada e paciente. Não mediu esforços para que conquistasse o aprendizado.

A meus amigos e colegas do programa de Pós-graduação, Marion, Leonardo, Hugo, Celso, Bruna Rodrigues, Fernanda, Flávia, Claudius, Cynthia, Letícia, Bruna Rosa, Pedro Henrique, André, Nathália, Cristine, Camila, Rafael, Roberta, Waldemir, que se tornaram uma grande família, na qual pude me apoiar quando precisei.

Às alunas de PIBIC e estagiárias do Laboratório de Doenças infecciosas, Luana, Luiza e Elaine, que sempre me ajudaram na bancada demonstrando interesse.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem animal. Em especial ao Prof. Dr. Elmiro Rosendo do Nascimento e Prof. Dr^a Virginia Lei de Almeida Pereira, que prontamente disponibilizaram materiais, equipamentos e espaço para que este projeto pudesse ser desenvolvido.

Aos secretários e membros do Programa de Pós-graduação em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem animal. Em especial ao secretário Drausio Paiva Ferreira e a secretária Mariana Ferreira sempre atenciosos e prestativos.

À Prof.^a Pós-Dr.^a. Maysa Beatriz Mandetta Clementino, colaboradora INCQS/FIOCRUZ, que foi mais que uma colaborada, disponibilizando-nos o laboratório e contribuindo com seu imenso conhecimento para que o presente trabalho pudesse ter sido desenvolvido.

À MSc. Valéria de Melo Medeiros, colaboradora INCQS/FIOCRUZ, que não mediu esforços e paciência para me treinar e ensinar.

Ao Prof. Dr. Felipe Piedade Gonçalves Neves e ao Técnico André Barbosa, colaboradores do Instituto Biomédico/UFF, pela disponibilidade em poder ceder espaço para que parte do projeto fosse desenvolvido.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa concedida, o qual viabilizou a realização do referido estudo.

“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam
um pouco de si, levam um pouco de nós.”
(Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é considerada atualmente um importante problema de saúde coletiva. A real contribuição do uso de antimicrobianos na cadeia alimentar para a seleção de bactérias multirresistentes e patogênicas aos humanos tem sido alvo de discussões em todo o mundo. As aves são reconhecidas como reservatório e veiculador de *Campylobacter* spp., importante patógeno para humanos e devido ao corrente uso de fluoroquinolonas na avicultura, existe uma crescente seleção de cepas de *Campylobacter* resistentes à esses antimicrobianos. Diante desse cenário, objetivou-se neste estudo investigar e caracterizar a resistência de cepas de *Campylobacter* spp. isoladas de frangos de corte de criação convencional e orgânica e de galinhas poedeiras pela detecção de mutações genéticas na Região Determinante de Resistência à Quinolona (RDRQ) do gene *gyrA* pelo sequenciamento gênico. No primeiro experimento (**Artigo 1**), foi sequenciada a RDRQ do *gyrA* de 38 cepas de *C. jejuni* e 19 cepas de *C. coli* (n=57) isoladas de frangos de corte de criação convencional, previamente caracterizadas como resistentes à ciprofloxacina e enrofloxacin por métodos fenotípicos. Todas as cepas possuíam a mutação Tre-86-Ile na RDRQ do gene *gyrA*, que confere resistência às fluoroquinolonas, confirmando a predominância dessa mutação em cepas de *Campylobacter* resistentes a esses antimicrobianos. No segundo experimento (**Artigo 2**), foram coletadas 80 amostras do conteúdo cecal de dois lotes de frangos de criação orgânica para pesquisa de *Campylobacter* spp. e caracterização da resistência por métodos fenotípicos e genotípicos. *Campylobacter* spp. foi isolado de todas as amostras, sendo a espécie *C. jejuni* predominante (68,75%). No teste de difusão em disco, todas as cepas foram resistentes à ciprofloxacina e a maioria (55,00%) resistentes à enrofloxacin. No teste de diluição em ágar, todas as cepas foram resistentes à ciprofloxacina (CIM $\geq 16\mu\text{g/mL}$ - $\geq 64\mu\text{g/mL}$) e 42,50% das cepas foram resistentes à enrofloxacin (CIM $\geq 4-32\mu\text{g/mL}$), enquanto 38,75% possuíam resistência intermediária (CIM=2 $\mu\text{g/mL}$). Todas as cepas continham a mutação Tre-86-Ile na RDRQ do gene *gyrA* e outras mutações foram observadas. Em todas as cepas sensíveis à enrofloxacin foi encontrada a mutação Tre-86-Ile, levando-se à suspeita que outros mecanismos de aquisição de resistência frente à enrofloxacin em *Campylobacter* devem ser investigados.

Palavra-chave: enrofloxacin, ciprofloxacina, mutação, *Campylobacter*, concentração inibitória mínima

ABSTRACT

Bacterial resistance to antimicrobial agents is now considered a major problem of public health. The real contribution of antimicrobial use in the food chain for the selection of multiresistant bacteria and pathogenic to humans has been the subject of discussions worldwide. Birds are recognized as a reservoir and disseminator of *Campylobacter* spp., an important pathogen for humans and due to the current use of fluoroquinolones in poultry, there is a growing selection of resistant *Campylobacter* strains to these antimicrobials. This study aimed to investigate and characterize the resistance of *Campylobacter* spp strains isolated from broilers from conventional and organic farming and laying hens, for the detection of genetic mutations in the Quinolone Resistance Determinant Region (QRDR) of *gyrA* gene by sequencing. In the first experiment (**Article 1**), the QRDR of *gyrA* of 38 strains of *C. jejuni* and 19 strains of *C. coli* (n = 57) isolated from conventional poultry breeding, previously characterized as resistant to ciprofloxacin and enrofloxacin by phenotypic methods was sequenced. All strains had the mutation Thr-86-Ile in the QRDR, which confers resistance to fluoroquinolones, confirming the prevalence of this mutation in *Campylobacter* strains resistant to these antibiotics. In the second experiment (**Article 2**), we collected 80 samples of cecal contents of poultry from two flocks of organic chicken raising to investigate the presence of *Campylobacter* spp. and characterize the resistance by phenotypic and genotypic methods. *Campylobacter* spp. was isolated from all samples, and *C. jejuni* was the most frequent species (68.75%). By the disk diffusion method, all strains were resistant to ciprofloxacin and the majority (55.00%) resistant to enrofloxacin. By the agar dilution method, all strains were resistant to ciprofloxacin (MIC $\geq 16\mu\text{g/mL}$ - $\geq 64\mu\text{g/mL}$) and 42.50% of the strains were resistant to enrofloxacin (MIC $\geq 4\text{-}32\mu\text{g/mL}$), while 38.75 % had intermediate resistance (MIC = 2 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$). All strains showed the mutation Thr-86-Ile in the QRDR and other mutations were observed. All strains sensible to enrofloxacin had the Thr-86-Ile mutation, suggesting that other mechanisms regarding the resistance acquisition to enrofloxacin in *Campylobacter* should be investigated.

Keyword: enrofloxacin, ciprofloxacin, mutation, *Campylobacter*, minimum inhibitory concentration

SUMÁRIO

RESUMO, p.7

ABSTRACT, p.8

LISTA DE ILUSTRAÇÕES, p.10

LISTA DE TABELAS, p.11

1 INTRODUÇÃO, p.12

2 REVISÃO DE LITERATURA, p.14

2.1 *Campylobacter* spp., p.14

2.2 QUINOLONAS, p.16

2.3 RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS, p.18

2.3.1 *Campylobacter* spp. e resistência às quinolonas, p.18

2.4 CRIAÇÃO ORGÂNICA, p.20

3 DESENVOLVIMENTO, p.22

3.1 ARTIGO 1, p.22

3.2 ARTIGO 2, p.36

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS, p.47

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p.48

6 ANEXOS, p.62

6.1 COMPROVANTE DE SUBMISSÃO ARTIGO 1, p.62

6.2 COMPROVANTE DE SUBMISSÃO ARTIGO 2, p.63

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

2º ARTIGO

Quadro 1 Resultados do isolamento e da suscetibilidade das cepas de *C. jejuni* e *C. coli* à enrofloxacina pelo método de difusão em disco e pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), p. 45

Fig. 1 Alinhamento das diferentes sequências obtidas da Região Determinante de Resistência às Quinolonas (RDRQ) do gene *gyrA* das cepas de *C. jejuni* e *C. coli* isoladas dos frangos de criação orgânica. Foram incluídos *C. jejuni* (L04566.1) e *C. coli* (U63413.1) como padrões sensíveis obtidos no GenBank. As alterações caracterizadas como não silenciosas estão representadas com um traço abaixo da mudança observada, e as demais são caracterizadas como silenciosas, p. 46

LISTA DE TABELAS

1º ARTIGO

Tabela 1 - Ocorrência de mutações silenciosas e não silenciosas na Região Determinante de Resistência às Quinolonas do gene *gyrA* das 57 cepas de *Campylobacter* investigadas, f. 35

1 INTRODUÇÃO

Em 2013, o Brasil teve uma produção de 12.308 mil toneladas de carne de frango, ocupando o terceiro lugar na produção mundial, precedido pelos Estados Unidos e China. Do total produzido, em 2011, cerca de 69,8% permaneceram no mercado interno, o que comprova a força dessa indústria para o país, sendo o consumo *per capita* aproximadamente 45 quilos em 2012 no Brasil. Nas exportações, o Brasil mantém, desde 2004, a posição de maior exportador mundial, exportando 3.918 mil toneladas no ano passado (UBABEF, 2013).

Os frangos de corte são frequentemente colonizados por *Campylobacter* spp., um importante patógeno humano de origem alimentar, no entanto, a infecção das aves é assintomática, o que dificulta o seu controle nas granjas (VAZ; AVES, 2008). As espécies termofílicas encontradas nesses animais e patogênicas para os seres humanos incluem *C.jejuni*, *C. coli* e *C. lari*. *C. jejuni* é a espécie mais comumente envolvida nos casos de infecções humanas, sendo considerado o principal patógeno de origem alimentar em muitos países (MOORE et al., 2005). Em humanos a maioria dos casos de campilobacteriose ocorre de forma esporádica e muitos casos não são diagnosticados ou declarados. Estima-se que mais de 2,4 milhões de pessoas são infectadas a cada ano nos EUA (CDC, 2014). Em 2005, na União Europeia, o número de casos ultrapassou os de salmonelose e em 2011, houve um aumento de 2,2% de casos com relação ao ano anterior. Nas cepas isoladas de humanos foi observada alta resistência à ampicilina, ciprofloxacina, ácido nalidíxico e tetraciclina. O mesmo foi observado com relação ao ácido nalidíxico e à tetraciclina quando analisadas as cepas isoladas de galinha e carne de frango (EFSA; EDCD, 2013).

A transmissão de bactérias resistentes entre animais e seres humanos pode ocorrer pelo consumo de produtos de origem animal ou pelo contato direto (ISHIDA et al., 2010), existindo a possibilidade de infecções multirresistentes em humanos e insucesso no tratamento terapêutico (WHO, 2012). A exposição dos microrganismos aos antimicrobianos é considerada o fator mais importante na origem da resistência e quando a utilização de antimicrobianos é reduzida ou abolida, pode ocorrer um decréscimo na prevalência de isolados resistentes (CANTÓN; MOROSINI, 2011).

O uso de antimicrobianos em produção animal, de forma terapêutica, preventiva e promotora de crescimento, especialmente na avicultura industrial, trouxe inúmeras vantagens como o aumento da produtividade e melhora da conversão alimentar, promovendo o barateamento do custo desse alimento para o consumidor, redução do período de criação para o mercado e diminuição da incidência de patologias nos animais. Entretanto, a utilização de

antimicrobianos, de maneira excessiva e imprópria na produção animal intensiva, tem desencadeado um aumento do número de microrganismos resistentes, os quais podem ser disseminados para o solo, os alimentos e os mananciais aquáticos. Na década de 60, começaram a surgir preocupações quanto ao surgimento de cepas bacterianas resistentes na produção animal e desde 2006, a União Européia e algumas nações de outros continentes proibiram o uso de certos antimicrobianos na produção animal (EFSA; ECDC; EMEA, 2009).

No Brasil, a produção e comercialização dos produtos orgânicos foram aprovadas pela Lei 10.831, de 23 de dezembro de 2003 (BRASIL, 2003), porém sua regulamentação ocorreu apenas com a publicação do Decreto Nº 6.323 em 27 de dezembro de 2007 (BRASIL, 2007). No sistema orgânico de produção agropecuária são adotadas técnicas específicas, visando otimizar os recursos naturais e socioeconômicos disponíveis, sustentabilidade ecológica e econômica, diminuindo o uso de energias não renováveis, evitando o uso de materiais sintéticos, não sendo permitido o uso de organismos geneticamente modificados e radiação ionizante, e antimicrobianos em qualquer fase do processo de produção, sempre protegendo o ambiente (BRASIL 2003). No Brasil, todo produto orgânico é identificado por um selo único em todo território nacional (BRASIL 2007). O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), através do subprograma de monitoramento em carnes (bovina, aves, suína e equina), leite, pescado, mel e ovos do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), pela Instrução Normativa SDA nº 11, de sete de maio de 2014, determina os limites de referência para ciprofloxacina e enrofloxacina em carne de aves como a soma das duas igual a $100 \mu\text{g}/\text{Kg}^{-1}$, e em ovos $10 \mu\text{g}/\text{Kg}^{-1}$ (BRASIL, 2014).

No entanto, no Brasil, existem poucos registros sobre resistência de *Campylobacter* spp. frente aos antimicrobianos, principalmente fluoroquinolonas. Diante da importância deste microrganismo na saúde coletiva e da necessidade de se pesquisar o nível de resistência, objetivou-se com este trabalho investigar cepas de *Campylobacter* isoladas de frangos de corte provenientes de criações convencionais e orgânicas e de galinhas poedeiras provenientes do município de São José do Vale do Rio Preto /RJ quanto à suscetibilidade à ciprofloxacina e enrofloxacina através dos métodos de difusão em disco, diluição em ágar com determinação da concentração inibitória mínima e sequenciamento da Região Determinante de Resistência às Quinolonas (RDRQ) do gene *gyrA* para detecção de possíveis mutações.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Campylobacter* spp.

Anteriormente classificado como *Vibrio* spp., o gênero *Campylobacter* foi primeiramente proposto, em 1963, por Sébald e Véron, depois dos testes de Hugh e Leifson's para o metabolismo fermentativo e composição das bases do DNA serem aplicados. Apenas duas espécies foram incluídas nesse gênero, *Campylobacter fetus* e '*Campylobacter bubulus*', agoraposteriormente classificado como *Campylobacter sputorum* (VERON; CHATELAIN, 1973). Diferenças bioquímicas e sorológicas foram observadas ao comparar os componentes mais importantes do microrganismo (GERMANO; GERMANO, 2011), portanto *Campylobacter* foi denominado como um gênero (ON, 2001). Foram classificados em três grupos, *Campylobacter* catalase positiva e H₂S negativa (*Campylobacter fetus* subsp. *fetus* e *Campylobacter fetus* subsp. *veneralis*), *Campylobacter* catalase e H₂S positivos (*C. jejuni* e *C. coli*), e *Campylobacter* catalase negativa (*C. sputorum* subsp. *bubulus* e *C. sputorum* subsp. *sputorum*) (VERON; CHATELAIN, 1973).

Apenas oito espécies e subespécies de *Campylobacter* foram listadas na "*Approved List of Bacterial Names*", na década de 80 (NCBI, 1989). Mas novas espécies e subespécies foram descobertas e relatadas nesse grupo, enquanto outras foram transferidas para outros grupos como *Arcobacter* e *Helicobacter* (GOODWIN et al., 1989; PASTER; DEWHIRST, 1988). Os estudos taxonômicos e a importância clínica de *Campylobacter* spp. nas décadas seguintes levaram a um aumento nas pesquisas e proporcionaram uma revisão no número de espécies descritas. Em 2009, o gênero possuía 29 espécies e 13 subespécies e em 2010 o número de espécies aumentou para 32, permanecendo o número de subespécies (EUZÉBY, 2010). Em 2014 o número de espécie e subespécie descritas em 2010 permanece (EUZÉBY, 2014).

Campylobacter pertence à ordem *Campylobacterales* e à família *Campylobacteraceae*. Microrganismos delgados (0,2 a 0,5nm) e compridos (0,5 a 5nm), móveis por possuírem um único flagelo polar com duas a três vezes o comprimento da célula bacteriana, Gram negativo, espiralado, podendo ser curvos ou em forma de asa de gaivota. Não fermentam açúcares, portanto a energia utilizada por esses microrganismos é obtida de aminoácidos ou componentes intermediários do ciclo do ácido tricarbóxico (FRANCO, 2012; NACHAMKIN, 2001; FRANCO; LANDGRAF, 2008). Se desenvolve em condições de microaerofilia, necessitando de 3 a 5% de oxigênio e 2 a 10% de gás carbônico, e cresce a

temperaturas entre 37 e 42°C (FRANCO, 2012). O pH para seu crescimento pode variar de 5,0 a 9,0, sendo o pH ótimo de 7,0 a 7,5, não crescendo em pH ácido. Sensíveis à desidratação e altamente sensíveis ao sal, a atividade de água ideal é de 0,987 (FRANCO, 2012; FRANCO; LANDGRAF, 2008). A conservação em geladeira, a 4°C, leva à inativação mais rápido do microrganismo do que a conservação em temperatura ambiente. Apresentam alta sensibilidade ao congelamento, porém podem se manter viáveis por semanas se conseguirem sobreviver à queda brusca que ocorre no início desse processo (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

O trato intestinal de bovinos, cães, gatos, ovinos, roedores, podem apresentar espécies de *Campylobacter*, porém as aves, sejam pombos, patos, perus e frangos, e os suínos são os reservatórios mais frequentes de *C. jejuni* e *C. coli*, respectivamente (STERN et al., 2003; USDA, 2013). Gaivotas e outras aves de ambientes aquáticos possuem *C. lari* como parte de sua microbiota intestinal (FRANCO; LANDGRAF, 2008). As espécies se assemelham bastantes, porém *C. jejuni* pode ser diferenciada de *C. coli* pela segunda não ser capaz de hidrolisar hipurato (FRANCO; LANDGRAF, 2008). A diferenciação de *C. lari* é devido sua não capacidade de hidrolisar o indoxilacetato (STERN et al, 2001). Contudo, todos esses reservatórios são fontes de infecção para os seres humanos e a transmissão ocorre pelo contato direto com fezes ou por contaminação cruzada nos alimentos como carne crua ou mal cozida e leite cru (CDC, 2013).

A via de transmissão é fecal-oral, sendo a dose infectante entre 500 a 1.000 células, por ingestão de alimentos e/ou água contaminados. O período de incubação varia de dois a cinco dias, podendo chegar a 10 dias (FRANCO, 2012; FRANCO; LANDGRAF, 2008). A patogenicidade de *C. jejuni* não está muito esclarecida, já que vários fatores podem determiná-la, sendo a adesão à mucosa do trato intestinal um fator indispensável. Pode ocorrer também a produção de toxinas, destacando-se citotoxinas e uma toxina termolábil. Uma invasão no cólon é sugerida, devido à presença de sangue e muco nas fezes do hospedeiro. Além disso, pode ocorrer sua multiplicação na lâmina própria intestinal (FRANCO; LANDGRAF, 2008). A campilobacteriose humana frequentemente não é diagnosticada, apesar de ser reconhecida como uma das principais doenças transmitidas por alimentos, podendo, em alguns países, ultrapassar a salmonelose com relação a número de casos (EFSA, 2013). No homem, a doença é de curso rápido e autolimitante, os sintomas apresentados são febre, náusea, dores abdominais e raramente vômitos, podendo ocorrer diarreia sanguinolenta (FRANCO, 2012). Na maioria das vezes não é diagnosticada e/ou notificada. O tratamento com antimicrobianos é recomendado em casos graves e apesar de apresentar curso rápido, a

doença não diagnosticada ou com tratamento ineficaz pode levar a complicações como a Síndrome de Guilland Barré (SCALLAN et al., 2011).

Além da baixa notificação, seu isolamento é trabalhoso, uma vez que exige meios ricos, baixa concentração de oxigênio e a diferenciação entre as espécies por meio da bacteriologia convencional é difícil, visto que não existem grandes especificidades bioquímicas entre as espécies (MILLER et al., 2010). Sendo assim, a melhor identificação é a molecular (BEHRINGER et al., 2011; GHARST et al., 2013; GOERING, 2010; MILLER et al., 2010).

2.2 QUINOLONAS

As quinolonas são os produtos secundários da síntese de um agente antimalárico de atividade antibacteriana conhecida e comprovada. Surgiram casualmente em 1962 descobertas por George Lesher et al. em uma destilação, durante a síntese de cloroquina, no entanto, este produto secundário possuem também atividade antimicrobiana, surgindo assim a primeira quinolona (HIGGINS; FLUIT, SCHMITZ, 2003). As quinolonas e fluoroquinolonas representam uma classe de antimicrobianos sintéticos composta por drogas fármacos quimicamente semelhantes e altamente eficazes no tratamento de uma série de infecções, cuja atividade consiste fundamentalmente na inibição da replicação do DNA (HOPKINS; DAVIES; THRELFALL, 2005).

O ácido nalidíxico foi a primeira quinolona a ser introduzida, seguindo-se a flumequina e o ácido oxonílico, sendo então denominadas quinolonas de primeira geração. Em 1980, a partir das primeiras quinolonas, obtiveram-se as denominadas quinolonas de segunda geração, as fluoroquinolonas (APPELBAUM; HUNTER, 2000). Quimicamente, as fluoroquinolonas diferem das anteriores por possuírem a combinação de um átomo de flúor e um grupo piperazinil. As principais representantes deste grupo são a enrofloxacin, que tem uso exclusivo em Medicina Veterinária, norfloxacin, ciprofloxacina, ofloxacina, lomefloxacina e perfloxacina que também são utilizadas no tratamento em humanos. A combinação dos fármacos levou a um maior espectro de ação, ao aumento da capacidade das quinolonas penetrarem na parede bacteriana e, conseqüentemente, a melhor atividade contra bactérias Gram-negativas, passando a abranger algumas espécies Gram-positivas atingindo um perfil farmacocinético maior, chegando a ter atividade antibacteriana 1.000 vezes superior à observada pelo ácido nalidíxico, seu antecessor (SOUSA, 2007). As quinolonas de primeira geração têm ação frente à enterobactérias e gram-negativos, porém são inativadas por Gram-

positivos, aeróbios e patógenos atípicos. As quinolonas de segunda geração, norfloxacin e ciprofloxacina, têm ação muito maior para Gram-negativos, com moderada atividade a Gram-positivos (BARROS et al., 2001).

Na Medicina Veterinária, no final da década de 80 e início de 90, deu-se início à utilização das fluoroquinolonas (EMEA, 2006). A ação do antimicrobiano consiste na inibição da girase, nas bactérias Gram-negativas, e da topoisomerase IV, nas bactérias Gram-positivas. São indicadas para o tratamento das infecções por bacilos aeróbicos Gram-negativos incluindo *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, espécies de *Enterobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* e *Pseudomonas aeruginosa*, porém as outras *Pseudomonas* são resistentes às quinolonas (HORIQUINI, 2009).

A fluoroquinolona exclusiva de uso veterinário é a enrofloxacin, um membro da família de 6-fluoro-7-piperazinil-4-quinolonas, altamente lipofílica, e possui adição de um ácido carboxílico e uma amina terciária o que contribuiu para sua propriedade anfotérica. A ciprofloxacina, usada em medicina humana se apresenta na forma 1-Ciclo-Propil-6-Fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-7-(Peperazin-1-yl)-quinolona-3-ácido carboxílico (KHAN et al, 2012), possuindo um grupo etil no carbono um do anel aromático (MORIANA; CÁRDENAS; RACERO, 2002). O metabolismo da enrofloxacin varia conforme a espécie, apesar de ser um antimicrobiano ativo, a biotransformação a partir da ciprofloxacina pode ocorrer (MITCHELL, 2006).

No Brasil, o uso das quinolonas só é permitido como terapêutico, sendo proibido como promotor de crescimento ou como medicação preventiva, apesar de haver uma diminuição média no desempenho das aves quando retira-se o antimicrobiano como promotor de crescimento, além do impacto negativo sobre a saúde animal e aumento da mortalidade. Ainda assim a enrofloxacin desde 2004 foi o antimicrobiano mais usado na avicultura de corte e postura no Estado do Paraná conforme o Programa Estadual de Controle de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMvet) do Estado do Paraná (MACHINSKU JUNIOR et al., 2005). Porém, organismos reguladores internacionais, como Food and Drug Administration (FDA), e a Comissão das Comunidade Européias (CEE), implantaram legislações rigorosas, além de constatarem que alguns produtos poderiam contribuir para o aparecimento de reações de hipersensibilidade e resistência em humanos. Devido a isto, no Brasil, esta técnica tem sido abolida. (GONZALES, 2004).

2.3 RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS

Cepas de *Campylobacter* spp. resistentes vem sendo selecionadas devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos na medicina veterinária, principalmente nos animais de produção, no tratamento e prevenção de doenças. (ENGBERG et al, 2011; NICHOLS et al, 2012). O número de isolados de *Campylobacter* resistentes à antimicrobianos, principalmente às fluoroquinolonas tem aumentado em vários países (FRASAO; AQUINO, 2014). A preocupação com tal fato reside no âmbito da saúde coletiva, tendo em vista que alguns antimicrobianos de eleição para o tratamento da campilobacteriose já não surtem mais efeito, como as fluoroquinolonas que eram de eleição no tratamento, sendo macrolídeos os mais recomendados atualmente (IOVINE, 2013).

O mecanismo de resistência varia conforme a classe do antimicrobiano. Nas fluoroquinolonas o principal mecanismo é a mutação na Região Determinante de Resistencia às Quinolonas do gene *gyrA* da DNA girase, sendo a principal a mutação Tre-86-Ile, porém outras mutações já foram descritas (Asp-90-Asn, Ala-70-Tre), além do efluxo pela bomba CmeABC, devido à mutação no gene *cmeR* ou à mutação na sequencia de repetição, o que leva a uma expressão exacerbada das bombas de efluxo CmeABC. Nos macrolídeos observa-se mutações no rRNA 23S, mutações em proteínas ribossomais L4/L22, efluxo através da CmeABC além da diminuição da permeabilidade da membrana devido à principal porina da membrana externa (Major Outer Membrane Porin-MOMP), enquanto nas tetraciclinas ocorre a modificação do alvo ribossomal por ligação da proteína TetO, ação da bomba de efluxo CmeABC e outros (ALFREDSON e KOROLIK, 2007; IOVINE,2013; LIN et al., 2005; YAN et al. 2006).

2.3.1 *Campylobacter* spp. e resistência às quinolonas

A resistência adquirida pode ser por diferentes mecanismos, sendo que os mecanismos gerais de resistência aos antimicrobianos incluem a modificação do sítio de ação do antimicrobiano, inibição da ação antimicrobiana, efluxo do antimicrobiano por bomba de efluxo e modificação ou inativação do antimicrobiano. Bactérias resistentes à fluoroquinolonas podem ter modificações na DNA girase ou na bomba de efluxo (IOVINE, 2013).

Fluoroquinolonas já foram entre os antimicrobianos de eleição para tratamento de campilobacteriose humana, pois *Campylobacter* spp. é naturalmente suscetível a esses agentes

e concentrações altas desse antimicrobiano podem ser alcançadas no lúmen intestinal. Porém desde a década de 90 tem ocorrido um aumento preocupante na prevalência de *Campylobacter* spp. resistente às fluoroquinolonas, isoladas de humanos e frangos o que foi correlacionado com o uso desse antimicrobiano na avicultura, diante disso o tratamento de escolha mudou (PIDDOCK et al., 2003). Quando não é possível realização do antibiograma atualmente se recomenda o tratamento com macrolídeos como tratamento empírico ou de primeira escolha.

Dois mecanismos responsáveis pela resistência às fluoroquinolonas foram descritos em *Campylobacter* spp. O primeiro, e mais frequente, é a inativação do sítio de ação por mutações na Região de Resistência às Quinolonas (RDRQ) e o segundo a expulsão das fluoroquinolonas por bomba de efluxo (GE et al., 2005).

As duas principais enzimas relacionadas com a replicação do DNA são DNA girase, que é formada pelo *gyrA* e *gyrB* e a topoisomerase IV, formada pelo *parC* e *parE* (GE et al., 2005; YAN et al., 2006). As fluoroquinolonas tem como principal alvo em *Campylobacter* a DNA girase, formando um complexo estável com a enzima e conseqüentemente reduzem a síntese de DNA, levando à morte celular (YAN et al., 2006). Pontos de mutação específicos na Região de Determinação de Resistência a Quinolona (RDRQ) do gene *gyrA*, determinam a resistência às fluoroquinolonas em *C. jejuni* e *C. coli*, sendo a mais comum a mutação com substituição de Treonina por Isoleucina (Tre-86-Ile). Esta mutação aumenta muito a resistência ao ácido nalidíxico e a concentração inibitória mínima de ciprofloxacina ($CIM \geq 16 \mu\text{g/mL}$) (ZIRNSTEIN et al., 2000). Outra mutação, substituindo treonina por alanina (Tre-86-Ala), no mesmo códon, confere resistência apenas ao ácido nalidíxico mas não para outras fluoroquinolonas (JESSE et al., 2006), enquanto a mutação menos comum no *gyrA* é a substituição de asparagina por ácido aspartato (Asp-90-Asn) conferindo um grau intermediário de resistência à ciprofloxacina ($CIM \geq 6$ a $16 \mu\text{g/mL}$) (WANG et al., 1993). Em trabalhos realizado por Zirnstein et al. (2000) e Hakanen et al. (2002), a maioria dos isolados clínicos resistentes tinham a mutação Tre-86-Ile no *gyrA*. Outras mutações também foram observadas na RDRQ do gene *gyrA* como, prolina por serina (Pro-104-Ser) (HAKANEN et al., 2002), treonina por lisina (Tre-86-Lis) ou treonina por alanina (Tre-86-Ala) (BACHOUAL et al., 2001). Em pesquisa desenvolvida na China, todas as cepas resistentes à ciprofloxacina tinham a mutação pontual C257T (Tre-86-Ile) na QRDR do gene *gyrA* (QIN et al., 2011). Mas o papel na resistência às fluoroquinolonas ainda não foi estabelecido para todas essas mutações, sendo a de maior importância a substituição da Treonina pela Isoleucina no códon 86 (Tre-86-Ile) (ADLER-MOSCA; ALTWEGG, 1991). No Brasil, estudos anteriores

revelaram uma frequência de 95% das cepas isoladas de frango de corte resistentes à ciprofloxacina (HUNGARO et al., 2014; MOURA et al., 2013).

Outras mutações como alterações no gene *gyrB* relacionadas à resistência às fluoroquinolonas ainda não foram documentadas em *Campylobacter* (IOVINE, 2013), e poucos estudos revelam mutações no gene *parC* associada com resistência às fluoroquinolonas (PIDDOCK et al, 2003). Ainda, foi observado que algumas cepas de *C. jejuni* e *C.coli* não possuem os genes *parC* e *parE*, (PARKHILL et al., 2000), portanto alterações nesses genes não podem ser consideradas como aquisição de resistência às fluoroquinilonas.

2.4 CRIAÇÃO ORGÂNICA

Diante de preocupações com a saúde coletiva, o sistema de criação orgânico foi criado visando otimizar o uso dos recursos naturais e socioeconômicos disponíveis, respeitando a cultura das comunidades rurais. Em 2007, o Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) aprovou o Decreto N°. 6.323/dezembro de 2007 (BRASIL, 2007), o que dispõe sobre as atividades desenvolvidas na agricultura orgânica, definidas pela Lei N° 10.831, de 23 de dezembro de 2003 (BRASIL, 2003). A criação orgânica de frangos, com base nas normas vigentes, deve ser adequada às diretrizes da produção orgânica, maximizando os benefícios sociais, minimizando a necessidade de uso de energia não-renovável, com substituição do uso de materiais sintéticos, de organismos geneticamente modificados, ou radiação ionizante por métodos biológicos ou mecânicos (BRASIL 2007).

Frangos orgânicos foram considerados, pelo USDA como “...um produto vindo de animais que não tiveram uso de antimicrobianos ou hormônios de crescimento. O alimento orgânico é produzido sem uso dos pesticidas mais comuns; fertilizantes sintéticos; bioengenharia; ou radiação ionizante. Antes do produto obter o selo ‘orgânico’, há um certificado de inspeção governamental aprovando a fazenda na qual o alimento é produzido, a fim de certificar que a fazenda segue todas as normas necessárias. As empresas que manipulam ou processam alimentos orgânicos, antes da sua distribuição para os supermercados ou restaurantes, também precisam ser certificadas” (NOP 2008). A produção orgânica de frangos difere da convencional pois além dos pontos apresentados acima, as aves tem acesso ao ambiente, ou seja, são criadas a pasto, assim, os fatores de risco para a exposição a *Campylobacter* aumentam (ROSENQUIST et al. 2013). Além disso a idade de abate é superior, sendo expostas um maior período a fatores de risco relacionados. A

prevalência de *Campylobacter* em frangos orgânicos varia de 60% a 100% (COLLES et al., 2008; EFSA, 2010; EL-SHIBINY et al., 2005; ESTEBAN et al., 2008; HEUER et al., 2001; HOOGENBOOM et al., 2008; OVERBEKE et al., 2006).

3 DESENVOLVIMENTO

3.1 ARTIGO 1

Detecção de resistência às fluoroquinolonas através da mutação no gene *gyrA* em *Campylobacter* spp. isolados de frangos de corte e galinhas (*Gallus gallus domesticus*) poedeiras, no Estado do Rio de Janeiro

Detection of fluoroquinolone resistance by mutation in *gyrA* gen of *Campylobacter* spp. isolates from broiler and laying (*Gallus gallus domesticus*) hens, from Rio de Janeiro State

Beatriz da Silva Frasao^{I*}, Valéria Medeiros^{II}, André Victor Barbosa^{III}, Waldemir Silva de Aguiar^I, Dayse Lima da Costa Abreu^{IV}, Maysa Mandetta Clementino^{II}, Maria Helena Cosendey de Aquino^{IV}

RESUMO

As aves são consideradas o principal reservatório de *Campylobacter* spp., um importante patógeno para humanos e muitos estudos têm relatado uma rápida seleção de cepas resistentes às fluoroquinolonas após o uso destes antimicrobianos na produção avícola e na medicina humana. O principal mecanismo de resistência às fluoroquinolonas em *Campylobacter* consiste na mutação na Região Determinantes de Resistência às Quinolonas (RDRQ) do gene

^IDepartamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Fluminense (UFF), 24230-340, Niterói, RJ, Rua Vital Brazil Filho 64, Brasil. Email: beatrizfrasao@id.uff.br, beatrizfrasao90@gmail.com.*Autor para correspondência.

^{II}Setor de Alimentos, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brasil.

^{III}Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto Biomédico, Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, RJ, Brasil.

^{IV}Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública, Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, RJ, Brasil.

gyrA, que codifica para a subunidade A da enzima DNA girase, alvo das fluoroquinolonas. O objetivo deste estudo foi investigar a mutação na RDRQ do gen *gyrA* em cepas de *Campylobacter* previamente isoladas de carcaças de frangos de corte e fezes de galinhas poedeiras. Foram selecionadas 38 cepas de *C jejuni* e 19 cepas de *C. coli* (n=57), previamente caracterizadas como resistentes à ciprofloxacina e enrofloxacina pelo método da difusão em disco e pela determinação da concentração inibitória mínima. Para detecção da mutação foi utilizado sequenciamento direto de um fragmento de 454pb da RDRQ do gene *gyrA* gerado por PCR. Todas as cepas apresentaram a mutação na RDRQ do gene *gyrA* no códon 86 (Tre-86-Ile), que confere resistência às fluoroquinolonas e outras mutações silenciosas foram observadas. A caracterização genotípica da resistência às fluoroquinolonas em *Campylobacter* confirmou a prévia detecção fenotípica dessa resistência e a mutação Tre-86-Ile foi observada na totalidade das amostras comprovando ser esta a mutação predominante em cepas de *C. jejuni* e *C. coli* resistentes à enrofloxacina e ciprofloxacina.

Palavras-chave: enrofloxacina, ciprofloxacina, aves, *C. jejuni*, *C. coli*.

ABSTRACT

Poultry are considered the main reservoir of *Campylobacter* spp., an important pathogen for humans. Many studies have reported a rapid selection of fluoroquinolones resistant strains after the use of these antimicrobials in poultry production and human medicine. The main mechanism of fluoroquinolone resistance in *Campylobacter* is a mutation in the Quinolone Resistance Determinant Region (QRDR) in the *gyrA* gene, which codes for the subunit of the enzyme DNA gyrase, the target for fluoroquinolone. The aim of this study was to investigate the mutation in QRDR in the *gyrA* gene of *Campylobacter* strains previously isolated from broiler carcasses and faeces of laying hens. Thirty eight strains of *C. jejuni* and 19 *C. coli* strains (n = 57), previously characterized as resistant to ciprofloxacin and enrofloxacin by

disk diffusion method and minimum inhibitory concentration (MIC), were selected. For detection of the mutation, a fragment of 454pb QRDR in the *gyrA* gene was used for direct sequencing. All strains presented QRDR mutation in the *gyrA* gene at codon 86 (Thr-86-Ile), which confers resistance to fluoroquinolones. Other known silent mutations were observed. This genotypic characterization of fluoroquinolone resistance in *Campylobacter* strains has confirmed the prior phenotypic detection of the resistance. The Thr-86-Ile mutation was observed in all samples confirming that this is the predominant mutation in enrofloxacin and ciprofloxacin resistant strains of *C. jejuni* and *C. coli*.

Key words: enrofloxacin, ciprofloxacin, poultry , *C. jejuni*, *C. coli*.

INTRODUÇÃO

Campylobacter jejuni e menos frequentemente *C. coli* emergiram nas últimas décadas como a principal causa de gastroenterite de origem alimentar em países desenvolvidos (WANG et al., 2013). As aves são consideradas a principal fonte de transmissão para humanos (BOLTON et al., 2014) devido à frequente presença desse microrganismo no trato gastrointestinal desses animais, em particular no ceco, o qual propicia um ambiente favorável para o seu desenvolvimento (MEREDITH et al., 2013).

A campilobacteriose humana, na maioria dos casos, ocorre de forma esporádica e em muitos casos não é diagnosticada ou relatada, sendo estimado que, por ano, mais de 2,4 milhões de pessoas são infectadas (CDC, 2013). Normalmente as infecções por *Campylobacter* são auto-limitantes mas em alguns casos é necessário o uso de antimicrobianos em infecções persistentes e severas ou em mulheres grávidas, crianças, idosos e imunossuprimidos (WIECZOREK & OSEK, 2013). É possível observar em alguns casos a ocorrência da Síndrome de Guillain-Barré, uma polineuropatia desmielinizante (ANON, 2011).

A transmissão de *Campylobacter* para humanos ocorre por contato direto com fezes ou por contaminação cruzada na cadeia produtiva de alimentos, sendo a carne de frango o alimento mais incriminado (MILLER et al., 2010). Estudos no Brasil tem revelado a presença de resistência às fluoroquinolonas em até 100% das cepas isoladas de frango (BADARÓ, 2013; MOURA, 2010). No ano de 1990, ao mesmo tempo em que houve a introdução da enrofloxacin na produção animal, na Ásia e na Europa a resistência às fluoroquinolonas, especialmente à ciprofloxacina, começou a aumentar entre as cepas de *Campylobacter* isoladas de humanos (ENDTZ et al., 1991). O mesmo ocorreu no Reino Unido e nos Estados Unidos após a aprovação da sua utilização na Medicina Veterinária (SAM et al., 1999; NACHAMKIN et al., 2002). A aquisição dessa resistência comprometeu o tratamento dos pacientes e aumentou a duração dos sintomas gastrointestinais em pacientes infectados com cepas resistentes às fluoroquinolonas, pois nesses casos a duração dos sintomas tende a ser maior do que nos pacientes infectados com cepas sensíveis (SMITH et al., 1999).

A ação das fluoroquinolonas consiste na inibição da replicação do DNA bacteriano, através da ação sobre as enzimas topoisomerases tipo II, a DNA girase e a topoisomerase IV (ALTE et al., 2012). O principal mecanismo de resistência às fluoroquinolonas em *Campylobacter* é a mutação na Região Determinante de Resistência às Quinolonas (RDRQ) no gene *gyrA*, que codifica para a subunidade A da enzima DNA girase, conferindo diminuição da sensibilidade da DNA girase a esses antimicrobianos. A maioria das cepas de *C. jejuni* altamente resistentes às fluoroquinolonas possuem a mutação Tre-86-Ile, onde ocorre uma transição de citosina para timina resultando na substituição do aminoácido treonina para isoleucina (WILSON et al., 2000). Outras substituições foram reportadas como Asp-90-Asn, Ala-70-Tre, Asp-85-Tir, Pro-104-Ser (IOVINE, 2013; QIN et al., 2011; WIECZOREK & OSEK, 2013), mas o papel na resistência às fluoroquinolonas ainda não foi estabelecido para todas essas mutações. Outras mutações como alterações no gene *gyrB* ainda não foram documentadas em

Campylobacter e poucos estudos revelam mutações no gene *parC* associada com resistência às fluoroquinolonas (PIDDOCK et al., 2003).

Diante do exposto acima, este estudo tem como objetivo determinar a presença de mutação na Região Determinante de Resistência à Quinolonas no gene *gyrA*, em cepas de *Campylobacter jejuni* e *C. coli* resistentes a esses antimicrobianos isoladas de frangos de corte e galinhas poedeiras no Estado do Rio de Janeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Um total de 57 cepas de *Campylobacter* resistentes às fluoroquinolonas isoladas de carcaças de frango (n=49) pertencentes a 6 lotes diferentes e de galinhas poedeiras (n=8) provenientes de três granjas do Estado do Rio de Janeiro foram estudadas. A prévia detecção da resistência às fluoroquinolonas foi obtida pelo método de difusão em disco (NCCLS, 2003) e pela determinação da concentração inibitória mínima frente à enrofloxacin e ciprofloxacina (NCCLS, 2003). As cepas foram descongeladas e estriadas em placas com Ágar Columbia suplementado com carvão (0,4%), e incubadas a 37°C por 48 horas, em microaerofilia Para confirmação das espécies, foi realizada técnica de PCR multiplex utilizando iniciadores C412_F e C1288_R para o gene 16S rRNA (816 pb) específicos para o gênero *Campylobacter* (LINTON et al., 1996) e os iniciadores C1 e C4 para o gene da oxirredutase (160 bp) específico para *C. jejuni* (WINTERS & SLAVIK, 1995). Para confirmação da espécie *C. coli* foi utilizada a técnica convencional de PCR utilizando os iniciadores Col1 e Col2 para o gene *ceuE* (894 pb) (GONZALEZ et al., 1997). *C. jejuni* ATCC 33560 e *C. coli* ATCC 33559, gentilmente cedidas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/FIOCRUZ), foram incluídas como controle. Para a PCR, o DNA foi extraído com o Kit de Extração Comercial da QIAGEN (QIAGEN Companies - Uniscience Brazil) de acordo com as instruções do manual. Para a PCR

multiplex, foram utilizados volumes de 50 μ L contendo 5 μ L de DNA, 1X PCR Buffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl [pH 9.0]); 1 μ L (200 μ M cada) dATP, dCTP, dGTP e dTTP; 20 pmol de cada primer; 2.5 U Taq DNA polymerase e 2 mM de MgCl₂. Para a PCR convencional, foi utilizado 1.5 mM de MgCl₂ e 25 pmol de cada primer. A reação de amplificação foi feita no termociclador Eppendorf® AG 22331 Hamburg (Automatie motorized lid). Na multiplex PCR, a desnaturação inicial foi a 94°C por 3 minutos e 25 ciclos foram realizados com desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento do primer a 50°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 5 minutos. Para a PCR convencional, foram feitos 30 ciclos com desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento do primer a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Para a visualização do produto da PCR, 12 μ L do amplicon foi utilizado na eletroforese em gel de agarose a 1.5% com tampão TBE (Invitrogen) e brometo de etídio (3mg/mL) e comparado com peso molecular de 100 pb (Invitrogen).

Para o sequenciamento, foi realizada PCR com primers específicos para amplificação da RDRQ do gene *gyrA*, CjgyrA QRDR F e CjgyrA QRDR R (PARKHILL et al., 2000; PRICE et al., 2005). Na reação foi utilizado 1X PCR Buffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl [pH 9.0]); 5 μ L (1mM cada) dATP, dCTP, dGTP e dTTP; 0,5 μ L de cada primer, 1.0 U Taq DNA polimerase e 2 mM de MgCl₂. A reação de amplificação foi feita em termociclador “Thermo Electron Corporation – Px2 Thermal Cycler”, com desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento do primer a 55°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final por 10 minutos a 72°C. O produto da amplificação foi purificado com o Kit de Purificação Comercial da GE®, seguindo as instruções descritas no manual. Após isso, a dosagem do DNA purificado foi realizada de acordo com o recomendado no protocolo “Low DNA Mass Ladder” (Invitrogen), sendo utilizado 4 μ L do amplicon purificado para eletroforese nas condições já descritas. Foi

utilizado sequenciador automático ABI-PRISM 3100® GeneticAnalyze com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems). As sequências obtidas nos cromatogramas foram processadas através dos softwares BioEdit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999) e Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0-MEGA6 (TAMURA et al. 2013). Para confirmar a ocorrência de mutação, a sequência de duas cepas obtidas no GenBank foram usadas como padrão de cepas sensíveis, sendo *C. jejuni* (L04566.1) e *C. coli* (U63413.1).

RESULTADOS

Das 57 cepas selecionadas, 38 (66,67%) foram caracterizadas como *C. jejuni* e 19 (33,33%) como *C. coli*. Das cepas isoladas das carcaças de frango, 19 foram confirmadas como a espécie *C. coli* e 30 como *C. jejuni*, enquanto que todas as oito cepas isoladas das galinhas poedeiras foram confirmadas como sendo a espécie *C. jejuni*.

Todas as cepas, com exceção das cepas *C. jejuni* ATCC 33560 e *C. coli* ATCC 33559, apresentaram mutação no códon 86 (Tre-86-Ile) presente no fragmento da RDRQ do gene *gyrA*, além de outras mutações silenciosas. Em todas as cepas isoladas de galinhas poedeiras foram observadas as mutações silenciosas His-81-His, Ser-119-Ser, Ala-120-Ala. Todas as cepas de *C. jejuni* provenientes de carcaças de frangos apresentaram a mutação silenciosa Gli-74-Gli e uma cepa apresentou mais duas mutações silenciosas Asp-75-Asp e Ser-79-Ser. Todas as cepas de *C. coli* das carcaças de frango apresentaram as mutações silenciosas Fen-99-Fen e Ala-122-Ala (Tabela 1).

DISCUSSÃO

Neste estudo todas as cepas testadas apresentaram resistência às fluoroquinolonas devido à presença de mutação que substitui o aminoácido treonina pela isoleucina. O mesmo foi observado por DUARTE et al. (2014) em Portugal, que encontraram a mutação em todas as

cepas que apresentaram resistência à ciprofloxacina em outros testes. Ruiz et al. (1998), demonstraram que cepas com CIM para ciprofloxacina $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ apresentaram mutação Tre-86-Ile, com uma exceção devido à ocorrência da mutação Tre-86-Lys, enquanto todas as cepas com CIM de ciprofloxacina $\leq 0,25 \mu\text{g/mL}$ não apresentaram mutação no códon Tre-86. No presente estudo, todas as cepas analisadas possuíam alto nível de resistência comprovadas pelos valores obtidos na CIM, que variaram entre $\geq 8 \mu\text{g/mL}$ a $\leq 64 \mu\text{g/mL}$ para enrofloxacin e entre $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ a $\leq 128 \mu\text{g/mL}$ para ciprofloxacina, confirmando que esta alteração é sempre associada com altos valores de CIM para fluoroquinolonas (SAID et al., 2010).

Não foram observadas outras mutações que conferissem resistência às fluoroquinolonas nas cepas investigadas além da mutação Tre-86-Ile. Todas as cepas de *C. jejuni* apresentaram alteração do nucleotídeo 257 do *gyrA* de ACA para ATA e todas as cepas de *C. coli*, alteração de ACT para ATT conforme descrito previamente (SAID et al. 2010). A ciprofloxacina é o metabólito principal da enrofloxacin e a atividade antimicrobiana desta última tem sido associada em parte à ação deste metabólito (MENGOZZI et al., 1996). Embora trabalhos anteriores se refiram somente às mutações encontradas em cepas resistentes à ciprofloxacina, no presente estudo as cepas apresentavam resistência também à enrofloxacin, sugerindo o mesmo mecanismo de aquisição de resistência.

Mutações silenciosas são frequentemente descritas em cepas sensíveis e resistentes às fluoroquinolonas e muitas combinações de transições e mutações podem existir. BECKMANN et al. (2004) relataram as mesmas mutações silenciosas detectadas neste trabalho, His-81-His e Ser-119-Ser em cepas sensíveis às quinolonas. A mutação silenciosa Ala-120-Ala, observada nesse estudo, foi também previamente descrita por WILSON et al. (2000) e HAKANEN et al. (2002).

O crescente nível de resistência às fluoroquinolonas observado atualmente em cepas de *Campylobacter* spp. isoladas de aves revela o impacto do uso desses antimicrobianos na

produção avícola. Os níveis de resistência variam de acordo com os países, por diferentes fatores, entre eles a permissão do uso desta droga na avicultura (CHEN et al., 2010). No Brasil, esta droga tem seu uso permitido para fins terapêuticos na produção avícola, entretanto na Noruega e na Austrália onde não é permitido o uso desses antimicrobianos na avicultura, não foram detectadas cepas de *Campylobacter* resistentes às fluoroquinolonas em estudos realizados em abatedouros avícolas (NORSTRÖM et al., 2007; OBENG et al., 2012).

A caracterização genotípica da resistência às fluoroquinolonas em *Campylobacter* nesse estudo, confirmou a prévia detecção fenotípica dessa resistência e a mutação Tre-86-Ile foi observada na totalidade das cepas comprovando ser esta a mutação predominante em cepas de *C. jejuni* e *C. coli* resistentes à enrofloxacin e ciprofloxacina.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos confirmam a presença da mutação no gene *gyrA* como sendo o mecanismo mais frequente de aquisição de resistência em cepas de *Campylobacter jejuni* e *C. coli* frente às fluoroquinolonas e essa resistência observada é preocupante, uma vez que a ciprofloxacina pode ser utilizada no tratamento da campilobacteriose humana. Estudos de genotipagem e de nível de resistência a esses antimicrobianos entre cepas de *Campylobacter* spp. isoladas de surtos em humanos e de frangos devem ser realizados, a fim de se investigar a participação das cepas resistentes originadas de aves nas infecções humanas.

AGRADECIMENTOS

À aluna de iniciação científica Luana R. Cortez, do laboratório de doenças infecciosas da UFF, pelo apoio em bancada. À Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-graduação e Inovação (PROPPI/FOPESQ). B. S. Frasco foi apoiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de

Pessoal de Nível Superior (CAPES), e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

ALTE, M. A. et al. Avaliação da atividade tóxico-genética da enrofloxacina. **Revista de Iniciação Científica da ULBRA**, n.10, 2012.

ANON. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ); scientific opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. **EFSA Journal**, v. 9, n.4, p. 10-141, 2011.

BADARÓ, A. C. L. **Qualidade de carcaças de frango de abatedouros do estado de Minas Gerais: Ocorrência de *Campylobacter jejuni* e perfil de resistência a antimicrobianos**. 2013. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Curso de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa.

BECKMANN L. et al. Analysis 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. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02242.x

BOLTON, D. et al. Poultry Food Safety Control Interventions in the Domestic Kitchen: Poultry Food Safety. **Journal of Food Safety**, v. 34, n. 1, p. 34–41, 2014. doi: 10.1111/jfs.12092

CDC. **Centers for Disease Control and Prevention**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/campylobacter/>>. Acesso em: 12 nov. 2013.

- CHEN, X. et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolates in broilers from China. **Veterinary Microbiology**, v. 144, n. 1-2, p. 133–139, 2010. doi:10.1016/j.vetmic.2009.12.035
- DUARTE, A. 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, n. 4, p. 306–313, 2014. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2014.06.012
- ENDTZ, H. P. et al. Quinolone resistance in *Campylobacter* isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. **Antimicrobial Chemotherapy**, n. 27, p.199–208, 1991.
- GONZALEZ, I. et al. Specific identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using a PCR test based on the *ceuE* gene encoding a putative virulence determinant. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 759–763, 1997.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v.41, p.95-98, 1999.
- HAKANEN, A. et al. *gyrA* polymorphism in *Campylobacter jejuni*: detection of *gyrA* mutations in 162 *C. jejuni* isolates by singlestrand conformation polymorphism and DNA sequencing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, p.2644–2647, 2002.
- IOVINE, N. M. Resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni*. **Virulence**, v. 4, n. 3, p. 230–240, 2013.
- LINTON, D. et al. Rapid Identification by PCR for the genus *Campylobacter* and of five *Campylobacter* species enteropathogenic for man and animals. **Research in Microbiology Institute Pasteur Elsevier**, v.147,p. 707-718, 1996.
- MENGOZZI, G. et al. Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after intravenous and intramuscular administrations in sheep. **American Journal of Veterinary Research**, v. 57, p. 1040-1043, 1996.

MEREDITH, H. et al. An evaluation of trisodium phosphate, citric acid and lactic acid cloacal wash treatments to reduce *Campylobacter*, total viable counts (TVC) and total enterobacteriaceae counts (TEC) on broiler carcasses during processing. **Food Control**, v. 32, n. 1, p. 149–152, 2013. doi:10.1016/j.foodcont.2012.11.026

MILLER, R. S. et al. DNA identification and characterization of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from caecal samples of chickens in Grenada. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 3, p. 1041–1049, 2010. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04507.x

MOURA, H. M. **Isolamento e análise de resistência e antimicrobianos de cepas de *Campylobacter jejuni* em amostras de carne de aves resfriadas comercializadas no Distrito Federal**. 2010. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) – Curso de Pós-graduação em saúde animal, Universidade de Brasília.

NACHAMKIN I. et al. Increasing fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni*, Pennsylvania, EUA, 1982- 2001. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, n.12, p1501–1503, 2002.

NCCLS. *Performance standars for antimicrobial disk susceptibility test approved standard*. 8 ed. Wayne, Pennsylvania-EUA, 2003.

NORSTRÖM, M. et al. Antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* from broilers and broiler house environments in Norway. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 3, p. 736–738, 2007. doi:10.1017/S0950268805004814

OBENG, A. S. et al. Antimicrobial susceptibilities and resistance genes in *Campylobacter* strains isolated from poultry and pigs in Australia. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 2, p. 294–307, 2012. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05354.x

PARKHILL, J. et al. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. **Nature**, v. 403, p.665–668, 2000.

PIDDOCK, L. J. V. et al. Fluoroquinolone resistance in *Campylobacter* species from man and

- animals: detection of mutations in topoisomerase genes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 51, p. 19-26, 2003. doi: 10.1093/jac/dkg033.
- PRICE, L.B. et al. Fluoroquinolone-Resistant *Campylobacter* Isolates from Conventional and Antibiotic-Free Chicken Products. **Environmental Health Perspectives**, v.113, p.557–560, 2005. doi: 10.1289/ehp.7647
- QIN, S. S. et al. Antimicrobial resistance in *Campylobacter coli* isolated from pigs in two provinces of China. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, n. 1, p. 94–98, 2011. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.035
- RUIZ, J. et al. Increased resistance to quinolones in *Campylobacter jejuni*: a genetic analyses of *gyrA* gene mutations in quinolone-resistant clinical isolates. **Microbiology and Immunology**, v.42, n.3, p.223-226, 1998.
- SAID, M. M. et al. Detection of *gyrA* mutation among clinical isolates of *Campylobacter jejuni* isolated in Egypt by MAMA PCR. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 4, n.9, p. 546-554, 2010.
- SAM, W.I.C.; LYONS, M.M.; WAGHORN, D.J. Increasing rates of ciprofloxacin resistant *Campylobacter*. **Journal of Clinical Pathology**, v.52, n.9, 709p, 1999.
- SMITH, K. E. et al. Quinolone-resistant *Campylobacter jejuni* infections in minnesota, 1992–1998. **The New England Journal of Medicine**. v. 340, n. 20, 1999.
- TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.30, p.2725–2729, 2013.
- WANG, J. et al. Prevalence and risk assessment of *Campylobacter jejuni* in chicken in china. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 26, n.4, p.243-248, 2013.
- WIECZOREK, K. & OSEK, J. Antimicrobial Resistance Mechanisms among *Campylobacter*. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–12, 2013. doi: 10.1155/2013/340605

WILSON, D.L. et al. Identification of ciprofloxacin-resistant *Campylobacter jejuni* by use of a fluorogenic PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p.3971–3978, 2000.

WINTERS, D. K. & SLAVIK, M. F. Evaluation of a PCR based assay for specific detection of *Campylobacter jejuni* in chicken washes. **Molecular and Cellular Probes**, v.9, p.307–310, 1995.

Tabela 1 – Ocorrência das mutações silenciosas e não silenciosas na Região Determinante de Resistência às Quinolonas do gene *gyrA* das 57 cepas estudadas.

Tipo da Mutação	Mudança no Nucleotídeo	Mudança de Aminoácido	Número de isoladas por espécie	
			<i>C. jejuni</i> (38 cepas)	<i>C. coli</i> (19 cepas)
Silenciosa	CAC → CAT	His-81 → His	8	---
	AGT → AGC	Ser-119 → Ser		
	GCC → GCT	Ala-120 → Ala		
	GGT → GGG	Gli-74 → Gli	29	---
	GGT → GGG	Gli-74 → Gli		
	GCT → GAT	Asp-75 → Asp	1	---
	CGT → AGT	Ser-79 → Ser		
	TTT → TTC	Fen-99 → Fen	---	19
	GCG → GCA	Ala-122 → Ala		
Não Silenciosa	ACA → ATA	Tre-86 → Ile	38	---
	ACT → ATT	Tre-86 → Ile	---	19

3.2 ARTIGO 2

Detecção de resistência às fluoroquinolonas em *Campylobacter* isolados de frangos de criação orgânica

Beatriz S. Frasao^{2*}, Luana R. Côrtes³, Elmiro R. Nascimento⁴, Nathalie C. Cunha⁴, Virginia L. Almeida⁴ e Maria Helena C. Aquino⁴

ABSTRACT. – Frasao B. S., Cortes L. R., Nascimento E. R., Cunha N. C., Almeida V. L. & Aquino M. H. C. 2014. [Detection of fluoroquinolone resistance in *Campylobacter* strains from organic poultry.] Detecção de resistência às fluoroquinolonas em *Campylobacter* isolados de frangos de criação orgânica. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Fluminense (UFF), Rua Vital Brasil Filho 64, Niterói, RJ 24 230-340, Brasil. E-mail: beatrizfrasao@id.uff.br;beatrizfrasao90@gmail.com

Cecal contents of 80 broilers from organic raising chickens, slaughtered under State Inspection Service (S.I.S) of the State of Rio de Janeiro, were collected and tested for the presence of *Campylobacter*. The determination of ciprofloxacin and enrofloxacin susceptibility was done by disk diffusion and agar dilution methods for determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). The detection of mutation in Quinolone Resistance Determinant Region (QRDR) in *gyrA* gene was done by sequencing. *Campylobacter* was isolated from 100% of the samples, being 68.75% and 31.25% corresponding *C. jejuni* and *C. coli*, respectively. By the disk diffusion method, resistance to ciprofloxacin was observed in all the isolates and 56.25% of the strains were resistant to enrofloxacin. By agar dilution method, all strains were resistant to ciprofloxacin (MIC \geq 16 μ g/mL a \geq 64 μ g/mL) and full and intermediate resistance to enrofloxacin was detected in 42.50% (MIC \geq 4-32 μ g/mL) and 38.75% (MIC=2 μ g/mL) of the strains, respectively. Mutation Thr-86-Ile, which confers resistance to quinolones, was observed in 100% of the isolates investigated. In addition to this mutation, others no silent mutations (Val-73-Glu, Ser-114-Leu, Val-88-Asp, Ala-75-Asp, Gly-119-Ser, Arg-79-Lys) and silent mutations (His-81-His, Ser-119-Ser, Ala-120-Ala, Phe-99-Phe, Ala-122-Ala, Gly-74-Gly, Ile-77-Ile, Ala-91-Ala, Leu-92-Leu, Val-93-Val, Ile-106-Ile, Thr-107-Thr, Gly-113-Gly, Ile-115-Ile, Gly-110-Gly) were detected. The enrofloxacin-sensitive strains by the phenotypic methods had the Thr-86 to Ile substitution, which suggests other mechanisms contributing to enrofloxacin resistance in *Campylobacter*.

INDEX TERMS: Sequencing, Quinolone Determine-Resistance Region of *gyrA* gene, Minimum Inhibitory Concentration.

RESUMO.- Foram coletadas 80 amostras de conteúdo cecal de frangos provenientes de criação orgânica, abatidos sob Serviço de Inspeção Estadual (S.I.E.) do Estado do Rio de Janeiro, para a pesquisa de *Campylobacter*. A determinação da suscetibilidade à ciprofloxacina e enrofloxacina foi feita pela técnica de difusão em disco, técnica de diluição em ágar para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e pela pesquisa da presença de mutação na Região Determinante de Resistência às Quinolonas (RDRQ) no gene *gyrA* através de sequenciamento. *Campylobacter* foi isolado a partir de 100% das amostras avaliadas, sendo 68,75% e 31,25% correspondentes a *C. jejuni* e *C. coli*, respectivamente. No teste de difusão em disco, foi observada resistência à ciprofloxacina em todas as cepas isoladas e 56,25% das cepas foram resistentes à enrofloxacina. No teste de diluição em ágar, todas as cepas foram resistentes à ciprofloxacina e apresentaram CIM \geq 16 - 64 μ g/mL. Para enrofloxacina, 42.50% das cepas foram resistentes (CIM \geq 4-32 μ g/mL) e 38,75% apresentaram resistência intermediária (CIM=2 μ g/mL). Foi observada a mutação Tre-86-Ile, que confere resistência às quinolonas, em 100% das cepas analisadas. Além dessa mutação, foram

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

² Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Fluminense (UFF), Rua Vital Brasil Filho 64, Niterói, RJ 24230-340, Brazil. *Corresponding author: beatrizfrasao@id.uff.br;beatrizfrasao90@gmail.com

³ Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense (UFF), Rua Vital Brasil Filho 64, Niterói, RJ 24230-340, Brazil.

⁴ Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública, Universidade Federal Fluminense (UFF), Rua Vital Brasil Filho 64, Niterói, RJ 24230-340, Brazil

observadas outras mutações não silenciosas (Val-73-Glu, Ser-114-Leu, Val-88-Asp, Ala-75-Asp, Ser-119-Gli, Arg-79-Lis) e mutações silenciosas (His-81-His, Ser-119-Ser, Ala-120-Ala, Fen-99-Fen, Ala-122-Ala, Gli-74-Gli, Ile-77-Ile, Ala-91-Ala, Leu-92-Leu, Val-93-Val, Ile-106-Ile, Tre-107-Tre, Gli-113-Gli, Ile-115-Ile, Gli-110-Gli). A observação de que cepas sensíveis à enrofloxacinina pelos testes fenotípicos apresentavam a substituição Tre-86 para Ile sugere que outros mecanismos podem contribuir para a resistência à enrofloxacinina em *Campylobacter*.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Sequenciamento, Região Determinante de Resistência às Quinolonas do gene *gyrA*, Concentração Inibitória Mínima.

INTRODUÇÃO

Campylobacter spp. está entre as bactérias que requerem grande atenção dos serviços de saúde coletiva, pois são patogênicas para humanos e são comumente encontradas no trato gastrointestinal das aves. A maioria das infecções por este microrganismo está associada ao consumo de carne de frango e seus subprodutos, que podem ser contaminados durante o processamento (Hermans et al. 2011, Hermans et al. 2012, Wagenaar et al. 2013). Para humanos, a espécie *C. jejuni* é considerada a mais patogênica além de ser, normalmente, mais frequente do que *C. coli* e coinfeções também podem ocorrer (Barbour et al. 2012, Niederer et al. 2011).

O número de campilobacteriose humana aumentou em todo o mundo, superando o número de salmonelose e shigelose (Cover et al 2014). Na União Européia em 2011, *Campylobacter* foi reportado como o patógeno bacteriano gastrointestinal mais isolado em humanos desde 2005 e foram confirmados 220.209 casos de campilobacteriose. Associado a este fato, as cepas isoladas de humanos apresentaram alta resistência à ampicilina, ciprofloxacina, ácido nalidíxico e tetraciclina e o mesmo foi observado quando se analisou o ácido nalidíxico e a tetraciclina em cepas isoladas de carnes de frango (EFSA & ECDC 2013).

A enrofloxacinina é um antimicrobiano muito usado na avicultura no Brasil, sendo o mais usado tanto na avicultura de corte quanto na de postura segundo relatos do Programa Estadual de Controle de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMvet) do Estado do Paraná (Machinski Junior et al. 2005). O uso excessivo e sem controle de antimicrobianos na produção animal pode contribuir para o aumento do número de bactérias resistentes, que podem ser disseminadas durante a produção ou processamento dos alimentos. Em razão disto, desde 2006, a União Européia e outras nações baniram o uso de alguns antimicrobianos na produção animal (EFSA, ECDC & EMEA 2009).

A resistência às quinolonas em *Campylobacter* está relacionada principalmente à mutação Tre-86-Ile na RDRQ do gene *gyrA* da DNA girase, como já foi descrito por vários autores (Yang et al. 2006, Qin et al. 2011, Iovine 2013, Frasco & Aquino 2014). Entretanto outras mutações (Tre-86-Ile, Asp-90-Asn, Ala-70-Tre, Asp-85-Tir, Pro-104-Ser) nessa região já foram descritas como relacionadas à resistência em *Campylobacter*, além de mutações no gene *parC*, da topoisomerase IV e da ação exacerbada da bomba de efluxo CmeABC devido à mutação no gene *cmeR* (Bachoual et al. 2001, Piddock et al. 2003, Yang et al. 2006, Qin et al. 2011, Wiczorek & Osek 2013; Iovine 2013; Hungaro et al. 2015).

No Brasil, a produção e comercialização dos produtos orgânicos foram aprovadas pela Lei 10.831, de 23 de dezembro de 2003 (Brasil 2003), porém sua regulamentação ocorreu apenas com a publicação do Decreto Nº 6.323 em 27 de dezembro de 2007 (Brasil 2007). Segundo a lei supracitada, o sistema orgânico de produção agropecuária adota técnicas específicas, visando otimizar os recursos naturais e socioeconômicos disponíveis, visando a sustentabilidade ecológica e econômica, minimizando as dependências de energia não renovável e empregando sempre que possível métodos culturais, biológicos ou mecânicos, evitando o uso de materiais sintéticos, não sendo permitido o uso de organismos geneticamente modificados e radiação ionizante, em qualquer fase do processo de produção, sempre protegendo o ambiente (Brasil 2003). Com o decreto, houve a implantação do Sistema Brasileiro de Avaliação da Conformidade Orgânica, integrado pelos Sistemas Participativos de Garantia da Qualidade Orgânica e pela Certificação por Auditoria, sendo identificado por um selo único em todo território nacional (Brasil 2007). O uso de antimicrobiano como promotor de crescimento na produção de carne orgânica é proibido (Crabone et al. 2005, Brasil, 2008) e tratamentos terapêuticos alternativos são realizados (Griggs & Jacob, 2005).

A criação orgânica de frangos de corte difere da criação convencional pelo fato do animal ter acesso ao ambiente, sendo uma criação “à pasto” (Rosenquist et al. 2013) e pela idade de abate ser mais avançada. Sendo assim, esses animais podem se infectar com *Campylobacter* presente no ambiente ou oriundo de aves silvestres. Estudos revelam uma prevalência de *Campylobacter* spp. em frangos de criação

orgânica entre 60% a 100% (Heuer et al. 2001, El-Shibiny et al. 2005, Overbeke et al. 2006, Colles et al. 2008, Esteban et al. 2008, Hoogenboom et al. 2008, EFSA 2010).

Face ao exposto, o objetivo desta pesquisa foi determinar a ocorrência de *Campylobacter jejuni* e *C. coli* em frangos de criação orgânica e determinar sua suscetibilidade à ciprofloxacina e enrofloxacinina através de métodos fenotípicos e genotípicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas 80 amostras do ceco de frangos de corte de criação orgânica provenientes de dois lotes (40 animais por lote). A coleta foi realizada imediatamente após a evisceração, na linha de abate, em abatedouro com Serviço de Inspeção Estadual (S.I.E.) do Estado do Rio de Janeiro. Suabes contendo as fezes foram diluídos em quatro mililitros de água destilada esterilizada e 0,3 mL foram inoculados em placas contendo Ágar Columbia suplementado com carvão ativado (0,4%) e suplemento seletivo CAMPYLOFAR® (CEFAR). Paralelamente, três mililitros da diluição foi previamente filtrada em membrana milipore (0,65µm) e o filtrado foi estriado nas placas com o meio de cultivo. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas, em condições de microaerofilia. As colônias suspeitas foram confirmadas pela técnica de PCR após identificação presuntiva pelas características morfotintórias e testes de produção de oxidase e catalase.

Para a confirmação por PCR, o DNA foi extraído com o kit de extração comercial 'Wizard® Genomic DNA Purification Kit' (PROMEGA®). De cada amostra, foi removida uma alça bacteriana e colocada em um mililitro de Caldo *Brucella* para a obtenção de uma concentração de 2×10^9 células (Mac Farland 4). Posteriormente, foram seguidas as recomendações do protocolo para o isolamento do DNA genômico de bactérias Gram-negativas. Para a identificação foi utilizada a técnica de PCR multiplex, baseada no que foi descrito por Harmon et al. (1997) modificada por Aquino et al. (2002). Dois pares de primers preparados pela Invitrogen foram utilizados: primers pg3/pg50 que amplificam uma região conservada nas duas espécies (*C. jejuni* e *C. coli*), relacionada ao gene da flagelina (Oyofe et al. 1992), e primers C-1 /C-4 que amplificam uma região específica da espécie *C. jejuni* (Winters & Slavik, 1995). A reação de amplificação foi feita com volume final de 50µL, contendo 5 µL do DNA amostral, 1X PCR Buffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl [pH 8.5]), 4 µL (200 µM cada) dATP, dCTP, dGTP e dTTP, 0,4 µM de cada primer pg3 e pg50 (gene *flaA*), 0,2 µM de cada primer C1 e C4 (gene da oxirredutase), 2,5 U de Taq DNA polymerase e 5,5 mM/L de MgCl₂. O termociclador "Thermo Electron Corporation - Px2 Thermal Cycler" foi utilizado para reação de amplificação. A desnaturação inicial foi realizada a 94°C por quatro minutos, seguida por 25 ciclos de amplificação constituídos em um minuto a 94°C, um minuto a 55°C, um minuto a 72°C e extensão a 72°C por sete minutos. Para a verificação dos amplicons, foi realizada eletroforese em cuba horizontal 'Electrophoresis Cell (BioAmérica)' com TBE 0,5x, com fonte Power Pac 300 (Bio-Rad), em gel de agarose 1,5% e o GelRed foi utilizado juntamente com o 'loading buffer' para corar as bandas amplificadas. Foi utilizado o peso molecular de 100 pb para comparar o tamanho das bandas amplificadas. Os produtos da amplificação foram visualizados e fotografados em um transiluminador com luz ultravioleta (Nova Instruments). Foram utilizadas como controle positivo as cepas de referência *C. jejuni* ATCC 33560 e *C. coli* ATCC 33559, gentilmente cedidas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/FIOCRUZ).

A sensibilidade de *Campylobacter jejuni* e *C. coli* à enrofloxacinina e ciprofloxacina foi determinada pelo método de difusão em disco e pelo método de difusão em ágar, para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de acordo com os critérios determinados pelo "Clinical and Laboratory Standards Institute" (CLSI 2010). As concentrações utilizadas foram 64 µg/mL, 32 µg/mL, 16 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL, 2 µg/mL e 1 µg/mL. A suspensão de *Campylobacter* inoculada foi ajustada ao equivalente a turbidez do padrão de McFarland 0.5. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas, em microaerofilia.

Todas as cepas isoladas foram submetidas ao sequenciamento da Região Determinante de Resistência às Quinolonas (RDRQ) do gene *gyrA*. A PCR foi realizada com primers específicos para amplificar a RDRQ do gene *gyrA*: *CjgyrA* QRDR F e *CjgyrA* QRDR R (Parkhill et al. 2000, Price et al. 2005). Para a reação foi utilizado 50µL contendo 5µL, 1X PCR Buffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl [pH 8.5]), 5µL (1mM cada) dATP, dCTP, dGTP e dTTP, 0,5µL de cada primer, 1.0 U Taq DNA polymerase e 2 mM MgCl₂. A reação de amplificação foi realizada no termociclador "Thermo Electron Corporation - Px2 Thermal Cycler", sendo feita desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos e 35 ciclos com desnaturação por 30 segundos a 94°C, anelamento do primer a 55°C por 30 segundos, extensão a 72°C por um minuto e extensão final a 72°C por 10 minutos. Para a visualização do produto da PCR, 6 µL do amplicon foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1,5%, com tampão TBE [1,0 M Tris, 0,01 M ácido bórico, 0,01 M EDTA, pH 8.2 (Invitrogen), e GelRed juntamente com o 'loading buffer'. A imagem foi visualizada e fotografada em transiluminador com luz ultravioleta (Nova Instruments). O produto da amplificação foi

purificado com Kit de Purificação Comercial da GE®, seguindo as instruções descritas no manual. A dosagem do DNA purificado foi realizada de acordo com o recomendado no protocolo “Low DNA Mass Ladder” (Invitrogen), sendo utilizado 4 µL do amplicon purificado para eletroforese nas condições já descritas. Foi utilizado sequenciador automático Sequenciador 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems) com 96 capilares e polímero POP-7 (Applied Biosystems). As sequências foram montadas através dos cromatogramas obtidos utilizando o BioEdit Sequence Alignment Editort (Hall 1999) e Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0-MEGA6 (Tamura et al. 2013). Para investigar a ocorrência de mutações foram utilizadas sequências de cepas sensíveis do GenBank de *C. jejuni* (L04566.1) e *C. coli* (U63413.1). Foram incluídas como controle as cepas *C. jejuni* ATCC 33560 e *C. coli* ATCC 33559, sensíveis à enrofloxacina e ciprofloxacina.

RESULTADOS

Campylobacter spp. foi isolado de 100% das amostras e através da técnica de PCR multiplex, *C. jejuni* foi identificado em 68,75% e *C. coli* em 31,25% das amostras. Nos dois lotes, a espécie mais isolada foi *C. jejuni*, sendo 82,50% no lote A e 55,00% no lote B (Quadro 1).

Na avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos no teste de difusão em disco 100% e 56,25% das cepas foram resistentes à ciprofloxacina e à enrofloxacina, respectivamente. No teste de diluição em ágar, todas as cepas foram resistentes à ciprofloxacina e apresentaram CIM variando de 16µg/mL a ≥64µg/mL Para a enrofloxacina, apenas 18,75% das cepas foram sensíveis (CIM ≤1µg/mL), enquanto 38,75% foram intermediárias (CIM=2µg/mL), sendo a maioria (42,50%) classificada como resistente (CIM≥4µg/mL). No lote A, a maioria das cepas apresentaram resistência à enrofloxacina pelos métodos de difusão em disco (72,50%) e diluição em ágar (67,50%), enquanto 7,5% apresentaram resistência intermediária. No lote B, 40,00% e 17,50% das cepas foram resistentes pelo teste de difusão em disco e CIM, respectivamente, enquanto 70% apresentaram resistência intermediária (Quadro 1). A maioria (74,07%) das cepas resistentes à enrofloxacina no teste de diluição em ágar do lote A apresentou CIM=4µg/mL. A maior CIM para enrofloxacina encontrada em ambos os lotes foi de 32µg/mL, sendo que apenas uma cepa em cada lote apresentou esta concentração, enquanto foi observada CIM para ciprofloxacina ≥ 64µg/mL.

Na pesquisa de mutação na Região Determinante de Resistência às Quinolonas (RDRQ) do gene *gyrA*, 100% das cepas apresentaram a mutação Tre-86-Ile. Outras mutações silenciosas (His-81-His, Ser-119-Ser, Ala-120-Ala, Fen-99-Fen, Ala-122-Ala, Gli-74-Gli, Ile-77-Ile, Ala-91-Ala, Leu-92-Leu, Val-93-Val, Ile-106-Ile, Tre-107-Tre, Gli-113-Gli, Ile-115-Ile, Gli-110-Gli) foram observadas em ambos os lotes e não silenciosas (Val-73-Glu, Ser-114-Leu, Val-88-Asp, Ala-75-Asp, Ser-119-Gli, Arg-79-Lis) também foram observadas em cepas isoladas dos frangos do lote B. Além das mutações por substituição citadas acima, no códon 73 foi observada mutação por deleção (GTG→G_G) em duas cepas (Figura 1).

DISCUSSÃO

A elevada ocorrência de *Campylobacter* spp. nos frangos de criação orgânica pode ser devido à idade de abate avançada, com maior exposição das aves ao ambiente devido ao tipo de criação, fatores estes previamente descritos como predisponentes para colonização de *Campylobacter* em aves de criação orgânica (Adkin et al. 2006). A mesma frequência em frangos de criação orgânica foi demonstrada por Cui et al. (2005), Luangtongkum et al. (2006) e Soonthornchaikul et al. (2006).

C. jejuni foi observado com mais frequência em ambos os lotes, resultado este que vai ao encontro de outros autores que também investigaram criações orgânicas (Luangtongkum et al. 2006) e outros que pesquisaram frangos de criação convencional (Garin et al. 2012, Obeng et al. 2012, Ugarte-Ruiz et al. 2012, Zendeabad et al. 2013). No entanto, Cui et al (2005) isolaram mais *C. coli* do que *C. jejuni* em frangos de criação orgânica e sugeriram a exposição a diferentes fontes ambientais, como a proximidade com criação de suínos um fator determinante para a maior ocorrência dessa espécie (El-Shibiny et al. 2005, Petersen et al. 2001).

No presente trabalho, todas as cepas foram resistentes à ciprofloxacina quando observada a CIM, variando entre 16µg/mL a ≥64µg/mL. Lehtopolku et al. (2005) e Schonberg-Norio et al. (2006), também obtiveram CIM = 64 µg/mL para ciprofloxacina em 94,70% das cepas de *Campylobacter* investigadas na Finlândia. Nesse estudo, a maioria das cepas foram classificadas como resistentes à enrofloxacina com CIM variando de 4µg/mL a 32µg/mL, sendo que 64,71% das cepas apresentaram CIM=4µg/mL, enquanto que 74,07% das cepas resistentes no lote A também apresentaram CIM=4µg/mL, demonstrando um nível de resistência inferior ao detectado para ciprofloxacina. A diferença entre os lotes observada na determinação da concentração inibitória mínima, sendo detectada maior número de cepas resistentes no

lote A e de cepas intermediárias no lote B, pode ser explicado pela mudança de fornecedores dos pintinhos adquiridos pelo produtor. O fato das cepas isoladas de criação orgânica no presente trabalho, supostamente sem uso de antimicrobianos, serem 100% resistentes e com alto nível de resistência à ciprofloxacina, pode estar relacionada com a persistência de cepas resistentes no ambiente de criação. Diversos estudos revelam que a CIM de *Campylobacter* rapidamente aumenta após o uso de fluoroquinolonas em criações avícolas e a resistência das cepas pode se manter por várias semanas após a supressão do tratamento. Essas cepas podem persistir tanto nas aves como no ambiente de criação (Humphrey & Jorgensen 2005).

Os resultados obtidos nesse estudo, embora incluam apenas criações orgânicas do Estado do Rio de Janeiro, onde supostamente não se fez uso de antimicrobianos, revelam a presença de cepas de *Campylobacter* resistentes às fluoroquinolonas na criação. No Brasil, estudos anteriores revelaram uma frequência de 95% das cepas isoladas de frango de corte resistentes à ciprofloxacina (Hungaro et al. 2014; Moura et al. 2013). Nesse estudo foi observada uma alta frequência e nível de resistência à ciprofloxacina e em menor nível à enrofloxacina. Outros trabalhos revelaram porcentagens bastante inferiores (8%) de cepas resistentes à ciprofloxacina em criações orgânicas nos EUA (Cui et al. 2005), e até mesmo ausência de resistência a este antimicrobiano tanto nos EUA como no Reino Unido (Luangtongkum et al. 2006, Soonthornchaikul et al. 2006). Em 2005, o Food and Drug Administration (FDA) nos EUA proibiu o uso das fluoroquinolonas na avicultura alegando que cepas de *Campylobacter* resistentes às fluoroquinolonas podiam ser transmitidas pela carne desses animais e causar infecção humana, sendo portanto uma ameaça à saúde coletiva. (FDA, 2014). Também Na Noruega e na Austrália onde não é permitido o uso desses antimicrobianos na avicultura, não foram detectadas cepas de *Campylobacter* resistentes às fluoroquinolonas em estudos realizados em abatedouros avícolas (Norström et al. 2007, Obeng et al. 2012). No Brasil, sabe-se que não é proibido o uso de enrofloxacina, medicamento de uso exclusivo em medicina veterinária, quando este tem fins terapêuticos na avicultura.

A mutação característica no códon 86 que substitui a treonina pela isoleucina (Tre-86-Ile) foi detectada em todas as cepas sequenciadas. Qin et al. (2011) revelaram relação da presença da mutação Tre-86-Ile com altos níveis de resistência à ciprofloxacina, enquanto Duarte et al. (2014) encontraram a mutação em todas as cepas que apresentaram resistência à ciprofloxacina em outros testes, sendo o mesmo observado por Stapleton et al. (2010). A ciprofloxacina é considerada um metabólito da enrofloxacina (Idowu et al, 2010) e a alta resistência observada nesse estudo pode estar relacionada ao uso frequente da enrofloxacina na avicultura, com persistência de cepas resistentes no ambiente de criação.

Nesse estudo 18,8% das cepas foram sensíveis à enrofloxacina (CIM $\leq 1\mu\text{g/mL}$). Em sua revisão, Možina et al (2011) relataram que alguns autores afirmam que além de mutações pontuais, a resistência a antimicrobianos pode ser conferida por bombas de efluxo, que bombeiam ativamente as moléculas dos fármacos evitando a acumulação intracelular necessária para a letalidade do microrganismo. Em *Campylobacter*, Hungaro et al. (2015) demonstraram a presença dos três genes requeridos para sintetizar o sistema de efluxo CmeABC em 90% das cepas analisadas. O uso de inibidores da bomba de efluxo no referido estudo resultou em uma significativa redução na CIM dos antimicrobianos testados incluindo a ciprofloxacina. Jeon et al. (2011) afirmam que a superexpressão do operon cmeGH em *C. jejuni*, relacionado ao gene cmeG que codifica um transportador na bomba de efluxo, aumentou significativamente a sua resistência às fluoroquinolonas. Cagliero et al. (2007) selecionaram um mutante de *Campylobacter jejuni* multirresistente através do aumento das concentrações de enrofloxacina *in vitro* e afirmaram que a bomba de efluxo CmeABC tem relação com a resistência neste microrganismo. Em *Campylobacter* a bomba de efluxo CmeABC foi também descrita como conferindo resistência a importantes antimicrobianos (Lin et al. 2005, Mu et al. 2013, Oh et al. 2014) e foi também classificada como responsável pela resistência de cepas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* à enrofloxacina (Wang et al. 2010).

Além da mutação Tre-86-Ile, que confere resistência às fluoroquinolonas, outras mutações não silenciosas por substituição foram detectadas em cepas do lote B (Val-73-Glu, Ala-75-Asp, Arg-79-Lis, Val-88-Asp, Ser-114-Leu, Ser-119-Gli) porém diferentes de outras mutações (Tre-86-Lis; Tre-86-Ala; Asp-90-Asn, Ala-70-Tre, Asp-85-Tir, Pro-104-Ser) já descritas na literatura como relacionadas à resistência de *Campylobacter* spp. às fluoroquinolonas (Wang et al. 1993, Barchoual et al. 2001, Hakanen et al. 2002, Wilson et al. 2000, Iovine 2013, Qin et al. 2011, Wieczorek & Osek 2013, Hungaro et al 2014). A mutação por deleção no códon 73 (GTG→G_G) observada em duas cepas de *C. jejuni* não foi aparentemente descrita anteriormente em cepas de *Campylobacter* resistentes à fluoroquinolonas. Mutações silenciosas são frequentemente descritas em cepas sensíveis e resistentes às fluoroquinolonas e dentre as mutações silenciosas identificadas no presente trabalho, a mutação Fen-99-Fen foi descrita em cepas de *C. coli* resistentes à quinolonas (Qin et al. 2011). As mutações His-81-His e Ser-119-Ser foram descritas

principalmente em cepas sensíveis às quinolonas (Beckmann et al. 2004) e a mutação Ala-120-Ala foi descrita em cepas sensíveis e resistentes (Wilson et al. 2000, Hakanen et al. 2002).

O mecanismo molecular da resistência de *Campylobacter* à enrofloxacin tem sido pouco explorado até o momento, excetuando o mecanismo que se refere à mutação Tre-86-Ile como responsável pela resistência às fluoroquinolonas. A presença dessa mutação em cepas sensíveis à enrofloxacin sugere a participação de outros mecanismos na aquisição de resistência frente a esse antimicrobiano. São necessárias portanto, investigações complementares relacionadas à participação da bomba de efluxo na aquisição dessa resistência, entre outros possíveis mecanismos.

CONCLUSÃO

Foi observada elevada frequência de *Campylobacter* spp. em frangos de criação orgânica, sendo a espécie predominante *C. jejuni*. O alto nível de resistência e a frequência de cepas de *Campylobacter* resistentes às fluoroquinolonas observados nesse estudo em frangos de criação orgânica sugere o uso indiscriminado desses antimicrobianos na avicultura, com persistência dessas cepas no ambiente. Outros possíveis mecanismos que conferem resistência à enrofloxacin além da mutação Tre-86-Ile no gene *gyrA* devem ser investigados.

Agradecimentos.- À doutorando do Programa de Pós-graduação em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal, Marion Pereira da Costa, pelo apoio em coleta. À estagiária do laboratório de doenças infecciosas da UFF, Luiza Curzio de Souza, pelo apoio em bancada. À Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-graduação e Inovação (PROPPI/FOPESQ). B. S. Frasco foi apoiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

- Adkin A., Hartnett E., Jordan L., Newell D. & Davison H. 2006. Use of a systematic review to assist the development of *Campylobacter* control strategies in broilers. *J. Appl. Microbiol.* 100:306–315.
- Aquino M.H.C., Filgueiras A.L.L., Ferreira M.C.S., Oliveira S.S., Bastos M.C. & Tibana A. 2002. Antimicrobial resistance and plasmid profiles of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from human and animal sources. *Lett. Appl. Microbiol.* 34:149–153.
- Barbour E.K., Ahmadieh D., Harakeh S. & Kumosani T. 2012. Impact of Antimicrobials use in chickens on emergence of drug-resistant *Campylobacter* organisms in humans. *Int. Arab. J. Antimicrob. Agents.* 2(4).
- Bachoual R., Ouabdesselam S., Mory F., Lascols C., Soussy C.J. & Tankovic J. 2001. Single or double mutational alterations of *gyrA* associated with fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Microb. Drug Resist.* 7: 257–261.
- Beckmann L., Müller M., Luber P., Schrader C., Bartelt E. & Klein G. 2004. Analysis 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. *J. Appl. Microbiol.* 96:1040–1047.
- Brasil. Lei nº 10831, de 23 de dezembro de 2003. Dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências. Publicado no Diário Oficial da União de 24/12/2003, Seção 1, Página 8.
- Brasil. Decreto nº 6.323, de 27 de dezembro de 2007. Regulamenta a Lei no 10.831, de 23 de dezembro de 2003, que dispõe sobre a agricultura orgânica, e dá outras providências. Publicado no Diário Oficial da União de 28/12/2007, Seção 1, Página 2.
- Brasil. Instrução Normativa nº 64, de 18 de dezembro de 2008. Aprova o regulamento técnico para os sistemas orgânicos de produção animal e vegetal. Publicado no Diário Oficial da União de 12/2009, Página 21.
- Cagliero C., Maurel M., Cloeckert A. & Payot S. 2007. Regulation of the expression of the CmeABC efflux pump in *Campylobacter jejuni*: identification of a point mutation abolishing the binding of the CmeR repressor in an in vitro -selected multidrug-resistant mutant. *FEMS Microbiol Lett.* 267:89–94. DOI:10.1111/j.1574-6968.2006.00558.x
- CLSI. 2010. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved guideline-Second Edition. CLSI document M45-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

- Colles F.M., Jones T.A., McCarthy N.D., Sheppard S.K., Cody A.J., Dingle K.E., Dawkins M.S. & Maiden M.C.J. 2008. *Campylobacter* infection of broiler chickens in a free-range environment. *Environ. Microbiol.* 10:2042–2050.
- Cover K.E., Ruiz S.A. & Chapman A.S. 2014. Reported gastrointestinal infections in the U.S. Air Force, 2000–2012. *MSMR* 21: 2–7.
- Crabone G.T., Moori R.G. & Sato G.S. 2005. Fatores relevantes na decisão de compra de frango caipira e seu impacto na cadeia produtiva. *Org. Rurais & Agroind.* 7(3):312-323
- Cui S., Ge B., Zheng J. & Meng J. 2005. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* Serovars in Organic Chickens from Maryland Retail Stores. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:4108–4111.
- Dalhoff A. 2012. Global Fluoroquinolone Resistance Epidemiology and Implications for Clinical Use. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 2012:1–37.
- Duarte A., Santos A., Manageiro V., Martins A., Fraqueza M.J., Caniça M., Domingues F.C. & Oleastro M. 2014. Human, food and animal *Campylobacter* spp. isolated in Portugal: High genetic diversity and antibiotic resistance rates. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 44:306–313.
- EFSA. (European Food Safety Authority), ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), EMEA, (European Medicines Agency). 2009. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. Joint Opinion on antimicrobial resistance (AMR) focused on zoonotic infections Scientific Opinion of the European Centre for Disease Prevention and Control; Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards; Opinion of the Committee for Medicinal Products for Veterinary Use; Scientific Opinion of the Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks, *EFSA J.*, 7 (11), 78 p.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2010. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses in the EU, 2008, part B: analysis of factors associated with *Campylobacter* colonisation of broiler batches and with *Campylobacter* contamination of broiler carcasses; and investigation of the culture method diagnostic characteristics used to analyse broiler carcass samples. *EFSA J.* 8 (8), 1522p.
- EFSA, (European Food Safety Authority), ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). 2013. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011; *EFSA J.*, 1(4): 250p.
- El-Shibiny A., Connerton P.L. & Connerton I.F. 2005. Enumeration and Diversity of *Campylobacters* and Bacteriophages Isolated during the Rearing Cycles of Free-Range and Organic Chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:1259–1266.
- Esteban J.I., Oporto B., Aduriz G., Juste R.A. & Hurtado A. 2008. A survey of food-borne pathogens in free-range poultry farms. *Int. J. Food. Microbiol.* 123:177–182.
- FDA (Food and Drug Administration). 2014. Enrofloxacin for Poultry. Disponível em <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/SafetyHealth/RecallsWithdrawals/ucm042004.htm>. Acesso em 21 nov. 2014.
- Frasao B. S. & Aquino M. H. C. 2014. *Campylobacter* spp. em aves (*Gallus gallus domesticus*) e suínos (*Sus domesticus*): resistência a antimicrobianos e importância na saúde coletiva. *Encicl. Biosf.* 10(18): 744-758.
- Garin B., Gouali M., Wouafo M., Perchec A-M., Thu P.M., Ravaonindrina N., Urbès F., Gay M., Diawara A., Leclercq A., Rocourt J. & Pouillot R. 2012. Prevalence, quantification and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. on chicken neck-skins at points of slaughter in 5 major cities located on 4 continents. *Int. J. Food. Microbiol.* 157:102–107.
- Griggs J.P. & Jacob J.P. 2005. Alternatives to antibiotics for organic poultry production. *J. Appl. Poultry Re.* 14(4):750-756.
- Hakanen A., Jalava J., Kotilainen P., Jousimies-Somer, H., Siitonen, A. & Huovinen P. 2002 *gyrA* polymorphism in *Campylobacter jejuni* : Detection of *gyrA* mutations in 162 *C. jejuni* isolates by Single-Strand Conformation Polymorphism and DNA sequencing. *Antimicrob Agents Ch.*46:2644–2647.
- Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Harmon K. M., Ransom G. M. & Wesley I. V. Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Prob.* 11:195-200.
- Hermans D., Van Deun K., Messens W., Martel A., Van Immerseel F., Haesebrouck F., Rasschaert G., Heyndrickx M. & Pasmans F. 2011. *Campylobacter* control in poultry by current intervention measures ineffective: Urgent need for intensified fundamental research. *Vet. Microbiol.* 152:219–228.

- Hermans D., Frank Pasmans F., Winy Messens W., An Martel A., Filip Van Immerseel F., Geertrui Rasschaert G., Marc Heyndrickx M., Kim Van Deun K. & Freddy Haesebrouck F. 2012. Poultry as a Host for the Zoonotic Pathogen *Campylobacter jejuni*. Vector Borne Zoonotic Dis. 12(2): 89-98.
- Heuer O.E., Pedersen K., Andersen J.S. & Madsen M. 2001. Prevalence and antimicrobial susceptibility of thermophilic *Campylobacter* in organic and conventional broiler flocks. Lett. Appl. Microbiol. 33:269-274.
- Hoogenboom L.A.P., Bokhorst J.G., Northolt M.D., van de Vijver L.P.L., Broex N.J.G., Mevius D.J., Meijs J.A.C. & Van der Roest J. 2008. Contaminants and microorganisms in Dutch organic food products: a comparison with conventional products. Food. Addit. Contam. Part. A. 25:1195-1207.
- Humphrey T.J., Jorgensen F., Frost J.A., Wadda H., Domingue G., Elviss N.C., Griggs D.J. & Piddock L.J.V. 2005. Prevalence and subtypes of ciprofloxacin-resistant *Campylobacter* spp. in commercial poultry flocks before, during and after treatment with fluoroquinolones. Antimicrob Agents Chemother. 49(2):690-698.
- Hungaro H.M, Mendonça R.C.S., Rosa V.O., Badaró A.C.L., Moreira M.A.S. & Chaves J.B.P. 2015. Low contamination of *Campylobacter* spp. on chicken carcasses in Minas Gerais state, Brazil: Molecular characterization and antimicrobial resistance. Food Control. 51:15-22.
- Idowu O.R., Peggins J.O., Cullison R. & von Bredow J. 2010. Comparative pharmacokinetics of enrofloxacin and ciprofloxacin in lactating dairy cows and beef steers following intravenous administration of enrofloxacin. Rs. Vet. Sc. 89:230-235.
- Iovine E, N. M. 2013. Resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni*. Virulence. 4(3):230-240.
- Jeon B., Wang Y., Hao H., Barton Y. & Zhang Q. 2011. Contribution of CmeG to antibiotic and oxidative stress resistance in *Campylobacter jejuni*. J Antimicrob Chemother. 66: 79-85.
- Lehtopolku M., Hakanen A.J., Siitonen A., Huovinen P. & Kotilainen P. 2005. In vitro activities of 11 fluoroquinolones against *Campylobacter jejuni* strains isolated from Finnish patients, with special reference to ciprofloxacin resistance. J Antimicrob Chemother. 56:1134-1138.
- Lin J., Michel L.O. & Zhang Q. 2002. CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. Antimicrob Agents Chemother. 46: 2124-31.
- Lin J., Akiba M., Sahin O. & Zhang Q. 2005. CmeR functions as a transcriptional repressor for the multidrug efflux pump CmeABC in *Campylobacter jejuni*. Antimicrob Agents Chemother. 49(3): 1067-1075.
- Logue C.M., Danzeisen G.T., Sherwood J.S., Thorsness J.L., Mercier B.M. & Axtman J.E. 2010. Repeated therapeutic dosing selects macrolide-resistant *Campylobacter* spp. in a turkey facility: Macrolide-resistant *Campylobacter* in turkey production. J. Appl. Microbiol. 109:1379-1388.
- Luangtongkum T., Morishita T.Y., Ison A.J., Huang S., McDermott P.F. & Zhang Q. 2006. Effect of Conventional and Organic Production Practices on the Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Campylobacter* spp. in Poultry. Appl. Environ. Microbiol. 72:3600-3607.
- Machinski Junior M., Benini A., Netto D.P, Nunes M.P., Vedovello Filho D., Benatto A., Scucato E.S., Machado E., Belmonte I.L., Alberton M., Lopes M.O. & Bosquioli S.L. 2005. Medicamentos Veterinários Utilizados na Avicultura de Postura no Estado do Paraná. Relatório Anual do PAMvet. 24p.
- Možina S.S., Kurinčič M., Klančnik A. & Mavri A. 2011. *Campylobacter* and its multi-resistance in the food chain. Trends. Food. Sci. Technol. 22:91-98.
- Mu Y., Shen Z., Jeon B., Dai L. & Zhang Q. 2013. Synergistic Effects of Anti-CmeA and Anti-CmeB Peptide Nucleic Acids on Sensitizing *Campylobacter jejuni* to Antibiotics. Antimicrob Agents Chemother. 57(9): 4575-4577.
- Niederer L., Kuhnert P., Egger R., Büttner S., Hächler H. & Korvzak B.M. 2011. Genotypes and Antibiotic Resistances of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Isolates from Domestic and Travel-Associated Human Cases. Appl. Environ. Microbiol. 78(1):288-291.
- Norström M., Hofshagen M., Stavnes T., Schau J., Lassen J. & Kruse H. 2007. Antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* from broilers and broiler house environments in Norway. J. Food Prot. 70(3):736-738.
- Obeng A.S., Rickard H., Sexton M., Pang Y., Peng H. & Barton M. 2012. Antimicrobial susceptibilities and resistance genes in *Campylobacter* strains isolated from poultry and pigs in Australia. J. Appl. Microbiol. 113:294-307.
- Oh E., Zhang Q. & Jeon B. 2014. Target optimization for peptide nucleic acid (PNA)-mediated antisense inhibition of the CmeABC multidrug efflux pump in *Campylobacter jejuni*. J Antimicrob Chemother. 69: 375-380.
- Overbeke I.V., Duchateau L., Zutter L.D., Albers G. & Ducatelle R. 2006. A Comparison Survey of Organic and Conventional Broiler Chickens for Infectious Agents Affecting Health and Food Safety. Avian. Dis. 50:196-200.

- Oyoyo B.A., Thornton S.A., Burr D.H., Pavlovskis O.R. & Guerry P. 1992. Specific detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30:2613–2619.
- Parkhill J., Wren B.W., Mungall K., Ketley J.M., Churcher C., Basham D., Chillingworth T., Davies R.M., Feltwell T. & Holroyd S. 2000. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature* 403:665–668.
- Petersen L., Nielsen E.M. & On S.L. 2001. Serotype and genotype diversity and hatchery transmission of *Campylobacter jejuni* in commercial poultry flocks. *Vet. Microbiol.* 82:141–154.
- Piddock L. J. V., Ricci V., Pumbwe L., Everett M. J. & Griggs D. J. 2003. Fluoroquinolone resistance in *Campylobacter* species from man and animals: detection of mutations in topoisomerase genes. *J. Antimicrob. Chemother.* 51:19–26.
- Price L.B., Johnson E., Vailes R. & Silbergeld E. 2005. Fluoroquinolone-Resistant *Campylobacter* Isolates from Conventional and Antibiotic-Free Chicken Products. *Environ. Health. Perspect.* 113:557–560.
- Qin S. S., Wu C. M., Wang Y., Jeon B., Shen Z. Q., Wang Y., Zhang Q. & Shen J. Z. 2011. Antimicrobial resistance in *Campylobacter coli* isolated from pigs in two provinces of China. *Int. J. Food Microbiol.* 146(1):94–98.
- Rosenquist H., Boysen L., Krogh A.L., Jensen A.N. & Nauta M. 2013. *Campylobacter* contamination and the relative risk of illness from organic broiler meat in comparison with conventional broiler meat. *Int. J. Food. Microbiol.* 162:226–230.
- Schonberg-Norio D., Hänninen M., Katila M., Kaukoranta S., Koskela M., Eerola E., Uksila J., Pajarre S. & Rautelin H. 2006. Activities of Telithromycin, Erythromycin, Fluoroquinolones and Doxycycline against *Campylobacter* Strains Isolated from Finnish Subjects. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50(3):1086–1088.
- Soonthornchaikul N., Garelick H., Jones H., Jacobs J., Ball D. & Choudhury M. 2006. Resistance to three antimicrobial agents of *Campylobacter* isolated from organically- and intensively-reared chickens purchased from retail outlets. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 27:125–130.
- Stapleton K., Cawthraw S.A., Cooles S.W., Coldham N.G., La Ragione R.M., Newell D.G. & Ridley A.M. 2010. Selecting for development of fluoroquinolone resistance in a *Campylobacter jejuni* strain 81116 in chickens using various enrofloxacin treatment protocols. *J. Appl. Microb.* 109:1132–1138.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. & Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725–2729.
- Ugarte-Ruiz M., Gómez-Barrero S., Porrero M.C., Álvarez J., García M., Comerón M.C., Wassenaar T.M. & Domínguez L. 2012. Evaluation of four protocols for the detection and isolation of thermophilic *Campylobacter* from different matrices: Protocols for isolation of *Campylobacter*. *J. Appl. Microbiol.* 113:200–208.
- Wagenaar J.A., French N.P. & Havelaar A.H. 2013. Preventing *Campylobacter* at the source: why is it so difficult? *Clin. Infect. Dis.* 57(11):1600–1606.
- Wang Y., Huang W.M. & Taylor D.E. 1993. Cloning and nucleotide sequence of the *Campylobacter jejuni gyrA* gene and characterization of quinolone resistance mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:457–463.
- Wang Y., Chan J. P., Yeh K., Chang C., Hsuan S., Hsieh Y., Chang Y., Lai T., Lin W. & Chen T. 2010. Molecular characterization of enrofloxacin resistant *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates. *Vet. Microbiol.* 142:309–312.
- Wieczorek K. & Osek J. 2013. Antimicrobial Resistance Mechanisms among *Campylobacter*. *BioMed Res. Int.l.* 13:1–12.
- Wilson D.L., Abner S.R., Newman T.C., Mansfield L.S. & Linz, J. E. 2000. Identification of ciprofloxacin-resistant *Campylobacter jejuni* by use of a fluorogenic PCR assay. *J. of Clin. Microbiol.* 38:3971–3978.
- Winters D. K. & Slavik M. F. 1995. Evaluation of a PCR based assay for specific detection of *Campylobacter jejuni* in chicken washes. *Mol. Cell. Prob.* 9: 307–310.
- Yang M., Sahin O., Lin J. & Zhang Q. 2006. Role of the CmeABC efflux pump in the emergence of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* under selection pressure. *J. Antimicrob. Chemother.* 58:1154–1159.
- Zendehbad B., Arian A.A. & Alipour A. 2013. Identification and antimicrobial resistance of *Campylobacter* species isolated from poultry meat in Khorasan province, Iran. *Food. Control.* 32:724–727.

Legendas das Figuras

Fig.1. Alinhamento das diferentes sequencias obtidas com o sequenciamento da Região Determinante de Resistência às Quinolonas (RDRQ) do gene *gyrA* das cepas de *C. jejuni* e *C. coli* isoladas dos frangos de criação orgânica. Sendo *C. jejuni* (L04566.1) e *C. coli* (U63413.1) padrões sensíveis obtidos no GenBank, e o restante os isolados do presente trabalho. As alterações caracterizadas como não silenciosas estão representadas com um traço abaixo da mudança observada, e as demais são caracterizadas como silenciosas.

O Quadro

Quadro 1 Resultados do isolamento e da suscetibilidade das cepas de *C. jejuni* e *C. coli* à enrofloxacin pelo método de difusão em disco e pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

TESTES			<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	Total
LOTE A	Isolamento		33 (82,50%)	7 (17,50%)	40 (100%)
	Difusão em disco	Resistente	25 (62,50%)	4 (10,00%)	29 (72,50%)
		Sensível	8 (20,00%)	3 (7,50%)	11 (27,50%)
	CIM	Resistente	23 (57,50%)	4 (10,00%)	27 (67,50%)
		Intermediária	2 (5,00%)	1 (2,50%)	3 (7,50%)
		Sensível	8 (20,00%)	2 (5,00%)	10 (25,00%)
LOTE B	Isolamento		22 (55,00%)	18 (45,00%)	40 (100%)
	Difusão em disco	Resistente	8 (20,00%)	8 (20,00%)	16 (40,00%)
		Sensível	14 (35,00%)	10 (25,00%)	24 (60,00%)
	CIM	Resistente	4 (10,00%)	3 (7,50%)	7 (17,50%)
		Intermediária	15 (37,50%)	13 (32,50%)	28 (70,00%)
		Sensível	3 (7,50%)	2 (5,00%)	5 (12,50%)
TOTAL	Isolamento		55 (68,75%)	25 (31,25%)	80 (100%)
	Difusão em disco	Resistente	33 (41,25%)	12 (15,00%)	45 (56,25%)
		Sensível	22 (27,50%)	13 (16,25%)	35 (43,75%)
	CIM	Resistente	27 (33,75%)	7 (8,75%)	34 (42,50%)
		Intermediária	17 (21,25%)	14 (17,50%)	31 (38,75%)
		Sensível	11 (13,75%)	4 (5,00%)	15 (18,75%)

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse estudo observou-se alta frequência de *Campylobacter* spp. em frangos de corte de criação orgânica, sendo *C. jejuni* a espécie mais isolada.

A elevada frequência e nível de resistência à ciprofloxacina, encontrada em todas as cepas e a resistência à enrofloxacin observada na maioria das cepas investigadas ressaltam o provável uso indiscriminado de fluoroquinolonas na produção avícola. A frequência e o nível de resistência à enrofloxacin observados foram inferiores aos da ciprofloxacina, o que pode ser resultante do contato das cepas de *Campylobacter* com o metabólito ciprofloxacina, quando na administração da enrofloxacin, antimicrobiano de uso veterinário.

A detecção da mutação Tre-86-Ile no gene *gyrA* nas cepas sensíveis e resistentes à enrofloxacin, considera-se que esteja ocorrendo a participação de outros possíveis mecanismos na aquisição de resistência frente a esse antimicrobiano.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AÇIK, M. N.; ÇETINKAYA, B. Heterogeneity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains from health sheep. *Veterinary Microbiology*, n.115, p.370-375, 2006.
- ADKIN A., HARTNETT E., JORDAN L., NEWELL D.; DAVISON H. Use of a systematic review to assist the development of *Campylobacter* control strategies in broilers. *Journal of Applied Microbiology*, v.100, p.306–315, 2006.
- ADLER-MOSCA, H.; ALTWEGG, M. Fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from human faeces in Switzerland. *Journal of Infection*, v. 23, n. 3, p. 341–342, 1991.
- ALFREDSON, D.; KOROLIK, V. Antibiotic resistance and resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *FEMS Microbiology Letters*, v.277, p.123–132, 2007.
- ALTE, M. A.; THOMÉ S.; ABREU, B. R. R.; LEHMANN, M.; DIHL, R. R. Avaliação da atividade tóxico-genética da enrofloxacin. *Revista de Iniciação Científica da ULBRA*, n.10, 2012.
- ANON. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ); scientific opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. *EFSA Journal*, v. 9, n.4, p. 10-141, 2011.
- APPELBAUM, P. C.; HUNTER, P. A. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 16, n. 1, p. 5–15, 2000.
- AQUINO, M.H.C.; FILGUEIRAS, A.L.L.; FERREIRA, M.C.S.; OLIVEIRA, S.S.; BASTOS M.C.; TIBANA A. Antimicrobial resistance and plasmid profiles of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from human and animal sources. *Letter Applied Microbiology*, v.34, p.149–153, 2002.
- BACHOUAL, R.; OUABDESSELAM. S.; MORY, F.; LASCOLS, C.; SOUSSY, C. J.; TANKOVIC, J. Single or double mutational alterations of *gyrA* associated with fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Microbial Drug Resistance*, v.7, p.257–261, 2001.
- BADARÓ, A. C. L. *Qualidade de carcaças de frango de abatedouros do estado de Minas Gerais: Ocorrência de Campylobacter jejuni e perfil de resistência a antimicrobianos*. 2013. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Curso de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa.

BARBOUR, E. K.; AHMADIEH, D.; HARAKEH, S.; KUMOSANI, T. Impact of Antimicrobials use in chickens on emergence of drug-resistant *Campylobacter* organisms in humans. *The Internacional Arabic Journal of Antimicrobial Agents*, v.2, n.4, 2012.

BARROS E. G., MACHADO A. R. L., BITTENCOURT H., CARAMORI M. L. A. *Antimicrobianos: consulta rápida*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed; 2001.

BECKMANN, L.; MÜLLER, M.; LUBER, P.; SCHRADER, C.; BARTELT, E.; KLEIN, G. Analysis 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, n. 2, p. 194–201, 2011.

BOLTON, D; MEREDITH, H.; WALSH, D.; MCDOWELL, D. Poultry Food Safety Control Interventions in the Domestic Kitchen: Poultry Food Safety. *Journal of Food Safety*, v. 34, n. 1, p. 34–41, 2014.

BRASIL . Instrução Normativa nº 64, de 18 de dezembro de 2008. Aprova o regulamento técnico para os sistemas orgânicos de produção animal e vegetal. Publicado no *Diário Oficial [da] União* de 12/2009, Página 21.

_____. Decreto nº 6.323, de 27 de dezembro de 2007. Regulamenta a Lei no 10.831, de 23 de dezembro de 2003, que dispõe sobre a agricultura orgânica, e dá outras providências. Publicado no *Diário Oficial [da] União* de 28/12/2007, Seção 1, Página 2.

_____. *Instrução Normativa SDA nº 11*, de 07 de maio de 2014. Publica o Subprograma de Monitoramento em Carnes (Bovina, Aves, Suína e Equina) Leite, Pescado, Mel e Ovos para o exercício de 2014, referente ao Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes – PNCRC.

_____. Lei nº 10831, de 23 de dezembro de 2003. Dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências. Publicado no *Diário Oficial [da] União* de 24/12/2003, Seção 1, Página 8.

CAGLIERO, C.; MAUREL, M.; CLOECKAERT, A.; PAYOT, S. Regulation of the expression of the CmeABC efflux pump in *Campylobacter jejuni* : identification of a point mutation abolishing the binding of the CmeR repressor in an in vitro – selected multidrug-resistant mutant. *FEMS Microbiology Letter*, v.267,p. 89–94, 2007.

CANTÓN, R.; MOROSINI, M.-I. Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics: Emergence of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 35, n. 5, p. 977–991, 2011.

CDC. *Centers for Disease Control and Prevention*. Disponível em:

<<http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/campylobacter/>>. Acesso em: 12 nov. 2013.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. *Campylobacter*. Disponível em:

<<http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/campylobacter/>>. Acesso em: 12 de nov. de 2014.

CHEN, X.; NAREN, G.; WU, C.; WANG, Y.; DAI, L.; XIA, L.; LUO, P.; ZHANG, Q.; SHEN, J. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolates in broilers from China. *Veterinary Microbiology*, v. 144, n. 1-2, p. 133–139, 2010.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved guideline-Second Edition. *CLSI document M45-A2*. 2010.

COLLES, F. M.; JONES, T. A.; MCCARTHY, N. D.; SHEPPARD, S. K.; CODY, A. J.; DINGLE, K.E.; DAWKINS, M. S.; MAIDEN, M. C. *Campylobacter* infection of broiler chickens in a free-range environment. *Environmental Microbiology*, v. 10, n. 8, p. 2042–2050, 2008.

COVER, K. E.; RUIZ, S. A.; CHAPMAN, A. S. 2014. Reported gastrointestinal infections in the U.S. Air Force, 2000–2012. *MSMR*, v.21, p. 2–7, 2014.

CRABONE, G. T.; MOORI, R. G.; SATO, G. S. Fatores relevantes na decisão de compra de frango caipira e seu impacto na cadeia produtiva. *Organizações Rurais & Agroindustriais*, v.7, n.3, p.312-323, 2005.

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

DALHOFF A. Global Fluoroquinolone Resistance Epidemiology and Implications for Clinical Use. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. v.2012, p.1–37, 2012.

DUARTE, A.; SANTOS, A.; MANAGEIRO, V.; MARTINS, A.; FRAQUEZA, M. J.; CANIÇA, M.; DOMINGUES, F. C.; OLEASTRO M. Human, food and animal *Campylobacter* spp. isolated in Portugal: High genetic diversity and antibiotic resistance rates. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 44, n. 4, p. 306–313, 2014.

EFSA (European Food Safety Authority). Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses in the EU, 2008, part B: analysis of factors associated with *Campylobacter* colonisation of broiler batches and with *Campylobacter* contamination of broiler carcasses; and investigation of the culture method diagnostic characteristics used to analyse broiler carcass samples. *EFSA Journal*, v.8, n.8, 1522p., 2010.

EFSA (European Food Safety Authority); ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control); EMEA (European Medicines Agency). Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. Joint Opinion on antimicrobial resistance (AMR) focused on zoonotic infections Scientific Opinion of the European Centre for Disease Prevention and Control; Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards; Opinion of the Committee for Medicinal Products for Veterinary Use; Scientific Opinion of the Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks, *EFSA Journal*, v.7, n.11, 78 p, 2009.

EFSA (European Food Safety Authority); ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011; *EFSA Journal*, v. 1, n. 4, 250 p, 2013.

EL-SHIBINY, A.; CONNERTON, P. L.; CONNERTON, I. F. Enumeration and Diversity of Campylobacters and Bacteriophages Isolated during the Rearing Cycles of Free-Range and Organic Chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 3, p. 1259–1266, 2005.

EMEA. *European Medicines Agency*. Veterinary Medicines and Inspections. Committee for Medicinal Products For Veterinary Use (CVMP). Reflection Paper on the Use of Fluoroquinolones in Food-Producing Animals in the European Union: Development of Resistance and Impact on Human and Animal Health. London, 18 Jan. 2006, 23p.

ENDTZ, H. P. RUIJS, G. J.; VAN KLINGEREN, B.; JANSEN, W. J.; VAN DER REYDEN, T.; MOUTAN, R. P. Quinolone resistance in *Campylobacter* isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. *Antimicrobial Chemotherapy*, n. 27, p.199–208, 1991.

ENGBERG, J.; AARESTRUP, F. M.; TAYLOR, D. E.; GERNER-SMIDT, P.; NACHAMKIN, I. Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates. *Emerging Infectious Diseases Journal*, v.7, p.24-34, 2011.

ESTEBAN, J. I.; OPORTO, B.; ADURIZ, G.; JUSTE, R. A.; HURTADO, A. A survey of food-borne pathogens in free-range poultry farms. *International Journal of Food Microbiology*, v. 123, n. 1-2, p. 177–182, 2008.

EUZÉBY, J. P. 2010. *List of prokaryotic names with standing in nomenclature: genus Campylobacter*. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/campylobacter.html>>. Acesso em 20 de dez.de 2013.

EUZÉBY, J. P. 2014. *List of prokaryotic names with standing in nomenclature: genus Campylobacter*. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/campylobacter.html>>. Acesso em 13 de mar. de 2014.

FDA (Food and Drug Administration). 2014. *Enrofloxacin for Poultry*. Disponível em: <<http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/SafetyHealth/RecallsWithdrawals/ucm042004.htm>>. Acesso em 21 nov. 2014.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia de Alimentos*. São Paulo: Editora Atheneu, 2008, 182p.

FRANCO, R. M. *Agentes Etiológicos de Doenças Alimentares*. Niterói- Rio de Janeiro: Editora da UFF, 2012, 120p.

FRASAO, B. S.; AQUINO, M. H. C. *Campylobacter spp.* em aves (*Gallus gallus domesticus*) e suínos (*Sus domesticus*): resistência a antimicrobianos e importância na saúde coletiva. *Enciclopédia Biosfera*, v.10, n.18, p.744-758, 2014.

GARIN, B.; GOUALI, M.; WOUAFO, M.; PERCHEC, A-M.; THU, P. M.; RAVAONINDRINA, N.; URBÈS, F.; GAY, M.; DIAWARA, A.; LECLERCQ, A.; ROCOURT, J.; POUILLOT, R. Prevalence, quantification and antimicrobial resistance of *Campylobacter spp.* on chicken neck-skins at points of slaughter in 5 major cities located on 4 continents. *Internacional Journal of Food Microbiology*, v.157, p.102–107, 2012.

GE, B.; MCDERMOTT, P. F.; WHITE, D. G.; MENG, J. Role of Efflux Pumps and Topoisomerase Mutations in Fluoroquinolone Resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, n. 8, p. 3347–3354, 2005.

GERMANO, P. M.; GERMANO, M. I. S. *Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos: qualidade das matérias-primas, doenças transmitidas por alimentos, treinamento de recursos humanos*. 4ª ed. Barueri-SP: Manole, 2011, 1034p.

GHARST, G.; OYARZABAL, O. A.; HUSSAIN, S. K. Review of current methodologies to isolate and identify *Campylobacter spp.* from foods. *Journal of Microbiological Methods*, v. 95, n. 1, p. 84–92, 2013.

GOERING, R. V. Pulsed field gel electrophoresis: A review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 10, n. 7, p. 866–875, 2010.

GONZALES, E. Ação Pró-nutritiva dos aditivos alimentares. In: *Curso de Fisiologia da Digestão e Metabolismo dos Nutrientes em Aves*. Faculdades de Ciências Agrárias e Veterinária- UNESP, Jaboticabal- São Paulo, 2004, 56 p.

GONZALEZ, I. GRANT, K. A.; RICHARDSON, P. T.; PARK, S. F.; COLLINS, M. D. Specific identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using a PCR test based on the *ceuE* gene encoding a putative virulence determinant. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 35, n. 3, p. 759–763, 1997.

GOODWIN, C.S.; ARMSTRONG, J.A.; CHILVERS, T.; PETERS, M.; COLLINS, M.D.; SLY, L.; MCCONNELL, W.; HARPER, W.E.S. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.39, p.397-405, 1989.

GRIGGS, J. P.; JACOB, J. P. Alternatives to antibiotics for organic poultry production. *Journal off Applied Poultry Research*, v.14, n.4, p.750-756, 2005.

HAKANEN, A.; JALAVA, J.; KOTILAINEN, P.; JOUSIMIES-SOMER, H.; SIITONEN, A.; HUOVINEN P. *gyrA* Polymorphism in *Campylobacter jejuni*: Detection of *gyrA* Mutations in 162 *C. jejuni* Isolates by Single-Strand Conformation Polymorphism and DNA Sequencing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, n. 8, p. 2644–2647, 2002.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, v.41,p.95-98, 1999.

HARMON, K. M.; RANSOM, G. M.; WESLEY I. V. Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes*, v.11, p.195-200, 1997.

HERMANS, D.; PASMANS, F.; MESSENS, W.; MARTEL, A.; VAN IMMERSEEL, F.; RASSCHAERT, G.; HEYNDRIKX, M., VAN DEUN, K.; HAESBROUCK, F. Poultry as a Host for the Zoonotic Pathogen *Campylobacter jejuni* . *Vector Borne Zoonotic Disease*, v.12, n.2, p. 89-98, 2012.

HERMANS D., VAN DEUN K., MESSENS W., MARTEL A., VAN IMMERSEEL F., HAESBROUCK F., RASSCHAERT G., HEYNDRIKX M. & PASMANS F. *Campylobacter* control in poultry by current intervention measures ineffective: Urgent need for intensified fundamental research. *Veterinary Microbiology*, v.152, p.219–228, 2011.

HEUER, O. E.; PEDERSEN, K.; ANDERSEN, J. S.; MADSEN, M. Prevalence and antimicrobial susceptibility of thermophilic *Campylobacter* in organic and conventional broiler flocks. *Letters in Applied Microbiology*, v. 33, n. 4, p. 269–274, 2001.

HIGGINS, P.G.; FLUIT, A.C.; SCHMITZ, F.J. Fluoroquinolones: structure and target sites. *Current Drug Targets*: v.4, p.181-189, 2003.

HOOGENBOOM, L. A. P.; BOKHORST, J. G.; NORTHOLT, M. D.; VAN DE VIJVER, L. P.; BROEX, N. J.; MEVIUS, D. J.; MEIJS, J. A.; VAN DER ROEST, J. Contaminants and

microorganisms in Dutch organic food products: a comparison with conventional products. *Food Additives & Contaminants: Part A*, v. 25, n. 10, p. 1195–1207, 2008.

HOPKINS, K. L.; DAVIES, R. H.; THRELFALL, E. J. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *International Journal of Antimicrobial Agents*, Amsterdam, 2005. v. 25, n. 5, p. 358-373.

HORQUINI, A. *Microbiologia: Quinolonas*. 2009. Disponível em: <<http://microbiologiabrasil.blogspot.com.br/2009/12/quinolonas.html>>. Acesso em: 14/11/2014.

HUMPHREY T.J., JORGENSEN F., FROST J.A., WADDA H., DOMINGUE G., ELVISS N.C., GRIGGS D.J. & PIDDOCK L.J.V. Prevalence and subtypes of ciprofloxacin-resistant *Campylobacter* spp. in commercial poultry flocks before, during and after treatment with fluoroquinolones. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v.49, n.2, p.690-698, 2005.

HUNGARO, H.M; MENDONÇA, R.C.S.; ROSA, V.O.; BADARÓ, A.C.L.; MOREIRA, M.A.S.; CHAVES J.B.P. 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.

IDOWU, O.R.; PEGGINS, J.O.; CULLISON, R.; VON BREDOW, J. Comparative pharmacokinetics of enrofloxacin and ciprofloxacin in lactating dairy cows and beef steers following intravenous administration of enrofloxacin. *Research in Veterinary Science*, v.89, p.230-235, 2010.

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

ISHIDA, Y.; AHMED, A. M.; MAHFOUZ, N. B.; KIMURA, T.; EL-KHODERY, S. A.; MOAWAD, A. A.; SHIMAMOTO, T. Molecular Analysis of Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Bacteria Isolated from Fish Farms in Egypt. *The Journal of Veterinary Medical Science*. v.72, n.6, p. 727–734, 2010.

JEON B., WANG Y., HAO H., BARTON Y. & ZHANG Q. Contribution of CmeG to antibiotic and oxidative stress resistance in *Campylobacter jejuni*. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy*, v.66, p.79–85, 2011.

JESSE, T. W.; ENGLER, M. D.; PITTENGER-ALLEY, L. G.; FEDORKA-CRAY, P. J. Two distinct mutations in *gyrA* lead to ciprofloxacin and nalidixic acid resistance in *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* isolated from chickens and beef cattle. *Journal of Applied Microbiology*, v. 100, n. 4, p. 682–688, 2006.

KHAN, M. K.; KHAN, M. F.; MUSTAFA, G.; SUALAH M. Comparison of High-Pressure Liquid Chromatography and microbiological assay for determination of ciprofloxacin tablets

in human plasma employed in bioequivalence and pharmacokinetics study. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.25, n.1, p. 81-88, 2012.

LEHTOPOLKU, M.; HAKANEN, A.J.; SIITONEN, A.; HUOVINEN, P.; KOTILAINEN, P. In vitro activities of 11 fluoroquinolones against *Campylobacter jejuni* strains isolated from Finnish patients, with special reference to ciprofloxacin resistance. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy*, v.56, p.1134–1138, 2005.

LIN, J.; AKIBA, M.; SAHIN, O.; ZHANG, Q. CmeR functions as a transcriptional repressor for the multidrug efflux pump CmeABC in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.49, n.3, p. 1067–1075, 2005.

LIN J., MICHEL L.O. & ZHANG Q. CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.46, p. 2124–31, 2002.

LINTON, D.; OWEN, R. J.; STANLEY, J. Rapid Identification by PCR for the genus *Campylobacter* and of five *Campylobacter* species enteropathogenic for man and animals. *Research in Microbiology Institute Pasteur Elsevier*, v.147, p. 707-718, 1996.

LOGUE, C. M.; DANZEISEN, G. T.; SHERWOOD, J. S.; THORSNESS, J. L.; MERCIER, B. M.; AXTMAN, J. E. Repeated therapeutic dosing selects macrolide-resistant *Campylobacter* spp. in a turkey facility: Macrolide-resistant *Campylobacter* in turkey production. *Journal of Applied Microbiology*, v.109, p.1379–1388, 2010.

LUANGTONGKUM, T.; MORISHITA, T. Y.; ISON, A. J.; HUANG, S.; MCDERMOTT, P. F.; ZHANG, Q. 2006. Effect of Conventional and Organic Production Practices on the Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Campylobacter* spp. in Poultry. *Applied and Environmental Microbiology*, v.72, p.3600–3607.

MACHINSKI JUNIOR, M.; BENINI, A.; NETTO, D. P.; NUNES, M. P.; VEDOVELLO FILHO, D.; BENATTO, A.; SCUCATO, E. S.; MACHADO, E.; BELMONTE, I. L.; ALBERTON, M.; LOPES, M. O.; BOSQUIROLI, S. L. Medicamentos Veterinários Utilizados na Avicultura de Postura no Estado do Paraná. *Relatório Anual do PAMvet*. 24p., 2005.

MENGOZZI, G.; INTORRE, L.; BERTINI, S.; SOLDANI, G. Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after intravenous and intramuscular administrations in sheep. *American Journal of Veterinary Research*, v. 57, p. 1040-1043, 1996.

MEREDITH, H.; MCDOWELL, D.; BOLTON, D. J. An evaluation of trisodium phosphate, citric acid and lactic acid cloacal wash treatments to reduce *Campylobacter*, total viable counts (TVC) and total enterobacteriaceae counts (TEC) on broiler carcasses during processing. *Food Control*, v. 32, n. 1, p. 149–152, 2013.

- MILLER, R. S.; MILLER, W. G.; BEHRINGER, M.; HARIHARAN, H.; MATTHEW, V.; OYARZABAL, O.A. DNA identification and characterization of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from caecal samples of chickens in Grenada. *Journal of Applied Microbiology*, v. 108, n. 3, p. 1041–1049, 2010.
- MITCHELL, M. A. Enrofloxacin. *Journal of Exotic Pet Medicine*, v. 15, n. 1, p. 66–69, 2006.
- MOORE, J. E.; CORCORAN, D.; DOOLEY, J. S. G.; FANNING, S.; LUCEY, B.; MATSUDA, M.; MCDOWEL, D. A.; MÉGRAUD, F.; MILLAR, B. C., O'RIORDAN, L.; O'ROURKE, M.; RAO, J. R.; ROONEY, P. J.; SAILS, A.; WHYTE, P. *Campylobacter. Veterinary Research*, v. 36, n. 3, p. 351–382, 2005.
- MORIANA, J. C. E.; CÁRDENAS, M. J. S.; RACERO, I. T. Sulfamidas, Cotrimoxazol, Quinolonas. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, v.8, n.72, p.3887-3896, 2002.
- MOURA, H. M. *Isolamento e análise de resistência e antimicrobianos de cepas de Campulobacter jejuni em amostras de carne de aves resfriadas comercializadas no Distrito Federal*. 2010. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) – Curso de Pós-graduação em saúde animal, Universidade de Brasília.
- MOURA, H. M.; SILVA, P. R.; da SILVA, P. H. C.; SOUZA, N. R., RACANICCI, A. M. C.; SANTANA, A. P. Antimicrobial Resistance of *Campylobacter jejuni* Isolated from Chicken Carcasses in the Federal District, Brazil. *Journal of Food Protection*, n.4, p.691-693, 2013.
- MOŽINA, S. S.; KURINČIČ, M.; KLANČNIK, A.; MAVRI, A. *Campylobacter* and its multi-resistance in the food chain. *Trends in Food Science & Technology*, v.22, p.91–98, 2011.
- MU, Y.; SHEN, Z.; JEON, B.; DAI, L.; ZHANG, Q. Synergistic Effects of Anti-CmeA and Anti-CmeB Peptide Nucleic Acids on Sensitizing *Campylobacter jejuni* to Antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*, v.57, n.9, p.4575–4577, 2013.
- NACHAMKIN, I.; UNG, H.; LI, M. Increasing fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni*, Pennsylvania, EUA, 1982- 2001. *Emerging Infectious Diseases*, v.8, n.12, p1501–1503, 2002.
- NACHAMKIN, I. Capítulo 9 - *Campylobacter jejuni*. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Washington: ASM Press. p.179 a 192, 2001.
- NCBI (National Center for Biotechnology Information). 1989. *Approved Lists of Bacterial Names (Amended)*. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK820/>>. Acesso em: 12 de nov. de 2014.

NCCLS. *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test approved standard*. 8 ed. Wayne, Pennsylvania-EUA, 2003.

NICHOLS, G. L.; RICHARDSON, J. F.; SHEPPARD, S. K.; LANE, C.; SARRAN, C. *Campylobacter* epidemiology: a descriptive study reviewing 1 million cases in England and Wales between 1989 and 201. *BMJ Open*, 2012.

NIEDERER, L.; KUHNERT, P.; EGGER, R.; BÜTTNER, S.; HÄCHLER, H.; KORVZAK, B. M. Genotypes and Antibiotic Resistances of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Isolates from Domestic and Travel-Associated Human Cases. *Applied and Environmental Microbiology*, v.78, n.1, p.288-291, 2011.

NOP, USDA. Natl. Organic Program 2008. Consumer Brochure: *Organic food standards and labels: the facts*. Disponível em: <<http://www.ams.usda.gov/nop/Consumers/brochure.html>>. Acesso em: 12 de nov. de 2014.

NORSTRÖM, M.; HOFSHAGEN, M.; STAVNES, T.; SCHAU, J.; LASSEN, J.; KRUSE, H. Antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* from broilers and broiler house environments in Norway. *Journal of Food Protection*, v.70, n. 3, p.736–738, 2007.

OBENG, A. S.; RICKARD, H.; SEXTON, M.; PANG, Y.; PENG, H.; BARTON, M. Antimicrobial susceptibilities and resistance genes in *Campylobacter* strains isolated from poultry and pigs in Australia. *Journal of Applied Microbiology*, v.113, p.294–307, 2012.

OH, E.; ZHANG, Q.; JEON, B. Target optimization for peptide nucleic acid (PNA)-mediated antisense inhibition of the CmeABC multidrug efflux pump in *Campylobacter jejuni*. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy*, v.69, p.375–380, 2014.

ON, S. L. Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns. *Journal of Applied Microbiology*, v. 90, n. 6, p. 1–15, 2001.

OVERBEKE, I. V.; DUCHATEAU, L.; ZUTTER, L. D.; ALBERS, G.; DUCATELLE, R. A Comparison Survey of Organic and Conventional Broiler Chickens for Infectious Agents Affecting Health and Food Safety. *Avian Diseases*, v. 50, n. 2, p. 196–200, 2006.

OYOFO, B. A.; THORNTON, S. A.; BURR, D. H.; PAVLOVSKIS, O. R.; GUERRY, P. Specific detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, v.30, p.2613–2619, 1992.

PARKHILL, J.; WREN, B. W.; MUNGALL, K.; KETLEY, J. M.; CHURCHER, C.; BASHAM, D.; CHILLINGWORTH, T.; DAVIES, R. M.; FELTWELL, T.; HOLROYD, S.; JAGELS, K.; KARLYSHEV, A. V.; MOULE, S.; PALLAN, M. J.; PENN, C. W.; QUAIL, M. A.; RAJANDREAM, M. A.; RUTHERFORD, K. M.; VAN VLIET, A. H. M.; WHITEHEAD, S.; BARREL, B. G. The genome sequence of the food-borne pathogen

Campylobacter jejuni reveals hypervariable sequences. *Nature*, v. 403, n. 6770, p. 665–668, 2000.

PASTER, B. J.; DEWHIRST, F. E. Phylogeny of *Campylobacters*, *wolinellas*, *Bacteroides gracilis*, and *Bacteroides ureolyticus* by 16S ribosomal ribonucleic acid sequencing. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.38, p.56-62, 1988.

PETERSEN, L.; NIELSEN, E. M.; ON, S. L. Serotype and genotype diversity and hatchery transmission of *Campylobacter jejuni* in commercial poultry flocks. *Veterinary Microbiology*, v.82, p.141–154, 2001.

PIDDOCK, L. J. V.; RICCI, V.; PUMBWE, L.; EVERETT, M. J.; GRIGGS D. J. Fluoroquinolone resistance in *Campylobacter* species from man and animals: detection of mutations in topoisomerase genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 51, p.19-26, 2003.

PRICE, L.B.; JOHNSON, E.; VAILES, R.; SILBERGELD, E. Fluoroquinolone-Resistant *Campylobacter* Isolates from Conventional and Antibiotic-Free Chicken Products. *Environmental Health Perspectives*, v.113, p.557–560, 2005.

QIN, S.-S.; WU, C.-M.; WANG, Y.; JEON, B.; SHEN, Z.; WANG, Y.; ZHANG, Q.; SHEN, J. Antimicrobial resistance in *Campylobacter coli* isolated from pigs in two provinces of China. *International Journal of Food Microbiology*, v. 146, n. 1, p. 94–98, 2011.

ROSENQUIST, H.; BOYSEN, L.; KROGH, A. L.; JENSEN, A. N.; NAUTA, M. *Campylobacter* contamination and the relative risk of illness from organic broiler meat in comparison with conventional broiler meat. *International Journal of Food Microbiology*, v. 162, n. 3, p. 226–230, 2013.

RUIZ, J.; GOÑI, O.; MARCO, F.; GALLARDO, F.; MIRELIS, B.; ANTA, T. J.; VILA, J. Increased resistance to quinolones in *Campylobacter jejuni*: a genetic analyses of *gyrA* gene mutations in quinolone-resistant clinical isolates. *Microbiology and Immunology*, v.42, n.3, p.223-226, 1998.

SAID, M. M.; EL-MOHAMADY, H.; EL-BEIH, F. M.; ROCKABRND, D. M.; ISMAIL, T. F.; MONTEVILLE, M. R.; AHMED, S. F.; KLENA, J. D.; SALAMA, M. S. Detection of *gyrA* mutation among clinical isolates of *Campylobacter jejuni* isolated in Egypt by MAMA PCR. *The Journal of Infection in Developing Countries*, v. 4, n.9, p. 546-554, 2010.

SAM, W.I.C.; LYONS, M.M.; WAGHORN, D.J. Increasing rates of ciprofloxacin resistant *Campylobacter*. *Journal of Clinical Pathology*, v.52, n.9, 709p, 1999.

SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R. M.; ANGULO, F. J.; TAUXE, R. V.; WIDDWSON, M.; ROY, S. L.; JONES, J. L.; GRIFFIN, P. M. Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, v. 17, n. 1, p. 7–15, 2011.

SCHONBERG-NORIO, D.; HÄNNINEN, M.; KATILA, M.; KAUKORANTA, S.; KOSKELA, M.; EEROLA, E.; UKSILA, J.; PAJARRE, S.; RAUTELIN, H. Activities of Telithromycin, Erythromycin, Fluoroquinolones and Doxycycline against *Campylobacter* Strains Isolated from Finnish Subjects. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.50, n.3, p.1086–1088, 2006 .

SÉBALD, M.; VERON, M. Teneur en baases de l'AND et classification des vibrions. *Annales de l'Institut Pasteur*, v. 105, p. 897-910, 1963.

SMITH, K. E.; BESSER, J. M.; HEDBERG, C. W.; LEANO, F. T.; BENDER, J. B.; WICKLUND, J. H.; JOHNSON, B. P.; MOORE, K. A.; OSTERHOLM, M. T. Quinolone-resistant *Campylobacter jejuni* infections in minnesota, 1992–1998. *The New England Journal of Medicine*. v. 340, n. 20, 1999.

SOONTHORNCHAIKUL, N.; GARELICK, H.; JONES, H.; JACOBS, J.; BALL, D.; CHOUDHURY, M. Resistance to three antimicrobial agents of *Campylobacter* isolated from organically- and intensively-reared chickens purchased from retail outlets. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.27, p.125–130, 2006.

SOUSA, I. C. DE S. C. 2007. *Interação da Enrofloxacin com modelos biomembranares: Influência das suas propriedades físico-químicas*. Disponível em: <<http://repositorio-aberto.up.pt/handle/10216/64142>>. Acesso em: 12 de nov. de 2014.

STAPLETON, K.; CAWTHRAW, S. A.; COOLES, S. W.; COLDHAM, N. G.; LA RAGIONE, R. M.; NEWELL, D. G; RIDLEY, A. M. Selecting for development of fluoroquinolone resistance in a *Campylobacter jejuni* strain 81116 in chickens using various enrofloxacin treatment protocols. *Journal of Applied Microbiology*, v.109, p.1132-1138, 2010.

STERN N J; HIETT K L; ALFREDSSON G A; KRISTINSSON, K. G.; REIERSEN, J.; HARDARDOTTIR, H.; BRIEM, H.; GUNNARSSON, E.; GEORGSSON, F.; LOWMAN, R.; BERNDTSON, E.; LAMMERGIND, AM. M.; PAOLI, G. M.; MUSGROVE, M. T. *Campylobacter* spp. in Icelandic poultry operations and human disease. *Epidemiology e Infection*, v. 130, p. 23–32, 2003.

STERN, N.J.; LINE, J.E.; CHEN, H-C. *Campylobacter* in: DOWNES, F.P.; ITO, K. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, Washington, DC: APHA, 2001. Chapter 31, p. 301-310.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, v.30, p.2725–2729, 2013.

UBABEF (União Brasileira de Avicultura). 2014. *Frango*. Disponível em: <<http://www.ubabef.com.br/>>. Acesso em: 12 de nov. de 2014.

UGARTE-RUIZ, M.; GÓMEZ-BARRERO, S.; PORRERO, M. C.; ÁLVAREZ, J.; GARCÍA, M.; COMERÓN, M. C.; WASSENAAR, T. M.; DOMÍNGUEZ, L. Evaluation of four protocols for the detection and isolation of thermophilic *Campylobacter* from different matrices: Protocols for isolation of *Campylobacter*. *Journal of Applied Microbiology*, v.113, p.200–208, 2012.

USDA (United States Department Of Agriculture). *Food Safety and Inspection Service: Campylobacter Questions and Answers*. 2013. Disponível em: <http://www.fsis.usda.gov/wps/portal/food-safety-education/get-answers/food-safety-fact-sheets/foodborne-illness-and-disease/campylobacter-questions-and-answers/CT_Index/>. Acesso em: 20 de mar. de 2014.

VAZ, C. S. L.; AVES, Á. DE S. A. *Campylobacter* na segurança dos alimentos e na avicultura. *Avicultura Industrial*, v. 99, n. 1165, p. 15–19, 2008.

VERON, 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 is it so difficult?. *Clinical and Infection Disease*, v.57, n.11, p.1600-1606, 2013.

WANG, Y.; CHAN, J. P.; YEH, K.; CHANG, C.; HSUAN, S.; HSIEH, Y.; CHANG, Y.; LAI, T.; LIN, W.; CHEN, T. Molecular characterization of enrofloxacin resistant *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates. *Veterinary Microbiology*, v.142, p.309–312, 2010.

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 Chemotherapy*. 37:457–463, 1993.

WANG, J. GUO, Y. C.; LI, N. Prevalence and risk assessment of *Campylobacter jejuni* in chicken in china. *Biomedical and Environmental Sciences*, v. 26, n.4, p.243-248, 2013.

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.

WHO. 2012. *Antimicrobial Resistance*. Disponível em <www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>. Acesso em 10 de out. de 2014.

WIECZOREK, K.; OSEK, J. Antimicrobial Resistance Mechanisms among *Campylobacter*. *BioMed Research International*, v. 2013, p. 1–12, 2013.

WILSON, D.L.; ABNER, S.R.; NEWMAN, T.C.; MANSFIELD, L. S.; LINZ, J. E. Identification of ciprofloxacin-resistant *Campylobacter jejuni* by use of a fluorogenic PCR assay. *Journal. of Clinical. Microbiology*, v.38, p.3971–3978, 2000.

WINTERS, D. K.; SLAVIK, M. F. Evaluation of a PCR based assay for specific detection of *Campylobacter jejuni* in chicken washes. *Molecular and Cellular Probes*, v.9, p.307–310, 1995.

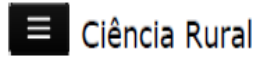
YAN, M.; SAHIN, O.; LIN, J.; ZHANG, Q. Role of the CmeABC efflux pump in the emergence of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* under selection pressure. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 58, n. 6, p. 1154–1159, 2006.

ZENDEHBAD, B.; ARIAN, A. A.; ALIPOUR, A. Identification and antimicrobial resistance of *Campylobacter* species isolated from poultry meat in Khorasan province, Iran. *Food. Control*. 32:724–727, 2013.

ZIRNSTEIN, G.; HELSEL, L.; LI, Y.; SWAMINATHAN, B.; BESSER, J. Characterization of *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance in *Campylobacter coli* by DNA sequence analysis and MAMA PCR. *FEMS Microbiology Letters*, v. 190, n. 1, p. 1–7, 2000.

6 ANEXOS

6.1 COMPROVANTE DE SUBMISSÃO ARTIGO 1



Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Ciência Rural*.

Manuscript ID: CR-2014-1712

Detection of fluoroquinolone resistance by mutation in *gyrA* gen of

Title: *Campylobacter* spp. isolates from broiler and laying (*Gallus gallus domesticus*) hens, from Rio de Janeiro State

Frasao, Beatriz
Medeiros, Valéria
Barbosa, André

Authors: Aguiar, Waldemir
Abreu, Dayse
Clementino, Maysa Beatriz
Aquino, Maria Helena

Date Submitted: 25-Nov-2014

 Print  Return to Dashboard

6.2 COMPROVANTE DE SUBMISSÃO ARTIGO 2

RES: Submissão de Artigo, Trabalho 4044 LD Entrada x

Jurgen Dobreiner
jurgen.dobreiner@pvb.com.br

12:06 (Há 35 minutos) ☆

para mim ▾

Mostrar detalhes

Prezada Dra. Beatriz,

O seu artigo foi registrado como **Trabalho 4044 LD**.

Atenciosamente,

Jürgen Dobreiner
Editor Pesq. Vet. Bras.

De: **Beatriz Da Silva Frasão** <beatrizfrasao@id.uf.br>
Data: 1 de dezembro de 2014 09:16
Assunto: Submissão de Artigo
Para: jurgen.dobreiner@pvb.com.br

Boa Dia,

venho por meio deste submeter meu artigo intitulado: **Deteção de resistência às fluoroquinolonas em *Campylobacter* isolados de frangos de criação orgânica**, com os autores na seguinte ordem : Beatriz S. Frasao, Luana R. Côrtes, Elmiro R. Nascimento, Nathalie C. Cunha, Virginia L. Almeida e Maria Helena C. Aquino.

Att.

Beatriz da Silva Frasão
Médica Veterinária - UFU/MG
Mestranda no Programa Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal - UFF/RJ