



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**ISOLAMENTO E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM CEPAS DE
CAMPYLOBACTER JEJUNI E *CAMPYLOBACTER COLI* ISOLADAS DE
CARÇAÇAS RESFRIADAS DE FRANGO NA REGIÃO DO DISTRITO
FEDERAL E ENTORNO**

PATRÍCIA RENAULT SILVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

BRASÍLIA/DF

JULHO/2013



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**ISOLAMENTO E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM CEPAS DE
CAMPYLOBACTER JEJUNI E *CAMPYLOBACTER COLI* ISOLADAS DE
CARCAÇAS RESFRIADAS DE FRANGO NA REGIÃO DO DISTRITO
FEDERAL E ENTORNO**

PATRÍCIA RENAULT SILVA

ORIENTADOR: PROFa. DRa. ÂNGELA PATRÍCIA SANTANA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

PUBLICAÇÃO: 079/2013

BRASÍLIA/DF

JULHO/2013

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

SILVA, P. R. **Isolamento e resistência antimicrobiana em cepas de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* isolados de carcaças resfriadas de frango na região do Distrito Federal e Entorno.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2013, 45p. Dissertação de mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília, e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Patrícia Renault

Isolamento e resistência antimicrobiana em cepas de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* isolados de carcaças resfriadas de frango na região do Distrito Federal e Entorno./ Patrícia Renault Silva; Orientação de Ângela Patrícia Santana - Brasília, 2013. 45p.: il.

Dissertação de mestrado (M) – Universidade de Brasília/ Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2013.

1. *Campylobacter jejuni*. 2. *Campylobacter coli*. 3. Carcaças resfriadas de frango. 4. Antibiograma. 5. Genes de resistência antimicrobiana. I. RENAULT, P.R. II. Título.

CCD ou CPU

Agris/FAO



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

ISOLAMENTO E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM CEPAS DE *CAMPYLOBACTER JEJUNI* E *CAMPYLOBACTER COLI* ISOLADAS DE CARÇAÇAS RESFRIADAS DE FRANGO NA REGIÃO DO DISTRITO FEDERAL E ENTORNO

PATRÍCIA RENAULT SILVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM SAÚDE ANIMAL.

APROVADO POR:

ÂNGELA PATRÍCIA SANTANA, PROF^a. DR^a. UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

(ORIENTADOR)

SIMONE PERECMANIS, PROF^a., DR^a. UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

(EXAMINADOR INTERNO)

CRISTIANO SALES-PRADO, PROF. DR. UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

(EXAMINADOR EXTERNO)

BRASÍLIA/DF, 12 DE JULHO DE 2013

*Dedico este trabalho aos meus amados
pais, Sissi e Dácio, e as minhas irmãs,
Bárbara e Isabella, por todo o apoio,
compreensão e paciência*

e

*À pequena Luísa, inspiração maior na
minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares, em especial meus pais Sissi e Dácio, e minhas irmãs Bárbara e Isabella, por acreditarem em mim, pela paciência nos momentos difíceis, pelo incentivo e por ajudarem a cuidar da minha filha Luísa e a consolar seus choros nos períodos em que estive ausente.

Ao meu namorado, melhor amigo e confidente Adriano, por todo o amor, compreensão e paciência.

À Prof^a. Ângela Patrícia Santana, pela orientação e pela oportunidade que me foi dada para o desenvolvimento deste trabalho em seu laboratório.

Aos professores Simone Perecmanis e Cristiano Sales Prado, por todo o aprendizado e conhecimento compartilhado e pelo aceite e participação na banca examinadora.

Aos amigos e companheiros de laboratório Pâmela, Pati, Nara, Helenira, Ana Cláudia, Milena e Igor, por toda a amizade e descontração, que fizeram esta jornada mais agradável.

À dona Socorro, por toda a ajuda, carinho e atenção, sempre preocupada com minha saúde e meu sono perdido.

À Universidade de Brasília, pela oportunidade e pela qualidade de ensino proporcionada aos alunos.

E a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....IX

ABSTRACT.....X

CAPÍTULO I

I. **INTRODUÇÃO**.....1

II. REFERENCIAL TEÓRICO

1. Caracterização do gênero.....2

2. *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*.....4

3. Epidemiologia.....4

4. Mecanismos de patogenicidade.....6

5. Campilobacteriose em humanos.....8

6. Resistência de *Campylobacter* spp. aos antimicrobianos.....10

6.1. Resistência aos macrolídeos.....11

6.2. Resistência às quinolonas.....12

6.3. Resistência à tetraciclina.....13

6.4. Resistência aos aminoglicosídeos.....14

6.5. Resistência ao cloranfenicol.....14

7. *Campylobacter* spp. em alimentos.....14

III. **OBJETIVOS**.....17

IV. **REFERÊNCIAS**.....18

CAPÍTULO II

I. **INTRODUÇÃO**.....24

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Obtenção das amostras e isolamento bacteriano.....25

2. Identificação por PCR das espécies *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* e teste de susceptibilidade antimicrobiana.....26

3. Detecção de genes de resistência antimicrobiana através de PCR.....	27
III. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
1. Identificação das espécies de <i>Campylobacter jejuni</i> e <i>Campylobacter coli</i> por isolamento microbiológico e PCR.....	29
2. Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	31
3. Detecção de genes de resistência antimicrobiana em cepas de <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>	34
IV. CONCLUSÕES.....	38
V. REFERÊNCIAS.....	39

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi realizar o isolamento de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* em carcaças resfriadas de frango comercializadas na região do Distrito Federal e Entorno, bem como verificar a ocorrência de resistência antimicrobiana e de genes de resistência. De um total de 105 carcaças de frango resfriadas coletadas, 11 (11,55%) amostras foram positivas para a pesquisa de *Campylobacter* spp., sendo 7 (63,64%) amostras positivas para *C. jejuni* e 4 (36,36%) amostras positivas para *C. coli*, resultados verificados tanto pelo método de isolamento microbiológico convencional como por PCR. Todas as cepas positivas foram submetidas a teste de susceptibilidade antimicrobiana, pelo método de difusão de discos, a sete antimicrobianos. Das 7 cepas de *C. jejuni* e das 4 cepas de *C. coli* testadas, 6 (85,71%) e 4(100%) apresentaram resistência a um ou mais antimicrobianos, respectivamente. A ocorrência dos genes de resistência *aph3-1* (aminoglicosídeos), *aadE* (estreptomicina) e *tet(O)* (tetraciclina) foi verificada por PCR e os resultados foram de 57,14%, 28,57% e 42,86%, respectivamente, para *C. jejuni*, enquanto que em *C. coli*, houve 25% de ocorrência de *aph3-1* e *tet(O)*, sem resultados positivos para *aadE*. Para verificar a resistência às quinolonas em *C. jejuni*, foi realizado PCR-RFLP com enzima de restrição *RsaI*, sendo que das 7 cepas testadas, 3 (42,86%) apresentaram mutações que conferem resistência a esta classe de antimicrobianos. Os resultados mostram um alto nível de resistência antimicrobiana em *C. jejuni* e *C. coli*, o que evidencia a necessidade de programas de vigilância e monitoramento específicos para *Campylobacter* spp.

Palavras-chave: *Campylobacter jejuni*; *Campylobacter coli*; carcaças resfriadas de frango; resistência antimicrobiana; genes de resistência.

ABSTRACT

The aim of this work was to perform the isolation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in cooled chicken carcasses marketed in the Federal District and surrounding areas, as well as to verify the occurrence of antimicrobial resistance and resistance genes. A total of 105 chicken carcasses were collected, totaling 11 (11.55%) positive samples for the presence of *Campylobacter* spp., 7 (63.64%) of with *C. jejuni* and 4 (36.36%) *C. coli*, both results checked by conventional microbiological isolation method and PCR. All positive strains were subjected to antimicrobial susceptibility testing by the disc diffusion method. Of the 7 strains of *C. jejuni* tested, 6 (85.71%) showed resistance to one or more antibiotics, while 4 (100%) strains of *C. coli* had this result. The occurrence of resistance genes *aph3-1* (aminoglycosides), *aadE* (streptomycin) and *tet(O)* (tetracycline) was verified by PCR and the results were 57.14%, 28.57% and 42.86%, respectively, for *C. jejuni*, whereas *C. coli* occurrence of *tet(O)* and *aph3* were 25% and no *aadE* positive results were observed. To check resistance of *C. jejuni* to quinolones, a PCR-RFLP was performed with the restriction enzyme *RsaI*. Of the 7 tested strains, 3 (42.86%) had mutations that confer resistance to this class of antibiotics. The results show a high level of antimicrobial resistance in *C. jejuni* and *C. coli*, which highlights the need for surveillance and specific monitoring programs for *Campylobacter* spp.

Keywords: *Campylobacter jejuni*; *Campylobacter coli*; chilled chicken carcasses; antimicrobial resistance; resistance genes.

CAPÍTULO I

I. INTRODUÇÃO

As bactérias do gênero *Campylobacter* spp. são importantes patógenos, sendo as principais responsáveis por enterites em humanos em países desenvolvidos e em países em desenvolvimento (GOMES et al., 2006), especialmente *C. jejuni* e *C. coli* (FINDIK et al., 2010). Elas fazem parte da microbiota intestinal de várias espécies animais, incluindo animais de produção, domésticos e silvestres (KURINCIC et al., 2007), mas habitam principalmente o trato intestinal de aves domésticas (PRATT & KOROLIK, 2005). Em países desenvolvidos, a transmissão da campilobacteriose de pessoa para pessoa é rara, sendo os principais meios de transmissão, o consumo da carne e leite crus e água contaminada (HAN et al., 2008). A carne de frango é a fonte mais comum, devido às operações de abate mal conduzidas e manipulações sem a observação de práticas higiênicas, o que acaba gerando uma contaminação na carcaça e vísceras (FREITAS & NORONHA, 2007). Segundo ZOETE et al. (2007), a temperatura interna destes animais também contribui para a predileção do microrganismo por esta espécie animal.

Nas últimas quatro décadas, *Campylobacter* spp. ressurgiu como um organismo emergente, despontando como importante agente de gastroenterite de origem alimentar em várias partes do mundo (FREITAS & NORONHA, 2007). Acredita-se que esse aumento se deve, principalmente, pelo aumento do consumo de alimentos de origem aviária (MOURA, 2010). Segundo FERRAZ (2010), dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos indicam que o consumo mundial per capita de carne de frango cresceu de aproximadamente 2kg/habitante/ano em 1970 para mais de 10,5kg/habitante/ano em 2009. Uma das explicações para esse aumento é a redução dos preços da carne de frango quando comparados com as carnes de outras espécies, tornando-a mais acessível à população (MOURA, 2010).

Segundo PRATT & KOROLIK (2005), o uso de antimicrobianos em medicina veterinária é amplo e indiscriminado, sendo estes utilizados por razões terapêuticas, profiláticas e como promotores de crescimento, o que contribui para o aumento da resistência de *C. jejuni* e *C. coli*, dificultando o tratamento clínico ou prolongando o curso da campilobacteriose. Além disso, segundo FÁBREGA et al. (2008), esses microrganismos podem transferir genes de resistência a outras bactérias patogênicas.

Tendo em vista a importância crescente desta bactéria para saúde pública, este trabalho teve como objetivo efetuar o isolamento microbiano de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* em carcaças resfriadas de frango, comercializadas na região do Distrito Federal e Entorno, bem como a realização de antibiograma e pesquisa de genes de resistência.

II. REFERENCIAL TEÓRICO

1. Caracterização do gênero

A família *Campylobacteraceae* é composta por 3 gêneros, *Campylobacter*, *Arcobacter* e *Sulfurospirillum*, sendo os dois primeiros comensais de humanos e animais domésticos. O gênero *Campylobacter* é composto por pequenos bacilos gram-negativos (0,2-0,8µm X 0,5-5µm) curvos e finos, dispostos em espiral. Quando uma ou mais células se agrupam, formam uma estrutura característica do gênero, em formato de “S” ou “V”, também chamado de asa de gaivota. A maioria das espécies possui um movimento característico em “saca-rolhas”, graças a um flagelo único preso a uma das extremidades da bactéria (DEBRUYNE et al., 2008; SILVA et al., 2011).

Segundo GARRITY et al. (2004), *Campylobacter* spp. apresenta a seguinte classificação taxonômica:

- Reino: *Bacteria*
- Filo: *Proteobacteria*
- Classe: *Epsilonproteobacteria*
- Ordem: *Campylobacteriales*
- Família: *Campylobacteraceae*
- Gênero: *Campylobacter*

A estrutura taxonômica do gênero *Campylobacter* já sofreu algumas alterações e a quantidade de espécies que o compõe ainda gera controvérsias. Segundo DEBRUYNE et al. (2008), existem 14 espécies e segundo FERNÁNDEZ et al. (2008) existem 20 espécies e subespécies dentro do gênero. As espécies que já foram isoladas de humanos são: *C.coli*, *C. concisus*, *C. curvus*, *C. fetus*, *C. hominis*, *C. hyointestinalis*, *C. jejuni*, *C. lanienae*, *C. lari*, *C. mucosalis*, *C. rectus*, *C. showae*, *C. sputorum* e *C. upsaliensis* (DEBRUYNE et al., 2008).

Espécies termófilas de *Campylobacter* conseguem crescer a uma temperatura entre 37 e 42°C, sendo a temperatura ótima de crescimento 41,5°C (SILVA et al., 2011) Não formam esporos e ao contrário de outros microrganismos transmitidos por alimentos, como *Salmonella* e *Shigella*, possuem um crescimento fastidioso e requerem um ambiente de microaerofilia para se multiplicarem, obtendo crescimento máximo em atmosfera contendo aproximadamente 5% de O₂, 10% de CO₂ e 85% de N₂ (YAN et al., 2005; LEVIN, 2007; GARÉNAUX et al., 2008; SILVA et al., 2011).

Em seu metabolismo, não fermentam ou oxidam açúcares, obtendo energia através de aminoácidos e produtos intermediários do Ciclo de Krebs (MOURA, 2010; SILVA et al., 2011). São bactérias muito susceptíveis ao estresse ambiental, sendo facilmente inativadas quando expostas ao ar atmosférico, ressecamento, pH abaixo de 4,9 e acima de 9,0 e armazenamento prolongado (BOUFLEUR, 2009; MOURA, 2010; SILVA et al., 2011). Possuem a característica de mudar seu formato espiral para cocóide em situações desfavoráveis ao seu crescimento ou em culturas velhas (DEBRUYNE et al., 2008; PARK et al., 2002). Além disso, em ambientes hostis, as bactérias do gênero *Campylobacter* possuem a habilidade de formar células viáveis, mas não cultiváveis (SILVA et al., 2011; MOORHEAD AND DYKES, 2002), ocorrendo a captação de aminoácidos e manutenção de uma membrana externa intacta, porém os microrganismos são incapazes de crescer em meios de cultura seletivos (ALTEKRUSE et al., 1999).

Segundo PARKHILL et al. (2000), o genoma de *Campylobacter* possui entre 1600 a 1700Kb, com uma pequena variação para *C. upsaliensis*, que possui cerca de 2000Kb. Comparado ao de outras bactérias, o genoma de *Campylobacter* é considerado pequeno, o

que conjectura-se ser a explicação para o metabolismo fastidioso e para a incapacidade de fermentar açúcares (THOMÉ, 2006).

2. *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*

Entre as espécies de *Campylobacter* que causam gastroenterites em humanos, *C. jejuni* é a mais importante, seguida de *C. coli*. (ZILBAUER et al., 2007) Existem duas subespécies de *C. jejuni* reconhecidas, *C. jejuni* subs. *jejuni* e *C. jejuni* subs. *doylei*. *C. jejuni* subs. *doylei* se caracteriza bioquimicamente pela ausência da redução de nitrato, resistência à cefalotina e fraca reação da enzima catalase, ao contrário das cepas de *C. jejuni* subs. *jejuni*. O papel patogênico de *C. jejuni* subs. *doylei* é desconhecido. Quando isolado, apesar de infrequente, é obtido de amostras clínicas de humanos, frequentemente associado à bacteremia em crianças (DEBRUYNE et al., 2008).

Campylobacter coli e *Campylobacter jejuni* subs. *jejuni* podem ser diferenciados bioquimicamente pela sua habilidade de hidrolisar o hipurato, a qual *C. coli* é negativo. No entanto, cepas de *Campylobacter jejuni* subs. *jejuni* que não hidrolisam hipurato são comuns. A falta de padronização dos testes, que leva a resultados laboratoriais diferentes, e a existência de limitações dos testes bioquímicos, como a que ocorre com o hipurato de sódio (THOMÉ, 2006), levaram ao desenvolvimento de métodos genotípicos para diferenciação de espécies de *Campylobacter*, principalmente entre *C. jejuni* e *C. coli*. Esses métodos incluem a determinação do nível de hibridização DNA-DNA, sequenciamento dos genes do rRNA, reação em cadeia da polimerase (PCR), polimorfismo dos comprimentos dos fragmentos de restrição (PCR-RFLP), entre outras técnicas em Biologia Molecular (DEBRUYNE et al., 2008).

3. Epidemiologia

As infecções causadas por *Campylobacter* spp. foram primariamente reconhecidas como causa de diarreia em bovinos e de distúrbios reprodutivos, principalmente abortos, em bovinos e ovinos. (DEBRUYNE et al., 2008). Mais recentemente, passaram a ser reconhecidas como uma das mais frequentes causas de gastroenterites em várias partes do mundo, principalmente nos países desenvolvidos, sendo *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* as espécies mais frequentes (CARVALHO et al., 2001).

Nos Estados Unidos foram estimados mais de 845 mil casos de campilobacteriose em 2011, colocando este microrganismo na lista dos cinco patógenos que mais causam doenças de origem alimentar no país, perdendo somente para Norovírus, *Salmonella* spp. não tifoidal e *Clostridium perfringens*. Além disso, neste mesmo ano, *Campylobacter* spp. gerou mais de 8.400 hospitalizações e 76 mortes resultantes de complicações da infecção. (SCALLAN et al., 2011). No Reino Unido, foram estimados mais de 320.000 casos de gastroenterites causadas por *Campylobacter* spp., somente na Inglaterra e País de Gales, no ano de 2008, tornando este microrganismo o principal patógeno transmitido por alimentos da região (FSA, 2011). Segundo dados do Departamento de Saúde da Austrália, foram notificados mais de 16.900 casos documentados de *Campylobacter* spp. em 2010, tornando-o o maior causador de gastroenterites do país (DHA, 2010). Nos países em desenvolvimento, a pesquisa de microrganismos causadores de gastroenterites é escassa e a epidemiologia da campilobacteriose não é muito esclarecida (SCOTT, 2003)

Campylobacter jejuni e *Campylobacter coli* causam sintomatologia clínica muito parecida e muitas vezes a diferenciação entre as espécies não é um fato considerado importante (DEBRUYNE et al., 2008). Segundo PARK (2002), em humanos, infecções causadas por *Campylobacter* spp. são consideradas, primariamente, resultado da ingestão de alimentos de origem animal contaminados, apesar de ser desconhecido o número de infecções causadas por animais de estimação e água contaminada.

Componentes da microbiota intestinal de animais domésticos e silvestres, as espécies do gênero *Campylobacter* disseminam-se pelo meio ambiente, contaminando a água, as pastagens e as culturas vegetais (FREITAS & NORONHA, 2007). O intestino de aves é facilmente colonizado por *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* e esses animais constituem o principal reservatório do microrganismo (ALTEKRUSE et al., 1999). A colonização das aves ocorre por várias fontes, como água, ração, contato com outras espécies de animais e fezes de outras aves ou animais presentes no galpão. *Campylobacter* spp. geralmente coloniza o trato gastrointestinal de aves sem causar alterações patológicas. A presença do patógeno é restrita à mucosa intestinal, que é um local que favorece o crescimento do microrganismo, porque sua temperatura ótima de crescimento de 42°C coincide com a

temperatura do intestino das aves, que difere da temperatura encontrada em mamíferos de 37°C (OLIVEIRA et al., 2008).

O consumo de frangos e derivados constitui a principal forma de aquisição da gastroenterite em todo o mundo, estimando-se sua implicação em 50 a 70% das infecções esporádicas humanas (THOMÉ, 2006). Segundo CARVALHO et al. (2001), a carcaça de frango possui grande importância na contaminação cruzada, pois durante seu descongelamento, a água de degelo em contato com alimentos ingeridos *in natura* poderiam explicar a ocorrência de campilobacteriose. Além disso, a dose infectante de *Campylobacter* é muito baixa e a ingestão de apenas 500 microrganismos, facilmente presentes em uma gota de água de degelo contaminada, podem causar enterites em humanos.

O trato gastrointestinal de outras espécies animais também é colonizado por *Campylobacter*, especialmente *C. jejuni* e *C. coli*. Em bovinos, a prevalência do patógeno varia de 0-80%, enquanto em ovelhas, a prevalência é consideravelmente menor, em torno de 20% (MOORE et al., 2005). Segundo MALAKAUSKAS et al. (2006), a ocorrência de *Campylobacter* em altos níveis, isolado a partir de fezes de suínos, tem sido relatada, com uma proporção maior em *C. coli* do que em *C. jejuni*. Porém, a contaminação de carcaças por *Campylobacter* nesta espécie animal ocorre em níveis mais baixos.

O consumo de leite não pasteurizado e de água não tratada também constitui uma potencial fonte de contaminação de *Campylobacter* spp.. Segundo THOMÉ (2006), a água é um ambiente hostil para o desenvolvimento do microrganismo e sua presença pode ser utilizada como indicador de contaminação fecal recente, já que o tempo de sobrevivência deste patógeno neste ambiente é menor do que os usuais indicadores bacterianos.

4. Mecanismos de patogenicidade

Os mecanismos de patogenicidade envolvidos na infecção intestinal por *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* ainda não estão claramente elucidados, porém, sabe-se que existem alguns fatores de virulência envolvidos na patogênese da infecção, como cápsula, flagelos e toxinas (KOPECKO et al., 2001). Segundo THOMÉ (2006), duas principais atividades

patogênicas já foram descritas, a adesão e invasão de células epiteliais e a produção de toxinas.

Polissacarídeos capsulares constituem um importante componente estrutural na superfície de algumas bactérias, permitindo uma maior persistência no organismo, pois dificultam a ocorrência de fagocitose. Além disso, podem contribuir na patogenicidade do microrganismo, já que as variações estruturais desses polissacarídeos constituem uma variação antigênica. (ZILBAUER et al., 2007). A habilidade de *Campylobacter* spp. de chegar até o intestino é, em parte, devido à resistência aos ácidos gástricos e sais biliares e acredita-se que a cápsula tenha envolvimento nessa habilidade (SILVA et al., 2011). Apesar da contribuição na patogenia da doença, a principal função da cápsula está relacionada com a persistência do microrganismo no ambiente externo, evitando a sua dessecação (ZILBAUER et al., 2007).

Campylobacter spp. possui um único flagelo em um ou em ambos os pólos da célula, o que propicia ao microrganismo um alto grau de motilidade, necessário para superar o peristaltismo e penetrar na camada mucosa intestinal (ZILBAUER et al., 2007). O flagelo deste microrganismo é composto por duas proteínas, as flagelinas *FlaA* e *FlaB*, codificadas por dois genes que possuem um alto grau de similaridade. Alterações na sequência de aminoácidos destas proteínas, especialmente *FlaA*, reduzem a habilidade de *Campylobacter* spp. em colonizar o trato gastrointestinal (CRUSHELL et al., 2004). Acredita-se que os flagelos possuem a habilidade de secretar proteínas não-flagelares, que podem estar associadas com outros mecanismos de virulência, que não a motilidade (SILVA et al., 2011). A quimiotaxia também é importante na colonização por *Campylobacter* spp., que é atraído por mucina, L-serina e L-fucose e repelido por ácidos biliares (THOMÉ, 2006).

Segundo PARK et al. (2002), a ocupação da camada mucosa intestinal de *Campylobacter* spp. representa uma importante vantagem sobre as outras bactérias presentes no trato gastrointestinal, sendo o flagelo e seu formato em espiral responsáveis por ela. Acredita-se ainda, que o microrganismo desenvolveu a característica de microaerofilia devido à baixa presença de oxigênio no local. A competição por nutrientes na camada mucosa é

desfavorável aos outros microrganismos, pois eles ficam paralisados neste ambiente, ao contrário do que ocorre com *Campylobacter*.

Após *Campylobacter* spp. atravessar a barreira do muco, é necessária sua aderência na superfície epitelial para que a efetiva colonização ocorra, porém os fatores necessários para a aderência e invasão ainda não foram totalmente esclarecidos (THOMÉ, 2006). Um modelo teórico de como ocorre a interação do microrganismo com o hospedeiro é de que, após a passagem por essa barreira mucosa, *Campylobacter* spp. atinja a membrana apical dos enterócitos do hospedeiro, liberando em sua superfície uma série de proteínas de adesão, como lipopolissacarídeos, polissacarídeos capsulares e proteína de ligação à fibronectina (CadF), que alteram a estrutura dos microtúbulos dos enterócitos, permitindo a entrada da bactéria nas células (CRUSHELL et al., 2004).

Uma vez dentro da célula, *Campylobacter* spp. produz uma série de toxinas, que passam a alterar o metabolismo normal dos enterócitos, provocando efeitos prejudiciais. Porém, seus mecanismos de ação e sua importância na doença causada por este patógeno ainda são desconhecidos (THOMÉ, 2006). A toxina melhor documentada dentro deste gênero é a toxina de distensão citoletal (CDT), amplamente distribuída entre as bactérias gram-negativas, constituída de três subunidades codificadas pelos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*. Essa toxina prende a célula ao estágio G2/M do ciclo celular, impedindo que a mesma realize mitose, e sua progressiva distensão acaba provocando sua morte. Acredita-se que a subunidade B da toxina apresenta atividade de DNase, induzindo um dano no DNA do hospedeiro por quebra das duplas ligações (SILVA et al., 2011). O envolvimento da CDT no processo de diarreia está relacionado à alteração na maturação e sobrevivência das células da cripta epitelial, levando a uma erosão das mesmas e subsequentes perdas da função absorptiva (THOMÉ, 2006).

5. Campilobacteriose em humanos

A enterite causada por bactérias do gênero *Campylobacter* é uma doença que causa diarreia aguda, com sintomas clínicos semelhantes aos causados por outras doenças do trato gastrointestinal, como salmonelose e shigelose. Clinicamente, essas enterites são

indistinguíveis, apesar da presença de um período prodrômico com febre sem diarreia, dor abdominal intensa e prostração, ser um fator favorável ao diagnóstico de campilobacteriose. O diagnóstico definitivo é feito pela detecção do patógeno nas fezes e não parece haver diferenças entre infecções causadas por *C. coli* e *C. jejuni* (DEBRUYNE et al., 2008).

Segundo MOORE et al. (2005), os sintomas da campilobacteriose podem variar, mas são caracterizados por diarreia aquosa com um quadro brando, podendo progredir para diarreia sanguinolenta, acompanhados ou não de febre, vômitos e dores abdominais. O período médio de incubação é de 3 dias, podendo variar de 18 horas a oito dias. A doença é adquirida por via fecal-oral, via comum a várias bactérias intestinais (THOMÉ, 2006)

A maioria das infecções é autolimitante e o tratamento se restringe à fluidoterapia. A terapia antimicrobiana é necessária somente em casos mais severos e prolongados, infecção sistêmica ou para controlar a doença em grupos de alto risco (MOURA, 2010). Nesses casos, os antimicrobianos indicados são os macrolídeos e fluoroquinolonas, seguidos de tetraciclina. Aminoglicosídeos podem ser administrados de forma intravenosa em casos mais graves (MOORE et al., 2006).

Na maioria dos casos, as infecções por *Campylobacter* spp. causam somente sintomas de gastroenterites, sendo as complicações incomuns. No entanto, uma importante complicação tardia pode ocorrer, a chamada Síndrome de Guillain-Barré (GBS) (THOMÉ, 2006). Trata-se de uma polirradiculoneuropatia desmielinizante inflamatória, caracterizada pela ocorrência de um ataque agudo dos nervos periféricos e craniais, com origem autoimune, que leva à paralisia flácida e pode comprometer os músculos da respiração e levar à morte (BENETI E SILVA, 2006).

Não existem testes específicos para o diagnóstico da Síndrome de Guillain-Barré. Geralmente, é feita uma avaliação dos padrões da evolução das paralisias com arreflexia, bem como da presença de outros sintomas sistêmicos e ausência de febre, aliada a investigações epidemiológicas para detecção de eventos antecedentes ao aparecimento dos sintomas (YAN et al., 2005). A causa exata da síndrome ainda é desconhecida, mas estudos mostram que a maioria dos pacientes com Síndrome de Guillain-Barré sofreu algum tipo de infecção nas

semanas que antecederam ao início da doença (BENETI E SILVA, 2006), sendo a infecção por *Campylobacter jejuni* a mais frequente, ocorrendo em 30-40% dos pacientes com a síndrome (CRUSHELL et al., 2004). A relação entre *Campylobacter jejuni* e Síndrome de Guillain-Barré não está totalmente esclarecida, mas acredita-se que o microrganismo apresenta semelhanças estruturais com moléculas químicas presentes nos nervos periféricos e raízes espinhais do hospedeiro, o que provoca um ataque dos anticorpos ao próprio organismo (BENETI E SILVA, 2006).

Outras alterações extraintestinais que podem ocorrer secundariamente à campilobacteriose incluem artrite reativa ou Síndrome de Reiter, composta pela tríade clínica de artrite, uretrite e conjuntivite pós-infecciosas, bacteremia e manifestações dermatológicas, as duas últimas com ocorrência mais rara (PETERSON, 1994).

6. Resistência de *Campylobacter* spp. aos antimicrobianos

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

Segundo AARESTRUP (2005), uma grande variedade de antimicrobianos é utilizada na produção de animais. Eles podem ser administrados tanto no tratamento, quanto na prevenção de doenças, além do uso como promotores de crescimento, gerando aumentos na eficiência alimentar e ganhos reais de peso. Porém, a maioria desses fármacos é utilizada em doses subterapêuticas, o que favorece a seleção, multiplicação e persistência de cepas bacterianas resistentes aos antimicrobianos (TOLLEFSON AND MILLER, 2000).

Quando expostos a antimicrobianos, *Campylobacter* spp. e outras bactérias podem diminuir sua sensibilidade a estes fármacos e se tornam potenciais reservatórios de genes de resistência, que podem ser transmitidos horizontalmente a outras bactérias patogênicas. Por este motivo, a resistência antimicrobiana de bactérias comensais do trato gastrointestinal

constitui um indicador da pressão seletiva exercida pelo uso destes fármacos (ZHANG et al., 2006). Além disso, antimicrobianos podem permanecer como resíduos em produtos de origem animal, o que permite uma seleção de bactérias resistentes após o consumo desses alimentos, ou podem ser despejados no ambiente, através de efluentes humanos ou animais (FÀBREGA et al., 2008).

Apesar das infecções causadas por *Campylobacter* spp. serem, geralmente, autolimitantes e tratadas basicamente com fluidoterapia, em alguns casos o uso dos antimicrobianos é necessário (AARESTRUP et al., 2005; KURINCIC et al., 2007; HAN et al., 2007). Segundo MOORE et al. (2006), macrolídeos e fluoroquinolonas são os fármacos de escolha no tratamento da campilobacteriose. A tetraciclina é citada na literatura como um tratamento alternativo e no caso de infecções mais graves, como bacteremias e septicemias, são administrados aminoglicosídeos intravenosos.

6.1. Resistência aos macrolídeos

Os macrolídeos são antimicrobianos que se caracterizam pela presença de um anel lactâmico macrocíclico em sua estrutura básica, ao qual se ligam um ou mais açúcares. A eritromicina é a primeira opção de tratamento da campilobacteriose em humanos. O mecanismo de ação deste fármaco, típico do grupo dos macrolídeos, consiste na inibição da síntese de proteínas, através da sua ligação à subunidade 50S do ribossomo, impedindo a transferência dos aminoácidos conduzidos pelo RNA transportador para a cadeia polipeptídica em formação, passo conhecido como translocação (GIBREEL & TAYLOR, 2006).

A resistência de *Campylobacter* spp. aos macrolídeos pode ocorrer por três diferentes mecanismos, a inibição da ligação do fármaco ao ribossomo, a inativação do fármaco e por bombas de efluxo (AARESTRUP & ENGBERG, 2001).

A) Inibição da ligação dos macrolídeos ao ribossomo

A resistência aos macrolídeos associada às modificações no alvo do fármaco, o ribossomo, envolvem mais de um mecanismo, entre eles, a produção de uma enzima que age no RNA ribossomal (rRNA), adicionando grupos metila em um resíduo de adenina na posição 2058, impedindo a ligação dos macrolídeos (GIBREEL & TAYLOR, 2006). Além desse

mecanismo, a alteração do ribossomo também pode ocorrer por modificações de proteínas da porção 50S do ribossomo, através de mutações específicas no rRNA (ENGBERG et al., 2001).

B) Inativação dos macrolídeos

A inativação dos macrolídeos pode ocorrer através de enzimas, que modificam a estrutura do fármaco através de processos como glicosilação e fosforilação. A maioria dos genes que codificam estas enzimas estão presentes em plasmídeos (GIBREEL & TAYLOR, 2006).

C) Bombas de efluxo

Uma bomba de efluxo contra múltiplas drogas, chamado de CmeABC, encontra-se amplamente distribuído no gênero *Campylobacter*, especialmente *C. jejuni*. Ela é codificada por três genes localizados no cromossomo bacteriano, e é constituída de três componentes, uma proteína de fusão periplasmática (CmeA), um transportador de drogas da membrana plasmática (CmeB) e uma proteína da membrana externa. O complexo de proteínas funciona como uma bomba ejetora, expulsando da célula uma grande variedade de componentes, como detergentes, corantes e antimicrobianos de diversas classes, inclusive macrolídeos (GIBREEL et al., 2007).

6.2. Resistência às quinolonas

Segundo WASSENER et al. (2007), na última década, a resistência de *Campylobacter* spp. às quinolonas tem aumentado em vários países, o que coincide com a introdução deste antimicrobiano em aplicações veterinárias, principalmente seu uso em criações de frangos para combater infecções respiratórias.

O mecanismo de ação das quinolonas consiste na inibição de topoisomerasas do tipo II, a DNA girase e topoisomerase IV, enzimas responsáveis por tornar a molécula de DNA compacta e biologicamente ativa. Com a inibição, a molécula de DNA passa a ocupar muito espaço dentro da célula, além de alterar processos como replicação, transcrição e decatenação, o que leva à morte celular (FÀBREGA et al., 2008).

A resistência às quinolonas em *Campylobacter* spp. envolve, principalmente, mutações nos genes que codificam as subunidades da DNA girase, que estão presentes na região determinante de resistência às quinolonas (QRDR). Mutações no gene *gyrA*, que codifica a subunidade A da DNA girase, conferem um alto grau de resistência às quinolonas, sendo que a principal delas envolve a troca da Treonina por Isoleucina na posição 86. A troca de Aspartato, na posição 90, por Asparagina (Asp-90-Asn) e Alanina, na posição 70, por Treonina (Ala-70-Thr) também estão relacionadas à resistência às quinolonas, porém em níveis bem mais baixos (AARESTRUP & ENGBERG, 2001; ENGBERG et al., 2001).

Apenas uma mutação no gene *gyrB* foi caracterizada, ocorrendo em *C. coli*, e envolve a troca de Metionina por Leucina, na posição 491 (Met-491-Leu). *Campylobacter* spp., assim como outros microrganismos, como *Helicobacter pylori* e *Mycobacterium tuberculosis*, não apresentam mutações na topoisomerase IV, codificada pelo gene *parC* (FÀBREGA et al., 2008). Além das mutações na região determinante de resistência às quinolonas, bombas de efluxo também estão envolvidas na resistência a esta classe de antimicrobianos (ENGBERG et al., 2001).

6.3. Resistência à tetraciclina

As tetraciclinas se ligam à subunidade 30S do ribossomo e inibem a tradução bacteriana, pois bloqueiam a ligação do RNA transportador ao complexo ribossomo- RNA mensageiro (DASTI et al., 2007).

A resistência às tetraciclinas em *Campylobacter* spp. pode ocorrer por bombas de efluxo, modificações na estrutura do fármaco, mutações na porção 16S do DNA ribossomal e proteção do sítio de ligação ribossomal (AARESTRUP & ENGBERG, 2001). Níveis altos de resistência a este antimicrobiano geralmente estão associados com a presença de um gene, designado tet(O), que codifica uma proteína envolvida na proteção do sítio de ligação do ribossomo. Esse gene é frequentemente encontrado em plasmídeos, em *C. jejuni* e *C. coli*, apesar de também estar presente no cromossomo bacteriano (PRATT & KOROLIK, 2005).

6.4. Resistência aos aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos inibem a síntese de proteínas, se ligando à subunidade 30S do ribossomo bacteriano, impedindo a leitura correta do RNA mensageiro e síntese da proteína correspondente (CAMPOS, 2012). A resistência de *Campylobacter* spp. aos aminoglicosídeos está relacionada com a presença de enzimas que modificam a estrutura destas drogas. Essas enzimas são divididas em 3 diferentes grupos, as aminoglicosídeos fosfotransferases (APH), adeniltransferases (AAD) e acetiltransferases (AAC) (AARESTRUP & ENGBERG, 2001).

6.5. Resistência ao cloranfenicol

O cloranfenicol age se ligando à subunidade 50S do ribossomo bacteriano, impedindo o processo de tradução. A resistência de *Campylobacter* spp. ao cloranfenicol ocorre, principalmente, devido à produção de enzimas que modificam a sua estrutura, impedindo que ocorra a ligação ao ribossomo. A resistência ao cloranfenicol não se encontra muito difundida entre o gênero *Campylobacter* (AARESTRUP & ENGBERG, 2001).

7. *Campylobacter* spp. em alimentos

A incidência de doenças de origem alimentar tem crescido consideravelmente nos últimos anos em todos os países e apesar da maioria das infecções serem brandas, um número significativo de mortes, infecções agudas e sequelas mais graves podem ocorrer, além de gastos exorbitantes com custos médicos e diminuição da produtividade (SCOTT et al., 2003).

Segundo MADALOZZO et al. (2007), os produtos de carne e derivados, principalmente de aves, têm sido vinculados a estas infecções. A busca de novos mercados e alimentos mais seguros tem levado as indústrias de produtos de origem animal a implementar uma melhoria contínua na qualidade microbiológica de toda a cadeia produtiva.

Membros do gênero *Campylobacter* tem sido reconhecidos como agentes infecciosos há quase um século, porém, somente em 1972 esses microrganismos foram reconhecidos como potenciais patógenos em alimentos. A partir deste ano, a presença de *Campylobacter* passou a ser monitorada, e a incidência da campilobacteriose só tem aumentado a cada ano.

Hoje, este microrganismo é reconhecido como o principal patógeno de origem alimentar nos países desenvolvidos (PARK et al., 2002). Acredita-se que a prevalência de *Campylobacter* spp. seja ainda maior nos países em desenvolvimento, porém, pela falta de investigação epidemiológica e coleta de dados, não se pode afirmar isso com certeza (SCOTT et al., 2003).

As doenças de origem alimentar podem surgir pelo consumo de produtos que foram contaminados em alguma fase da sua cadeia produtiva, como abate, processos de industrialização e estocagem. Além disso, uma forma importante de disseminação dos agentes patogênicos ocorre pela contaminação cruzada, em que durante a preparação de um alimento contaminado, o microrganismo acaba atingindo outros alimentos ou objetos que não estavam contaminados (MYLIUS et al., 2007). Apesar dos sistemas de coleta de dados epidemiológicos de doenças de origem alimentar não serem eficazes na detecção de surtos ou casos isolados que ocorrem em residências, sabe-se que muitos consumidores adquirem doenças alimentares devido a manipulação e preparo impróprio de alimentos na sua própria cozinha (SCOTT et al., 2003).

As indústrias de alimentos prontos e os abatedouros no Brasil vêm apresentando um maior interesse no controle de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*, visto que existe a possibilidade de que seu controle seja obrigatório no país. No abate de frangos, principal espécie animal envolvida na transmissão da campilobacteriose por alimentos, a escaldagem, depenagem e o resfriamento têm sido apontados como as etapas de maior risco de contaminação (MADALOZZO et al., 2007).

A maioria dos patógenos de origem alimentar são considerados microrganismos robustos, já que precisam sobreviver em ambiente hostis, tanto no processamento, quanto na aplicação de técnicas de conservação de alimentos. Nesse contexto, as espécies de *Campylobacter* fogem a essa regra, pois são considerados microrganismos de crescimento fastidioso, além de serem extremamente sensíveis ao ambiente externo (PARK, 2002). Dificilmente, se multiplicam fora de um organismo hospedeiro ou durante processamentos ou estocagem de alimentos. Não crescem em ambientes com atividade de água inferior a 0,987 e são facilmente inativados pelo calor. O congelamento também é prejudicial ao seu crescimento,

inativando o microrganismo em menos de 3 dias, a -15°C , apesar de não eliminá-lo (SILVA et al., 2011).

Apesar de não se multiplicar em temperaturas abaixo de 30°C , a sobrevivência de *Campylobacter* em alimentos é, geralmente, melhor em temperaturas abaixo da temperatura ambiente e são metabolicamente ativos, com produção de ATP, em temperaturas abaixo de 4°C (PARK et al., 2002). O estresse causado pelo congelamento pode levar a alterações subletais, levando o microrganismo a um estágio viável, mas não cultivável (VBNC), onde a bactéria continua capaz de causar infecção, porém seu isolamento por métodos microbiológicos convencionais é inviável (MOORHEAD AND DYKES, 2002).

Quando exposto a ambientes hostis, a perda da viabilidade de *Campylobacter* spp. leva a alterações na morfologia da bactéria, que muda seu formato espiral para cocóide. (DEBRUYNE et al., 2008; PARK et al., 2002). Alguns autores acreditam que essa forma cocóide é, na verdade o estágio de viável, mas não cultivável. Já outros autores acreditam que essa é uma forma degenerativa da bactéria, que contém baixos níveis de ácidos nucleicos e peptídeos, o que leva a uma alteração na integridade da membrana celular (PARK et al., 2002).

As estratégias de controle de *Campylobacter* spp. em alimentos devem focar nas limitações fisiológicas do microrganismo, como sensibilidade ao ressecamento, congelamento e oxigênio (SILVA et al., 2011), além da implementação de programas como Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) (MOORE et al., 2005). Como os produtos de origem aviária constituem a principal fonte de contaminação do microrganismo, aliado ao fato destes produtos serem amplamente consumidos devido ao seu alto valor nutritivo e ao seu baixo custo, esses alimentos também devem receber atenção especial no controle da campilobacteriose em humanos (SILVA et al., 2011).

III. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivos:

- Realizar o isolamento microbiológico e identificação de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* por PCR em carcaças resfriadas de frango comercializadas na região do Distrito Federal e Entorno;
- Efetuar o antibiograma e verificar o perfil de resistência das colônias de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* isoladas no trabalho;
- Avaliar a presença de genes de resistência através de PCR.

IV. REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F.M. AND ENGBERG, J. Antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter*. **Vet. Res.**, v.32, p.311-321, 2001.
- AARESTRUP, F.M. Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.96, p.271-281, 2005.
- ALTEKRUSE, S.F.; STERN, N.J.; FIELDS, P.I.; SWERDLOW, D.L. *Campylobacter jejuni* - An emerging foodborne pathogen. **Perspectives**, v. 5, p. 28-35, 1999.
- BENETI, G.M. AND SILVA, D.L.D. Guillain – Barré Syndrome. **Semina: Ciências Biológicas e Saúde**, v.27, p.57-69, 2006.
- BOUFLEUR, R. *Campylobacter jejuni* em frangos de corte, carne e vísceras de frango no Rio Grande do Sul e efeito do congelamento sobre a contaminação nos cortes. 43f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, 2009.
- CAMPOS, A.C.F.B.de. Resistência antimicrobiana de cepas de *Enterococcus* isoladas de carcaças de frango comercializadas no Distrito Federal. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2012, 72p. Dissertação de Mestrado.
- CARVALHO, A.C.F.B.; LIMA, V.H.C.; PEREIRA, G.T.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P. *Campylobacter* em granja avícola. **RPCV**, v.96, p.191-195, 2001.
- CRUSHELL, E.; HARTY, S.; SHARIF, F.; BOURKE, B. Enteric *Campylobacter*: Purging its secrets? **Pediatric Research**, v.55, p.3-12, 2004.
- DASTI, J.I.; GROB, U.; POHL, S.; LUGERT, R.; WEIG, M.; SCHMIDT, R. Role of the plasmid-encoded tet(O) gene in tetracycline resistant clinical isolates of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **Journal of Medical Microbiology**. V.56, p.833-837, 2007.
- DEBRUYNE, L.; GEVERS, D. VANDAMME, P. "Taxonomy of the family Campylobacteraceae" in *Campylobacter*, 3rd. Edn, eds I. Nachamkin, C. M. Szymanski and M.J. Blaser (Washington, DC: ASM), 3–27, 2008.

DHA (DEPARTMENT OF HEALTH AND AGEING) Monitoring the incidence and causes of diseases potentially transmitted by food in Australia: Annual Report of the OzFoodNet Network, 2010. Online. Acessado em 19 de maio de 2013. Disponível em: [http://www.health.gov.au/internet/main/publishing.nsf/content/cda-cdi3603-pdf-cnt.htm/\\$FILE/cdi3603a.pdf](http://www.health.gov.au/internet/main/publishing.nsf/content/cda-cdi3603-pdf-cnt.htm/$FILE/cdi3603a.pdf)

ENGBERG, J.; AARESTRUP, F.M.; TAYLOR, D.E.; GERNER-SMIDT, P.; NACHAMKINS, I. Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanisms and trends in humans isolates. **Emerging Infectious Disease**, v.7, p.24-34, 2001.

FÁBREGA, A.; CÉSPEDES, J.S.; SOTO, S.; VILA, J. Quinolone resistance in food chain. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v.31, p.307-315, 2008.

FERNÁNDEZ, H.; VERA, F.; VILLANUEVA, M.P.; GARCIA, A. Occurrence of *Campylobacter* species in healthy well-nourished and malnourished children. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 1-3, 2008.

FERRAZ, J.V. Consumo de carne de frango no país sobe 300% em 26 anos. Federação da Agricultura e Pecuária de Goiás, Goiás, jun 2010. Online. Acessado em 19 de maio de 2013. Disponível em: http://www.faeg.com.br/index.php?option=com_content&view=article&id=6495:consunoticias&Itemid=16

FINDIK, A.; ICA, T.; ONUK, E.E.; PERCIN, D. KEVENL, T.O.; CIFTCI, A. Molecular typing and cdt genes prevalence of *Campylobacter jejuni* isolates from various sources. **Rev. Trop. Animal Health Prod.** DOI 10.1007/11250-010-9758-0, 2010.

FREITAS, J.A.; NORONHA, G.N. Ocorrência de *Campylobacter* spp. em carne e miúdos de frango expostos ao consumo em Belém, Pará. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** V.59, n.3, p.813-815, 2007.

GARÉNAUX, A.; JUGIAU, F.; JORGE, R.; DENIS, M.; FEDERIGHI, M.; RITZ, M. *Campylobacter jejuni* strains from different origins under oxidative stress conditions: effect of temperature. **Curr. Microbiol.**, v.56, p.293-297, 2008.

GARRITY, G.M.; BELL, J.A.; LILBURN, T.G. Taxonomic Outline of the Prokaryotes – Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2^a Ed., Release 5.0, May, 2004.

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

GIBREEL, A.; WETSCH, N.M.; TAYLOR, D.E. Contribution of the CmeABC Efflux Pump to Macrolide and Tetracycline resistance in *Campylobacter jejuni*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.51, p.3212-3216, 2007.

GOMES, F.R.; CURCIO, B.R.; LADEIRA, S.R.; FERNÁNDEZ, H. MEIRELES, M.C. *Campylobacter jejuni* occurrence in chicken fecal samples from small properties in Pelotas, Southern of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiol.** V.37, p.375-378, 2006.

HAN, K.; JANG, S.S.; CHOO, E.; HEU, S.; RYU, S. Prevalence, genetic diversity and antibiotic resistance patterns of *Campylobacter jejuni* from retail raw chickens in Korea. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, p. 50-59, 2007.

HAN, J.; SAHIN, O.; BARTON, Y.W.; ZHANG, Q. Key role of Mfd in the Development of Fluoroquinolone Resistance in *Campylobacter jejuni*. **Plos pathogens**. V.4, N^o6, 2008.

KOPECKO, D.J.; HU, L.; ZAAL, K.J.M. *Campylobacter jejuni* – microtubule dependent invasion. **Trends in Microbiology**, v.9, p.389-396, 2001.

KURINCIC, M.; BOTTELDOORN,N; HERMAN,L.; MOZINA, S.S. Mechanisms of erythromycin resistance of *Campylobacter* spp. isolated from food, animals and humans. **International Journal of Food Microbiology**. V.120, p.186-190, 2007.

LEVIN, R.E. *Campylobacter jejuni*: a review of its characteristics, pathogenicity, ecology, distribution, subspecies characterization and molecular methods of detection. **Food Biotechnol.**, v.21, p.271-347, 2007.

MADALOZZO, F.R.; KOETZ, P.R.; SANTOS, L.R.; RODRIGUES, L.B. Campylobacteriose em humanos e o controle de qualidade em produtos de origem aviária. **Higiene Alimentar**, v.21, p.59-63, 2007.

MALAKAUSKAS, M.; JORGENSEN, K.; NIELSEN, E.M.; OJENIYI, B.; OLSEN, J.E. Isolation of *Campylobacter* spp. from a pig slaughterhouse and analysis of cross-contamination. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 295-300, 2006.

MOORE, J.E.; BARTON, M.D.; BLAIR, I.S.; CORCORAN, D.; DOOLEY, J.S.G.; FANNING, S.; KEMPF, I.; LASTOVICA, A.J.; LOWERY, C.J.; MATSUDA, M.; MCDOWELL, D.A.; MCMAHON, A.; MILLAR, B.C.; RAO, J.R.; ROONEY, P.J.; SEAL, B.S.; SNELLING, W.J.; TOLBA, O. The epidemiology of antibiotic resistance in *Campylobacter*. **Microbes and Infection**, v.8, p.1955-1966, 2006.

MOORE, J.E.; CORCORAN, D.; DOOLEY, J.S.G.; FANNING, S.; LUCEY, B.; MATSUDA, M.; MCDOWELL, D.A.; MÉGRAUD, F.; MILLAR, B.C.; O'MAHONY, R.; O'RIORDAN, L.; O'ROURKE, M.; RAO, J.R.; ROONEY, P.J.; SAILS, A.; WHYTE, P. *Campylobacter*. **Vet. Res.**, v.36, p.351-382, 2005.

MOORHEAD, S.M. AND DYKES, G.A. Survival of *Campylobacter jejuni* on beef trimmings during freezing and frozen storage. **Letters in Applied Microbiology**, v. 34, p. 72-76, 2002.

MOURA, H.M. Isolamento e análise de resistência a antimicrobianos de cepas de *Campylobacter jejuni* em amostras de carnes de aves resfriadas comercializadas no Distrito Federal 2010. 62f. Dissertação (Mestrado em saúde animal), Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2010.

MYLIUS, S.D.; NAUTA, M.J.; HAVELAAR, A.H. Cross-Contamination during food preparation: a mechanism model applied to chicken-borne *Campylobacter*. **Risk Analysis**, v.27, p.803-813, 2007.

OLIVEIRA, K.A.M., MENDONÇA, R.C.S., ANDRADE, N.J., ALBINO, L.F.T. Ocorrência de *Campylobacter* no ambiente de criação de frango de corte. **Revista Ceres**, v. 55, p.556-561, 2008.

PARK, S.F. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, p. 177-188, 2002.

PARKHILL, J.; WREN, B.W.; MUNGALL, K.; KELLEY, J.M.; CHURCHER, C.; BASHAM, D.; CHILLINGWORTH, T.; DAVIES, R.M.; FELTWELL, T.; HOLROYD, S.; JAGELS, K.; KARLYSHEV, A.V.; MOULE, S.; PALLAN, M.J.; PENN, C.W.; QUALL, M. A.; RAJANDREAM, M-A.; RUTHERFORD, K.M.; van VLLET, A.H.M.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B.G. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. **Nature**, v.403, p.665-668, 2000.

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

PETERSON, M.C. Clinical aspects of *Campylobacter jejuni* infections in adults. **West J. Med.**, v.161, p.148-152, 1994.

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

SCOTT, E. Food Safety and foodborne disease in 21st century homes. **Can. J. Infect. Dis.**, v.14, p. 277-280, 2003.

SILVA, J.; LEITE, D.; FERNANDES, M.; MENA, C.; GIBBS, P.A.; TEIXEIRA, P. *Campylobacter* spp. as foodborne pathogen: a review. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, p. 1-12, 2011.

THOMÉ, J.D.S. Citotoxinas e hemolisinas produzidas por *Campylobacter jejuni* isolados de diferentes origens. 88f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, 2006.

TOLLEFSON, L. AND MILLER, M.A. Antibiotic use in food animals: controlling the human health impact. **Journal of AOAC International**, v.83, p.245-254, 2000.

WASSENAAR, T.M.; KIST, M.; JONG, A. Re-analysis of the risks attributed to ciprofloxacin-resistant *Campylobacter jejuni* infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.30, p.195-201, 2007.

YAN, S.S.; PENDRAK, M.L.; FOLEY, S.L.; POWERS, J.H. Campylobacter infection and Guillain-Barré syndrome: public health concerns from a microbial food safety perspective. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v. 5, p.285-305, 2005.

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

ZILBAUER, M.; DORRELL, N.; WREN, B.W.; BAJAJ-ELLIOTT, M. *Campylobacter jejuni* – mediated disease pathogenesis: an update. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, doi: 10.1016/j.trstmh.2007.09.019, 2007.

ZOETE, M.R.; PUTTEN, J.P.M.; WAGENAAR, J.A. Vaccination of chickens against *Campylobacter*. **Vaccine**, v.25, p.5548-5557, 2007.

CAPÍTULO II

I. INTRODUÇÃO

Campylobacter jejuni e *Campylobacter coli* são atualmente considerados um dos principais agentes causadores de gastroenterites em humanos, sendo a principal fonte de contaminação a carne de aves (HANNINEM AND HANNULA, 2007; AARESTRUP AND ENGBERG, 2001; WASSENAAR et al., 2007; ISHIHARA et al., 2004; FREDIANI-WOLF et al., 2003; ENGLER et al., 2007). Nos Estados Unidos foram estimados mais de 845 mil casos de campilobacteriose em 2011 (SCALLAN et al., 2011), porém a doença é subnotificada em vários países e a sua incidência real pode ser pelo menos 10 vezes maior do que os casos documentados (GIBREEL AND TAYLOR, 2006). Apesar da campilobacteriose ser uma infecção branda, autolimitante e de curso breve, o uso de antimicrobianos é necessário nos casos mais graves. Os macrolídeos, principalmente eritromicina, e as fluoroquinolonas são as drogas de escolha para tratamento da doença (AARESTRUP, 2005; KURINCIC et al., 2007; HAN et al., 2007).

Os antimicrobianos são usados na produção animal como agentes terapêuticos, profiláticos e como promotores de crescimento (FÁBREGA et al., 2008) e seu uso indiscriminado possui efeitos colaterais inevitáveis, sendo o mais preocupante a disseminação de genes de resistência e, conseqüentemente, de microrganismos resistentes, principalmente pela transferência horizontal que ocorre através de elementos genéticos móveis, como plasmídeos, transposons e integrons (ZHANG et al., 2006).

O Brasil atualmente é o 3º maior produtor mundial de frangos e líder em exportações, atingindo 142 países (MAPA, 2012; USDA, 2012). No entanto, não há até o presente momento, legislação específica para pesquisa de *Campylobacter* spp., o que evidencia a necessidade de maiores estudos sobre a ocorrência deste patógeno no país e seus potenciais riscos à saúde humana (CORTEZ et al, 2006). No Brasil há subnotificação dos casos, mas em alguns países desenvolvidos os casos de enterites por *Campylobacter* spp. são mais frequentes do que os causados por *Salmonella* spp. ou *Shigella* spp. (FSA, 2011; DHA, 2010).

Diante do exposto e tendo em vista a emergência crescente da contaminação por *Campylobacter* spp. no cenário mundial, principalmente através do consumo de carne de frango ou de seus subprodutos, o objetivo deste trabalho foi pesquisar a ocorrência de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* em carcaças resfriadas de frango, comercializadas na região do Distrito Federal e Entorno, bem como pesquisar a resistência antimicrobiana e detectar genes de resistência aos antimicrobianos por reação em cadeia da polimerase.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Obtenção das amostras e isolamento bacteriano

Foram adquiridas 105 amostras de carcaças de frango resfriado, de marcas variadas, provenientes de estabelecimentos comerciais localizados por todo o Distrito Federal e Entorno, no período de março de 2011 a junho de 2012. As amostras foram adquiridas simulando uma situação real de compra pelo consumidor, onde uma unidade amostral adquirida era composta por uma carcaça inteira, com embalagem íntegra, sem qualquer sinal de violação, procedente de frigorífico com Serviço de Inspeção Federal, resfriadas, com temperatura próxima a 4°C e dentro do prazo de validade. As amostras foram transportadas em caixas isotérmicas até o Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília para em seguida proceder ao isolamento microbiológico.

O isolamento microbiológico foi feito de acordo com KUDIRKIEN et al. (2011), onde foram pesados 10g de cada amostra, retirados da região do pescoço, peito e cloaca e inseridos em um saco estéril para homogeneização, acrescentando 90ml de Caldo de enriquecimento de Bolton (Bolton Broth, Oxoid, CM0983) adicionado de suplemento seletivo de Bolton (Oxoid, SR183E) e 5% de sangue de cavalo desfibrinado, incubados a uma temperatura de 42°C, por 48h em jarra de anaerobiose (Permutation[®]) e com gerador de microaerofilia (BD BBL™ CampyPak™ Plus Microaerophilic System Envelopes with Palladium Catalyst). Após incubação, foi distribuída uma alíquota de 0,1ml sobre a superfície de uma placa contendo *Campylobacter* Blood-free selective agar base (mCCDA, Oxoid, CM 0739) acrescentado de suplemento seletivo CCDA (Oxoid, SR155E) e incubados a uma temperatura de 37°C, por 48h,

em microaerofilia. Colônias gram-negativas, espiraladas ou curvadas, oxidase e catalase positivas e hipurato de sódio positivas (*C. jejuni*) foram classificadas como pertencentes ao gênero *Campylobacter*.

2. Identificação por PCR das espécies *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* e teste de susceptibilidade antimicrobiana

Todas as 105 amostras coletadas foram submetidas à análise da identificação das espécies de *Campylobacter* por PCR. Foi retirada uma alíquota de 1ml do Caldo de Enriquecimento de Bolton, após incubação a 42°C por 48h, em microaerofilia, para em seguida proceder a extração do DNA total seguindo a metodologia descrita por SAMBROOK AND RUSSEL (2006), utilizando fenol-clorofórmio-álcool isoamílico, nas proporções 25:24:1, respectivamente. Para identificação de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* foi realizada PCR seguindo metodologia descrita por LINTON et al. (1997). O gene *hip(O)* foi amplificado para identificação de *C. jejuni*, e foram utilizados os oligonucleotídeos HIP400 F 5'-GAAGAGGGTTTGGGTGGTG-3' e HIP1134 R 5'-AGCTAGCTTCGCATAATAACTTG-3', gerando um produto de 735bp. Para identificação de *C. coli*, o fragmento de gene *aspA* foi amplificado, e os oligonucleotídeos utilizados foram CC18 F 5'-GGTATGATTTCTACAAAGCGAG-3' e CC519 R 5'-ATAAAAGACTATCGTCGCGTG-3', gerando um produto de 500bp. As reações ocorreram com um volume final de 25µl, contendo 2,5mM MgCl₂, 2µl de 2mM dNTPs, 1µl de 10 pmol de cada primer, 2,5U *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), 2,5µl de tampão PCR 10X e 1µl de DNA template. Os reagentes do mix foram submetidos a 25 ciclos de amplificação, com uma temperatura de desnaturação de 94°C por 1min, anelamento a 66°C (*C. jejuni*) e 60°C (*C. coli*) por 1min e extensão a 72°C por 1min.

As cepas de *Campylobacter* spp. obtidas através do isolamento microbiológico convencional foram submetidas ao teste de susceptibilidade aos antimicrobianos, seguindo metodologia descrita por TAREMI et al. (2006). A técnica utilizada foi a de difusão de discos em ágar Mueller-Hinton (HIMEDIA, M1084) suplementado com 5% de sangue de ovelha. As placas foram incubadas a 42°C por 24h, em microaerofilia. Os seguintes antimicrobianos foram testados (Newprov[®]): tetraciclina (15µg), estreptomicina (30µg), ciprofloxacina (5µg),

eritromicina (15µg), gentamicina (10µg), ácido nalidíxico (30µg), cloranfenicol (30µg). A leitura do teste foi realizada de acordo com as recomendações da NCCLS (2002).

3. Detecção de genes de resistência antimicrobiana através de PCR

Todas as cepas de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* foram testadas para a presença dos genes *tet(O)* (tetraciclina), *aph-3* (aminoglicosídeos) e *aadE* (estreptomicina) por PCR. O Quadro 1 mostra a sequência dos oligonucleotídeos utilizados para detecção dos genes de resistência antimicrobiana. A metodologia utilizada para detecção dos genes *aph-3* e *aadE* foi descrita por OBENG et al. (2012). As reações ocorreram com um volume final de 25µl, contendo 4,0mM MgCl₂, 2µl de 2mM dNTPs, 1µl de 10pmol de cada primer, 2,5U Taq DNA polymerase (Invitrogen), 2,5µl de tampão PCR 10X e 1µl de DNA template. As temperaturas utilizadas para a reação foram: desnaturação inicial de 95°C por 4min, seguida de 30 ciclos de amplificação, com uma temperatura de desnaturação de 95°C por 30seg, temperatura de anelamento a 54°C por 30seg e temperatura de extensão a 72°C por 30seg, com extensão final de 72°C por 4min. Para detecção do gene *tet(O)*, utilizou-se a metodologia descrita por PRATT AND KOROLIK (2005), com uma pequena modificação na concentração de cloreto de magnésio. As reações ocorreram com um volume final de 25µl, com as mesmas concentrações descritas para os genes *aph-3* e *aadE*, com exceção da concentração de MgCl₂, que foi de 3,5mM. O ciclo de amplificações consistia em uma desnaturação inicial de 95°C por 2min, seguida de 35 ciclos de amplificação, com uma temperatura de desnaturação de 95°C por 2min, temperatura de anelamento de 52°C por 30seg e temperatura de extensão de 72°C por 1min, com extensão final de 72°C por 2min.

Quadro 1- Oligonucleotídeos utilizados na detecção dos genes de resistência antimicrobiana

Primer	Sequência 5'-3'	Produto (bp)	Referência
<i>aadE</i> F	GAACAGGATGAACGTATTTCG		
<i>aadE</i> R	GCATATGTGCTATCCAGG	837	Obeng et al. (2012)
<i>aphA-3</i> F	TGCGTAAAAGATACGGAAG		
<i>aphA-3</i> R	CAATCAGGCTTGATCCCC	701	Obeng et al. (2012)
<i>tet(O)</i> F	GGCGTTTTGTTTATGTGCG		
<i>tet(O)</i> R	ATGGACAACCCGACAGAAGC	559	Pratt and Korolik(2005)

Para detecção de resistência às quinolonas, foi realizada PCR- RFLP do gene *cjgyr* para *Campylobacter jejuni*, segundo metodologia descrita por WARDAK et al. (2005). A análise inicia-se com a amplificação do fragmento de 179bp contendo a região determinante da resistência às quinolonas (QRDR), presente no gene da girase A. As mutações nesta região envolvem a troca de Treonina na posição 86 (Thr-86) por Isoleucina (Ile) (LUANGTONGKUM et al., 2009; PAYOT et al., 2006; IOVINE, 2013). Os oligonucleotídeos utilizados na reação foram *cjgyr*F 5'-AAATCAGCCCGTATAGTGGGTGCTGTTATAGGTCGTTATCACCCACACATGGAGGT-3' e *cjgyr*R 5'-TCAGTATAACGCATCGCAGC-3', gerando um fragmento de 179bp. As reações ocorreram com um volume final de 25µl, contendo 2,0mM MgCl₂, 2µl de 2mM dNTPs, 1µl de 10pmol de cada primer, 2,5U *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), 2,5µl de tampão PCR 10X e 1µl de DNA genômico. As temperaturas utilizadas para a reação foram: desnaturação inicial de 94°C por 5min, seguida de 30 ciclos de amplificação, com uma temperatura de desnaturação de 94°C por 1 min, temperatura de anelamento de 51°C por 1 min e temperatura de extensão a 72°C por 45seg, com extensão final de 72°C por 7min. Uma digestão foi realizada com enzima *Rsa*I (Promega) em um mix de 20µl, contendo 10µl do produto de PCR (20ng) e 10U de enzima, com a finalidade de detectar mutações na região QRDR da girase A, que em caso de ausência, verificar-se-á dois fragmentos de 125 e 54 pares de base. A visualização da digestão foi realizada em gel de agarose a 3%.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Identificação das espécies de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* por isolamento microbiológico e PCR

Das 105 amostras de carcaça de frango resfriado, analisadas pelo isolamento microbiológico, 11 (11,55%) amostras foram positivas para a pesquisa de *Campylobacter* spp., sendo 7 (63,64%) amostras positivas para *C. jejuni* e 4 (36,36%) amostras positivas para *C. coli*. Todas as 105 amostras foram submetidas à análise por PCR para identificação das espécies de *Campylobacter* e os resultados obtidos coincidiram com os resultados encontrados no isolamento microbiológico, sendo 7 (63,64%) amostras positivas para *C. jejuni* e 4 (36,36%) amostras positivas para *C. coli*, gerando produtos de 735bp e 500bp, respectivamente. A Figura 1 mostra o resultado das amplificações dos genes *hip(O)*, que identifica *C. jejuni* e *aspA*, que identifica *C. coli*.

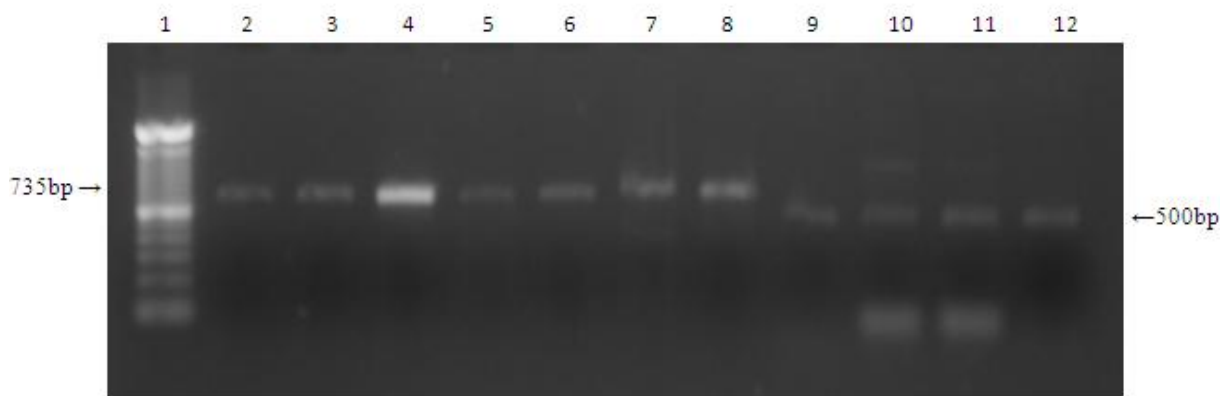


Fig.1. Resultados da PCR para identificação de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* em carcaças de frango resfriadas comercializadas no Distrito Federal. 1) 100bp DNA Ladder (Invitrogen®); 2 a 8) Fragmento de 735bp, resultante de amplificação do gene *hip(O)* das 7 amostras de *Campylobacter jejuni* detectadas em caldo de Bolton, após incubação a 42°C por 48h, em microaerofilia; 9 a 12) Fragmento de 500bp, resultante de amplificação do gene *aspA* das 4 amostras de *Campylobacter coli* detectadas em caldo de Bolton, após incubação a 42°C por 48h, em microaerofilia.

Os resultados da ocorrência de *Campylobacter jejuni* foram similares aos verificados em trabalho prévio, realizado pelo nosso grupo de pesquisa, em que MOURA et al. (2013) detectaram 19,56% de *Campylobacter* spp., sendo todas as cepas identificadas por análise microbiológica como *C. jejuni*, em 92 carcaças de frango resfriados comercializados na região do Distrito Federal, Brasil, embora neste estudo prévio não tenha sido identificado *Campylobacter coli*. Resultados semelhantes também foram encontrados por FREDIANI-WOLF AND STEPHAN (2003), em que 24,4% de *Campylobacter jejuni* foram detectados em pele de pescoço de frangos coletados em abatedouro na Suíça. CORTEZ et al. (2006) detectaram 5,2% de *Campylobacter* spp., isolado de fezes, penas e água provenientes de vários pontos diferentes de abatedouro de frangos localizado em São Paulo, Brasil, sendo que 4,9% das cepas foram identificadas como *C.jejuni* e 0,35% como *C. coli*.

Por outro lado, resultados diferentes dos obtidos neste trabalho foram relatados por alguns autores, como FERNÁNDEZ et al. (1996), que detectaram 92,9% de cepas de *Campylobacter* spp., sendo que destas, 78,6% foram identificadas como *C. coli* e 21,4% como *C. jejuni*, isolados de fígado de frango congelado no Chile. SALLAM (2007) detectou 64,7% de *Campylobacter* spp., sendo que 85,5% das amostras positivas foram identificadas como *C. jejuni* e 24,5% como *C. coli*, isolados de carcaças e subprodutos de frangos no Japão. Resultados diferentes dos encontrados no presente trabalho, no que se refere à presença de *Campylobacter* spp, também foram relatados por FREITAS AND NORONHA (2007), que detectaram 87,5% de *Campylobacter* spp. isolados de carcaças e miúdos de frango em Belém, Brasil.

A ocorrência de *Campylobacter jejuni* (63,64%) foi maior do que a de *Campylobacter coli* (36,36%), resultados também observados por KANG et al. (2006), que encontraram 36,3% de *C.jejuni* e 26,4% de *C.coli*, isolados de carcaças de frango na Coreia. OBENG et al. (2012) encontraram 30,4% de *C.jejuni* e 14,5% de *C.coli*, isolados de swabs retais de frangos na Austrália. HAN et al. (2007) encontraram 37,7% de *C.jejuni* e 35,5% de *C.coli* isolados de carcaças de frango na Coreia. A carne de frango e seus subprodutos constituem a principal fonte de contaminação de *C. jejuni* e alguns trabalhos têm demonstrado que a ocorrência de

C.coli é maior em suínos do que em aves (HARVEY et al, 1999; SÁENZ et al., 2000; PEZZOTTI et al., 2003).

2. Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

Os resultados do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos das cepas de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*, realizado pelo método de difusão de discos, segundo TAREMI et al., (2006) e NCCLS (2002), estão listados na Tabela 1. Entre as cepas de *C. jejuni*, a resistência à tetraciclina e ao ácido nalidíxico (71,43%) foram as mais frequentes, seguidas de ciprofloxacina e eritromicina (57,14%). Três cepas de *C. jejuni* (42,86%) apresentaram resistência à estreptomicina e gentamicina e apenas duas cepas (28,57%) ao cloranfenicol. Entre as cepas de *C. coli*, a resistência à tetraciclina e estreptomicina foram as mais frequentes, onde todas as 4 cepas (100%) foram resistentes, seguidas de eritromicina (75%). Duas cepas (50%) apresentaram resistência à ciprofloxacina, gentamicina e ao ácido nalidíxico e nenhuma resistência ao cloranfenicol foi observada. Cinco cepas (71,43%) de *C. jejuni* e todas as quatro cepas (100%) de *C. coli* apresentaram multi-resistência, sendo resistentes a três ou mais antimicrobianos

Tabela 1. Resultados do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos pelo método de difusão de discos em ágar Mueller-Hinton suplementado com 5% de sangue de ovelha, para as cepas de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* isoladas no trabalho.

Agente	<i>C. jejuni</i> (n=7)			<i>C. coli</i> (n=4)		
	S(%)	I(%)	R(%)	S(%)	I(%)	R(%)
TET	14,29	14,29	71,43	0	0	100
EST	28,57	28,57	42,86	0	0	100
CIP	28,57	14,29	57,14	25	25	50
ERI	28,57	14,29	57,14	25	0	75
GEN	42,86	14,29	42,86	50	0	50
AC.NAL.	28,57	0	71,43	0	50	50
CLO	28,57	42,86	28,57	50	50	0

TET: tetraciclina; EST: estreptomicina; CIP: ciprofloxacina; ERI: eritromicina; GEN: gentamicina; AC.NAL.: ácido nalidíxico; CLO: cloranfenicol; Perfil de resistência: S: suscetível; I: intermediário; R: resistente.

Os resultados da resistência à tetraciclina foram os mais elevados, sendo de 71,43% e 100% para as cepas de *C. jejuni* e *C.coli*, respectivamente. Valores semelhantes também foram observados em outros trabalhos, como o de HAN et al. (2007), que encontraram 99,1% de resistência em amostras de *C. jejuni* isoladas de carne de frangos na Coreia. ISHIHARA et al. (2004) encontraram 87,9% de resistência a este antimicrobiano em cepas de *C. coli* isoladas de animais de produção no Japão e SON et al. (2007) encontraram 99,1% de resistência em cepas de *Campylobacter* spp. isolados de carcaças de aves nos Estados Unidos.

A resistência ao ácido nalidíxico e à ciprofloxacina foi de 71,43% e 57,14%, respectivamente, para *C. jejuni* e de 50% para ambos os antimicrobianos para *C. coli*. Um aumento crescente na resistência de *Campylobacter* spp. às quinolonas tem sido relatado em vários países (HÄNNINEM AND HANNULA, 2007; ISHIHARA et al., 2004; SON et al., 2007). RODRIGO et al. (2007) detectaram 86,8% de resistência à ciprofloxacina em cepas de *C. jejuni* e 86,2% em cepas de *C. coli*, isoladas de frangos em Trinidad e Tobago. HAN et al. (2007) detectaram 92,2% de resistência ao ácido nalidíxico e à ciprofloxacina em cepas de *C. jejuni* isoladas de carne de frangos na Coreia. WASSENAR et al. (2000) e RODRIGO et al. (2007) mencionam pesquisas relacionando o aumento da resistência ao uso das quinolonas na criação de frangos na primeira semana de vida, para reduzir problemas na vacinação, e na terceira e quarta semana de vida, no tratamento e prevenção de doenças respiratórias.

Os resultados da resistência à eritromicina foram de 57,14% para *C. jejuni* e de 75% para *C. coli*. Valores semelhantes foram observados por KURINCIC et al. (2007), que encontraram 66,6% de resistência em cepas de *C. coli* isoladas de pele e fígado de frangos na Eslovênia, e BESTER et al. (2008), que relatam a resistência de 50% de cepas de *C. jejuni* à eritromicina em amostras de ceco de frangos de corte e de 42,9% em amostras de ceco de galinhas poedeiras, na África do Sul. Segundo IOVINE et al. (2013) e AARESTRUP AND

ENGBERG (2001), a eritromicina é o antimicrobiano de primeira escolha no tratamento da campilobacteriose em humanos. Em amostras de alimentos de origem animal, a resistência a este fármaco é, geralmente, maior em *C. coli*, principalmente das cepas isoladas de suínos, do que em *C. jejuni* (ENGBERG et al., 2001). GIBREEL AND TAYLOR (2006) sugerem que isso ocorra devido ao seu extenso uso na produção de suínos, onde os macrolídeos são frequentemente usados como promotores de crescimento, criando-se uma pressão seletiva para a emergência e disseminação de resistência entre microrganismos. Os valores elevados de resistência de *C. coli* à eritromicina, verificados no presente trabalho, corroboram essa hipótese, assim como os resultados de PEZZOTTI et al. (2003), que detectaram 25% e 12,5% de resistência em cepas de *C. coli* e *C. jejuni*, respectivamente, isolados de carcaças de frango e 60% e 16,7% de resistência em cepas de *C. coli* e *C. jejuni*, respectivamente, isolados de carcaças de suínos, no nordeste da Itália.

Os resultados encontrados para estreptomicina e gentamicina, ambos da classe dos aminoglicosídeos, assemelham-se aos encontrados por MOURA et al. (2013), que relataram uma alta resistência (93,75%) de ambos os antimicrobianos em cepas de *C. jejuni* isoladas de frangos resfriados coletados na mesma região do presente trabalho. Outras pesquisas reportaram resultados diferentes, como RODRIGO et al. (2007), que encontraram 30% de resistência à estreptomicina e 5,4% de resistência à gentamicina, em amostras de *Campylobacter* spp. isolados de frangos em Trinidad e Tobago e MARINOU et al. (2012), que encontraram 14,3% de resistência à gentamicina em cepas de *C. coli* isoladas de swabs fecais de frangos na Grécia.

A baixa ocorrência de resistência ao cloranfenicol, observada somente em duas cepas (28,57%) de *Campylobacter jejuni*, não ocorrendo resistência em *Campylobacter coli*, pode ser explicada pelo fato de que em 2003, o uso de princípios ativos deste antimicrobiano tenha sido proibido na alimentação animal no Brasil pela Instrução Normativa nº 9, de 27 de junho de 2003 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, devido aos relatos de ocorrência de anemia aplástica em humanos (BRASIL, 2003). Resultados semelhantes também foram relatados por MOURA et al. (2013), em que 37,5% das cepas de *C. jejuni* foram resistentes a este antimicrobiano.

Os valores elevados de multi-resistência, observados em cinco cepas (71,43%) de *C. jejuni* e nas quatro cepas (100%) de *C. coli*, configuram grande preocupação para a saúde pública, tendo em vista que, segundo RODRIGO et al. (2007), os microrganismos que habitam o trato gastrointestinal possuem a característica de trocar informações genéticas entre si, principalmente entre as bactérias gram-negativas, ampliando-se o espectro de resistência dos microrganismos.

3. Detecção de genes de resistência antimicrobiana em cepas de *C. jejuni* e *C. coli*

Os resultados da pesquisa dos genes de resistência aos aminoglicosídeos (*aph3-1*), estreptomicina (*aadE*) e tetraciclina (*tet(O)*), realizados por PCR, nas cepas de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* estão listados na Tabela 2. Quatro (57,14%) cepas de *C. jejuni* e uma (25%) cepa de *C. coli* amplificaram o fragmento de 701bp do gene *aph3-1*, que confere resistência aos aminoglicosídeos. Duas (28,57%) cepas de *C. jejuni* amplificaram o fragmento de 837bp do gene *aadE*, que confere resistência à estreptomicina. Três (42,86%) cepas de *C. jejuni* e uma (25%) cepa de *C. coli* amplificaram o fragmento de 559bp do gene *tet(O)*, que confere resistência à tetraciclina (Figura 2).

Tabela 2- Resultado da PCR para detecção dos genes de resistência das cepas de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* isoladas de carcaças de frango resfriadas

Espécie (n)	Gene	Número de cepas positivas (%)
<i>C. jejuni</i> (07)	<i>aph-3</i>	04 (57,14%)
	<i>aadE</i>	02 (28,57%)
	<i>tet(O)</i>	03 (25%)
<i>C. coli</i> (04)	<i>aph-3</i>	01 (25%)
	<i>aadE</i>	0
	<i>tet(O)</i>	01 (25%)

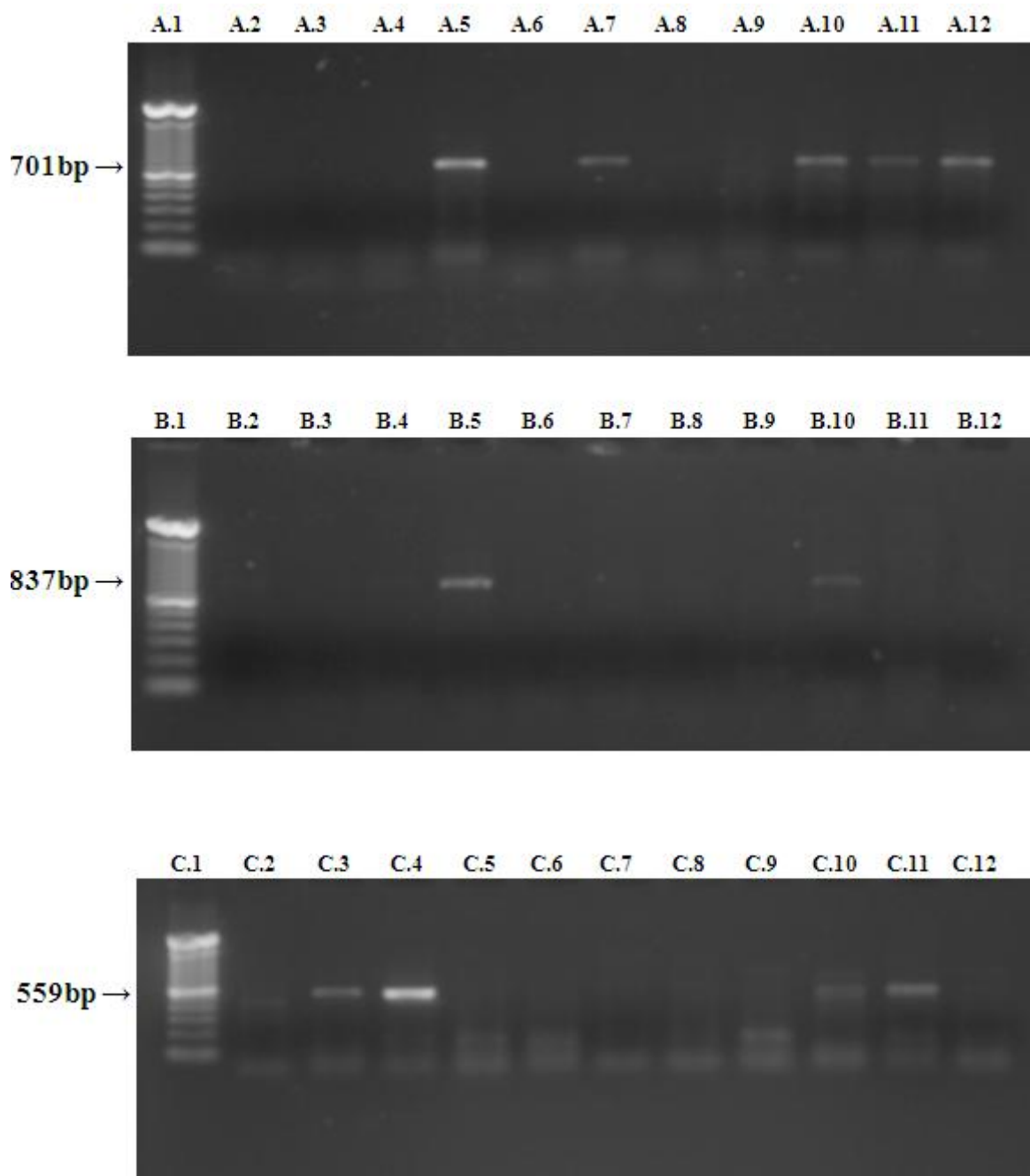


Fig. 2. Resultados da PCR para pesquisa de genes de resistência aos aminoglicosídeos (*aph-3*), estreptomicina (*aadE*) e tetraciclina (*tet(O)*), a partir das cepas de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*. A.1) 100bp DNA Ladder (Invitrogen®); A.5, A.10, A.11, A.12) Fragmento de 701bp do gene *aph-3*, detectado em *C.jejuni*; A.7) Fragmento de 701bp do gene *aph-3*, detectado em *C.coli*; B.1) 100bp DNA Ladder (Invitrogen®); B.5, B.10) Fragmento de 837bp do gene *aadE*, detectado em *C. jejuni*; C.1) 100bp DNA Ladder (Invitrogen®); C.3, C.10, C.11) Fragmento de 559bp do gene *tet (O)*, detectado em *C.jejuni*; C.4) Fragmento de 559bp do gene *tet(O)*, detectado em *C.coli*.

A presença do gene *aph-3* já foi reportada previamente em cepas de *Campylobacter* spp. por FRYE et al. (2011), que relataram sua presença em 9,7% de cepas de *C. coli* isoladas de *swabs* fecais de suínos nos Estados Unidos. OBENG et al., (2012) pesquisaram a ocorrência do gene em cepas de *C. coli* isoladas de suínos, e em cepas de *C. jejuni* e *C. coli*, isoladas de amostras fecais de aves e os resultados mostraram a ocorrência do gene *aph-3* em 0,9% das cepas de *C. coli* isoladas de suínos e a ausência do mesmo nas cepas de *C. jejuni* e *C. coli*, isoladas de amostras fecais de aves, na Austrália. Segundo IOVINE (2013), o gene *aph-3*, normalmente presente em plasmídeos, é responsável pela codificação de uma fosfotransferase, enzima envolvida na resistência aos aminoglicosídeos, e pode ser encontrado associado com o gene *aadE*, que confere resistência à estreptomicina através de uma adeniltransferase.

PINTO-ALPHANDARY et al. (1990) relataram a ocorrência do gene *aadE* em 67% das cepas de *C. coli* testadas, as quais foram isoladas de animais e humanos na França e na Espanha. Os mesmos autores também relataram a ocorrência do gene em 100% das cepas de *C. jejuni* isoladas de humanos na Tailândia. OBENG et al., (2012) pesquisaram a ocorrência do gene *aadE* em cepas de *C. coli* e *C. jejuni*, oriundas de aves e suínos na Austrália, porém não obtiveram resultados positivos. A resistência de cepas de *Campylobacter* spp. aos aminoglicosídeos não costuma ser monitorada, por não ser uma droga de escolha no tratamento da campilobacteriose em humanos. Porém, segundo THIBODEAU et al. (2013), essa pesquisa é importante devido à possibilidade do microrganismo agir como um reservatório de genes de resistência, que podem ser transferidos a outros microrganismos. Sabe-se que a resistência à eritromicina também pode ocorrer por modificação do antimicrobiano por ação de fosfotransferases, porém esse mecanismo só foi demonstrado em *Staphylococcus* spp (PAYOT et al., 2006).

Assim como no presente trabalho, a presença do gene *tet(O)* em cepas de *Campylobacter* spp. já foi relatada por outros autores, como LEE et al., (1994), que pesquisaram a sua ocorrência em cepas de *C. jejuni* e *C. coli*, isolados de frangos em Taiwan e o encontraram em 98% das amostras, sendo que 87% se localizavam em plasmídeos e 11% no cromossomo. Segundo LUANGTONGKUM et al. (2009), o gene *tet(O)* pode estar presente

no cromossoma bacteriano, ou mais comumente, em plasmídeos. O principal mecanismo de resistência às tetraciclina em bactérias gram-negativas, segundo IOVINE et al. (2013), envolve a ligação da proteína *tet(O)* ao sítio de ligação da tetraciclina no ribossomo, protegendo-o da ação do antimicrobiano.

A Figura 3 mostra o resultado da PCR-RFLP, realizada nas amostras de *C. jejuni*, para detecção de mutações associadas à resistência às quinolonas. Das 7 cepas de *C. jejuni* que foram submetidas à análise do gene *cjgyr*, apenas 3 (42,86%) apresentaram mutações, significando em resistência às quinolonas. Nos casos em que o DNA da cepa analisada apresentou mutações na posição Thr-86-Ile da girase A, o sítio artificial de clivagem da enzima *RsaI* encontrava-se destruído e um fragmento de 179bp, idêntico ao produto de PCR não digerido, foi observado. Nas cepas sensíveis às quinolonas, o sítio artificial de clivagem da enzima encontrava-se intacto e então dois fragmentos foram observados como resultado da digestão, um de 54 e outro de 125bp.

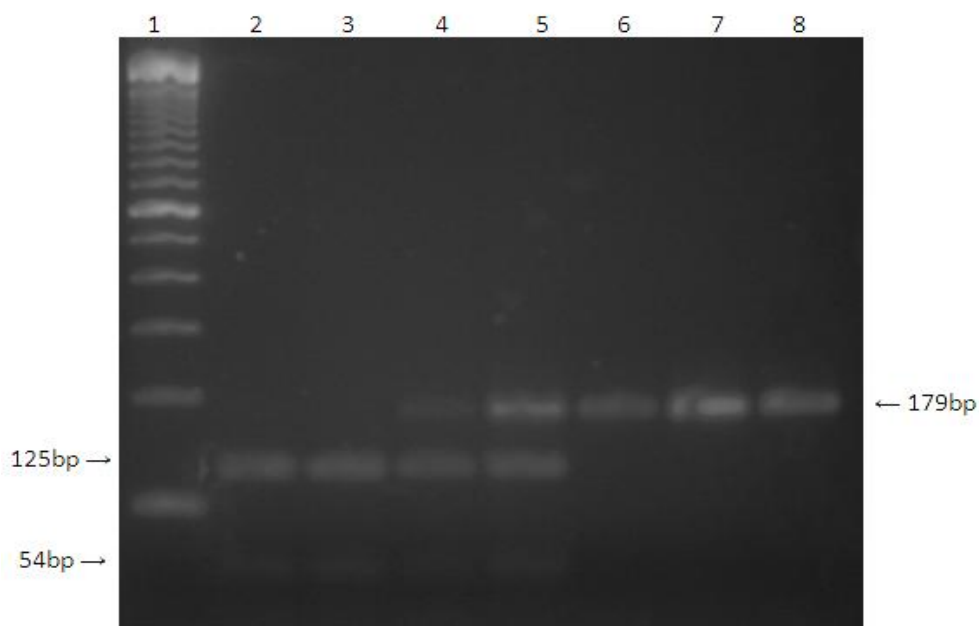


Fig.3. Resultados da PCR-RFLP para detecção de mutações Thr-86-Ile na região determinante de resistência às quinolonas (QRDR) da girase A de *Campylobacter jejuni*, obtidos por digestão do produto de PCR pela enzima *RsaI*. 1) 100bp DNA Ladder (Invitrogen®); 6,7,8) Fragmento de 179bp da QRDR da girase A, não digerido pela enzima *RsaI*, em cepas de *C. jejuni* resistentes às quinolonas.

BOONMAR et al. (2007) também relataram a ocorrência de mutações Thr-86-Ile na girase A, verificada através de sequenciamento, em 77% das cepas de *C. jejuni*, isoladas de swabs fecais de frangos na Tailândia. SONNEVEND et al. (2006), relataram a ocorrência da mesma mutação, verificada por Mismatch Amplification Mutation Assay (MAMA PCR) e sequenciamento, em 85% das cepas de *C. jejuni*, isoladas de fezes de humanos nos Emirados Árabes Unidos.

As três cepas de *C. jejuni* que apresentaram mutações Thr-86-Ile na girase A, verificadas pela PCR-RFLP, também apresentaram resistência às quinolonas pelo antibiograma de difusão de discos, duas delas resistentes à ciprofloxacina e ao ácido nalidíxico e uma cepa resistente somente ao ácido nalidíxico. No entanto, outras duas cepas apresentaram resistência no antibiograma de difusão de discos aos dois antimicrobianos. Segundo IOVINE et al., (2013), a ocorrência de mutação isolada de Thr-86-Ile na girase A de *Campylobacter* spp. confere alto nível de resistência ao ácido nalidíxico e fluoroquinolonas. Porém, segundo KINANA et al. (2007), esse não é um mecanismo exclusivo da resistência às quinolonas, podendo haver ainda envolvimento de bombas de efluxo, outras mutações na girase A e ainda, mutações na girase B, fatores que não foram pesquisados no trabalho e que podem ter contribuído para a resistência das outras cepas.

IV. CONCLUSÕES

No presente trabalho, foi reportada a ocorrência de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* em carcaças resfriadas de frango, comercializadas na região do Distrito Federal e Entorno, bem como a presença de resistência antimicrobiana e de genes de resistência. Os resultados evidenciam a necessidade da implementação de programas de vigilância e procedimentos específicos de isolamento de *Campylobacter* em carnes de aves no Brasil. Além disso, os resultados da resistência antimicrobiana mostram que existe uma necessidade de maiores pesquisas no país, para que sua origem seja verificada, possibilitando, dessa maneira, um planejamento de medidas mais eficazes de manejo na produção de animais, bem como na manipulação dos alimentos de origem animal na indústria, como controle de microrganismos e aplicação de medicamentos, o que afeta diretamente a indústria de alimentos e conseqüentemente, a saúde pública.

V. REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F.M. Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 96, p. 271-281, 2005.

AARESTRUP, F.M. AND ENGBERG, J. Antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter*. **Vet. Res**, v.32, p. 311-321, 2001.

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

BOONMAR, S.; MORITA, Y.; FUJITA, M.; SANGSUK, L.; SUTHIVARAKOM, K.; PADUNGTOD, P.; MARUYAMA, S.; KABEYA, H.; KATO, M.; KOZAWA, K.; YAMAMOTO, S.; KIMURA, H. Serotypes, antimicrobial susceptibility, and *gyr A* gene mutation of *Campylobacter jejuni* isolates from human and chickens in Thailand. **Microbiol. Immunol.**, v. 51, p. 531-537, 2007.

BRASIL. Instrução Normativa nº 9, de 27 de junho de 2003. Proíbe a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos cloranfenicol, nitrofuranos e os produtos que contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e suscetível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 30 jun. 2003. Seção 1, número 123, p.4.

CORTEZ, A.L.L.; CARVALHO, A.C.F.B.; SCARCELLI, E.; MIYASHIRO,S.; VIDAL-MARTINS, A.M.C.; BÜRGER, A.P. Survey of chicken abattoir for the presence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 48, p. 307-310, 2006.

DHA (DEPARTMENT OF HEALTH AND AGEING) Monitoring the incidence and causes of diseases potentially transmitted by food in Australia: Annual Report of the OzFoodNet Network, 2010. Online. Acessado em 19 de maio de 2013. Disponível em: [http://www.health.gov.au/internet/main/publishing.nsf/content/cda-cdi3603-pdf-cnt.htm/\\$FILE/cdi3603a.pdf](http://www.health.gov.au/internet/main/publishing.nsf/content/cda-cdi3603-pdf-cnt.htm/$FILE/cdi3603a.pdf)

ENGBERG, J.; AARESTRUP, F.M.; TAYLOR, D.E.; GERNER-SMIDT, P.; NACHAMKIN, I. Quinolone and Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates. **Emerging Infectious Disease**, v. 7, n.1, p. 24-34, 2001.

ENGLER, M.D.; HILL, A.E.; DARGATZ, D.A.; LADELY, S.R.; FEDORKA-CRAY, P.J. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* in US dairy cattle. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 1570-1577, 2007.

FÀBREGA, A.; SÁNCHEZ-CÉSPEDES, J.; SOTO, S.; VILA, J. Quinolone resistance in the food chain. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 31, p. 307-315, 2008.

FERNÁNDEZ, H. AND PISÓN, V. Isolation of thermotolerant species of *Campylobacter* from commercial chicken livers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 29, p. 75-80, 1996.

FREDIANI-WOLF, V.; STEPHAN, R.; Resistance patterns of *Campylobacter* spp. strains isolated from poultry carcasses in a big Swiss poultry slaughterhouse. **International Journal of Food Microbiology**, v. 89, p. 233-240, 2003.

FREITAS, J.A.; NORONHA, G.N. Ocorrência de *Campylobacter* spp. em carnes de miúdos de frango expostos ao consumo em Belém, Pará. **Arq. Bras. Med. Zootec.**, v. 59, n.3, p. 813-815, 2007.

FRYE, J. G.; LINDSEY, R.L.; MEINERSMANN, R.J.; BERRANG, M.E.; JACKSON, C.R.; ENGLER, M.D.; TURPIN, J.B.; FEDORKA-CRAY, P.J. Related antimicrobial resistance genes detected in different bacterial species co-isolated from swine fecal samples. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.8, n.6, p. 666-679, 2011.

FSA (FOOD STANDARDS AGENCY) Foodborne Disease Strategy 2010-15. United Kingdom, 2011. Online. Acessado em 19 de maio de 2013. Disponível em: <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/fds2015.pdf>

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

HAN, K.; JANG, S.S.; CHOO, E.; HEU, S.; RYU, S. Prevalence, genetic diversity and antibiotic resistance patterns of *Campylobacter jejuni* from retail raw chickens in Korea. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, p. 50-59, 2007.

HÄNNINEN, M. AND HANNULA M.; Spontaneous mutation frequency and emergence of ciprofloxacin resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.60, p. 1251-1257, 2007.

HARVEY, R.B; YOUNG, C.R.; ZIPRIN, R.I.; HUME, M.E.; GENOVESE, K.J.; ANDERSON, R.C.; DROLESKEY, R.E.; STANKER, L.H.; NISBET, D.J. Prevalence of *Campylobacter* spp. isolated from the intestinal tract of pigs raised in an integrated swine production system. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.215, p. 1601-1604, 1999.

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

ISHIHARA, K.; KIRA, T.; OGIKUBO, K.; MORIOKA, A.; KOJIMA, A.; KIJIMA-TANAKA, M.; TAKAHASHI, T.; TAMURA, Y. Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter* isolated from food-producing animals on farms (1999-2001): results from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.24, p. 63-69, 2004.

KANG, Y.; CHO, Y.; YOON, S.; YU, M.; KIM, C.; LEE, J.; PYUN, Y. Prevalence and Antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from raw chicken meat and human stools in Korea. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 12, p. 2915-2923, 2006.

KINANA, A.D.; CARDINALE, E.; BAHOUN, I.; TALL, F.; SIRE, J.; BREUREC, S.; GARIN, B.; BOYE, C. S.; PERRIER-GROS-CLAUDE, J. *Campylobacter coli* isolates derived from chickens in Senegal: Diversity, genetic exchange with *Campylobacter jejuni* and quinolone resistance. **Research in Microbiology**, v.158, p. 138-142, 2007.

KUDIRKIENĖ, E.; BUNEVICIENE, J.; BRONDSTED, L.; INGMER, H.; OLSEN, J.E.; MALAKAUSKAS, M. Evidence of broiler meat contamination with post-desinfection strains of

Campylobacter jejuni from slaughterhouse. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, p. 116-120, 2011.

KURINCIC, M.; BOTTELDOORN, N.; HERMAN, L.; SMOLE MOZINA, S. Mechanisms of erythromycin resistance of *Campylobacter* spp. isolated from food, animals and humans. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, p. 186-190, 2007.

LEE, C.Y.; TAI, C.L.; LIN, S.C.; CHEN, Y.T. Occurrence of plasmids and tetracycline resistance among *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from whole market chickens and clinical samples. **International Journal of Food Microbiology**, v.24, p. 161-170, 1994.

LINTON, D.; LAWSON, A.J.; OWEN, R.J.; STANLEY, J. PCR Detection, Identification to Species Level, and Fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Direct from Diarrheic Samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 10, p. 2568-2572, 1997.

LUANGTONGKUM, T.; JEON, B.; HAN, J.; PLUMMER, P.; LOGUE, C.M.; ZHANG, Q. Antibiotic resistance in *Campylobacter*: emergence, transmission, and persistence. **Future Microbiol.**, v. 4, p. 189-200, 2009.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). Online. Acessado em 19 de maio de 2013. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/aves>

MARINOU, I.; BERSIMIS, S.; IOANNIDIS, A.; NICOLAOU, C.; MITROUSSIA-ZIOUVA, A.; LEGAKIS, N.J.; CHATZIPANAGIOTOU, S. Identification and antimicrobial resistance of *Campylobacter* species isolated from animal sources. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1-6, 2012.

MOURA, H.M.; SILVA, P.R.; DA SILVA, P.H.; SOUZA, N.R.; RACANICCI, A.M.; SANTANA, A.P. Antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* isolated from chicken carcasses in the Federal District, Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 76, p. 691-693, 2013.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 2002. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from

animals, 2th ed. Approved standard. NCCLS publication no. M31-A2. **National Committee for Clinical Laboratory Standards**, Wayne, Pennsylvania.

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.

PAYOT, S.; BOLLA, J.; CORCORAN, D. Mechanisms of flouroquinolone and macrolide resistance in *Campylobacter* spp.. **Microbes and Infection**, v.8, p. 1967-1971, 2006.

PEZZOTTI, G.; SERAFIN, A.; LUZZI, I.; MIONI, R.; MILAN, M.; PERIN, R. Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in animals and meat in northeastern Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, p. 281-287, 2003.

PINTO-ALPHANDARY, H.; MABILAT, C.; COURVALINT, P. Emergence of aminoglycoside resistance genes aadA and aadE in the genus *Campylobacter*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 34, n. 6, p. 1294-1296, 1990.

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

RODRIGO, S.; ADESIYUN, A.; ASGARALI, Z.; SWANSTON, W. Antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. isolated from broilers in small poultry processing operations in Trinidad. **Food Control**, v. 18, p. 321-325, 2007.

SÁENZ, Y.; ZARAZAGA, M.; LANTERO, M.; GASTAÑARES, M.J.; BAQUERO, F.; TORRES, C. Antibiotic resistance in *Campylobacter* strains isolated from animals, foods and humans in Spain in 1997-1998. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n.2, p. 267-271, 2000.

SALLAM, K.I. Prevalence of *Campylobacter* in chicken and chicken by-products retailed in Sapporo area, Hokkaido, Japan. **Food Control**, v. 18, p. 1113-1120, 2007.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. The condensed protocols from molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2006.

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

SON, I.; ENGLER, M.D.; BERRANG, M.E.; FEDORKA-CRAY, P.J.; HARRISON, M.A. Antimicrobial resistance of *Arcobacter* and *Campylobacter* from broiler carcasses. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 29, p. 451-455, 2007.

SONNEVEND, Á.; ROTIMI, V.O.; KOLODZIEJEK, J.; USMANI, A.; NOWOTNY, N.; PÁL, T. High Level of ciprofloxacin resistance and its molecular background among *Campylobacter jejuni* strains isolated in the United Arab Emirates. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 1533-1538, 2006.

TAREMI, M.; DALLAL, M.M.S.; GACHKAR, L.; MOEZARDALAN, S.; ZOLFAGHARIAN, K.; ZALI, M.R. Prevalence and Antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolated from retail raw chicken and beef meat, Tehran, Iran. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 401-403, 2006.

THIBODEAU, A.; FRAVALO, P.; GARNEAU, P.; MASSON, L.; LAURENT-LEWANDOWSKI, S.; QUESSY, S.; HAREL, J.; LETELLIER, A. Distribution of Colonization and Antimicrobial resistance genes in *Campylobacter jejuni* isolated from chicken. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.10, n.4, p. 382-391, 2013.

USDA (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE). Online. Acessado em 19 de maio de 2013. Disponível em: http://www.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf

WARDAK, S.; SZYCH, J.; CIESLIK, A. Wykorzystanie techniki PCR-RFLP do wykrywania mutacji w kodonie 86 genu *gyrA* związanej z opornością na fluorochinolony pałeczek *Campylobacter jejuni*. **Med. Dosw. Mikrobiol.**, v. 57, p. 295-301, 2005.

WASSENAAR, T.M. AND NEWELL, D.G. Genotyping of *Campylobacter* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2000.

WASSENAAR, T.M.; KIST M.; JONG A. Re- analysis of the risks attributed to ciprofloxacin-resistant *Campylobacter jejuni* infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.30, p.195-201, 2007.

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