

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS



Dissertação

“Caracterização fenotípica e genotípica do perfil de resistência a antimicrobianos em isolados de *Campylobacter jejuni* da cadeia produtiva de frangos de corte da região sul do Rio Grande do Sul”

Natalie Rauber Kleinubing

Pelotas, 2019

Natalie Rauber Kleinubing

“Caracterização fenotípica e genotípica do perfil de resistência a antimicrobianos em isolados de *Campylobacter jejuni* da cadeia produtiva de frangos de corte da região sul do Rio Grande do Sul”

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

Orientador: Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva

Co-orientadoras: Prof. Dr. Graciela Völz Lopes

Dra. Louise Haubert

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

K64c Kleinubing, Natalie Rauber

Caracterização fenotípica e genotípica do perfil de resistência a antimicrobianos em isolados de *Campylobacter jejuni* da cadeia produtiva de frangos de corte da região sul do Rio Grande do Sul / Natalie Rauber Kleinubing ; Wladimir Padilha da Silva, orientador ; Graciela Völz Lopes, Louise Haubert, coorientadoras. — Pelotas, 2019.

89 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. *Campylobacter termofilicos*. 2. Genes de resistência a antimicrobianos. 3. Multirresistência. 4. Perfil de resistência. 5. Plasmídeos. I. Silva, Wladimir Padilha da, orient. II. Lopes, Graciela Völz, coorient. III. Haubert, Louise, coorient. IV. Título.

CDD : 636.51

Natalie Rauber Kleinubing

Caracterização fenotípica e genotípica do perfil de resistência a
antimicrobianos em isolados de *Campylobacter jejuni* da cadeia produtiva de frangos
de corte da região sul do Rio Grande do Sul

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em
Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade
Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 27/02/2019

Banca examinadora:

Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva (Orientador)

Doutor em Ciência dos Alimentos pela Universidade de São Paulo

Dr^a. Louise Haubert

Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dr. Rodrigo Casquero Cunha

Doutor em Ciência Animal pela Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

Prof. Dr^a. Rita de Cássia dos Santos da Conceição

Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dedico a meus pais, que mesmo à distância, sempre me deram todo o apoio e incentivo necessário para continuar.

Agradecimentos

Aos meus pais, Ariel e Aline, pelo apoio incondicional em todas as situações, e principalmente por todo amor e carinho demonstrado diariamente, apesar da grande distância. Por sempre me incentivarem e acreditarem em mim, mesmo quando nem eu acreditava.

Aos meus avós, Neni, Roque, Diana e Genésio, por todo o amor e carinho que sempre me deram, pelas horas de conversas e ensinamentos, estando sempre presentes em todos os momentos da minha vida.

Ao meu tio, quase irmão, Rodrigo, pelo companheirismo e amizade desde a infância.

Às minhas tias, Viviane e Ester, que estão sempre presentes, mesmo com a distância, demonstrando carinho e apoio.

Ao meu afilhado Luiz Felipe, por trazer muitas alegrias e amor incondicional.

Ao meu namorado e amigo Bolivar, por todo amor e companheirismo, por estar ao meu lado e me ajudar a continuar sempre, mesmo nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador, Wladimir Padilha da Silva, por ter acreditado em mim, pela paciência e por tantos ensinamentos, sendo exemplo como pessoa e profissional.

As minhas co-orientadoras Graciela Völz Lopes e Louise Haubert, pela amizade, colaboração e apoio no desenvolvimento do projeto de dissertação.

Aos queridos amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos por todo incentivo, pelas palavras de carinho e apoio em todos os momentos. A vocês, Andréia, Camila, Carla, Cláudio, Darla, Helena, Isabela, Itiane, Juliana, Kamila, Kauana, Laís, Letícia, Louise, Tassiana, Ytacyana e a professora Ângela, por todo incentivo e pelos momentos de descontração e amizade.

Às minhas queridas amigas Isabela e Tassiana, por toda a amizade, paciência e pelo apoio incondicional em todos os momentos, vocês são para mim, exemplos de pessoas e profissionais!

À amiga Simone, pela amizade e por todos os conhecimentos compartilhados durante tantos anos.

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

Ao CNPq pela concessão de bolsa de estudos.

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

A todos, que de alguma forma me acompanharam e torceram pela realização desse sonho.

A todos vocês, muito obrigada!

Resumo

Kleinubing, Natalie Rauber. **Caracterização fenotípica e genotípica do perfil de resistência a antimicrobianos em isolados de *Campylobacter jejuni* da cadeia produtiva de frangos de corte da região sul do Rio Grande do Sul**. 2019. 91f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

As bactérias do gênero *Campylobacter*, principalmente *C. jejuni*, são as principais causadoras de gastroenterite de origem alimentar em humanos, sendo a carne de frango a maior fonte de infecção por esse micro-organismo. A resistência aos antimicrobianos é causa de preocupação em todo o mundo, e a Organização Mundial da Saúde já classifica a resistência de *C. jejuni* às fluorquinolonas como de alto risco. Com isso, os objetivos desse estudo foram verificar o perfil fenotípico e genotípico de resistência a antimicrobianos, bem como avaliar a presença de plasmídeos em isolados de *C. jejuni* provenientes da cadeia produtiva de frangos de corte da região sul do Rio Grande do Sul, Brasil. Foram utilizados 28 isolados de *C. jejuni* com diferentes perfis clonais obtidos por PFGE. A resistência fenotípica foi avaliada qualitativamente pela técnica de Disco-Difusão (DD) em ágar, sendo os isolados resistentes submetidos a técnica quantitativa de microdiluição em caldo, para avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Para identificação dos genes associados à resistência aos antimicrobianos foi utilizada a técnica de *polymerase chain reaction* (PCR). Foram avaliadas, ainda, mutações no gene *gyrA*, por meio do sequenciamento da região de ligação das quinolonas ao seu alvo na bactéria. Dos isolados avaliados, 18,8% foram suscetíveis a todos os antimicrobianos testados, enquanto resistência a pelo menos um antimicrobiano foi observada em 82,2% (n=23) dos isolados, dos quais 53,57% (n=15) apresentaram perfil de multirresistência, sendo resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos. A resistência as quinolonas foi a mais frequente, ocorrendo em 75% (n=23) dos isolados, enquanto 60,7% (n=17) foram resistentes as tetraciclina. Para os macrolídeos avaliados, 21,4% (n=6) dos isolados apresentaram resistência fenotípica, sendo observada, ainda, resistência aos aminoglicosídeos (canamicina) e aos β -lactâmicos (ampicilina) em 39,3% (n=11) e 32,1% (n=9) dos isolados, respectivamente. Quanto aos mecanismos moleculares de resistência, os genes que compõem o operon *cmeA*, *cmeB* e *cmeC* foram encontrados, respectivamente, em 78,3% (n=18), 91,3 (n=21) e 100% (n=23) dos isolados que apresentaram resistência fenotípica no teste de DD. A bomba de efluxo *cmeG* também foi observada nos isolados de *C. jejuni* avaliados, estando presente em 91,3% dos isolados com resistência fenotípica as quinolonas. O gene *apha-3* foi observado em 100% (n=11) dos isolados resistentes à canamicina. Além disso, verificou-se a presença de plasmídeos em 85,7% (n=24) dos isolados, albergando os genes *tet(O)* e *apha-3* em 82,3% (n=14) e 81,8% (n=9) dos isolados que apresentaram resistência fenotípica à tetraciclina e à canamicina, respectivamente. Os resultados obtidos no presente estudo ressaltam a importância do monitoramento da resistência aos antimicrobianos em isolados de *C. jejuni* provenientes da cadeia produtiva de frangos, visto que a presença de isolados com perfil de resistência e multirresistência a antimicrobianos representa um grande risco à saúde pública.

Palavras-chave: *Campylobacter* termofílicos; genes de resistência a antimicrobianos; multirresistência; perfil de resistência; plasmídeos

Abstract

Kleinubing, Natalie Rauber. **Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance profile in *Campylobacter jejuni* isolates from the production chain of broilers in the southern region of Rio Grande do Sul.** 2019. 91f. Dissertation (Master degree in Food Science and Technology) – Postgraduate Program in Food Science and Technology, Faculty of Agronomy Eliseu Maciel, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil, 2019.

Campylobacter spp., mainly *C. jejuni*, are the main cause of foodborne gastroenteritis in humans, with poultry meat being the major source of infection by this microorganism. Antimicrobial resistance raises global concerns, and according the World Health Organization *C. jejuni* is a high-risk pathogen because of its resistance to fluoroquinolones. Therefore, the objectives of this study was to verify the phenotypic and genotypic profile of antimicrobial resistance, as well as, to evaluate the presence of plasmids in *C. jejuni* isolates from the productive chain of broilers (broiler farms, slaughterhouse and poultry meat products sold on the retail market) of the southern region of Rio Grande do Sul, Brazil. Twenty-eight isolates of *C. jejuni* with different PFGE patterns were studied. The phenotypic resistance was evaluated qualitatively by the agar Disk-Diffusion (DD) testing, and the resistant isolates were submitted to broth microdilution test, to quantify this minimum inhibitory concentration (MIC), the polymerase chain reaction (PCR) was used to identify genes associated with antimicrobial resistance. Mutations in the *gyrA* gene were evaluated by sequencing the binding region of the quinolones to their target in *C. jejuni*. Among the isolates evaluated, 17,8% (n=5) were susceptible to all antimicrobials evaluated, while resistance to at least one antimicrobial tested was observed in 82,2% (n=23) of the isolates, of which 53,57% (n=15) presented a multidrug resistance (MDR) profile, being resistant to three or more classes of antimicrobials. Resistance to quinolones was the most found, present in 75% (n=23) of *C. jejuni* isolates, while 60,7% (n=17) were resistant to tetracyclines in the disc-diffusion test. For the macrolides evaluated, 21,4% (n=6) of the isolates presented phenotypic resistance, resistance to aminoglycosides (kanamycin) and β -lactams (ampicillin) were observed in 39,3% (n=11) and 32,1% (n=9) of the isolates, respectively. In relation to the molecular mechanisms of resistance, the genes *cmeA*, *cmeB* and *cmeC* were found respectively in 78,3% (n=18), 91,3% (n=21) and 100% (n=23) resistant isolates in DD testing. The *cmeG* efflux pump was also observed in the isolates of *C. jejuni*, being present in 91,3% of the isolates with phenotypic resistance to quinolones. The *apha-3* gene was observed in 100% (n=11) of the isolates with resistance to kanamycin. The presence of plasmids in 85,7% (n=24) of the isolates was also detected, harboring the *tet(O)* and *apha-3* in 82,3% (n=14) and 81,8% (n=9) of the isolates that had phenotypic resistance to tetracycline and kanamycin, respectively. The results obtained in the present study highlight the importance of the monitoring of antimicrobial resistance in isolates of *C. jejuni* from the production chain of broilers, since the presence of isolates resistance or MDR profile to antimicrobials represents a great risk to public health.

Keywords: antimicrobial resistance genes; multidrug resistance; plasmids; resistance profile; thermophilic *Campylobacter*

Lista de Figuras

Figura 1. Linha do tempo da resistência aos antimicrobianos	24
Figura 2. Transferência horizontal de genes de resistência a antimicrobianos.....	27
Figura 3. Mecanismos de resistência a antimicrobianos	28
Figure 1. Presence of antimicrobial resistance genes in <i>Campylobacter jejuni</i> isolated from the productive chain of broilers	48

Lista de Tabelas

Table 1.	Antimicrobial resistance pattern in <i>Campylobacter jejuni</i> isolates from the productive chain of broilers	46
Table 2.	Distribution of the Minimum inhibitory concentration results for the <i>C. jejuni</i> isolates that presented resistance in the Disk Diffusion testing.....	47
Table 3.	Location of the <i>tet(O)</i> and <i>aphA-3</i> genes in <i>Campylobacter jejuni</i> isolates	50
Table S1.	Characteristics of the isolates and results of this study.....	64
Table S2.	Interpretative criteria for <i>Campylobacter jejuni</i> susceptibility testing used in this study.....	67
Table S3.	Oligonucleotides and references used in identification of antimicrobial resistance genes.....	68

Lista de abreviaturas e siglas

°C	Graus Celsius/Celsius degrees
µg	Micrograma(s)/ <i>Microgram(s)</i>
ABPA	Associação brasileira de proteína animal
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
BA2	Blood agar number 2
BSAC	<i>British society for antimicrobial chemotherapy</i>
<i>C. coli</i>	<i>Campylobacter coli</i>
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
CA-SFM	<i>Comité de l'antibiogramme de la société Française de microbiologie</i>
CDC	<i>Center of disease control and prevention</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CNPq	Conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico
DD	Disco difusão/ <i>Disc diffusion</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
ECDC	<i>European centre for disease prevention and control</i>
ECOFFs	Epidemiological cut-off values
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EFSA	<i>European food safety authority</i>
EU	<i>European Union</i>
EUA	Estados Unidos da América
EUCAST	<i>European committee on antimicrobial susceptibility testing</i>
IDSA	<i>Infectious diseases society of America</i>
MDR	<i>Multi drug resistance</i>
MIC	<i>Minimun inhibitory concentration</i>
mL	Mililitro(s)/ <i>Milliliter(s)</i>
mm	Milimetro(s)/ <i>Millimeter(s)</i>
NARMS	<i>National resistance monitoring system</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDR	<i>Pandrug resistance</i>
PFGE	<i>Pulsed-field gel eletrophoresis</i>

QRDR	Quinolone resistance-determining region
RNA	Ribonucleic acid
rRNA	RNA ribossomal
SGB	Síndrome de Guillain-Barré
spp.	Espécies
UE	União Europeia
UFC	Unidades formadora de colônia
UFPeI	Universidade Federal de Pelotas
USA	<i>United States of America</i>
WHO	<i>World health organization</i>
XDR	<i>Extended drug resistance</i>

Sumário

1	Introdução.....	16
1.1	Objetivo Geral	19
1.2	Objetivos Específicos	19
2	Revisão Bibliográfica	20
2.1	<i>Campylobacter</i> termofílicos e campilobacteriose	20
2.2	Resistência bacteriana a antimicrobianos	23
2.2.1	Transferência vertical de resistência	25
2.2.2	Transferência horizontal de resistência	26
2.2.3	Mecanismos de resistência a antimicrobianos	28
2.3	Resistência de <i>Campylobacter</i> termofílicos a antimicrobianos.....	29
2.3.1.	Resistência aos macrolídeos.....	31
2.3.2.	Resistência as quinolonas e fluorquinolonas.....	33
2.3.3.	Resistência as tetraciclinas	34
2.3.4.	Resistência aos aminoglicosídeos	36
2.3.5.	Resistência aos β -lactâmicos	37
3	Manuscrito	39
4	Considerações Finais	69
	Referências Bibliográficas	70
	Apêndices.....	77

1 Introdução

As bactérias do gênero *Campylobacter* são as principais causadoras de gastroenterite de origem alimentar em todo o mundo (EFSA/ECDC, 2017; KAAKOUSH et al., 2015). As espécies termofílicas (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* e *C. upsaliensis*) se destacam como as de maior importância em alimentos e dentre elas, *C. jejuni* e *C. coli* são as responsáveis pela maioria dos casos de campilobacteriose em humanos (KAAKOUSH et al., 2015; TRESSE; ALVAREZ-ORDÓÑEZ; CONNERTON, 2017).

O intestino das aves, especialmente dos frangos, é considerado reservatório primário de *Campylobacter* termofílicos, devido a temperatura corporal desses animais ser em torno de 42 °C, a qual coincide com a temperatura ótima de multiplicação desses micro-organismos (HALD et al., 2016). Entretanto, na maioria das vezes, os frangos são portadores assintomáticos desse patógeno (PARK, 2002). A contaminação da carne de frango normalmente ocorre durante o processo de abate, decorrente do contato direto de conteúdo intestinal com a carcaça, ou com utensílios e superfícies contaminadas (NEWELL et al., 2001). O consumo de carne de aves inadequadamente cozida, bem como a contaminação cruzada de alimentos consumidos *in natura* é uma das principais formas de infecção por *Campylobacter* termofílicos em humanos (CDC, 2017; WHO, 2018).

A campilobacteriose geralmente tem caráter autolimitante, cursando com sintomas como diarreia, cólica, dor abdominal e febre, com duração de 2 a 5 dias, podendo ter agravantes em indivíduos imunocomprometidos (EFSA/ECDC, 2017; WHO, 2018). Quando necessário, o tratamento preconizado da doença é composto por terapia de suporte aos sintomas e uso de antimicrobianos, o que vem se tornando preocupante devido aos crescentes casos de isolados de *Campylobacter* spp. resistentes ou multirresistentes, provenientes de humanos, animais e alimentos (ALLOS, 2001; IOVINE, 2013; WIECZOREK; OSEK, 2013).

Os principais antimicrobianos utilizados para o tratamento de campilobacteriose pertencem à classe dos macrolídeos, como a eritromicina. As fluorquinolonas, como a ciprofloxacina, já foram muito utilizadas para o tratamento dessa doença, porém, devido ao aumento de resistência aos antimicrobianos deste grupo, deixaram de ser utilizadas (ALLOS, 2001; IOVINE, 2013; WIECZOREK; OSEK, 2013; WHITEHOUSE; ZHAO; TATE, 2018). Já para o tratamento de casos mais graves de campilobacteriose, como bacteremia, medicamentos da classe dos aminoglicosídeos, como a gentamicina, vêm sendo utilizados (WHITEHOUSE et al., 2018).

Segundo dados da União Europeia (UE), o número de isolados de *Campylobacter* spp. resistentes a antimicrobianos vem aumentando. A resistência à eritromicina em *C. jejuni*, que era de 3,1% em 2011, passou para 5,9% em 2014. Para a gentamicina, no ano de 2015, o índice de resistência em isolados de *C. jejuni* foi de 0,8%. Contudo, para a ciprofloxacina essas taxas são mais elevadas, indicando 60,8% dos isolados de *C. jejuni* resistentes a esse fármaco (EFSA/ECDC, 2013, EFSA/ECDC, 2016).

Nos Estados Unidos da América (EUA), segundo o *National Antimicrobial Resistance Monitoring System* (NARMS), o número de isolados de *C. jejuni* provenientes de humanos, apresentando resistência à eritromicina aumentou de 1,5% em 2005 para 2,2% em 2013. Além disso, a resistência à gentamicina, que era de 0,1% em 2005, passou para 1,4% em 2014. O número de isolados resistentes à ciprofloxacina também foi superior, passando de 21,6%, em 2005, para 26,7% em 2014 (CDC, 2013; CDC, 2016).

No Brasil, a campilobacteriose não está entre as principais doenças transmitidas por alimentos (DTA), o que pode estar associado a subnotificação e/ou subdiagnóstico dos casos da doença no país, onde não existe legislação disponível preconizando a identificação de *Campylobacter* spp. em alimentos. Além disso, segundo o Ministério da Saúde, em cerca de 70% dos casos de DTA no Brasil não ocorre a identificação do agente etiológico (BRASIL, 2019).

Sendo assim, a identificação do perfil de resistência a antimicrobianos, bem como o melhor entendimento sobre os mecanismos que levam ao desenvolvimento da resistência a antimicrobianos em *C. jejuni* é fundamental, visto que não existem dados sobre a resistência nesse patógeno na região.

Os resultados obtidos no presente estudo contribuirão para um melhor entendimento sobre os mecanismos que conferem resistência a antimicrobianos em *C. jejuni*, além de fornecer dados epidemiológicos acerca desse importante patógeno alimentar, fornecendo uma base para mais estudos relacionados a resistência a antimicrobianos em *Campylobacter jejuni*.

1.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil fenotípico e genotípico de resistência a antimicrobianos em isolados de *Campylobacter jejuni* provenientes da cadeia produtiva de frangos de corte na região sul do Rio Grande do Sul.

1.2 Objetivos Específicos

Objetivo 1. Avaliar o perfil fenotípico qualitativo e quantitativo de resistência em isolados de *Campylobacter jejuni* provenientes da cadeia produtiva de frangos de corte da região sul do Rio Grande do Sul.

Objetivo 2. Avaliar o perfil genotípico de resistência a antimicrobianos dos isolados.

Objetivo 3. Avaliar a presença de plasmídeos nos isolados e verificar a presença de genes de resistência no DNA plasmidial.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 *Campylobacter* termofílicos e campilobacteriose

Campylobacter são bactérias Gram-negativas (VANDAMME; DE LEY, 1991), com morfologia típica de bastonetes curvos, em forma de “S” ou asa de gaivota, que apresentam motilidade “saca rolhas”, devido a flagelos polares em uma ou ambas extremidades (BERGEY; HOLT, 1994). As bactérias deste gênero não são formadoras de esporos, possuindo dimensões de aproximadamente 0,2 a 0,8 µm por 0,5 a 5 µm. São micro-organismos quimiorganotróficos, tendo como fonte de energia aminoácidos ou intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (VANDAMME; DEWHIRST; PASTER, 2005), cuja multiplicação máxima ocorre em atmosfera contendo aproximadamente 5% de O₂, 10% de CO₂ e 85% de N₂ (BOLTON, 2015).

Atualmente, o gênero *Campylobacter* é composto por 39 espécies e 16 subespécies (<http://www.bacterio.net/campylobacter.html> - acesso em 21/01/2019). Dessas, *C. jejuni*, *C. coli*, *C. upsaliensis* e *C. lari* compõem o grupo denominado termofílicos, por possuírem temperatura ótima de multiplicação de cerca de 42 °C (MOORE et al., 2006), sendo *C. jejuni* e *C. coli* as espécies mais importantes em saúde pública. Destas, *C. jejuni* é responsável por 80 a 90% das infecções em humanos, enquanto *C. coli* ocasiona de 5 a 10% dos casos (SZCZEPAŃSKA et al., 2015).

Campylobacter termofílicos estão amplamente distribuídos no ambiente e podem colonizar o trato gastrointestinal de animais silvestres e domésticos, como bovinos, ovinos, suínos, gatos, cães e aves (PARK, 2002), podendo também, ser encontrados em crustáceos (WHO, 2018). As aves, especialmente os frangos, são considerados reservatórios intestinais da bactéria e normalmente não apresentam sintomas de infecção por esse patógeno (HALD et al., 2016; PARK, 2002). Entretanto,

estudos recentes apontam que após a ingestão de *C. jejuni*, há a interação da bactéria com o intestino do hospedeiro, levando a alterações na absorção de nutrientes, devido a mudanças na histomorfologia das vilosidades intestinais (AWAD et al., 2015; AWAD; HESS; HESS, 2018; GHARIB NASERI; RAHIMI; KHAKI, 2012), além de alterar a permeabilidade da membrana intestinal, facilitando a colonização de outros patógenos, como *Escherichia coli* (AWAD et al., 2016).

Em humanos, a campilobacteriose normalmente está associada à ingestão de carne de aves crua ou inadequadamente cozida e à contaminação cruzada de alimentos consumidos *in natura* (CDC, 2013; WHO, 2018). Leite cru, água não tratada e o contato com animais infectados também são apontados como responsáveis por casos da doença (EFSA/ECDC, 2017). De acordo com a *World Health Organization* (WHO), infecções por *Campylobacter* termofílicos são uma das quatro principais causas globais de doenças diarreicas, sendo considerada a causa mais comum de gastroenterite ocasionada por bactérias em todo o mundo (WHO, 2018).

A campilobacteriose tem sido a infecção bacteriana de origem alimentar mais reportada na UE desde 2005, mantendo sua casuística constante nos últimos anos (EFSA/ECDC, 2016). No entanto, resultados de um estudo sorológico realizado na população da UE apontaram que apenas uma pequena parcela dos casos clínicos de campilobacteriose são relatados (GIBBONS et al., 2014). Assim, essa constância nos casos de campilobacteriose pode ser associada ao subdiagnóstico e à subnotificação nos casos da doença.

Nos EUA, a campilobacteriose é uma das doenças diarreicas mais comuns, sendo estimados 1,3 milhão de casos da doença anualmente, porém, segundo o *Center of Disease Control* (CDC), muitos casos não são reportados. Embora a infecção por *Campylobacter* termofílicos geralmente não provoque a morte do paciente, por ano, ocorrem aproximadamente 76 óbitos relacionados à doença no país (CDC, 2017).

No Brasil, contrário aos relatos de diversos países, a campilobacteriose não figura entre as principais doenças de origem alimentar, não estando presente em dados da vigilância epidemiológica do país (BRASIL, 2018). No entanto, estudos revelam altos percentuais de *Campylobacter* termofílicos em cortes comerciais de frango destinados ao consumo humano (ALVES et al., 2012; OLIVEIRA, A. L.; OLIVEIRA, 2003; SILVA et al., 2016; WÜRFEL et al., 2018), bem como em lotes de frangos de corte em granjas aviárias (ALVES et al., 2012; FRANCHIN; AIDOO;

BATISTA, 2005; SILVA et al., 2016). Sendo assim, a real situação epidemiológica da campilobacteriose no país não é conhecida (LAURIA-FILGUEIRAS, 2012), destacando a importância de estudos relativos a esse patógeno.

Os principais sintomas da infecção por *Campylobacter* termofílicos em humanos são: diarreia, dor abdominal, febre, dor de cabeça, náuseas e vômito. Os sintomas normalmente têm início em dois a cinco dias após a infecção e cessam entre três e seis dias (EFSA/ECDC, 2017; WHO, 2018), porém, a bactéria pode ser eliminada nas fezes durante várias semanas após o término dos sintomas, o que facilita a propagação do patógeno (CDC, 2017).

Além disso, algumas complicações estão associadas à campilobacteriose, como a Síndrome de Guillain-Barré (SGB) (CDC, 2017), uma polineuropatia autoimune, que leva a uma desmielinização dos nervos periféricos, devido ao mimetismo molecular que ocorre entre os antígenos presentes na membrana do micro-organismo e componentes da bainha de mielina, levando à paralisia flácida e, eventualmente, à morte (HADDEN; GREGSON, 2001). Nos EUA, estima-se que cerca de 40% dos casos de SGB são desencadeados mediante uma prévia infecção por *Campylobacter* termófilos (CDC, 2017). Além da SGB, ainda estão associadas à campilobacteriose outras complicações, como peritonite, pancreatite, hemorragia intestinal (SKIRROW et al., 1993) e, ainda, bacteremia (KIM et al., 2017). Estudos apontam que 5% a 20% dos pacientes acometidos pela campilobacteriose desenvolvem síndrome do intestino irritável, e até 5% desenvolvem artrite (CDC, 2017).

Apesar da maioria dos casos de campilobacteriose não necessitar de terapia com antimicrobianos, em casos onde ocorrem agravantes como febre alta, sintomas com duração superior a onze semanas, gravidez ou paciente imunocomprometido, se torna necessária a antibioticoterapia (ALLOS, 2001). O que desperta preocupação devido ao grande número de casos da doença e aos crescentes relatos de resistência desse patógeno contra os principais antimicrobianos de uso clínico (EFSA/ECDC, 2016; WHO, 2018). Os principais antimicrobianos utilizados na terapêutica de campilobacteriose pertencem à classe dos macrolídeos. A eritromicina é o fármaco de eleição para o tratamento da doença, porém, azitromicina e claritromicina também podem ser utilizadas e são pertencentes a essa classe (IOVINE, 2013; WHITEHOUSE et al., 2018).

A classe das fluorquinolonas, como a ciprofloxacina, é empregada em alguns casos de gastroenterite onde não há a confirmação do agente etiológico. Desta forma, as fluorquinolonas são utilizadas em muitos casos de campilobacteriose, porém, segundo os relatos, a resistência de *Campylobacter* termofílicos a essa classe de antimicrobianos é frequente, tornando muitas vezes o tratamento ineficaz (WHITEHOUSE et al., 2018).

As tetraciclinas, como a tetraciclina e a doxiciclina, podem ser utilizadas para o tratamento de campilobacteriose por possuírem amplo espectro de ação. Contudo, como foram amplamente utilizadas no passado, na medicina humana e animal, muitos isolados de *Campylobacter* termofílicos adquiriram resistência a esses princípios ativos. Por essa razão, atualmente não se faz uso de tetraciclinas para o tratamento de campilobacteriose, na maioria dos países (IOVINE, 2013).

Em algumas regiões, os fármacos do grupo dos β -lactâmicos são utilizados para o tratamento de doenças gastrointestinais (WHITEHOUSE et al., 2018). No entanto, os aminoglicosídeos, por apresentarem potente atividade frente à *Campylobacter* termofílicos, são uma alternativa terapêutica frequente, principalmente para casos mais graves da doença (ALFREDSON; KOROLIK, 2007).

2.1 Resistência bacteriana a antimicrobianos

A resistência a antimicrobianos ocorre quando um princípio ativo perde sua capacidade de eliminar os micro-organismos ou inibir efetivamente a multiplicação de micro-organismos, os quais se tornam resistentes e se multiplicam normalmente na presença de níveis terapêuticos dos antimicrobianos (ZAMAN et al., 2017).

A descoberta dos antimicrobianos pode ser considerada um dos mais significativos avanços do século XX, tendo salvo milhões de vidas e possibilitado a realização de procedimentos cirúrgicos, e outros tratamentos, que até então eram considerados de alto risco (WHO, 2017a). O primeiro antimicrobiano a ser utilizado contra infecções bacterianas foi a penicilina, descoberta em 1928 (FLEMING, 1929), porém, só liberada para uso da população, em geral, após 1943 (VENTOLA, 2015). Entretanto, antes mesmo de ser amplamente utilizada, já haviam sido identificadas estirpes de *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina. Entre os anos 1960 e 1980, a indústria farmacêutica produziu e comercializou diversos novos antimicrobianos, visando assim, combater o problema da resistência bacteriana aos

princípios ativos já existentes. Todavia, resistência foi observada frente a praticamente todos os antimicrobianos desenvolvidos (SPELLBERG; GILBERT, 2014) (Figura 1).

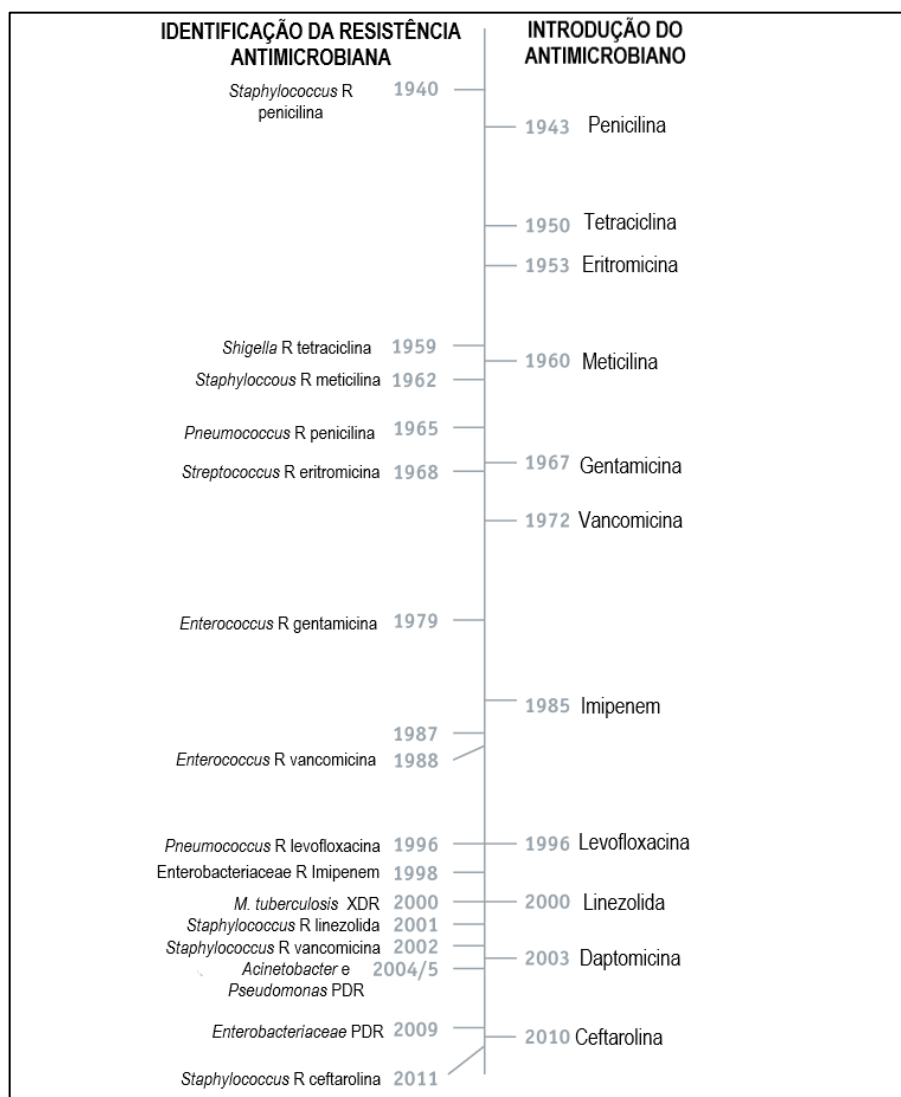


Figura 1 – Linha do tempo da resistência bacteriana aos antimicrobianos. R- Resistente, XDR- *Extensively Drug Resistance*, PDR- *Pandrug Resistance*.

Fonte: Adaptado de VENTOLA, 2015.

Após os anos 80, o desenvolvimento de novos fármacos decresceu (SPELLBERG; GILBERT, 2014) e, atualmente, a WHO estima que os novos antimicrobianos em elaboração não serão suficientes para controlar micro-organismos resistentes, já que a maioria dos fármacos são modificações das estruturas de princípios ativos já existentes e por isso, apresentam o mesmo sítio de ação (WHO, 2017a). Desta forma, a WHO alerta que há uma necessidade urgente de pesquisas relacionadas à resistência bacteriana, bem como do desenvolvimento de novos fármacos com ação contra bactérias resistentes, do contrário, as infecções

bacterianas representarão um alto risco e procedimentos cirúrgicos, hoje considerados simples, serão de grande risco (WHO, 2017b).

Atualmente, o surgimento de micro-organismos multirresistentes, que apresentam resistência a três ou mais classes de antimicrobianos, é uma preocupação, tendo se tornando um problema de saúde pública mundial (EFSA/ECDC, 2018). Segundo a *Infectious Diseases Society of America* (IDSA), essa pode ser uma das maiores ameaças à saúde humana (IDSA, 2011). Atualmente, são utilizadas terminologias como XDR, do inglês *Extended drug resistance*, quando um micro-organismo só apresenta suscetibilidade a uma classe de antimicrobiano e ainda PDR (*Pandrug resistance*) quando não há suscetibilidade a nenhuma classe de antimicrobianos (MAGIORAKOS et al., 2011).

A resistência bacteriana a antimicrobianos pode ser natural, intrínseca do micro-organismo, ou adquirida. A resistência intrínseca é causada por características estruturais ou bioquímicas, que estão naturalmente presentes nos micro-organismos, sendo essa característica comum a todas as amostras de uma mesma espécie bacteriana (MUNITA; ARIAS, 2016; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). A resistência intrínseca pode ser ocasionada por peculiaridades da célula bacteriana, as quais impedem o antimicrobiano de atuar em seu sítio alvo, como por exemplo na resistência de bactérias Gram-negativas à penicilina G (FLOREZ-CUADRADO et al., 2018).

Por outro lado, a resistência adquirida caracteriza-se pela perda da suscetibilidade a antimicrobianos por uma população dentro da espécie bacteriana, sendo decorrente de uma alteração genética que é expressa bioquimicamente (FLOREZ-CUADRADO et al., 2018; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). Essas alterações podem ser decorrentes de mutações no DNA, ou ainda, da aquisição de elementos genéticos móveis, como plasmídeos e *transposons*, podendo ainda ser adquirida verticalmente ou horizontalmente (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

2.1.1 Transferência vertical de resistência

As mutações pontuais de genes de resistência são eventos aleatórios, em decorrência, muitas vezes, de erros na replicação do DNA e costuma ocorrer em menor frequência (O'BRIEN; RODRIGUES; BUCKLING, 2013). Porém, quando presentes, essas mutações serão transferidas para as células filhas, por meio de transferência vertical (LAWRENCE, 2004). É importante destacar, que o uso de

antimicrobianos não leva a mutações, porém, ocasiona a seleção de isolados mutados, os quais apresentam resistência ao antimicrobiano utilizado. Desta forma, os isolados que não são eliminados, acabam por se multiplicar, repassando à sua progênie os genes mutados (FLOREZ-CUADRADO et al., 2018).

As mutações normalmente conferem resistência devido às alterações no sítio de ligação do antimicrobiano, impedindo que ocorra a ligação e consequentemente a ação do fármaco. A resistência às quinolonas, por exemplo, ocorre devido a mutações pontuais nos genes que codificam para as proteínas alvo desse grupo (FLOREZ-CUADRADO et al., 2018).

2.1.2 Transferência horizontal de resistência

Os eventos de transferência horizontal de genes de resistência são de grande importância, pois permitem que as bactérias tenham acesso a genes presentes no ambiente que as envolve (GARDNER; OLSON, 2012). Quando são utilizadas substâncias antimicrobianas em um ambiente, ocorre uma pressão de seleção, ou seja, somente as bactérias resistentes conseguem se manter viáveis, e assim, por meio da transferência horizontal de genes, mecanismos de resistência podem ser compartilhados entre as bactérias, disseminando rapidamente a resistência a antimicrobianos (VELAYATI et al., 2009)

A transferência horizontal de genes de resistência pode ocorrer por diferentes mecanismos como conjugação, transformação e transdução (Figura 2). Estudos relatam que *Campylobacter* termofílicos são capazes de realizar algumas das formas de transferência horizontal, como a conjugação e a transformação (BATCHELOR et al., 2004; HANSEN et al., 2007; WANG; TAYLOR, 1990), o que colabora com a evolução e manutenção do micro-organismo em diversos ambientes (GARDNER; OLSON, 2012). Os eventos de transformação ocorrem quando células receptoras captam o DNA presente no ambiente (LORENZ; WACKERNAGEL, 1994). Em contrapartida, a conjugação caracteriza-se pela transferência unidirecional de material genético entre duas células que estão em contato direto, ocorrendo por meio de plasmídeos conjugativos ou *transposons* (GARDNER; OLSON, 2012). Já a transdução caracteriza-se pela transferência de DNA de uma célula bacteriana para outra, por meio de um vírus replicativo (GARDNER; OLSON, 2012).

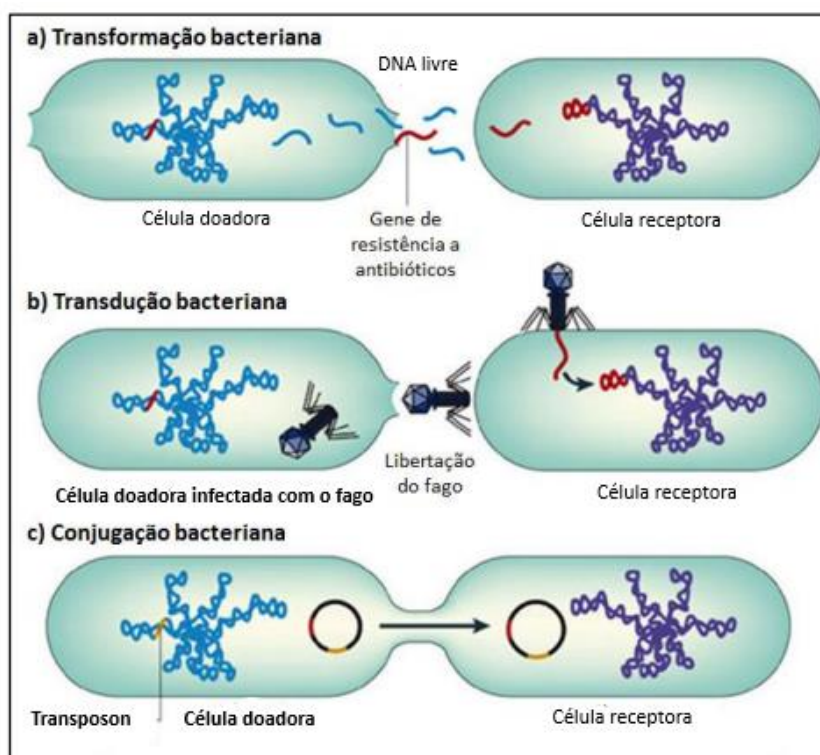


Figura 2 – Transferência horizontal de genes de resistência a antimicrobianos.

Fonte: Adaptado de FURUYA; LOWY, 2006.

Dentre os elementos genéticos móveis, destacam-se os plasmídeos, os quais são estruturas de DNA circular, com capacidade de replicação autônoma podendo, ou não, ter capacidade conjugativa. De modo geral, os plasmídeos conjugativos são grandes, com tamanho de 100kb ou maiores e contém os genes *tra*, um conjunto de genes responsáveis pela síntese da fímbria sexual, pela transferência de material genético e por regular o processo conjugativo (LORETO; FERREIRA, 2014).

Existem poucos plasmídeos descritos nesse patógeno e alguns deles apresentam capacidade conjugativa (CRESPO et al., 2016; GIBREEL; SKÖL; TAYLOR, 2004; TRACZ et al., 2005). Os genes *tet(O)* e *apha-3*, que conferem resistência às tetraciclina (CRESPO et al., 2016; PRATT; KOROLIK, 2005) e aos aminoglicosídeos, respectivamente, frequentemente estão presentes no DNA plasmidial (CRESPO et al., 2016; NIRDNOY; MASON; GUERRY, 2005). A alta prevalência do gene *tet(O)* no DNA plasmidial pode ser um dos principais fatores responsáveis pela rápida disseminação de isolados de *Campylobacter* spp. resistentes às tetraciclina (CRESPO et al., 2016; WIECZOREK; OSEK, 2013), destacando a importância de mais estudos relacionados a esse tema.

2.1.3 Mecanismos de resistência a antimicrobianos

Para que um antimicrobiano desempenhe sua função são necessárias algumas etapas: seu sítio alvo deve estar disponível, o fármaco deve conseguir alcançar seu sítio alvo em concentrações adequadas, e não pode ser inativado no decorrer desse trajeto. Desta forma, os principais mecanismos de resistência das bactérias frente a antimicrobianos são: a produção de enzimas com capacidade de inativar o antimicrobiano; diminuição da permeabilidade da membrana, impedindo a entrada do princípio ativo; alteração do sítio alvo do fármaco ou capacidade de expulsar o antimicrobiano da célula bacteriana (Figura 3) (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008)

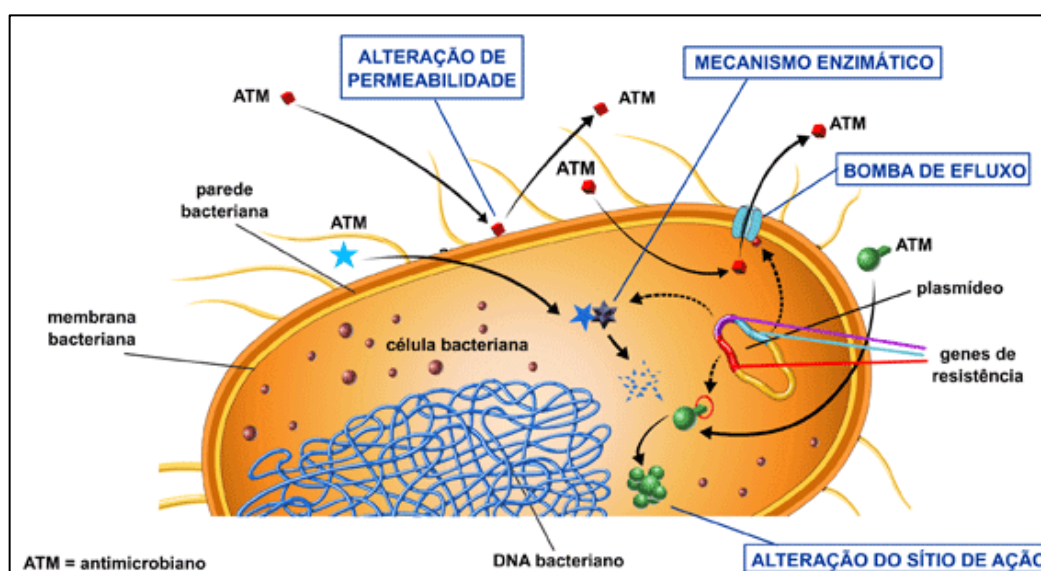


Figura 3 – Mecanismos de resistência a antimicrobianos.

Fonte: ANVISA, 2017a

As β -lactamases são exemplos de enzimas que possuem a capacidade de inativar os fármacos do grupo dos β -lactâmicos, pois essas enzimas hidrolisam o anel β -lactâmico presente nesses antimicrobianos, o qual é responsável pela sua ação antimicrobiana, conferindo resistência quando presentes (WIECZOREK; OSEK, 2013). Por outro lado, as bombas de efluxo conferem aos micro-organismos a capacidade de extrusar os antimicrobianos para fora da célula, impedindo que estes consigam atingir o seu sítio alvo. Além disso, as proteínas de proteção ribossomal, são exemplos do mecanismo de alteração do sítio de ação, têm a capacidade de alterar o sítio alvo das tetraciclínas, impedindo que esses fármacos se liguem ao seu

local de ação. Além disso, o local de ligação do antimicrobiano pode ser alterado por mutações nos genes, levando a alterações nas proteínas formadas e, conseqüentemente, a mudanças no local de ação, impedindo a ligação do fármaco (ANVISA, 2007b; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

2.2 Resistência de *Campylobacter* termofílicos a antimicrobianos

Os relatos de resistência em *Campylobacter* termofílicos são crescentes, sendo esse micro-organismo considerado de alta prioridade devido à sua resistência, principalmente ao grupo das fluorquinolonas (CDC, 2013). A resistência às fluorquinolonas raramente era observada nos EUA até 1995 (NACHAMKIN; UNG; LI, 2002). Nos anos de 1995 e 1996 foi aprovado o uso de fluorquinolonas para o tratamento de algumas doenças em frangos de corte e, após 1997, as taxas de resistência em isolados de *C. jejuni* aumentaram consideravelmente, sendo de 17% entre 1997 – 1999 e 25% entre 2012 – 2014 (CDC, 2017).

No Brasil, foi lançado recentemente o Plano de ação nacional de prevenção e controle da resistência a antimicrobianos, no âmbito da agropecuária (PAN-BR AGRO). Esse plano visa controlar o uso de antimicrobianos na produção animal (BRASIL, 2018). Até o presente momento, estão proibidos os seguintes antimicrobianos como promotores de crescimento: tetraciclina, penicilina, cloranfenicol e sulfonamidas sistêmicas (Portaria nº 159, de 19 de junho de 1992), espiramicina e eritromicina (Instrução Normativa nº 14, de 17 de maio de 2012) e sulfato de colistina (Instrução Normativa nº 45, de 22 de novembro de 2016).

O uso de antimicrobianos como promotores de crescimento em animais, principalmente na indústria avícola, é apontado como um dos fatores para a disseminação da resistência a antimicrobianos. No ano de 2006, a UE estabeleceu o banimento do uso de antimicrobianos na alimentação animal com essa finalidade (FLOREZ-CUADRADO et al., 2018). Segundo POSTMA et al. (2016), a restrição ao uso de antimicrobianos na produção de suínos reduziu em 39% a resistência bacteriana.

Até o momento, os níveis de resistência aos macrolídeos permanecem baixos, sendo esses os antimicrobianos de primeira escolha para o tratamento de campilobacteriose (CDC, 2017; EFSA/ECDC, 2018). Contudo, estudos revelam a presença do gene *ermB* em isolados de *Campylobacter*, o que é alarmante, visto que

esse gene pode conferir altos níveis de resistência aos macrolídeos, e tem capacidade de ser transmitido horizontalmente por estar frequentemente localizado em plasmídeos (QIN et al., 2014; WANG et al., 2014).

Desta forma, o monitoramento da resistência em isolados de *Campylobacter* termofílicos é de grande importância. Os métodos utilizados para avaliar a suscetibilidade a antimicrobianos são diversos, dentre eles os testes de difusão em ágar (Disco difusão em ágar e Etest®), ou os testes de diluição (em caldo ou em ágar) que podem ser utilizados para avaliar a resistência fenotípica em *Campylobacter* spp. (GE et al., 2013).

A validação e a padronização dos protocolos utilizados para os testes de suscetibilidade a antimicrobianos são controladas por instituições como o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), nos EUA, o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) na UE, a *British Society for Antimicrobial Chemotherapy* (BSAC), na Inglaterra e o *Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie* (CA-SFM), na França, que estabelecem protocolos para os testes em diversos micro-organismos, incluindo *C. jejuni* e *C. coli* (GE et al., 2013). Além da padronização, são estipulados os *clinical breakpoints*, os quais são valores que definem se um isolado é suscetível, intermediário ou resistente aos antimicrobianos, baseado na eficácia clínica do antimicrobiano (SILLEY, 2012).

Existem ainda os valores de corte epidemiológicos (ECOFFs – *Epidemiological cut-off values*). Esses valores são definidos pela EUCAST e classificam os isolados como microbiologicamente resistentes. Além disso, são determinados com base na distribuição da CIM para um antimicrobiano em determinada população bacteriana, classificando os isolados como selvagens (isolados que não apresentam mutações ou mecanismos de resistência) ou não selvagens (isolados que possuem mutações ou adquiriram genes que conferem resistência). Entretanto, ao contrário dos *clinical breakpoints*, os quais determinam se um isolado responderá ou não ao tratamento com o antimicrobiano, os isolados classificados como selvagens ou não selvagens podem ou não responder ao tratamento com os fármacos avaliados, pois esses valores não levam em consideração a eficácia clínica do antimicrobiano (SILLEY, 2012).

A cadeia produtiva de alimentos, principalmente de origem animal, é um ecossistema onde coexistem diversos micro-organismos, o que, associado à pressão seletiva exercida pelos antimicrobianos, utilizados em diversas etapas da produção,

representa um grande risco para a seleção de bactérias zoonóticas resistentes, como *C. jejuni* e *C. coli*. Essa contaminação por micro-organismos resistentes pode se propagar pela cadeia produtiva levando à contaminação durante o processo de abate dos animais, representando um enorme risco de contaminação do produto final por micro-organismos resistentes (FLOREZ-CUADRADO et al., 2018). Com isso, destaca-se a necessidade de monitoramento da resistência a antimicrobianos em todas as etapas da cadeia produtiva de frangos de corte, para que assim, sejam desenvolvidas medidas de controle e profilaxia, ressaltando a necessidade de um maior controle no uso de antimicrobianos em animais de produção.

2.3.1. Resistência aos macrolídeos

Os macrolídeos são moléculas grandes, que tem em sua composição um anel lactônico macrocíclico, com o número de átomos variando entre 14 e 16, sendo os antimicrobianos pertencentes a esta classe, classificados de acordo com o número de átomos existentes no anel (SPINOSA et al., 2011). Destacam-se nessa classe de antimicrobianos a eritromicina, a claritromicina e a azitromicina (IOVINE, 2013; SPINOSA et al., 2011; WIECZOREK; OSEK, 2013).

A eritromicina, descoberta em 1952, obtida a partir de culturas de *Streptomyces erythreus*, é a principal escolha para o tratamento de campilobacteriose e é capaz de atingir altas concentrações no interior das células, além de ter boa distribuição em diversos tecidos (SPINOSA et al., 2011). Além disso, possui amplo espectro de ação, agindo sobre micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos, cocos, espiroquetas e alguns bacilos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). A azitromicina é um macrolídeo semissintético e caracteriza-se por possuir amplo espectro de ação (SPINOSA et al., 2011) e meia vida prolongada, em relação à eritromicina (ANVISA, 2007a).

Os antimicrobianos pertencentes a classe dos macrolídeos ligam-se, reversivelmente, a subunidade 50S ribossomal, impedindo assim a síntese proteica bacteriana (IOVINE, 2013). Essa ligação inibe a translocação do RNA transportador, impedindo a adição de novos aminoácidos na sequência peptídica, atuando dessa forma, como bacteriostáticos, podendo ser bactericidas em altas concentrações (SPINOSA et al., 2011).

O isolamento de *Campylobacter* termofílicos resistentes aos macrolídeos, como a eritromicina, azitromicina e claritromicina, é menos frequente (IOVINE, 2013; EFSA/ECDC 2018). Segundo dados da UE, a resistência à eritromicina está presente em 2,1% dos isolados de *Campylobacter* termofílicos (EFSA/ECDC, 2018). HUNGARO et al. (2015) não encontraram resistência a eritromicina em *Campylobacter* spp. isolados de carcaças de frangos no Brasil. Contudo, relatos de resistência a esses princípios ativos são muito preocupantes, pois esses são os antimicrobianos de primeira escolha no tratamento de campilobacteriose e o aumento da resistência prejudica diretamente a terapêutica da doença.

A resistência de *Campylobacter* termofílicos aos macrolídeos ocorre, principalmente, devido a alguns mecanismos como: alterações nos sítios de ação do antimicrobiano, bombas de efluxo, alterações na permeabilidade da membrana bacteriana ou inativação enzimática do princípio ativo, podendo os dois primeiros mecanismos agir sinergicamente, conferindo altos níveis de resistência às bactérias (IOVINE, 2013).

Estudos estruturais demonstram que o sítio alvo dos macrolídeos situa-se nos nucleotídeos 2058 e 2059 do gene *23SrRNA*, com isso, mutações nessa região desempenham o principal mecanismo de resistência desses patógenos frente aos macrolídeos (IOVINE, 2013). Em *C. jejuni* e *C. coli* existem três cópias do gene *23S rRNA*. Estudos apontam que mutações na posição A2075G, onde ocorre a substituição de uma adenina por guanina no nucleotídeo 2075 e A2074T, no qual a adenina é substituída por timina na posição 2074, conferem altos níveis de resistência, com CIM superior a $128 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ para eritromicina, podendo ou não as três cópias do gene estarem mutadas (CORCORAN et al., 2006; LIN et al., 2007). Mutações e inserções nas proteínas ribossomais L4 e L22, codificadas pelos genes *rpID* e *rpIV*, respectivamente, também podem conferir resistência aos macrolídeos (CALDWELL et al., 2008).

A bomba de efluxo CmeABC, codificada pelo operon *cmeABC*, é a principal bomba de efluxo, composta por uma proteína de membrana externa (codificada pelo gene *cmeC*), um transportador interno de membrana (codificado pelo gene *cmeB*) e uma proteína periplasmática (codificada pelo gene *cmeA*). Esse mecanismo contribui para a resistência a múltiplas classes de antimicrobianos, como as fluorquinolonas, β -lactâmicos, tetraciclina e macrolídeos (IOVINE, 2013). Estudos indicam que esse mecanismo de resistência atua de forma sinérgica com as mutações cromossômicas,

e quando inativado, promove uma redução significativa da resistência aos macrolídeos em isolados de *Campylobacter* termofílicos os quais apresentam níveis baixos, médios ou altos de resistência a essa classe de antimicrobianos (SHEN et al., 2018).

Outra bomba de efluxo que atua conferindo multirresistência neste patógeno é a bomba CmeG, codificada por um gene de mesmo nome e composta por uma proteína transmembrana que possui 12 domínios transmembranares (JEON et al., 2011). Em estudo realizado por JEON et al. (2011), demonstrou-se que a bomba de efluxo CmeG confere resistência à eritromicina, ciprofloxacina, gentamicina e tetraciclina, porém, são escassos os estudos relativos a esse gene, sendo, portanto importante a realização de mais pesquisas a fim de elucidar a ação dessa bomba de efluxo. A inativação enzimática dos macrolídeos ainda é pouco reportada em *Campylobacter* termofílicos, sendo identificada a presença do gene *ermB*, que codifica para uma RNA metilase (LIU et al., 2017; QIN et al., 2014; WANG et al., 2014), o qual pode estar localizado no DNA cromossomal ou plasmidial (WANG et al., 2014), conferindo altos níveis de resistência aos macrolídeos (QIN et al., 2014).

2.3.2. Resistência as quinolonas e fluorquinolonas

O ácido nalidíxico foi a primeira quinolona a ser utilizada na medicina humana e veterinária, sendo chamado de quinolona de primeira geração. Esse princípio ativo caracteriza-se por ação frente a bactérias Gram-negativas, porém, não inibe *Pseudomonas aeruginosa*, bactérias anaeróbias e micro-organismos Gram-positivos (SPINOSA et al., 2011; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Na década de 1980, foram desenvolvidas as quinolonas de segunda geração, adicionadas de um átomo de flúor na posição seis do anel quinolônico e, por isso, também chamadas de fluorquinolonas. Os princípios ativos pertencentes ao grupo das fluorquinolonas, como a ciprofloxacina e a enrofloxacin, de uso exclusivo em animais, possuem ação contra bactérias Gram-negativas, incluindo *P. aeruginosa*, tendo assim, espectro expandido em relação as quinolonas de primeira geração (ANVISA, 2007a; SPINOSA et al., 2011; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

As quinolonas e fluorquinolonas atuam de forma bactericida, inibindo a síntese de DNA bacteriano, por meio da ligação nas enzimas DNA girase, codificada pelos genes *gyrA* e *gyrB*, e topoisomerase IV, codificada pelos genes *parC* e *parE*, que

atuam na replicação, transcrição, recombinação e no reparo do DNA bacteriano (ANVISA, 2007a; DRLICA et al., 2008; HOOPER, 1999).

Campylobacter termofílicos foram listadas como bactérias de alto risco em relação à sua resistência as fluorquinolonas (CDC, 2013), sendo relatados diversos casos de isolados, provenientes de alimentos, resistentes a essa classe de antimicrobianos (EFSA/ECDC, 2018; GARCÍA-SÁNCHEZ et al., 2018; HAN et al., 2016; NISAR et al., 2017). Em estudo realizado por GARCÍA-SÁNCHEZ et al. (2018) na Espanha, 100% dos isolados de *C. jejuni* e *C. coli* provenientes de carne de frango apresentaram resistência à ciprofloxacina e ao ácido nalidíxico. Wieczorek; Osek (2015), ao avaliarem isolados de *Campylobacter* spp. provenientes de cloaca de frangos, na Polônia, encontraram 33,1% dos isolados de *C. jejuni* e 29,6% de isolados de *C. coli* resistentes à ciprofloxacina e ao ácido nalidíxico. Alguns estudos relacionam os altos índices de resistência às quinolonas e fluorquinolonas ao amplo uso desses grupos de antimicrobianos na produção animal (MCDERMOTT et al., 2002; SMITH et al., 2018), principalmente na indústria avícola (MCDERMOTT et al., 2002).

A resistência às fluorquinolonas geralmente está associada a mutações pontuais nos genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE* (REDGRAVE et al., 2014), porém, em bactérias do gênero *Campylobacter*, somente mutações na região QRDR (Região determinante de resistência as quinolonas) conferem resistência a essa classe de antimicrobianos (PAYOT et al., 2006), sendo que, até o momento, mutações no gene *gyrB* não foram associadas à resistência nesses micro-organismos (PIDDOCK et al., 2003). Além disso, a bomba de efluxo CmeABC desempenha um importante papel na resistência a antimicrobianos, e estudos apontam que a inativação do operon *cmeABC* em isolados de *Campylobacter* spp. que apresentavam mutações no gene *gyrA*, fez que os isolados mutantes resistentes se tornassem suscetíveis às fluorquinolonas (LUO et al., 2003).

2.3.3. Resistência às tetraciclinas

As tetraciclinas são antibióticos produzidos por diversas espécies de *Streptomyces*, sendo algumas delas, semissintéticas. Possuem amplo espectro de ação, atuando de forma bacteriostática contra micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos. Os fármacos pertencentes a essa classe atuam inibindo a síntese proteica, ligando-se reversivelmente à subunidade 30S do ribossomo bacteriano,

impedindo assim, a fixação do RNA transportador ao ribossomo, impedindo a adição dos aminoácidos e consequente formação da proteína (IOVINE, 2013; SPINOSA et al., 2011).

A tetraciclina e a doxiciclina podem ser utilizadas como alternativas para o tratamento de campilobacteriose (SKIRROW & BLASER, 2000). Atualmente, as tetraciclina não são amplamente utilizadas na terapêutica das doenças diarreicas, pois seu amplo uso, na medicina humana e veterinária, no passado, levou à ocorrência de altos índices de resistência (IOVINE, 2013). No Brasil, HUNGARO et al. (2015) encontraram resistência à tetraciclina em 50% dos isolados de *Campylobacter* spp. provenientes de carcaças de frango. Na Espanha e na Polônia, foram reportados, respectivamente 98,2% (GARCÍA-SÁNCHEZ et al., 2018) e 33,1% de resistência a esses fármacos em *Campylobacter* spp. (WIECZOREK et al., 2015).

Os principais mecanismos de resistência às tetraciclina descritos em *Campylobacter* spp., são as alterações no sítio de ligação das tetraciclina e as bombas de efluxo (IOVINE, 2013; WIECZOREK; OSEK, 2013). A proteína de proteção ribossomal Tet(O), codificada pelo gene de mesmo nome, reconhece quando o sítio A da subunidade 30S ribossomal está vazio e se liga de maneira a induzir uma mudança conformacional no local, impedindo que as tetraciclina se liguem ao seu sítio de ligação e desempenhem sua ação antimicrobiana (CONNELL et al., 2003a). Essa mudança conformacional dura por um período prolongado, fazendo com que as bactérias continuem realizando a síntese proteica normalmente, mesmo na presença de tetraciclina (CONNELL et al., 2003a; CONNELL, 2003b).

Esse gene pode estar codificado tanto no DNA cromossomal quanto no DNA plasmidial bacteriano, sendo frequentemente encontrado em plasmídeos conjugativos (CHEN et al., 2013), como o pTet em *C. jejuni* (TAYLOR, 1986) e o pCC31 em *C. coli* (BATCHELOR et al., 2004), estando associado a altos índices de resistência à tetraciclina, muitas vezes com valores de CIM superiores a 512 µg.mL⁻¹ (GIBREEL et al., 2004). Estima-se que em torno de 30% dos isolados de *C. coli* e aproximadamente 15% de *C. jejuni* albergam os plasmídeos pCC31 e pTet, respectivamente (CHEN et al., 2013).

Outro mecanismo de resistência às tetraciclina reportado em *Campylobacter* termofílicos são as bombas de efluxo (IOVINE, 2013; WIECZOREK; OSEK, 2013), como as codificadas pelos genes *tet(A)* (ABDI-HACHESOO; KHOSHBAKHT; SHARIFIYAZDI, 2014) e pelo operon *cmeABC* (LIN; MICHEL; ZHANG, 2002), sendo

a bomba CmeABC, a principal bomba de efluxo presente em *Campylobacter* termofílicos (IOVINE, 2013).

A bomba de efluxo Tet(A), apesar de não ser frequente em isolados de *Campylobacter* (ABDI-HACHESOO et al., 2014), pode ser facilmente disseminada, visto que é comum a vários gêneros bacterianos e pode estar localizada em elementos genéticos móveis, como plasmídeos, podendo ocorrer transferência horizontal entre micro-organismos (SZCZEPANOWSKI et al., 2004). Estudos relatam que a prevalência do gene *tet(A)* em isolados de *E. coli* provenientes de granjas avícolas é alta, sendo encontrado em 50% dos isolados, podendo este patógeno atuar como um reservatório do gene *tet(A)* e, assim, transferir horizontalmente esse gene para *Campylobacter* spp. (FALSAFI et al., 2009).

2.3.4. Resistência aos aminoglicosídeos

A classe dos aminoglicosídeos caracteriza-se por ter ação bactericida, sendo que a maioria dos fármacos pertencentes a essa classe são antibióticos produzidos por *Streptomyces* ou por *Micromonospora*, porém, alguns aminoglicosídeos são semissintéticos. O primeiro fármaco dessa classe comercializado foi a estreptomicina, em 1943. Após, diversos outros aminoglicosídeos foram utilizados na terapêutica de infecções por micro-organismos Gram-negativos e Gram-positivos, como a canamicina no ano de 1957 e a gentamicina em 1963 (SPINOSA et al., 2011).

Os aminoglicosídeos exercem sua ação por interferência na síntese proteica bacteriana, ligando-se à subunidade ribossomal 30S. Para isso, dependem de oxigênio para transpor a membrana bacteriana, desta forma, não atuam contra micro-organismos anaeróbios (IOVINE, 2013). Após a ligação ao ribossomo, os aminoglicosídeos interferem na leitura do RNA mensageiro, por meio de uma ligação irreversível aos receptores da subunidade 30S, devido a isso, a síntese proteica é interrompida, podendo também ocorrer a incorporação de aminoácidos incorretos, sendo formadas proteínas defeituosas (SPINOSA et al., 2011). Os relatos de resistência de *Campylobacter* termofílicos frente à classe dos aminoglicosídeos são poucos. Segundo dados do *European Food Safety Authority/European Center for Disease Prevention and Control*, na UE, apenas 0,4% dos isolados desse micro-organismo apresentavam resistência aos fármacos dessa classe (EFSA/ECDC, 2018).

Em *Campylobacter* termofílicos o principal mecanismo de resistência aos aminoglicosídeos é a inativação do princípio ativo por enzimas, porém, as bombas de efluxo também podem estar envolvidas. Entretanto, a ação das bombas de efluxo, nessa resistência ainda não está bem elucidado (IOVINE, 2013). As enzimas denominadas aminoglicosídeos fosfotransferases, como a AphA-3, são os principais mecanismos associados a resistência aos aminoglicosídeos em *Campylobacter* e são responsáveis por fosforilar o grupo 3'hidroxil dos aminoglicosídeos, levando à resistência a princípios como canamicina e neomicina (GIBREEL et al., 2004; RAMIREZ; TOLMASKY, 2010).

2.3.5. Resistência aos β -lactâmicos

As penicilinas pertencentes à classe dos antimicrobianos β -lactâmicos, são polipeptídeos com um anel β -lactâmico em sua estrutura, que é essencial para a ação antimicrobiana. Esses fármacos atuam inibindo a síntese da parede celular das bactérias, interferindo na última etapa da síntese do peptidoglicano. Desta forma, as penicilinas atuam como bactericidas, mas somente em células que estão se replicando, visto que não atuam na parede celular já formada (IOVINE, 2013; SPINOSA et al., 2011).

As primeiras penicilinas, também chamadas de penicilinas naturais, foram obtidas de fungos do gênero *Penicillium* e somente exerciam ação contra bactérias Gram-positivas, tendo um espectro reduzido de ação, além de serem suscetíveis às β -lactamases. Buscando aumentar o espectro de ação das penicilinas, foram produzidas as penicilinas de largo espectro de ação, como a ampicilina e amoxicilina, as quais apresentam ação contra micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos, podendo ser associadas ao ácido clavulânico ou sulbactam, para obtenção de sinergismo e assim, ação sobre bactérias produtoras de β -lactamases (SPINOSA et al., 2011).

De uma forma geral, *Campylobacter* spp. possuem resistência à maioria das penicilinas e a outros β -lactâmicos, apresentando resistência intrínseca à penicilina G, devido a incapacidade destes fármacos de ligarem-se ao receptor, bem como a baixa permeabilidade da membrana (AARESTRUP; ENGBERG, 2001; WHITEHOUSE et al., 2018; WIECZOREK; OSEK, 2013). Porém, apresentam suscetibilidade à ampicilina e à amoxicilina (TAJADA et al., 1996; WHITEHOUSE et al., 2018).

A resistência de *Campylobacter* spp. aos β -lactâmicos é cada vez mais frequente em isolados de origem animal (ABAY et al., 2014; HUNGARO et al., 2015; LI et al., 2007). HUNGARO et al. (2015) em estudo realizado no Brasil, observaram 45% de resistência à ampicilina e 10% de resistência à amoxicilina com ácido clavulânico em isolados de *Campylobacter* termofílicos provenientes de carcaças de frango.

Em *Campylobacter* spp., os principais mecanismos de resistência às penicilinas são a produção de β -lactamases, bem como a presença de bombas de efluxo e alteração na permeabilidade da membrana (IOVINE, 2013). Até o momento, apenas uma β -lactamase foi descrita em *Campylobacter* spp. (SHEN et al., 2018). Codificada pelo gene *bla*_{-*oxa61*}, essa β -lactamase OXA-61 confere resistência a diversos antimicrobianos β -lactâmicos, dentre eles, as penicilinas (ZENG et al., 2014).

Estudos apontam que as bombas de efluxo podem contribuir com a resistência aos antimicrobianos desta classe, sendo CmeABC a bomba com maior relevância (IOVINE, 2013). Em estudo realizado por PUMBWE et al. (2004) isolados mutados para o gene *cmeB* foram quatro vezes mais suscetíveis à ampicilina, indicando relação entre a bomba de efluxo *cmeABC* e a resistência às penicilinas.

3 Manuscrito

**Antimicrobial resistance genes and plasmid identification in
Campylobacter jejuni from the production chain of broilers in Southern Brazil**

Manuscrito a ser submetido ao periódico *Food Control*.

Fator de Impacto 3.667

(Qualis A1 em Ciência de Alimentos)

Antimicrobial resistance genes and plasmid identification in *Campylobacter jejuni* from the production chain of broilers in Southern Brazil

Natalie Rauber Kleinubing¹, Tassiana Ramires¹, Simone de Fátima Rauber Würfel², Leticia Klein Scheik¹, Frederico Schmitt Kremer², Graciela Völz Lopes³, Louise Haubert¹, Wladimir Padilha da Silva^{1,2}

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

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

³ Instituto Federal Farroupilha, Frederico Westphalen, Rio Grande do Sul, Brasil

*Corresponding autor

E-mail address: silvawp@ufpel.edu.br (Silva, W. P.)

ABSTRACT

Campylobacter jejuni is the main cause of foodborne gastroenteritis in humans worldwide. There are increasing reports of antimicrobial resistance in *C. jejuni*. Besides impairing the treatment of campylobacteriosis, can promote the dissemination of *C. jejuni* with resistance profile in the food production chain representing concerns to human health. The aims of this study were to perform the phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in *C. jejuni* isolates from the chain production of broilers in southern Brazil, as well as to verify the presence of plasmids in these isolates. In this study, the majority (82.2%) of *C. jejuni* isolates presented resistance to at least one antimicrobial tested and 15 isolates (53.6%) were multidrug resistant. The CmeABC and CmeG efflux pumps were reported in the majority of the isolates (91.3%) with antimicrobial resistance. The *tet(O)* gene was the predominant gene related to tetracyclines resistance; however, *tetA* was not detected. According to the β -lactams resistance, the *bla_{oxa-61}* gene was present in 66.7% of the isolates with phenotypic resistance profile. The *tet(O)* and *apha-3* genes were found in chromosomal and plasmidial DNA. The high rates of antimicrobial resistance and the presence of plasmids harboring antimicrobial resistance genes found in the isolates from the broiler production chain highlights the importance of an improve control in the use of antimicrobials in animal production, as well as the relevance of further studies to monitor bacterial antimicrobial resistance in Brazil.

Keywords: *Campylobacter* spp.; efflux pumps; multidrug resistance; plasmid

1 Introduction

According to the World Health Organization (WHO), *Campylobacter* spp., mainly *C. jejuni*, are the leading cause of gastroenteritis worldwide. These bacteria cause 1 in 4 cases of gastroenteritis in the world, being the most common bacterial cause (WHO, 2018). In the United States of America (USA), campylobacteriosis affects 14 out of 100.000 people, leading about 1.3 million cases annually (CDC, 2017).

This pathogen is widely distributed in the environment and colonize the gastrointestinal tract of wild and domestic animals. Birds, especially poultry, are considered natural reservoirs of these bacteria in their intestines, and normally do not have symptoms of the disease. In humans, campylobacteriosis is usually associated with ingestion of raw or inadequately cooked poultry meat and cross-contamination of foods consumed *in natura* (EFSA, 2011; CDC, 2013).

Campylobacteriosis usually is self-limiting but in severe and prolonged cases, as infections in children or immunocompromised people, it is necessary the use of antibiotic therapy (Narvaez-Bravo et al., 2017). Antimicrobials of the class of macrolides and fluoroquinolones are the drugs of choice for the treatment of this disease (Allos, 2001; Blaser & Engberg, 2008), however, tetracyclines and aminoglycosides can be used in some cases (Luangtongkum et al., 2009). There are increasing reports of antimicrobial resistance of this bacteria (EFSA/ECDC, 2018; Wieczorek, Denis, & Osek, 2015) and *C. jejuni* was classified as a high-risk pathogen regarding its resistance to quinolones (CDC, 2013; WHO, 2017). This antimicrobial resistance has become a major public health concern, in some cases, compromising the treatments of *Campylobacter* infections (EFSA/ECDC, 2018).

The indiscriminate use of antimicrobials by the human population and in animal medicine as the treatment or as the growth promoting agent, could be responsible for a selection of antimicrobial resistant *Campylobacter* (Allos, 2001; Iovine, 2013). Thus, the spread of antimicrobial resistance genes occurs throughout the all production chain until reaching the final consumer (Florez-cuadrado, Moreno, Ugarte-ruíz & Domínguez, 2018).

The genetic elements responsible for resistance mechanisms in *C. jejuni* may be present in the chromosomal or plasmidial DNA. The major mechanisms of resistance of this bacteria are: modification or inhibition of the expression of the antimicrobial binding site; alteration of the permeability of the membrane; efflux pumps;

and modification of the active principle (Iovine, 2013; Wieczorek, Denis, & Osek, 2015). Few plasmids have already been described in this pathogen and some of them, with conjugative capacity (Crespo et al., 2016; Gibreel, Sköl, & Taylor, 2004). The high prevalence of resistance genes in plasmids may be one of the main reasons for the rapid spread in the number of some resistance genes in *Campylobacter* (Wieczorek, & Osek, 2013).

Brazil is the world's second largest producer of poultry meat, producing more than 13 million of poultry meat annually, of which more than 4 million tons are exported to several countries (ABPA, 2018). Some studies have already identified *C. jejuni* in several points of the Brazilian production chain of broilers, as well as the presence of some isolates with phenotypic profile of antimicrobial resistance (Moura et al., 2013; Panzenhagen et al., 2015; Würfel et al., 2018). On the other hand, there are few studies that have identified the molecular mechanisms related to antimicrobial resistance in *C. jejuni* isolates from Brazil (Hungaro et al., 2015; Sierra-Arguello et al., 2018).

Therefore, the aims of this study were to perform the phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in *C. jejuni* isolated from the chain production of broilers in southern Brazil, as well as, to verify the presence of plasmids in these isolates

2 Materials and methods

2.1 Bacterial isolates

A total of 28 *C. jejuni* isolates from production chain of broilers (broiler farms, slaughterhouse and poultry meat) and belonging to different pulsotypes according to the pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) technique (Oliveira, 2016; Ramires, 2017; Würfel et al., 2018) were evaluated in the present study. The isolates were collected in the Southern region of Rio Grande do Sul, Brazil, belonging to the collection of the Food Microbiology Laboratory of the Department of Science and Agroindustrial Technology FAEM/UFPEl. The source of the isolates is in the table S1 in the supplementary material.

2.2 Antimicrobial susceptibility tests

2.2.1 Disk Diffusion Test

All the 28 isolates were submitted to the agar disk diffusion testing (BAUER, KIRBY, SHERRIS, & TURCK, 1966) using the follow antimicrobials agents: ciprofloxacin (CIP 5 µg), enrofloxacin (ENO 5 µg), nalidixic acid (NAL 30 µg), azithromycin (AZI 15 µg), clarithromycin (CLA 15 µg), erythromycin (ERI 15 µg), doxycycline (DOX 30 µg), tetracycline (TET 30 µg), ampicillin (AMP 10 µg), amoxicillin + clavulanic acid (AMC 30 µg), gentamicin (GEN 10 µg) (Laborclin, Brazil) and kanamycin (KAN 30 µg) (Thermo Scientific™ Oxoid™, USA). The isolates were grown in Blood Agar N° 2 (BA2) (Acumedia®, Neogen, USA) supplemented with 5% defibrinated horse blood, and colonies were suspended in saline solution until the 0.5 MacFarland standard turbidity. The inoculum was placed on Mueller-Hinton agar (Acumedia®, Neogen, USA) plates surface, supplemented with 5% defibrinated horse blood and 20 mg.L⁻¹ β-NAD, followed by the application of the antimicrobials disks with incubation at 42 °C for 48 h in microaerophilic conditions, according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2018). Reference strain *C. jejuni* ATCC 33560 was used as the standard control and the test was performed in triplicate. The isolates were classified as susceptible or resistant to the antimicrobial agents tested.

The diameters of the inhibition zones for azithromycin, clarithromycin, erythromycin, ciprofloxacin, tetracycline and doxycycline were interpreted as recommended by EUCAST (EUCAST, 2018). For amoxicillin + clavulanic acid (<14mm), ampicillin (<14mm) and gentamicin (<17mm) parameters of the Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM & EUCAST, 2018) were used (Table S2). Multidrug resistance (MDR) was defined as resistance to three or more classes of antimicrobials (EFSA/ECDC, 2018).

2.2.2 Minimum Inhibitory Concentration

Isolates that presented qualitative resistance in the disk diffusion test were submitted to a broth microdilution testing, for the identification of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). The purpose of the MIC was to quantify the resistance to a drug belonging to one of the classes of antimicrobials previously tested

qualitatively. The antimicrobials used were ciprofloxacin (fluoroquinolone), erythromycin (macrolide), ampicillin (β -lactam), tetracycline (tetracycline) and kanamycin (aminoglycoside). The parameters to determinate the susceptibility of the isolates are described in Table S2.

MIC determination was performed according to the EUCAST (2018) recommendations, the isolates were grown on BA2 (Acumedia[®], Neogen, USA), supplemented with 5% defibrinated and lysate equine blood under microaerophilic conditions at 42 °C for 24 h. The cell suspension was prepared in saline solution, and the inoculum concentration approximately adjusted at 5×10^5 CFU.mL⁻¹ and then inoculated into microplates containing Mueller-Hinton broth (Acumedia[®], Neogen, USA), supplemented with 5% defibrinated and lysate equine blood and 20 mg.L⁻¹ β -NAD and antimicrobials at different concentrations. The microplates were incubated at 42 °C for 48 h under microaerophilic conditions, to read the results. MIC was considered the lowest concentration of antimicrobial that completely inhibited visibly bacterial growth. As positive control, the strain *C. jejuni* ATCC 33560 was used and the tests were performed in triplicate. For kanamycin MIC, the parameters were defined by Luangtongkum, Morishita, El-tayeb, Ison, & Zhang, (2007), enrofloxacin and nalidixic acid are evaluated according the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (2010) (Table S2).

2.3 Genotypic characterization

2.3.1 DNA Extraction

Genomic DNA extraction was performed according Sambrook & Russel (2012), with adaptations. The isolates were cultured in BA2 (Acumedia[®], Neogen, USA), supplemented with 5% equine blood under microaerophilic conditions for 24 h and suspended in Brucella broth (Acumedia[®], Neogen, USA) to the genomic DNA extraction. DNA was quantified through NanoVue [™] Plus (GE Healthcare Life Sciences, USA) equipment and stored at -20 °C.

The plasmid DNA was extracted and purified using the Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep Kit (Cellco Biotec, Brazil) according to protocol of the manufacturer. Extracted plasmids were subjected to an electrophoresis on a 0.8% agarose gel

(Kasvi[®], Brazil) in a Tris/Acetate/EDTA buffer (TAE, Ludwig Biotec, Brazil) for 2 h at 70V based on protocols described by Green & Sambrook (2012)..

2.3.2 Antimicrobial resistance genes

All isolates classified as resistant or intermediate resistant to antimicrobials by the disk diffusion testing were evaluated for the presence of several antimicrobial resistance genes. Genes coding resistance to multiples classes of drugs (operon *cmeABC*, *cmeG*), macrolides (*ermB*), tetracyclines (*tet(O)* and *tet(A)*), aminoglycosides (*apha-3*), quinolones (mutations on *gyrA*) and β -lactams (*bla_{OXA-61}*) were investigated through polymerase chain reaction (PCR). The presence of *tet(O)* and *apha-3* gene were also evaluated in the plasmid DNA. The primers used in this study are described in Table S3.

2.3.3 DNA Sequencing

For the identification of mutations that confer antimicrobial resistance, the PCR products were purified using the Purification kit for PCR products on column (Ludwig Biotec, Brazil), according the manufacturer's instructions. The purified products and their respective primers were sent for ACTGene Análises Moleculares (Brazil) and the DNA sequencing was performed by the Sanger method using the AB 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems[™], USA), and the sequences were compared with reference strains using the Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD).

3 Results

3.1 Antimicrobial resistance

3.1.1 Disk Difusion Testing

Of the 28 *C. jejuni* isolates, 17.8% (n = 5) were susceptible to all antimicrobials tested, and 82.2% (n=23) showed resistance to at least one antimicrobial evaluated (Table S1). The most common resistance was for the quinolone class, with 82.2% of the isolates being resistant to nalidixic acid, followed by resistance to enrofloxacin and ciprofloxacin, present in 75% (n=21) and 53.5%, (n=15), respectively.

The resistance to tetracyclines was the second most frequent, being that 60.7% (n=17) of the isolates were resistant to tetracycline and doxycycline, while 21.4% (n=6) were resistant to macrolides (azithromycin, clarithromycin and erythromycin). Regarding to the resistance to aminoglycosides, variable values were found, with 39.3% (n=11) of the isolates were resistant to kanamycin, whereas no isolate was resistant to gentamicin. For β -lactams, all isolates showed susceptibility to amoxicillin with clavulanic acid, but 32.1% (n=9) were resistant to ampicillin. MDR profile was found in 53.6% (n=15) of the *C. jejuni* isolates (Table 3).

Table 1. Antimicrobial resistance pattern in *Campylobacter jejuni* isolates from the productive chain of broilers

Classes of antimicrobials	Number of isolates
Susceptible	5
Q	6
Q + T	2
Q + T + B	4
Q + T + A	4
Q + T + A + M	2
Q + T + A + M + B	4
Q + T + A + B	1

Q= quinolones; T= tetracyclines; B= β -lactams; A= aminoglycosides; M= macrolides

3.1.2 Minimum Inhibitory Concentration

The results of the broth microdilution test confirmed the resistance indicated by the disk diffusion testing for all isolates for ciprofloxacin and ampicillin. For ciprofloxacin, the isolates obtained MICs ranging from 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ to 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. High MIC values were found for ampicillin, with MIC values greater than or equal to 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

However, MIC results diverged from the disc diffusion test for erythromycin, tetracycline, and kanamycin. Of the isolates that showed resistance to tetracycline (n=17) in the disk diffusion testing, 5.9% (n=1) were not confirmed as resistant by the broth microdilution test, with MIC less than 0.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, and 91.1% of the isolates (n=16) had MICs greater than or equal to 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Regarding resistance to erythromycin, of the isolates that presented phenotypic resistance (n=6) in the disc diffusion test, 16.7% (n=1) were considered susceptible with MIC of 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, and 83.3% (n=5) had MIC values of 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ or higher for this antimicrobial. For kanamycin, between the 11 isolates that presented resistance previously, 44.4% (n=4) were considered susceptible by the broth microdilution test, with MIC result of 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, and 55.6% (n=5) were resistant, with MICs of 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ or higher. The results of the MIC distribution for the isolates are described in Table 2.

Table 2. Distribution of the Minimum inhibitory concentration results for the *C. jejuni* isolates that presented resistance in the Disk Diffusion testing

Antimicrobial agent (breakpoints $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Ranges of antimicrobials and MIC of the <i>C. jejuni</i> isolates that have resistance profile in the DD test											Total of isolates tested
	<0.5	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128	
Ciprofloxacin >0.5	0	0	0	0	0	3	8	4	0	0	0	15
Tetracycline >1	1	0	0	0	0	0	2	1	6	4	3	17
Erythromycin >4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	4	6
Kanamycin >64	0	0	0	0	0	4	0	0	0	1	6	11
Ampicillin >16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	5	9

DD, disk diffusion test.

MIC, minimum inhibitory concentration.

3.2 Antimicrobial resistance genes

The presence of the *cmeA*, *cmeB* and *cmeC* genes was evaluated in all (n=23) isolates with phenotypic resistance in the disk diffusion testing, being present respectively in 78.3% (n=18), 91.3% (n=21) and 100% (n=23) of the isolates. The *cmeG* gene, another gene encoding an efflux pump that confers resistance to many antimicrobials, was present in 91.3% (n=21) of the *C. jejuni* isolates tested in this study.

Regarding the resistance to tetracyclines, the *tetA* and *tet(O)* genes were evaluated in the isolates that presented phenotypic resistance to this class of

antimicrobial (n=17). The *tetA* gene was not detected in any isolate, whereas the *tet(O)* gene was found in 76.5% (n=13) of the isolates. In relation to aminoglycoside resistance genes, all the isolates (n=11) with phenotypic resistance to kanamycin in the disk diffusion testing were positive for the presence of *apha-3* gene (Table S1).

The genotypic resistance to β -lactams was evaluated by the *bla*-*OXA61* gene, which was detected in 66.7% (n=6) of the tested isolates (n=9). Regarding to the resistance to macrolides, the *ermB* gene was investigated, but none of the isolates carried this gene.

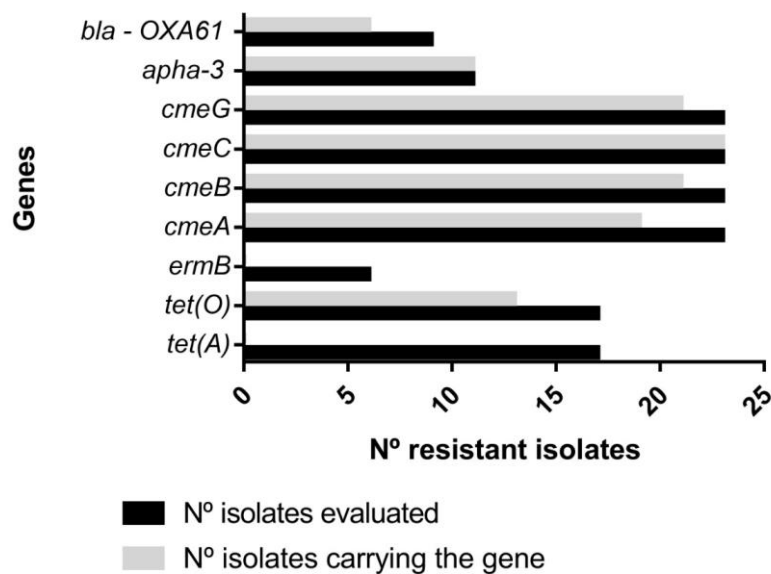


Figure 1 – Presence of antimicrobial resistance genes in *Campylobacter jejuni* from the production chain of broilers.

3.3 Point mutations conferring antimicrobial resistance

The point mutations in the Quinolone Resistance-Determining region (QRDR) of the *gyrA* gene were present in 100% (n=23) of the isolates that were resistant to quinolones and fluoroquinolones. In all the isolates, the mutation Thr-86-Ile was found.

3.4 Plasmid detection and presence of resistance genes in the plasmidial DNA

The presence of plasmids was detected in 85.7% (n=24) of the isolates (n=28) (Table S1). In all isolates with a resistance profile to tetracyclines or aminoglycosides in the disk diffusion testing, the presence of *tet(O)* and *apha-3* gene in the plasmid DNA was evaluated. The *tet(O)* was harbored in plasmids in 82.3% (n=14) of the *C. jejuni* isolates, whereas 81.8% (n=9) of the isolates harbored the *apha-3* in the plasmid DNA. The description of the location of the *tet(O)* and *apha-3* genes in the chromosomal or plasmid DNA in the isolates showing phenotypic resistance profile to tetracyclines or aminoglycosides is described in Table 3.

Table 3. Location of *tet(O)* and *apha-3* genes in *Campylobacter jejuni* isolated from the production chain of broilers

Resistant Isolates	Presence of plasmid	<i>tet(O)</i> gene		<i>apha-3</i> gene	
		plasmid DNA	cromossomal DNA	plasmid DNA	cromossomal DNA
3	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+
7	+	+	-	+	+
8	+	+	+	NA	NA
9	+	+	+	+	+
10	+	+	-	+	+
11	+	-	-	+	+
13	+	+	-	NA	NA
14	+	+	+	NA	NA
15	+	+	+	+	+
16	+	-	+	-	+
17	+	+	+	+	+
19	+	+	+	NA	NA
20	+	+	+	-	+
24	-	-	+	NA	NA
28	+	+	+	NA	NA

NA= Not applicable because the isolate is not resistant to aminoglycosides

4 Discussion

This study revealed high resistance levels in *C. jejuni* isolates from the production chain of broilers in the southern region of Rio Grande do Sul, Brazil, with 82.2% of the isolates presenting resistance to at least one of the 12 antimicrobials

tested. This result is in accordance with other studies that evaluated antimicrobial resistance in *C. jejuni*, showing 97% of resistance in isolates from chicken meat and slaughterhouses in India (Khan et al., 2018), and 92% of *C. jejuni* isolates from poultry with a resistance profile in Turkey (Abay et al., 2014).

The resistance to nalidixic acid was the most frequent, observed in 82.2% of the isolates of *C. jejuni*, which agrees with results obtained in *C. jejuni* isolates from poultry meat in Spain, where resistance to this drug occurred in 100% of the isolates (García-Sánchez et al., 2018). However, low resistance levels (31.7%) to nalidixic acid have been reported in *C. jejuni* isolated from food in Pakistan, which according to Nisar et al. (2017), is related to the fact that this drug is not used extensively in veterinary practice in that country.

In this study, high rates of ciprofloxacin resistance (53.3%) were found. In USA, the National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS) monitors the antimicrobial resistance in bacteria and reveals that *C. jejuni* resistance to ciprofloxacin increased from 16,7% in 1997 to 25,3% in 2015 (CDC, 2019), being considered a microorganism with high risk in relation to quinolone resistance (CDC, 2013). According to the EFSA/ECDC report, resistance to fluoroquinolones, especially ciprofloxacin, was extremely high in European Union (EU) countries, being reported in 66.9% of the *C. jejuni* isolates from poultry and in 54.6% of the isolates of human origin (EFSA/ECDC, 2018). It should be emphasized that ciprofloxacin is the second therapeutic option for the treatment of campylobacteriosis (EFSA/ECDC, 2013; Skirrow & Blaser, 2000); in this way the high levels of resistance reported may limit the use of this antimicrobial against *Campylobacter* infections (EFSA/ECDC, 2018; Maćkiw, Korsak, Rzewuska, Tomczuk, & Rozynek, 2012).

The enrofloxacin resistance was also high in this study, being observed in 75% of the isolates. This result was similar to studies in Pakistan (Nisar et al., 2017) and China (Li et al., 2016), which found 78% of resistance in isolates from food.

In relation to the tetracyclines resistance, this study detected resistance to tetracycline and doxycycline in 60.7% of the *C. jejuni* isolates. In the EU, *C. jejuni* resistance against tetracyclines was considered generally high, present in 48.6% of the isolates from poultry meat (EFSA/ECDC, 2018). On the other hand, in Lahore, Pakistan, the doxycycline resistance was present in only 8.6% of *C. jejuni* isolates from poultry meat (Nisar et al., 2017).

The presence of erythromycin resistance in *C. jejuni* isolates raises concern because this drug are the first choice for campylobacteriosis treatment (Iovine, 2013; WHO, 2018). The macrolides (erythromycin, azithromycin and clarithromycin) resistance was present in 21.4% of the *C. jejuni* isolates. The results of macrolide resistance are variable worldwide; in the EU, erythromycin resistance varies from 28.6% in Portugal to 2.4% in Belgium and no erythromycin-resistance in *C. jejuni* isolated from poultry meat was found in Estonia and Croatia (EFSA/ECDC, 2018). In another hand, a study placed on the north of Tunisia, found 100% of *C. jejuni* erythromycin-resistant isolates from broilers, making a positive association between the irrational and uncontrolled use of antimicrobial drugs and the high levels of antimicrobial resistance in *C. jejuni* (Gharbi et al., 2018).

All the isolates of *C. jejuni* evaluated in this study presented susceptibility to gentamicin, which are in agreement with the reports of gentamicin resistance in EU, where the *C. jejuni* resistance to gentamicin remains at low levels (0.6% in *C. jejuni* from humans, 0.1% in *C. jejuni* isolated from broilers and 0.7% in poultry meat) (EFSA/ECDC, 2018). However, in some studies, higher levels of gentamicin resistant isolates were found; in China the gentamicin resistance was detected in 47.5% of the *C. jejuni* isolates from broilers at slaughter (Han et al., 2016) and in 93.3% of *C. jejuni* isolates from broilers (Li et al., 2016). Gentamicin is used for the treatment of systemic cases of campylobacteriosis (Luangtongkum et al., 2009) and the results obtained in this study demonstrate that this antimicrobial may be a therapeutic option for the treatment of the disease in the southern region of Rio Grande do Sul, Brazil, and further studies are needed to monitor antimicrobial resistance in this important foodborne pathogen.

In this study, the kanamycin resistance was also evaluated, which was detected in 39.3% of the *C. jejuni* isolates, being in agreement with Luangtongkum et al. (2007) that found 36.3% of kanamycin-resistance in *C. jejuni* isolates from broilers.

Antimicrobial resistance against amoxicillin with clavulanic acid was not found in this study, whereas resistance to ampicillin was observed in *C. jejuni* isolates (39.3%), which was also observed in Minas Gerais, Brazil, where Hungaro et al. (2015) reported a high level of ampicillin resistance (45%) in *C. jejuni* isolates from poultry carcasses.

In addition, 53.7% of the *C. jejuni* isolates evaluated showed MDR profile, being resistant to at least one drug per antimicrobial class tested. In EU, generally low levels

of MDR isolates were described (around 2% or less), but in Italy and Portugal 8.1% and 10.4% of isolates exhibited MDR (EFSA/ECDC, 2018). This study found MDR isolates that were resistant to the main drugs used in campylobacteriosis treatment (macrolides, fluoroquinolones, aminoglycosides, β -lactams and tetracyclines) which may difficult the therapeutic of the disease, representing a serious risk for the public health.

Regarding to the genetic basis of antimicrobial resistance, the *cmeABC* operon encodes the major efflux pump, composed of an outer membrane protein (encoded by the *cmeC* gene), an internal membrane transporter (encoded by the *cmeB* gene) and a periplasmic protein (encoded by the *cmeA* gene). This mechanism contributes to resistance to multiple classes of antimicrobials, such as fluoroquinolones, β -lactams, macrolides and tetracyclines (Lin, Michel, & Zhang, 2002). In this study the genes *cmeA*, *cmeB* and *cmeC* were detected in 82.6%, 91.3% and 100% of the resistant-isolates; these results are in accordance with the results of Hungaro et al. (2015), that found *cmeB* gene presence in all *C. jejuni* isolates from poultry carcasses, while *cmeA* and *cmeC* were not detected in two and one isolates, respectively. Hungaro et al. (2010) also reported that the absence of *cmeA* and *cmeC* genes did not influence the antimicrobial resistance.

The efflux pump CmeG may also be present in *Campylobacter*; which has been associated with resistance to ciprofloxacin, erythromycin, tetracycline and gentamicin (Jeon, Wang, Hao, Barton, & Zhang, 2011a). In this study, *cmeG* gene was found in 91.3% of the isolates that had a resistance profile in the disk diffusion testing.

The mechanism of action of quinolones and fluoroquinolones in *C. jejuni* is based on the inactivation of the DNA gyrase, stopping the DNA synthesis (Hooper, 1999; Payot et al., 2006). Point mutations on the QRDR of the *gyrA* gene confers high levels of resistance for this class of drugs (Luangtongkum et al., 2009; Payot et al., 2006). The most frequently reported mutation in *gyrA* gene is the Thr-86-Ile mutation and this point mutation can cause high levels of resistance against fluoroquinolones and quinolones in *C. jejuni* (Iovine, 2013; Yang et al., 2017). In this study, all the isolates with a resistance profile to quinolones showed the Thr-86-Ile mutation in *gyrA* gene. The same results were obtained in a study that evaluated the antimicrobial mechanism in poultry carcasses in Minas Gerais, Brazil (Hungaro et al., 2015). In addition, some studies had demonstrate that the efflux pump CmeABC and the mutation Thr-86-Ile acts synergistically, conferring high levels of fluoroquinolone

resistance in *C. jejuni* isolates (Ge & McDermott, 2005; Luo, Sahin, Lin, Michel, & Zhang, 2003)

The *ermB* gene encodes a RNA methylase enzyme and this gene is able to confer high levels of erythromycin resistance in *C. jejuni* (Qin et al., 2014). In this study, the presence of *ermB* was not found in the *C. jejuni* isolates that were macrolide resistant. Therefore, the macrolide resistance observed in this study could be related to the presence of the CmeABC and CmeG efflux pump.

Regarding to the resistance to β -lactams, the *bla_{OXA-61}* is the main β -lactamase described in *C. jejuni* (Zeng, Brown, Gillespie, & Lin, 2014) and this mechanism of resistance was present in 66.7% of the *C. jejuni* ampicillin-resistant isolates and may be the responsible to confer ampicillin resistance in *C. jejuni* isolates evaluated in this study. Obeng et al. (2012) reported the presence of the *bla_{OXA-61}* gene in 33.3% of the *C. jejuni* isolated from poultry meat. Hungaro et al. (2015) identified the presence of *bla_{OXA-61}* gene in all isolates of *C. jejuni* with phenotypic resistance to β -lactams. In this study, the isolates of *C. jejuni* that presented ampicillin resistance in the disc diffusion test but did carry the *bla_{OXA-61}* gene, were positive for the CmeABC efflux pump, which may be responsible for conferring resistance to ampicillin in these isolates.

The main molecular mechanism of tetracyclines resistance is the ribosomal protection protein Tet(O) (Iovine, 2013; Shen, Wang, Zhang, & Shen, 2018), which can be located in chromosomal DNA or in plasmids (Batchelor, Pearson, Friis, Guerry, & Wells, 2004; Crespo et al., 2016). Another gene that can confer tetracyclines resistance is the *tet(A)*, which encodes for an efflux pump (Chopra & Roberts, 2001), however, there are few reports about the presence of *tet(A)* gene in *C. jejuni* isolates (Abdi-hachesoo, Khoshbakht, & Sharifiyazdi, 2014). In this study, *tet(A)* gene was not found in the tetracycline-resistant isolates, whereas *tet(O)* was detected in 76.5% of the isolates tested. On the other hand, Hungaro et al. (2015) and Obeng et al. (2012) had not seen a correlation between the *tet(O)* presence and the tetracycline resistance, because *tet(O)* was only present in 40% and 5.6% of the tetracycline-resistant isolates from chicken carcasses and poultry meat, respectively.

The molecular mechanism of aminoglycosides resistance was evaluated by the presence of the *aphA-3* gene that encodes for an aminoglycoside phosphotransferase conferring resistance to kanamycin. This gene may be located on the chromosomal or plasmid DNA (Gibreel et al., 2004; Lambert, Gerbaud, Trieu-Cuot, & Courvalin, 1985).

The *aphA-3* gene was detected in all the isolates that had phenotypic kanamycin resistance in this study.

The horizontal gene transfer has been described in *C. jejuni*, and confers capacity to this important foodborne pathogen to transfer its virulence and resistance genes for other bacteria, representing potential risk, in view of the possibility of rapid spreading of antimicrobial resistance in the food chain (Gardner & Olson, 2012).

The plasmid profiling of *C. jejuni* and *C. coli* was studied by Aquino, Filgueiras, Ferreira, & Oliveira (2002) in isolates from animal and human origins, and the authors found plasmid presence in 22.2% of swine isolates. Another study with *C. jejuni* isolated from humans and animals (poultry and pig), the authors detected plasmid presence in 63,9% of the isolates (Kim et al., 2010).

The *tet(O)* and *aphA-3* resistance genes are commonly harbored in plasmids (Crespo et al., 2016; Friis, Pin, Taylor, Pearson, & Wells, 2007; Pratt & Korolik, 2005). In this study, 82.3% (n=14) of the tetracycline-resistant isolates presented *tet(O)* gene harbored in plasmids. This result is in agreement with a study conducted in Korea, evaluating *Campylobacter* spp. isolates from human, poultry and swine, where of 115 isolates plasmids identified, 109 (94.8%) harbored the *tet(O)* gene. Some of these plasmids showed conjugative capacity, which, according to the authors, could be the reason why tetracycline-resistant *Campylobacter* isolates are highly present in Korea (Kim et al., 2010).

Regarding to the presence of *aphA-3* gene in plasmids, in 81.8% (n=9) of the kanamycin-resistant isolates, this gene was located in the plasmidial DNA, which is in agreement with Gibreel et al. (2004), that also found the presence of *aphA-3* gene in *C. jejuni* plasmids. In another study, a novel plasmid harboring the *tet(O)* and the *aphA-3* gene was described in a *C. jejuni* isolate from turkeys, and according to the authors it may suggest that the acquisition of kanamycin-resistance determinants may be associate with *tet(O)*-harboring plasmids (Crespo et al., 2016).

In Brazil, there are few studies regarding the plasmid profile and the presence of resistance genes in plasmids in *C. jejuni*. According Batchelor et al. (2004) the presence of antimicrobial resistance genes in plasmids and the rapid spreading of this resistance may be related to the use of antimicrobial, mainly in poultry farms, causing a selection of the isolates harboring plasmids containing resistance genes.

5 Conclusion

The high rates of antimicrobial resistance found in *C. jejuni* isolates from the production chain of broilers in the southern region of Rio Grande do Sul, Brazil represent a risk to public health, since Brazil is the second largest producer of poultry meat in the world. The presence of MDR isolates, presenting antimicrobial resistance to the main drugs used in the treatment of campylobacteriosis also raises concerns and suggest the importance of more measures to control the use of antimicrobials in Brazilian broiler production. Furthermore, the presence of plasmids containing resistance genes may mean a rapid spreading of these genes along the chicken production chain and further studies are necessary to unravel this point.

Acknowledgments

The authors wish to thank to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico— CNPq (483807/2012-5; 162947/2014-3; 309101/2016-6), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) (17/25510000956-8).

References

- Abay, S., Kayman, T., Otlu, B., Hizlisoy, H., Aydin, F., & Ertas, N. (2014). International Journal of Food Microbiology Genetic diversity and antibiotic resistance profiles of *Campylobacter jejuni* isolates from poultry and humans in Turkey. *International Journal of Food Microbiology*, 178, 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.03.003>
- Abdi-hachesoo, B., Khoshbakht, R., & Sharifiyazdi, H. (2014). Tetracycline Resistance Genes in *Campylobacter jejuni* and *C. coli* Isolated From Poultry Carcasses. *Jundishapur Journal Microbiology*, 7(9), 7–11. <https://doi.org/10.5812/jjm.12129>
- ABPA, Associação Brasileira de Proteína Animal. (2018). *Relatório anual 2018*. ABPA, Associação Brasileira de Proteína Animal. São Paulo. Retrieved from <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais>
- Allos, B. M. (2001). *Campylobacter jejuni* Infections: Update on Emerging Issues and

- Trends. *Clinical Infectious Diseases*, 32(8), 1201–1206.
<https://doi.org/10.1086/319760>
- Aquino, M. H. C., Filgueiras, A. L. L., Ferreira, M. C. S., & Oliveira, S. S. (2002). Antimicrobial resistance and plasmid profiles of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from human and animal sources. *Letters in Applied Microbiology*, 34, 149–153.
- Batchelor, R. A., Pearson, B. M., Friis, L. M., Guerry, P., & Wells, J. M. (2004). Nucleotide sequences and comparison of two large conjugative plasmids from different *Campylobacter* species. *Microbiology*, 150(10), 3507–3517.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.27112-0>
- BAUER, A. W., KIRBY, W. M., SHERRIS, J. C., & TURCK, M. (1966). Antimicrobial susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4), 493–496.
- CA-SFM, Commite de l'antibiogramme de la S. F. de M., & EUCAST, E. C. on A. S. T. (2019). *Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie Recommandations 2019*. Paris.
- CDC, Center for Diseases Control and Prevention (2013). Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013, 114.
- CDC, Center for Diseases Control and Prevention (2017). *Campylobacter*. Retrieved from <https://www.cdc.gov/campylobacter/symptoms.html>
- CDC. Center for Diseases Control and Prevention (2019). National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS) Now: Human Data. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, CDC.
<https://www.cdc.gov/narmsnow>. Accessed 3/25/2019.
- Chopra, I., & Roberts, M. (2001). Tetracycline Antibiotics: Mode of Action , Applications , Molecular Biology , and Epidemiology of Bacterial Resistance Tetracycline Antibiotics: Mode of Action , Applications , Molecular Biology , and Epidemiology of Bacterial Resistance, 65(2).
<https://doi.org/10.1128/MMBR.65.2.232>
- Corcoran, D., Quinn, T., Cotter, L., O'Halloran, F., & Fanning, S. (2005). Characterization of a cmeABC operon in a quinolone-resistant *Campylobacter coli* isolate of Irish origin. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, 11(4), 303–308. <https://doi.org/10.1089/mdr.2005.11.303>
- Crespo, M. D., Altermann, E., Olson, J., Miller, W. G., Chandrashekhar, K., &

- Kathariou, S. (2016). Novel plasmid conferring kanamycin and tetracycline resistance in the turkey-derived *Campylobacter jejuni* strain 11601MD. *Plasmid*, 86, 32–37. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2016.06.001>
- EFSA/ECDC, E. F. S. A. C. for D. P. and C. (2013). The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2011. *EFSA Journal*, 11(5), 1–359. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3196>. Available
- EFSA/ECDC, E. F. S. A. C. for D. P. and C. (2018). European union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food 2012 published. *Eurosurveillance*, 19(12). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5182>
- EUCAST. (2015). European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. Version 8.0, 2018*. [Http://www.Eucast.Org](http://www.Eucast.Org), 0–77. Retrieved from http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_8.0_Breakpoint_Tables.pdf
- EUCAST, E. C. on A. S. T. (2019). *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters*. Retrieved from <http://www.eucast.org>
- Florez-cuadrado, D., Moreno, M. A., Ugarte-ruíz, M., & Domínguez, L. (2018). Antimicrobial Resistance in the Food Chain in the European Union. *Advances in Food and Nutrition Research*. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2018.04.004>
- Frech, G., & Schwarz, S. (2000). Molecular analysis of tetracycline resistance in *Salmonella enterica* subsp . *enterica* serovars Typhimurium , Enteritidis , Dublin , Choleraesuis , Hadar and Saintpaul : construction and application of specific gene probes. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 633–641.
- Friis, L. M., Pin, C., Taylor, D. E., Pearson, B. M., & Wells, J. M. (2007). A role for the tet(O) plasmid in maintaining *Campylobacter* plasticity. *Plasmid*, 57(1), 18–28. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2006.06.005>

- García-Sánchez, L., Melero, B., Diez, A. M., Jaime, I., & Rovira, J. (2018). Characterization of *Campylobacter* species in Spanish retail from different fresh chicken products and their antimicrobial resistance. *Food Microbiology*, 76, 457–465. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.07.004>
- Gardner, S. P., & Olson, J. W. (2012). *Barriers to Horizontal Gene Transfer in Campylobacter jejuni*. *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 79). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394318-7.00002-4>
- Ge, B., & McDermott, P. (2005). Role of efflux pumps and topoisomerase mutations in fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(8), 3347–3354. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.8.3347>
- Gharbi, M., Béjaoui, A., Hamda, C. Ben, Jouini, A., Ghedira, K., Zrelli, C., ... Maaroufi, A. (2018). Prevalence and Antibiotic Resistance Patterns of *Campylobacter* spp. Isolated from Broiler Chickens in the North of Tunisia. *BioMed Research International*, 2018.
- Gibreel, A., Sköl, O., & Taylor, D. E. (2004). Characterization of Plasmid-Mediated aphA-3 Kanamycin Resistance in *Campylobacter jejuni*. *Microbial Drug Resistance*, 10(2), 98–105.
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2012). *Molecular Cloning: A laboratory manual* (Fourth edi). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Han, X., Zhu, D., Lai, H., Zeng, H., Zhou, K., Zou, L., ... Liu, S. (2016). Prevalence, antimicrobial resistance profiling and genetic diversity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from broilers at slaughter in China. *Food Control*, 69, 160–170. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.04.051>
- Hooper, D. C. (1999). Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, 2(1), 38–55. <https://doi.org/10.1054/drup.1998.0068>
- Hungaro, H. M., Mendonça, R. C. S., Rosa, V. O., Badaró, A. C. L., Moreira, M. A. S., & Chaves, J. B. P. (2015). Low contamination of *Campylobacter* spp. on chicken carcasses in Minas Gerais state, Brazil: Molecular characterization and antimicrobial resistance. *Food Control*, 51, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.11.001>
- Iovine, N. M. (2013). Resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni*. *Virulence*, 4(3), 230–240. <https://doi.org/10.4161/Viru.23753>

- Jensen, L. B., Frimodt-møller, N., & Aarestrup, F. M. (1999). Presence of erm gene classes in Gram-positive bacteria of animal and human origin in Denmark. *FEMS Microbiology Letters*, 170.
- Jeon, B., Wang, Y., Hao, H., Barton, Y.-W., & Zhang, Q. (2011a). Contribution of CmeG to antibiotic and oxidative stress resistance in *Campylobacter jejuni*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(1), 79–85. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq418>
- Jeon, B., Wang, Y., Hao, H., Barton, Y. W., & Zhang, Q. (2011b). Contribution of CmeG to antibiotic and oxidative stress resistance in *Campylobacter jejuni*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(1), 79–85. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq418>
- Ju, C. Y., Zhang, M. J., Ma, Y. P., Lu, J. R., Yu, M. H., Chen, H., ... Duan, Y. X. (2018). Genetic and Antibiotic Resistance Characteristics of *Campylobacter jejuni* Isolated from Diarrheal Patients, Poultry and Cattle in Shenzhen. *Biomedical Environmental Science*, 31(8), 579–585. <https://doi.org/10.3967/bes2018.079>
- Khan, J. A., Rathore, R. S., Abulreesh, H. H., Qais, F. A., & Ahmad, I. (2018). Prevalence and Antibiotic Resistance Profiles of *Campylobacter jejuni* Isolated from Poultry Meat and Related Samples at Retail Shops in Northern India. *Foodborne Pathogens and Disease*, 15(4), 1–8. <https://doi.org/10.1089/fpd.2017.2344>
- Kim, J. M., Hong, J., Bae, W., Koo, H. Y. E. C., Kim, S. O. H., & Park, Y. H. O. (2010). Prevalence , Antibiograms , and Transferable tet (O) Plasmid of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Isolated from Raw Chicken , Pork , and Human Clinical Cases in Korea. *Journal of Food Protection*, 73(8), 1430–1437.
- Lambert, T., Gerbaud, G., Trieu-Cuot, P., & Courvalin, P. (1985). Structural relationship between the genes encoding 3'-aminoglycoside phosphotransferases in *Campylobacter* and in Gram-positive cocci. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.*, 136, 135–150. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0769-2609\(85\)80040-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0769-2609(85)80040-5)
- Li, B., Ma, L., Li, Y., Jia, H., Wei, J., Shao, D., Ma, Z. (2016). Antimicrobial Resistance of *Campylobacter* Species Isolated from Broilers in Live Bird Markets in Shanghai, China. *Foodborne Pathogens and Disease*, XX(Xx), 1–7. <https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2186>
- Lin, J., Michel, L. O., & Zhang, Q. (2002). CmeABC Functions as a Multidrug Efflux System in *Campylobacter jejuni*, 46(7), 2124–2131. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.7.2124>
- Luangtongkum, T., Jeon, B., Han, J., Plummer, P., Logue, C. M., & Zhang, Q. (2009).

- Antibiotic resistance in *Campylobacter*: emergence, transmission and persistence. *Future Microbiology*, 4(2), 189–200.
- Luangtongkum, T., Morishita, T. Y., El-tayeb, A. B., Ison, A. J., & Zhang, Q. (2007). Comparison of Antimicrobial Susceptibility Testing of *Campylobacter* spp. by the Agar Dilution and the Agar Disk Diffusion Methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(2), 590–594. <https://doi.org/10.1128/JCM.00986-06>
- Luo, N., Sahin, O., Lin, J., Michel, L. O., & Zhang, Q. (2003). In Vivo Selection of *Campylobacter* Isolates with High Levels of Fluoroquinolone Resistance Associated with *gyrA* Mutations and the Function of the CmeABC Efflux Pump. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(1), 390–394. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.1.390>
- Maćkiw, E., Korsak, D., Rzewuska, K., Tomczuk, K., & Rozynek, E. (2012). Antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from food in Poland. *Food Control*, 23(2), 297–301. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.08.022>
- Moura, H. M. de, Silva, P. R., Silva, P. H. C. da, Souza, N. R., Racanicci, A. M. C., & Santana, Â. P. (2013). Antimicrobial Resistance of *Campylobacter jejuni* Isolated from Chicken Carcasses in the Federal District, Brazil. *Journal of Food Protection*, 76(4), 691–693.
- Narvaez-Bravo, C., Taboada, E. N., Mutschall, S. K., & Aslam, M. (2017). Epidemiology of antimicrobial resistant *Campylobacter* spp. isolated from retail meats in Canada. *International Journal of Food Microbiology*, 253(July 2016), 43–47. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.04.019>
- Nisar, M., Ahmad, M. ud D., Mushtaq, M. H., Shehzad, W., Hussain, A., Muhammad, J., Goyal, S. M. (2017). Prevalence and antimicrobial resistance patterns of *Campylobacter* spp. isolated from retail meat in Lahore, Pakistan. *Food Control*, 80, 327–332. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.03.048>
- Obeng, A. S., Rickard, H., Sexton, M., Pang, Y., Peng, H., & Barton, M. (2012). Antimicrobial susceptibilities and resistance genes in *Campylobacter* strains isolated from poultry and pigs in Australia. *Journal of Applied Microbiology*, 113. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05354.x>
- Olah, P. A., Doetkott, C., Fakhr, M. K., & Logue, C. M. (2006). Prevalence of the *Campylobacter* multi-drug efflux pump (CmeABC) in *Campylobacter* spp. Isolated from freshly processed Turkeys. *Food Microbiology*, 23(5), 453–460.

- <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.06.004>
- Panzenhagen, P. H. N., Aguiar, W. S., Frasso, B. da S., Pereira, V. L. de A., Abreu, D. L. da C., Rodrigues, D. dos P., Aquino, M. H. C. de. (2015). Prevalence and fluoroquinolones resistance of *Campylobacter* and *Salmonella* isolates from poultry carcasses in Rio de Janeiro, Brazil. *Food Control*. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.10.002>
- Payot, S., Bolla, J. M., Corcoran, D., Fanning, S., Mégraud, F., & Zhang, Q. (2006). Mechanisms of fluoroquinolone and macrolide resistance in *Campylobacter* spp. *Microbes and Infection*, 8(7), 1967–1971. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.12.032>
- Pratt, A., & Korolik, V. (2005). Tetracycline resistance of Australian *Campylobacter jejuni*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55(March), 452–460. <https://doi.org/10.1093/jac/dki040>
- Qin, S., Wang, Y., Zhang, Q., Zhang, M., Deng, F., Shen, Z., Shen, J. (2014). Report of ribosomal RNA methylase gene *erm(B)* in multidrug-resistant *Campylobacter coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(4), 964–968. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt492>
- Ramires, T. (2017). *Campylobacter* termofílicos em frangos de corte e em aviários na região sul do Rio Grande do Sul: ocorrência, diversidade genética, perfil de resistência a antimicrobianos e detecção de genes de virulência. Universidade Federal de Pelotas. Dissertação de mestrado.
- Sambrook, J., & Russel, D. (2012). Molecular Clonning. In M. R. Green & J. Sambrook (Eds.), *Molecular cloning: A laboratory Manual* (Fourth, p. 2028). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shen, Z., Wang, Y., Zhang, Q., & Shen, J. (2018). Antimicrobial Resistance in *Campylobacter* spp. *Microbiology Spectrum*, 6(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0013-2017>
- Sierra-Arguello, Y. M., Furian, T. Q., Perdoncini, G., Moraes, H. L. S., Salle, C. T. P., Rodrigues, L. B., ... Nascimento, V. P. (2018). Fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from poultry and human samples assessed by PCR-restriction fragment length polymorphism assay. *PLoS ONE*, 13(7), 1–9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199974> Editor:
- Skirrow, M. B., & Blaser, M. J. (2000). Clinical aspects of *Campylobacter* infection. In *Campylobacter jejuni: current strategy and future* (pp. 69–88). Washington, DC:

ASM Press.

- Thakur, S., Brake, J., Keelara, S., Zou, M., & Susick, E. (2013). Farm and environmental distribution of *Campylobacter* and *Salmonella* in broiler flocks. *Research in Veterinary Science*, 94(1), 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.07.014>
- WHO, W. H. O. (2017). *ANTIBACTERIAL AGENTS IN CLINICAL DEVELOPMENT An analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis*. Geneva, Switzerland.
- WHO, W. H. O. (2018). *Campylobacter*. Retrieved from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/campylobacter>
- Wieczorek, K., Denis, E., & Osek, J. (2015). Comparative analysis of antimicrobial resistance and genetic diversity of *Campylobacter* from broilers slaughtered in Poland. *International Journal of Food Microbiology*, 210, 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.006>
- Wieczorek, K., & Osek, J. (2013). Antimicrobial Resistance Mechanisms among *Campylobacter*. *BioMed Research International*, 2013, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2013/340605>
- Würfel, S. F. R., da Silva, W. P., de Oliveira, M. G., Kleinubing, N. R., Lopes, G. V, Gandra, E. A., & Dellagostin, O. A. (2018). Genetic diversity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from poultry meat products sold on the retail market in Southern Brazil. *Poultry Science*. <https://doi.org/10.3382/ps/pey365>
- Yang, W., Zhang, M., Zhou, J., Pang, L., Wang, G., & Hou, F. (2017). The Molecular Mechanisms of Ciprofloxacin Resistance in Clinical *Campylobacter jejuni* and Their Genotyping Characteristics in Beijing, China. *Foodborne Pathogens and Disease*, 14(7), 386–392. <https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2223>
- Zeng, X., Brown, S., Gillespie, B., & Lin, J. (2014). A single nucleotide in the promoter region modulates the expression of the β -lactamase OXA-61 in *Campylobacter jejuni*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(January), 1215–1223. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt515>
- Zirnstein, G., Li, Y., Swaminathan, B., & Angulo, F. (1999). Ciprofloxacin resistance in *Campylobacter jejuni* isolates: Detection of *gyrA* resistance mutations by mismatch amplification mutation assay PCR and DNA sequence analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(10), 3276–3280.

Supplementary material

Table S1. Characteristics of the isolates and results of this study

Bacterial isolate	Source	PFGE pattern	Resistance phenotype		Resistance genotype	Plasmid presence	Resistance genes in plasmids	
			DD	MIC (µl/mL)			tet(O)	apha-3
1	Chicken breast	1	Susceptible	-	-	+	NA	NA
2	Chicken carcass	2	Susceptible	-	-	+	NA	NA
3	Chicken carcass	3	DOX, TET, AZI, CLA, ERI, NAL, CIP, ENR, KAN	TET – 128, ERI >128, CIP – 16, KAN >128	<i>cmeA, cmeB, cmeC, tet(O), apha-3, cmeG</i>	+	+	+
4	Chicken liver	4	DOX, TET, AZI, CLA, ERI, NAL, CIP, ENR, AMP, KAN	TET – 64, ERI >128, CIP – 16, AMP – 128, KAN >128;	<i>cmeA, cmeB, cmeC, tet(O), apha-3, bla_{-OXA61}</i>	+	+	+
5	Chicken thigh	5	Susceptible	-	-	-	NA	NA
6	Chicken carcass	6	DOX, TET, NAL, CIP, ENR, KAN	TET – 64, CIP – 8, KAN >128	<i>cmeA, cmeB, cmeC, tet(O), apha-3, cmeG</i>	+	+	+
7	Chicken drumsticks	7	DOX, TET, AZI, CLA, ERI, NAL, CIP, ENR, AMP, +KAN	TET – 128, ERI – 2, CIP – 32, AMP – 128, KAN >128	<i>cmeA, cmeB, cmeC, apha-3, bla_{-OXA61}, cmeG</i>	+	+	+
8	Chicken breast	8	DOX, TET, NAL, ENR, AMP	TET – 16, AMP - 128	<i>cmeA, cmeB, cmeC, tet(O), bla_{-OXA61}, cmeG</i>	+	+	NA
9	Chicken liver	9	DOX, TET, AZI, CLA, ERI, NAL, CIP, ENR, KAN	TET – 64, ERI >128, CIP – 16, KAN - 8	<i>cmeB, cmeC, tet(O), apha-3, cmeG</i>	+	+	+
10	Chicken breast	10	DOX, TET, AZI, CLA, ERI, NAL, CIP, ENR, AMP, KAN	TET – 128, ERI – 128, CIP – 32, AMP >128, KAN >128	<i>cmeA, cmeB, cmeC, apha-3, bla_{-OXA61}, cmeG</i>	+	+	+

11	Chicken drumsticks	11	DOX, TET, AZI, CLA, ERI, NAL, CIP, ENR, AMP, KAN	TET – 128, ERI >128, CIP – 32, AMP > 128, KAN - 128	<i>cmeA, cmeB, cmeC, apha-3, bla^{-OXA61}, cmeG</i>	+	-	+
12	Chicken drumsticks	12	Susceptible	-	-	-	NA	NA
13	Chicken thigh	13	DOX, TET, NAL, CIP, ENR, AMP	TET >128, CIP – 16, AMP >128	<i>cmeA, cmeB, cmeC, cmeG</i>	+	+	NA
14	Chicken thigh	14	DOX, TET, NAL, CIP, ENR, AMP	TET >128, CIP – 16, AMP >128	<i>cmeA, cmeB, cmeC, tet(O), cmeG</i>	+	+	NA
15	Chicken drummete	15	DOX, TET, NAL, CIP, ENR, KAN	TET >128, CIP – 32, KAN >128	<i>cmeB, cmeC, tet(O), apha-3, cmeG</i>	+	+	+
16	Chicken thigh	16	DOX, TET, NAL, CIP, ENR, KAN	TET – 64, CIP – 8, KAN - 8	<i>cmeA, cmeB, cmeC, tet(O), apha-3, cmeG</i>	+	-	-
17	Chicken carcass	17	DOX, TET, NAL, CIP, ENR, KAN	TET – 64, CIP – 16, KAN - 8	<i>cmeA, cmeB, cmeC, tet(O), apha-3, cmeG</i>	+	+	+
18	Chicken breast	18	NAL, CIP, ENR	CIP - 16	<i>cmeA, cmeB, cmeC, cmeG</i>	-	NA	NA
19	Chicken drummete	19	DOX, TET, NAL, ENR, AMP	TET – 32, AMP >128	<i>cmeA, cmeB, cmeC, tet(O), cmeG</i>	+	+	NA
20	Chicken drumsticks	20	DOX, TET, NAL, ENR, AMP, KAN	TET – 16, AMP – 128, KAN - 8	<i>cmeA, cmeB, cmeC, tet(O), apha-3, bla^{-OXA61}, cmeG</i>	+	+	-
21	Slaughterhouse (Poultry after bleedin)	21	NAL, ENRO	-	<i>cmeA, cmeC</i>	+	NA	NA
22	Slaughterhouse (After chiller water)	22	Susceptible	-	-	+	NA	NA
23	Slaughterhouse (Poultry after evisceration)	23	NAL, ENRO	-	<i>cmeA, cmeB, cmeC, cmeG</i>	+	NA	NA
24	Slaughterhouse (Poultry cecum)	24	DOX, TET, NAL, CIP, ENR	TET - <0,5; CIP - 8	<i>cmeA, cmeB, cmeC, tet(O), cmeG</i>	-		NA

25	Slaughterhouse (Poultry after chiller)	25	NAL	-	<i>cmeA, cmeB, cmeC, cmeG</i>	+	NA	NA
26	Slaughterhouse (Poultry Liver)	26	NAL, ENR	-	<i>cmeB, cmeC, cmeG</i>	+	NA	NA
27	Slaughterhouse (Poultry after scald)	27	NAL	-	<i>cmeA, cmeB, cmeC, cmeG</i>	+	NA	NA
28	Poultry farm (Cloaca swab)	28	DOX, TET, NAL, CIP, ENR	TET – 64; CIP - 16	<i>cmeC, tet(O), cmeG</i>	+	+	NA

DD – disk diffusion testing; MIC – minimum inhibitory concentration

AMP – ampicillin; AZI – azithromycin; CIP – ciprofloxacin; CLA – clarithromycin; DOX – doxycycline; ENR – enrofloxacin; TET – tetracyclines; NAL – nalidixic acid; S- susceptible

NA - Not applicable because the isolate is not resistant to the antimicrobial of interest; + presence of the gene on plasmid DNA; - absence of the gene on plasmid DNA

Table S2. Interpretative criteria for *Campylobacter jejuni* susceptibility testing used in this study

Antimicrobial class	Antimicrobial	Disk diffusion method			Broth microdilution method			Reference
		Disk Content	Zone diameter (mm)		MIC (µg.mL ⁻¹)			
			S	R	S ^a	I ^b	R ^c	
Quinolones	Nalidixic acid	30 µg	≥32	<32	-	-	-	CLSI (2010)
	Enrofloxacin	5 µg	≥26	<26	-	-	-	
	Ciprofloxacin	5 µg	≥26	<26	≤0,5	-	>0,5	EUCAST (2018)
Macrolides	Azithromycin	15 µg	≥20	<20	-	-	-	EUCAST (2018)
	Clarithromycin	15 µg	≥20	<20	-	-	-	
	Erythromycin	15 µg	≥20	<20	≤4	-	4	
Aminoglycoside	Kanamycin	30 µg	≥18	≤13	≤16	32	>64	Luangtongkum et al. (2007)
	Gentamicin	10 µg	17	<17	-	-	-	CAS-FM (2018)
	Doxycycline	30 µg	≥30	<30	-	-	-	EUCAST (2018)
Tetracyclines	Tetracycline	30 µg	≥30	<30	≤2	-	>2	
β-lactams	Ampicilin	10 µg	≥19	<14	≤4	8	>16	CAS-FM (2018)
	Amoxicillin + clavulanic acid	30 µg	≥19	<14	-	-	-	

^a- susceptible^b- intermediate resistance^c - resistance

Table S3. Oligonucleotides and references used in identification of antimicrobial resistance genes in *C. jejuni* isolates

Encoding gene	Primer	Sequence (5'→3')	PCR Product (bp)	Reference
<i>apha-3</i>	F	GGGACCACCTATGATGTGGAACG	600	Gibreel et al. (2004)
	R	CAGGCTTGATCCCCAGTAAGTC		
<i>bla_{OXA61}</i>	F	AGAGTATAATACAAGCG	372	Obeng et al.(2012)
	R	TAGTGAGTTGTCAAGCC		
<i>cmeA</i>	F	TAGCGGCGTAATAGTAAATAAAC	435	Olah et al. (2006)
	R	ATAAAGAAATCTGCGTAAATAGGA		
<i>cmeB</i>	F	GACGTAATGAAGGAGAGCCA	1070	Corcoran, et al. (2005)
	R	CTGATCCACTCCAAGCTATG		
<i>cmeC</i>	F	CAAGTTGGCGCTGTAGGTGAA	431	Olah et al. (2006)
	R	CCCCAATGAAAAATAGGCAGAGTA		
<i>cmeG</i>	F	CATCTACACAAATGCCACTATCATCACTTAA		Jeon et al. (2011)
	R	GCCACAAGCCAAATTAGAGCTAAAATTACTAA		
<i>ermB</i>	F	CATTTAACGACGAAACTGGC	424	Jensen et al. (1999)
	R	GGAACATCTGTGGTATGGCG		
<i>gyrA*</i>	F	ATTTTATAGCAAAGATTCTGAT	673	Zirnstien et al. (1999)
	R	CCATAAATTATTCCACCTGT		
<i>tet(A)</i>	F	GTAATTCTGAGCACTGT	953	Frech & Schwarz (2000)
	R	CCTGGACAACATTGCTT		
<i>tet(O)</i>	F	GGCGTTTTGTTTATGTGCG	559	Thakur et al. (2013)
	R	ATGGACAACCCGACAGAAGC		

F= Forward; R= Reverse

* Point mutations results in antimicrobial resistance

3 Considerações Finais

Os isolados de *C. jejuni* avaliados neste estudo apresentaram altos índices de resistência a antimicrobianos, destacando-se a resistência às quinolonas, fluorquinolonas e tetraciclinas. A identificação de isolados multirresistentes apresentando, definidos como sendo aqueles que apresentam resistência a mais de três classes de antimicrobianos, dentre elas aos macrolídeos, é de grande relevância e gera preocupações, visto que essa classe de antimicrobianos é utilizada como primeira opção terapêutica no tratamento da campilobacteriose. É importante destacar que a campilobacteriose é a doença de origem alimentar de maior ocorrência em todo o mundo, sendo a carne de frango a maior fonte de contaminação, desta forma, a presença de isolados resistentes e multirresistentes na cadeia produtiva de frangos de corte, representa um risco à saúde pública.

De uma maneira geral, foram identificados alguns dos possíveis determinantes genéticos de resistência a antimicrobianos em *C. jejuni* isolados da cadeia produtiva de frangos da região sul do Rio Grande do Sul, porém, são necessários mais estudos para compreender o real envolvimento dos genes presentes sobre a resistência apresentada pelos isolados, bem como a avaliação dos níveis de expressão desses genes.

Além disso, foram detectados plasmídeos contendo genes de resistência às tetraciclinas e aos aminoglicosídeos nos isolados avaliados, sendo necessários mais estudos para verificar a capacidade de transferência horizontal desses elementos genéticos móveis para outras bactérias e assim disseminando rapidamente a resistência a essas classes de antimicrobianos.

Referências Bibliográficas

AARESTRUP, F. M.; ENGBERG, J. Antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter*. **Veterinary Research**, v. 32, p. 311–321, 2001.

ABAY, S.; KAYMAN, T.; OTLU, B.; HIZLISOY, H.; AYDIN, F.; ERTAS, N. International Journal of Food Microbiology Genetic diversity and antibiotic resistance profiles of *Campylobacter jejuni* isolates from poultry and humans in Turkey. **International Journal of Food Microbiology**, v. 178, p. 29–38, 2014.

ABDI-HACHESOO, B.; KHOSHBAKHT, R.; SHARIFIYAZDI, H. Tetracycline Resistance Genes in *Campylobacter jejuni* and *C. coli* Isolated From Poultry Carcasses. **Jundishapur Journal Microbiology**, v. 7, n. 9, p. 7–11, 2014.

ABPA, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatório anual 2018**. 2018. Disponível em < <http://abpabr.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais> >. Acesso em: 10 jan. 2019.

ALFREDSON, D. A.; KOROLIK, V. Antibiotic resistance and resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 277, p. 123–132, 2007.

ALLOS, B. M. *Campylobacter jejuni* Infections: Update on Emerging Issues and Trends. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 8, p. 1201–1206, 2001.

ALVES, L.; VOSS-RECH, D.; SILVA, V. S.; POZZA, J. dos S.; GASPARETTO, A.; VAZ, C. S. L. Study of thermophilic *Campylobacter* contamination of a broiler batch at slaughter. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 40, n. 3, p. 1–8, 2012.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. /. **Resistência Microbiana - Mecanismos e Impacto Clínico**. 2007a Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_

web/modulo1/bibliografia.html>. Acesso em: 10 jan. 2019.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. /. **Antimicrobianos - Bases Teóricas e Uso Clínico**. 2007b. Disponível em<
http://www.anvisa.gov.br/servicosauade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/mecanismos.html> Acesso em: 10 jan. 2019.

AQUINO, M. H. C.; FILGUEIRAS, A. L. L.; FERREIRA, M. C. S.; OLIVEIRA, S. S. Antimicrobial resistance and plasmid profiles of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from human and animal sources. **Letters in Applied Microbiology**, v. 34, p. 149–153, 2002.

AWAD, W. A.; DUBLECZ, F.; HESS, C.; DUBLECZ, K.; KHAYAL, B.; ASCHENBACH, J. R.; HESS, M. *Campylobacter jejuni* colonization promotes the translocation of *Escherichia coli* to extra-intestinal organs and disturbs the short-chain fatty acids profiles in the chicken gut. **Poultry Science**, v. 95, n. 10, p. 2259–2265, 2016.

AWAD, W. A.; HESS, C.; HESS, M. Re-thinking the chicken-*Campylobacter jejuni* interaction : a review. **Avian Pathology**, v. 9457, n. May, 2018.
 AWAD, W. A.; MOLNÁR, A.; ASCHENBACH, J. R.; GHAREEB, K.; KHAYAL, B.; HESS, C.; LIEBHART, D.; DUBLECZ, K.; HESS, M. *Campylobacter* infection in chickens modulates the intestinal epithelial barrier function. **Innate Immunity**, v. 21, n. 2, p. 151–160, 2015.

BATCHELOR, R. A.; PEARSON, B. M.; FRIIS, L. M.; GUERRY, P.; WELLS, J. M. Nucleotide sequences and comparison of two large conjugative plasmids from different *Campylobacter* species. **Microbiology**, v. 150, n. 10, p. 3507–3517, 2004.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antimicrobial susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493–496, 1966.

BERGEY, D. H.; HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9th. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.

BLASER, M. J.; ENGBERG, J. Clinical aspects of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* infections. In: NACHAMKIN I.; SZYMANSKI, C. M.; BLASER, M. J. editors. *Campylobacter*. 2nd ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology Press, p. 99-121, 2008 BOLTON, D. J. *Campylobacter* virulence and survival factors. **Food Microbiology**, v. 48, p. 99–108, 2015.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **AGROPREVINE: Agindo agora para preservar a eficácia dos antibióticos no futuro.** 2018.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil.** 2018. Disponível em:
<<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2019.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doenças transmitidas por alimentos: causas, sintomas, tratamento e prevenção.** 2019. Disponível em:
<<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/doencas-transmitidas-por-alimentos>>. Acesso em: 13 jan. 2019.

CA-SFM, C. de l'antibiogramme de la S. F. de M.; EUCAST, E. C. on A. S. T. **Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie Recommandations 2018.** 2018.

CALDWELL, D. B.; WANG, Y.; LIN, J.; AL, C. E. T. Development , Stability , and Molecular Mechanisms of Macrolide Resistance in *Campylobacter jejuni*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 11, p. 3947–3954, 2008.

CDC. National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria (NARMS): Human Isolates Surveillance Report for 2014 (Final Report). p. 1–83, 2016.

CDC, Center for Disease Control and Prevention. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013. p. 114, 2013.

CDC, Center for Disease Control and Prevention. **Campylobacter.** Disponível em<<https://www.cdc.gov/campylobacter/symptoms.html>>. Acesso em: 08 jan. 2019.

CHEN, Y.; MUKHERJEE, S.; HOFFMANN, M.; KOTEWICZ, M. L.; YOUNG, S.; ABBOTT, J.; LUO, Y.; DAVIDSON, M. K.; ALLARD, M.; MCDERMOTT, P.; ZHAO, S. Whole-genome sequencing of gentamicin-resistant *Campylobacter coli* isolated from U.S. retail meats reveals novel plasmid-mediated aminoglycoside resistance genes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 11, p. 5398–5405, 2013.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline Antibiotics : Mode of Action , Applications , Molecular Biology , and Epidemiology of Bacterial Resistance Tetracycline Antibiotics : Mode of Action , Applications , Molecular Biology , and Epidemiology of

Bacterial Resistance. v. 65, n. 2, 2001.

CONNELL, S. R.; TRAEZ, D. M.; NIERHAUS, K. H.; TAYLOR, D. E. Ribosomal Protection Proteins and Their Mechanism of Tetracycline Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 12, p. 3675–3681, 2003a.

CONNELL, S. R.; TRIEBER, C. A.; DINOS, G. P.; EINFELDT, E.; TAYLOR, D. E.; NIERHAUS, K. H. Mechanism of Tet(O)-mediated tetracycline resistance. **The EMBO Journal**, v. 22, n. 4, p. 945–953, 2003b.

CORCORAN, D.; QUINN, T.; COTTER, L.; FANNING, S. An investigation of the molecular mechanisms contributing to high-level erythromycin resistance in *Campylobacter*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, n. 1, p. 40–45, 2006.

CORCORAN, D.; QUINN, T.; COTTER, L.; O'HALLORAN, F.; FANNING, S. Characterization of a *cmeABC* operon in a quinolone-resistant *Campylobacter coli* isolate of Irish origin. **Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)**, v. 11, n. 4, p. 303–308, 2005.

CRESPO, M. D.; ALTERMANN, E.; OLSON, J.; MILLER, W. G.; CHANDRASHEKHAR, K.; KATHARIOU, S. Novel plasmid conferring kanamycin and tetracycline resistance in the turkey-derived *Campylobacter jejuni* strain 11601MD. **Plasmid**, v. 86, p. 32–37, 2016.

DRLICA, K.; MALIK, M.; KERNS, R. J.; ZHAO, X. Quinolone-mediated bacterial death. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 385–392, 2008.

EFSA. EFSA Panel on biological hazards (BIOHAZ) Scientific opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. **EFSA Journal**, v.9, 2011.

EFSA/ECDC, E. F. S. A. C. for D. P. and C. The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2011. **EFSA Journal**, v. 11, n. 5, p. 1–359, 2013.

EFSA/ECDC, E. F. S. A. C. for D. P. and C. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014. **EFSA Journal**, v. 14, n. 2, 2016.

EFSA/ECDC, E. F. S. A. C. for D. P. and C. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2015. **EFSA Journal**, v. 15, n. 2, 2017.

EFSA/ECDC, E. F. S. A. C. for D. P. and C. European union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food 2012 published. **Eurosurveillance**, v. 19, n. 12, 2018.

EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. **The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.0, 2018.** <http://www.eucast.org>, p. 0–77, 2018.

FALSAFI, T.; EBRAHIMI, M.; ASGARANI, E.; MIRTORABI, V. The pattern , association with multidrug-resistance and transferability of plasmid-mediated tetracycline resistance in *Escherichia coli* isolates from the poultry in Iran. **Annals of Microbiology**, v. 59, n. 2, p. 199–205, 2009.

FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium , with special reference to their use in the isolation of b . *Influenza* a 1e. n. 1923, 1929.

FLOREZ-CUADRADO, D.; MORENO, M. A.; UGARTE-RUIZ, M.; DOMÍNGUEZ, L. Antimicrobial Resistance in the Food Chain in the European Union. **Advances in Food and Nutrition Research**, 2018.

FRANCHIN, P. R.; AIDOO, K. E.; BATISTA, C. R. V. Sources of poultry meat contamination with thermophilic *Campylobacter* before slaughter. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 157–162, 2005.

FRECH, G.; SCHWARZ, S. Molecular analysis of tetracycline resistance in *Salmonella enterica* subsp . *enterica* serovars Typhimurium , Enteritidis , Dublin , Choleraesuis , Hadar and Saintpaul : construction and application of specific gene probes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, p. 633–641, 2000.

FRIIS, L. M.; PIN, C.; TAYLOR, D. E.; PEARSON, B. M.; WELLS, J. M. A role for the tet(O) plasmid in maintaining *Campylobacter* plasticity. **Plasmid**, v. 57, n. 1, p. 18–28, 2007.

FURUYA, E. Y.; LOWY, F. D. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. **Nature**, v. 4, n. January, 2006.

GARCÍA-SÁNCHEZ, L.; MELERO, B.; DIEZ, A. M.; JAIME, I.; ROVIRA, J. Characterization of *Campylobacter* species in Spanish retail from different fresh chicken products and their antimicrobial resistance. **Food Microbiology**, v. 76, p. 457–465, 2018.

GARDNER, S. P.; OLSON, J. W. **Barriers to Horizontal Gene Transfer in *Campylobacter jejuni***. Elsevier Inc., 2012. v. 79. 2012.

GE, B.; MCDERMOTT, P. Role of efflux pumps and topoisomerase mutations in fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 8, p. 3347–3354, 2005.

GE, B.; WANG, F.; SJÖLUND-KARLSSON, M.; MCDERMOTT, P. F. Antimicrobial resistance in *Campylobacter*: Susceptibility testing methods and resistance trends. **Journal of Microbiological Methods**, v. 95, n. 1, p. 57–67, 2013.

GHARBI, M.; BÉJAOU, A.; HAMDA, C. Ben; JOUINI, A.; GHEDIRA, K.; ZRELLI, C.; HAMROUNI, S.; AOUADHI, C.; BESSOUSSA, G.; GHARAM, A.; MAAROUFI, A. Prevalence and Antibiotic Resistance Patterns of *Campylobacter* spp . Isolated from Broiler Chickens in the North of Tunisia. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.

GHARIB NASERI, K.; RAHIMI, S.; KHAKI, P. Comparison of the effects of probiotic, organic acid and medicinal plant on *Campylobacter jejuni* challenged broiler chickens. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 14, n. SUPPL., p. 1485–1496, 2012.

GIBBONS, C. L.; MANGEN, M. J. J.; PLASS, D.; HAVELAAR, A. H.; BROOKE, R. J.; KRAMARZ, P.; PETERSON, K. L.; STUURMAN, A. L.; CASSINI, A.; FÈVRE, E. M.; KRETZSCHMAR, M. E. Measuring underreporting and under-ascertainment in infectious disease datasets: A comparison of methods. **BMC Public Health**, v. 14, n. 1, p. 1–17, 2014.

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

GIBREEL, A.; TRACZ, D. M.; NONAKA, L.; TRINH, N. M.; CONNELL, S. R.;

TAYLOR, D. E. Incidence of Antibiotic Resistance in *Campylobacter jejuni* Isolated in Alberta, Canada, from 1999 to 2002, with Special Reference to tet(O)-Mediated Tetracycline Resistance Amera. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 9, p. 3442–3450, 2004.

GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. Fourth edi ed. [s.l.] Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.

HADDEN, R. D. M.; GREGSON, N. A. Guillain-Barre syndrome and *Campylobacter jejuni* infection. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 145-154, 2001.

HALD, B.; SKOV, M. N.; NIELSEN, E. M.; RAHBK, C.; MADSEN, J. J.; WAINØ, M.; CHRIÉL, M.; NORDENTOFT, S.; BAGGESEN, D. L.; MADSEN, M. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in wild birds on Danish livestock farms. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 58, n. 1, p. 1–10, 2016.

HAN, X.; ZHU, D.; LAI, H.; ZENG, H.; ZHOU, K.; ZOU, L.; WU, C.; HAN, G.; LIU, S. Prevalence, antimicrobial resistance profiling and genetic diversity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from broilers at slaughter in China. **Food Control**, v. 69, p. 160–170, 2016.

HANSEN, V. M.; ROSENQUIST, H.; BAGGESEN, D. L.; BROWN, S.; CHRISTENSEN, B. B. Characterization of *Campylobacter* phages including analysis of host range by selected *Campylobacter* Penner serotypes. **BMC Microbiology**, v. 7, n. 90, p. 1–9, 2007.

HOOPER, D. C. Mechanisms of fluoroquinolone resistance. **Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy**, v. 2, n. 1, p. 38–55, 1999.

HUNGARO, H. M.; MENDONÇA, R. C. S.; ROSA, V. O.; BADARÓ, A. C. L.; MOREIRA, M. A. S.; CHAVES, J. B. P. Low contamination of *Campylobacter* spp. on chicken carcasses in Minas Gerais state, Brazil: Molecular characterization and antimicrobial resistance. **Food Control**, v. 51, p. 15–22, 2015.

IDSA, I. D. S. of A. **Combating Antimicrobial Resistance: Policy Recommendations to Save Lives** IDSA Policy Paper. 2011.
<https://doi.org/10.1093/cid/cir153>

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

JENSEN, L. B.; FRIMODT-MÖLLER, N.; AARESTRUP, F. M. Presence of *erm* gene classes in Gram-positive bacteria of animal and human origin in Denmark. **FEMS Microbiology Letters**, v. 170, 1999.

JEON, B.; WANG, Y.; HAO, H.; BARTON, Y.-W.; ZHANG, Q. Contribution of CmeG to antibiotic and oxidative stress resistance in *Campylobacter jejuni*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 1, p. 79–85, 2011.

JU, C. Y.; ZHANG, M. J.; MA, Y. P.; LU, J. R.; YU, M. H.; CHEN, H.; LIU, C. Y.; GU, Y. X.; FU, Y. Y.; DUAN, Y. X. Genetic and Antibiotic Resistance Characteristics of *Campylobacter jejuni* Isolated from Diarrheal Patients, Poultry and Cattle in Shenzhen. **Biomed Environ Sci**, v. 31, n. 8, p. 579–585, 2018.

KAAKOUSH, N. O.; CASTAÑO-RODRÍGUEZ, N.; MITCHELL, H. M.; MAN, S. M. Global epidemiology of *Campylobacter* infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 687–720, 2015.

KHAN, J. A.; RATHORE, R. S.; ABULREESH, H. H.; QAIS, F. A.; AHMAD, I. Prevalence and Antibiotic Resistance Profiles of *Campylobacter jejuni* Isolated from Poultry Meat and Related Samples at Retail Shops in Northern India. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. XX, n. Xx, p. 1–8, 2018.

KIM, J. M.; HONG, J.; BAE, W.; KOO, H. Y. E. C.; KIM, S. O. H.; PARK, Y. H. O. Prevalence , Antibigrams , and Transferable tet (O) Plasmid of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Isolated from Raw Chicken , Pork , and Human Clinical Cases in Korea. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 8, p. 1430–1437, 2010.

KIM, Y.; SHIN, J. A.; HAN, S. B.; CHO, B.; JEONG, D. C.; KANG, J. H.; ABDINIA, B. Recurrent *Campylobacter jejuni* bacteremia in a patient with hypogammaglobulinemia: A case report. **Medicine (United States)**, v. 96, n. 25, p. 18–20, 2017.

LAMBERT, T.; GERBAUD, G.; TRIEU-CUOT, P.; COURVALIN, P. Structural relationship between the genes encoding 3'-aminoglycoside phosphotransferases in *Campylobacter* and in Gram-positive cocci. **Ann. Inst. Pasteur Microbiol.**, v. 136, p. 135–150, 1985.

LAURIA-FILGUEIRAS, A. L. Aspectos gerais de *Campylobacter* na segurança dos alimentos. **Embrapa Suínos e Aves**, p. 11–15, 2012.

LAWRENCE, J. G. Horizontal and Vertical Gene Transfer: The Life History of

Pathogens. **Concepts in Bacterial Virulence**, v. 12, p. 255–271, 2004.

LI, B.; MA, L.; LI, Y.; JIA, H.; WEI, J.; SHAO, D.; LIU, K.; SHI, Y.; QIU, Y.; MA, Z. Antimicrobial Resistance of *Campylobacter* Species Isolated from Broilers in Live Bird Markets in Shanghai, China. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. XX, n. Xx, p. 1–7, 2016.

LI, X. Z.; MEHROTRA, M.; GHIMIRE, S.; ADEWOYE, L. β -Lactam resistance and β -lactamases in bacteria of animal origin. **Veterinary Microbiology**, v. 121, n. 3–4, p. 197–214, 2007.

LIN, J.; MICHEL, L. O.; ZHANG, Q. CmeABC Functions as a Multidrug Efflux System in *Campylobacter jejuni*. v. 46, n. 7, p. 2124–2131, 2002.

LIN, J.; YAN, M.; SAHIN, O.; PEREIRA, S.; CHANG, Y.; ZHANG, Q. Effect of Macrolide Usage on Emergence of Erythromycin-Resistant *Campylobacter* Isolates in Chickens . **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 5, p. 1678–1686, 2007.

LIU, D.; DENG, F.; GAO, Y.; YAO, H.; SHEN, Z.; WU, C.; WANG, Y.; SHEN, J. Dissemination of erm(B) and its associated multidrug-resistance genomic islands in *Campylobacter* from 2013 to 2015. **Veterinary Microbiology**, v. 204, n. October 2016, p. 20–24, 2017.

LORENZ, M. G.; WACKERNAGEL, W. Bacterial Gene Transfer by Natural Genetic Transformation in the Environment. **Microbiological reviews**, v. 58, n. 3, p. 563–602, 1994.

LORETO, E.; FERREIRA, H. B. Elementos Genéticos Móveis. In: ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, LUCIANE, M. P. (Ed.). **Biologia Molecular Básica**. Porto Alegre: ArtMed, 2014. p. 185–204.

LUANGTONGKUM, T.; JEON, B.; HAN, J.; PLUMMER, P.; LOGUE, C. M.; ZHANG, Q. Antibiotic resistance in *Campylobacter*: emergence, transmission and persistence. **Future Microbiology**, v. 4, n. 2, p. 189–200, 2009.

LUANGTONGKUM, T.; MORISHITA, T. Y.; EL-TAYEB, A. B.; ISON, A. J.; ZHANG, Q. Comparison of Antimicrobial Susceptibility Testing of *Campylobacter* spp . by the Agar Dilution and the Agar Disk Diffusion Methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 590–594, 2007.

LUO, N.; SAHIN, O.; LIN, J.; MICHEL, L. O.; ZHANG, Q. In Vivo Selection of *Campylobacter* Isolates with High Levels of Fluoroquinolone Resistance Associated with *gyrA* Mutations and the Function of the CmeABC Efflux Pump. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 1, p. 390–394, 2003.

MAĆKIW, E.; KORSK, D.; RZEWSKA, K.; TOMCZUK, K.; ROZYNEK, E. Antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from food in Poland. **Food Control**, v. 23, n. 2, p. 297–301, 2012.

MACRINA, F. L.; KOPECKO, D. J.; JONES, K. R.; AYERS, D. J.; MCCOWEN, S. M. A Multiple Plasmid-Containing *Escherichia coli* Strain : Convenient Source of Size Reference Plasmid Molecules. **Plasmid**, v. 420, p. 417–420, 1978.

MAGIORAKOS, A.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M.; GISKE, C.; HARBARTH, S.; HINDLER, J. Bacteria : an International Expert Proposal for Interim Standard Definitions for Acquired Resistance. **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2011.

MCDERMOTT, P. F.; BODEIS, S. M.; ENGLISH, L. L.; WHITE, D. G.; WALKER, R. D.; ZHAO, S.; SIMJEE, S.; WAGNER, D. D. Ciprofloxacin Resistance in *Campylobacter jejuni* Evolves Rapidly in Chickens Treated with Fluoroquinolones. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 185, n. 6, p. 837–840, 2002.

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, n. 7, p. 1955–1966, 2006.

MOURA, H. M. de; SILVA, P. R.; SILVA, P. H. C. da; SOUZA, N. R.; RACANICCI, A. M. C.; SANTANA, Â. P. Antimicrobial Resistance of *Campylobacter jejuni* Isolated from Chicken Carcasses in the Federal District , Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 4, p. 691–693, 2013.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of antibiotic resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. May 2017, p. 1–24, 2016.

NACHAMKIN, I.; UNG, H.; LI, M. Increasing fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni*, Pennsylvania, USA, 1982-2001. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 12, p. 1501–1503, 2002.

NARVAEZ-BRAVO, C.; TABOADA, E. N.; MUTSCHALL, S. K.; ASLAM, M. Epidemiology of antimicrobial resistant *Campylobacter* spp. isolated from retail meats in Canada. **International Journal of Food Microbiology**, v. 253, n. July 2016, p. 43–47, 2017.

NEWELL, D. G.; SHREEVE, J. E.; TOSZEGHY, M.; DOMINGUE, G.; BULL, S.; HUMPHREY, T.; MEAD, G. Changes in the Carriage of. **Society**, v. 67, n. 6, p. 2636–2640, 2001.

NIRDNOY, W.; MASON, C. J.; GUERRY, P. Mosaic Structure of a Multiple-Drug-Resistant , Conjugative Plasmid from *Campylobacter jejuni*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2454–2459, 2005.

NISAR, M.; AHMAD, M. ud D.; MUSHTAQ, M. H.; SHEHZAD, W.; HUSSAIN, A.; MUHAMMAD, J.; NAGARAJA, K. V.; GOYAL, S. M. Prevalence and antimicrobial resistance patterns of *Campylobacter* spp. isolated from retail meat in Lahore, Pakistan. **Food Control**, v. 80, p. 327–332, 2017.

O'BRIEN, S.; RODRIGUES, A. M. M.; BUCKLING, A. The evolution of bacterial mutation rates under simultaneous selection by interspecific and social parasitism. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 280, n. 1773, 2013.

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, 2012.

OLAH, P. A.; DOETKOTT, C.; FAKHR, M. K.; LOGUE, C. M. Prevalence of the *Campylobacter* multi-drug efflux pump (CmeABC) in *Campylobacter* spp. Isolated from freshly processed Turkeys. **Food Microbiology**, v. 23, n. 5, p. 453–460, 2006.

OLIVEIRA, M. G. ***Campylobacter* termofílicos em linha de abate de frangos: ocorrência, caracterização molecular e perfil de virulência.** 2016. 96f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

OLIVEIRA, A. L.; OLIVEIRA, R. B. P. Enumeração de *Campylobacter* spp. e presença de *Campylobacter jejuni* em carcaças de frango no estado de Minas Gerais. **Ciência Rural**, v. 43, n. 3, p. 480–484, 2003.

PANZENHAGEN, P. H. N.; AGUIAR, W. S.; FRASÃO, B. da S.; PEREIRA, V. L. de

A.; ABREU, D. L. da C.; RODRIGUES, D. dos P.; NASCIMENTO, E. R. do; AQUINO, M. H. C. de. Prevalence and fluoroquinolones resistance of *Campylobacter* and *Salmonella* isolates from poultry carcasses in Rio de Janeiro, Brazil. **Food Control**, 2015.

PARK, S. F. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, n. 3, p. 177–188, 2002.

PAYOT, S.; BOLLA, J. M.; CORCORAN, D.; FANNING, S.; MÉGRAUD, F.; ZHANG, Q. Mechanisms of fluoroquinolone and macrolide resistance in *Campylobacter* spp. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 7, p. 1967–1971, 2006.

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

POSTMA, M.; VANDERHAEGHEN, W.; SARRAZIN, S.; MAES, D.; DEWULF, J. Reducing Antimicrobial Usage in Pig Production without Jeopardizing Production Parameters. **Zoonoses and Public Health**, v. 64, n. 1, p. 63–74, 2016.

PRATT, A.; KOROLIK, V. Tetracycline resistance of Australian *Campylobacter jejuni*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, n. March, p. 452–460, 2005.

PUMBWE, L.; RANDALL, L. P.; WOODWARD, M. J.; PIDDOCK, L. J. V. Expression of the efflux pump genes *cmeB*, *cmeF* and the porin gene *porA* in multiple-antibiotic-resistant *Campylobacter jejuni*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 341–347, 2004.

QIN, S.; WANG, Y.; ZHANG, Q.; ZHANG, M.; DENG, F.; SHEN, Z.; WU, C.; WANG, S.; ZHANG, J.; SHEN, J. Report of ribosomal RNA methylase gene *erm(B)* in multidrug-resistant *Campylobacter coli*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 4, p. 964–968, 2014.

RAMIRES, T. ***Campylobacter* termofílicos em frangos de corte e em aviários na região sul do Rio Grande do Sul: ocorrência, diversidade genética, perfil de resistência a antimicrobianos e detecção de genes de virulência.** 2017. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

RAMIREZ, M. S.; TOLMASKY, M. E. Aminoglycoside modifying enzymes. **Drug Resistance Updates**, v. 13, n. 6, p. 151–171, 2010.

REDGRAVE, L. S.; SUTTON, S. B.; WEBBER, M. A.; PIDDOCK, L. J. V. Fluoroquinolone resistance : mechanisms , impact on bacteria , and role in evolutionary success. **Trends in Microbiology**, n. Figure 2, p. 1–8, 2014.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. Molecular Clonning. In: GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. (Ed.). **Molecular cloning: A laboratory Manual**. Fourth ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012. p. 2028.

SHEN, Z.; WANG, Y.; ZHANG, Q.; SHEN, J. Antimicrobial Resistance in *Campylobacter* spp. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 2, abr. 2018.

SIERRA-ARGUELLO, Y. M.; FURIAN, T. Q.; PERDONCINI, G.; MORAES, H. L. S.; SALLE, C. T. P.; RODRIGUES, L. B.; SANTOS, L. R. dos; GOMES, P.; NASCIMENTO, V. P. Fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from poultry and human samples assessed by PCR-restriction fragment length polymorphism assay. **PLoS ONE**, v. 13, n. 7, p. 1–9, 2018.

SILLEY, P. Susceptibility testing methods , resistance and breakpoints : what do these terms really mean?. **Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties**, v. 31, n. 1, p. 33–41, 2012.

SILVA, D. T. da; TEJADA, T. S.; BLUM-MENEZES, D.; DIAS, P. A.; TIMM, C. D. *Campylobacter* species isolated from poultry and humans, and their analysis using PFGE in southern Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 217, p. 189–194, 2016.

SKIRROW, M. B.; BLASER, M. J. Clinical aspects of *Campylobacter* infection. In: ***Campylobacter jejuni: current strategy and future***. Washington, DC: ASM Press, 2000. p. 69–88.

SKIRROW, M. B.; JONES, D. M.; SUTCLIFFE, E.; BENJAMIN, J. *Campylobacter* bacteraemia in England and Wales, 1981-91. **Epidemiology and Infection**, v. 110, n. 3, p. 567–573, 1993.

SMITH, A. B.; RENTER, D. G.; SHI, X.; CERNICCHIARO, N.; SAHIN, O.; NAGARAJA, T. G. *Campylobacter* Prevalence and Quinolone Susceptibility in Feces of Preharvest Feedlot Cattle Exposed to Enrofloxacin for the Treatment of Bovine Respiratory Disease. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 15, n. 6, p. 377–385, 2018.

SPELLBERG, B.; GILBERT, D. N. The Future of Antibiotics and Resistance : A Tribute to a Career of Leadership by John Bartlett. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, n. Suppl 2, p. 71–75, 2014.

SPINOSA, H. de S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

SZCZEPANOWSKI, R.; KRAHN, I.; LINKE, B.; GOESMANN, A.; PÜHLER, A.; SCHLÜTER, A. Antibiotic multiresistance plasmid pRSB101 isolated from a wastewater treatment plant is related to plasmids residing in phytopathogenic bacteria and carries eight different resistance determinants including a multidrug transport system. **Microbiology**, v. 150, p. 3613–3630, 2004.

SZCZEPAŃSKA, B.; KAMIŃSKI, P.; ANDRZEJEWSKA, M.; ŚPICA, D.; KARTANAS, E.; ULRICH, W.; JERZAK, L.; KASPRZAK, M.; BOCHEŃSKI, M.; KLAWE, J. J. Prevalence, Virulence, and Antimicrobial Resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in White Stork *Ciconia ciconia* in Poland. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, n. 1, p. 24–31, 2015.

TAJADA, P.; GOMES-GARCES, J. L.; ALÓS, J. I.; BALAS, D.; COGOLLOS, R. Antimicrobial Susceptibilities of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* to 12 β -Lactam Agents and Combinations with β -Lactamase Inhibitors. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 8, p. 1924–1925, 1996.

TAYLOR, D. E. Plasmid-mediated tetracycline resistance in *Campylobacter jejuni*: Expression in *Escherichia coli* and identification of homology with streptococcal class M determinant. **Journal of Bacteriology**, v. 165, n. 3, p. 1037–1039, 1986.

THAKUR, S.; BRAKE, J.; KEELARA, S.; ZOU, M.; SUSICK, E. Farm and environmental distribution of *Campylobacter* and *Salmonella* in broiler flocks. **Research in Veterinary Science**, v. 94, n. 1, p. 33–42, 2013.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. TRACZ, D. M.; KEELAN, M.; AHMED-BENTLEY, J.; GIBREEL, A.; KOWALEWSKA-GROCHOWSKA, K.; TAYLOR, D. E. pVir and Bloody Diarrhea in *Campylobacter jejuni* Enteritis. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 6, 2005.

TRESSE, O.; ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A.; CONNERTON, I. F. Editorial: About the foodborne pathogen *Campylobacter*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. OCT, p. 1–4, 2017.

VANDAMME, P; DE LEY, J. Proposal for a New Family,. n. July 1991, 1991.

VANDAMME P, DEWHIRST FE, PASTER BJ, O. S. Campylobacteraceae. In: GARRITY GM, BRENNER DJ, KRIEG NR, S. J. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. [s.l: s.n.]p. 1147–1160.

VELAYATI, A. A.; MASJEDI, M. R.; FARNIA, P.; TABARSI, P.; GHANAVI, J.; ZIAZARIFI, A. H.; HOFFNER, S. E. Emergence of New Forms of Totally Drug-Resistant Tuberculosis Bacilli. **CHEST**, v. 136, p. 420–425, 2009.

VENTOLA, C. L. The Antibiotic Resistance Crisis Part 1 : Causes and Threats. **P&T**, v. 40, n. 4, p. 277–283, 2015.

WANG, Y.; TAYLOR, D. E. Natural Transformation in *Campylobacter* Species. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 2, p. 949–955, 1990.

WANG, Y.; ZHANG, M.; DENG, F.; SHEN, Z.; WU, C.; ZHANG, J.; ZHANG, Q. Emergence of Multidrug-Resistant *Campylobacter* Species Isolates with a Horizontally Acquired rRNA Methylase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 9, p. 5405–5412, 2014.

WHITEHOUSE, C. A.; ZHAO, S.; TATE, H. **Antimicrobial Resistance in *Campylobacter* Species: Mechanisms and Genomic Epidemiology**. 1. ed. Elsevier Inc., 2018. v. 103.

WHO, World Health Organization. **ANTIBACTERIAL AGENTS IN CLINICAL DEVELOPMENT An analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis**. Geneva, Switzerland. 2017a.

WHO, World Health Organization. **The world is running out of antibiotics, WHO report confirms**. 2017b. Disponível em: < <https://www.who.int/news-room/detail/20-09-2017-the-world-is-running-out-of-antibiotics-who-report-confirms>>. Acesso em: 20 jan. 2019.

WHO, World Health Organization. **Campylobacter**. 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/campylobacter>>. Acesso em: 08 jan. 2019.

WIECZOREK, K.; DENIS, E.; OSEK, J. Comparative analysis of antimicrobial resistance and genetic diversity of *Campylobacter* from broilers slaughtered in Poland. **International Journal of Food Microbiology**, v. 210, p. 24–32, 2015.

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

WÜRFEL, S. F. R.; DA SILVA, W. P.; DE OLIVEIRA, M. G.; KLEINUBING, N. R.; LOPES, G. V.; GANDRA, E. A.; DELLAGOSTIN, O. A. Genetic diversity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from poultry meat products sold on the retail market in Southern Brazil. **Poultry science**, 2018.

YANG, W.; ZHANG, M.; ZHOU, J.; PANG, L.; WANG, G.; HOU, F. The Molecular Mechanisms of Ciprofloxacin Resistance in Clinical *Campylobacter jejuni* and Their Genotyping Characteristics in Beijing, China. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 14, n. 7, p. 386–392, 2017.

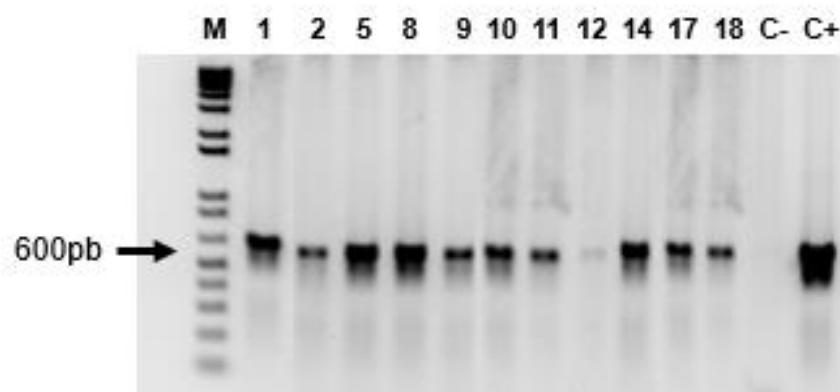
ZAMAN, S. Bin; HUSSAIN, M. A.; NYE, R.; MEHTA, V.; TAIB, K. A Review on Antibiotic Resistance : Alarm Bells are Ringing Origin of antibiotic resistance. **Cureus**, v. 9, n. 6, 2017.

ZENG, X.; BROWN, S.; GILLESPIE, B.; LIN, J. A single nucleotide in the promoter region modulates the expression of the β -lactamase OXA-61 in *Campylobacter jejuni*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. January, p. 1215–1223, 2014.

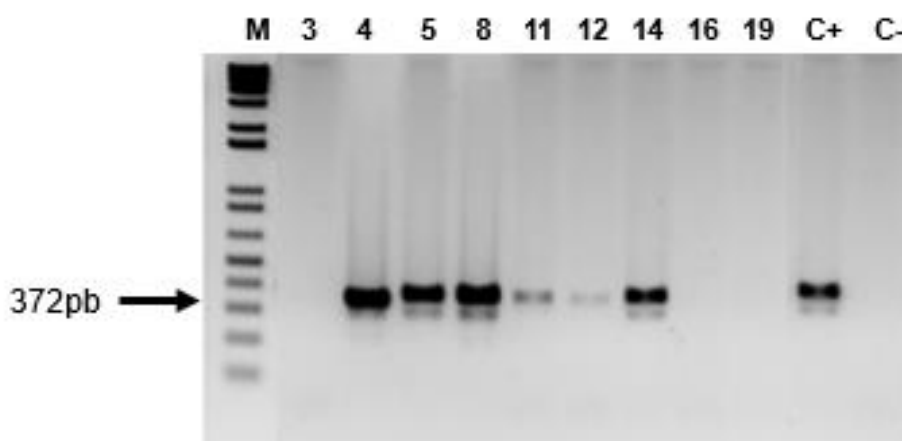
ZIRNSTEIN, G.; LI, Y.; SWAMINATHAN, B.; ANGULO, F. Ciprofloxacin resistance in *Campylobacter jejuni* isolates: Detection of *gyrA* resistance mutations by mismatch amplification mutation assay PCR and DNA sequence analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 10, p. 3276–3280, 1999.

Apêndices

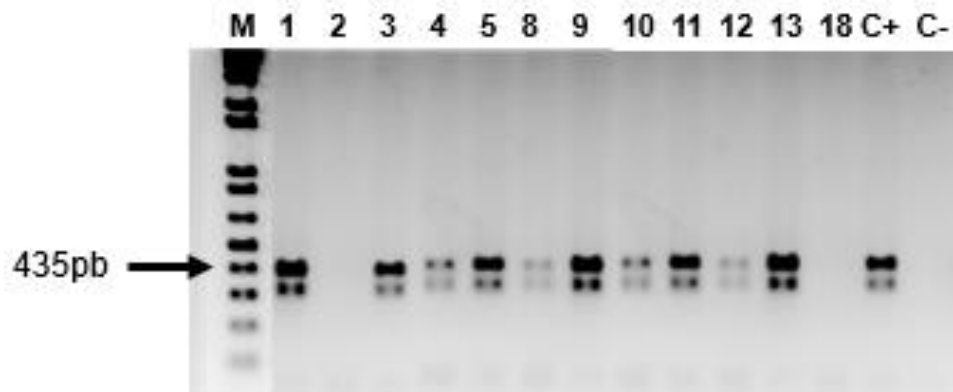
Apêndice A- Fotos de géis de agarose dos produtos de PCR dos genes avaliados no estudo



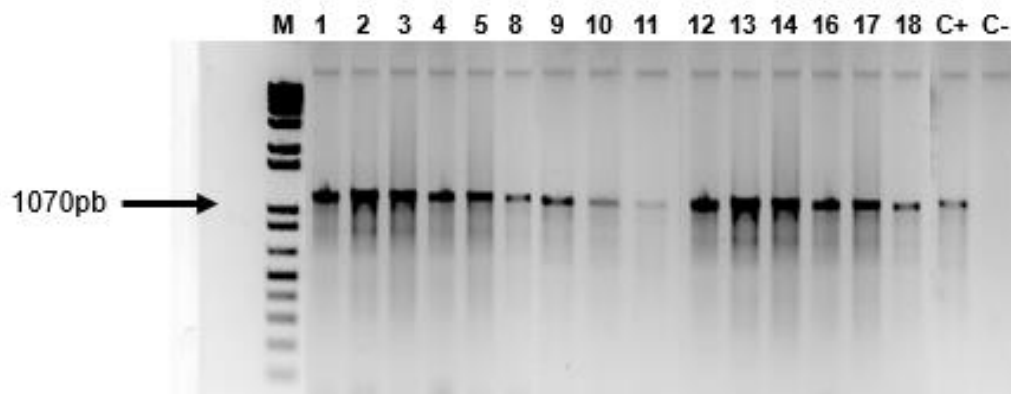
Deteccção do gene *apha-3* nos isolados de *C. jejuni* que apresentaram resistência fenotípica à canamicina. M: marcador de peso molecular (ladder 1kb). 1, 2, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 17, 18: isolados que apresentaram resistência fenotípica à canamicina. C-: reação sem DNA. C+: controle positivo *C. jejuni* 100.



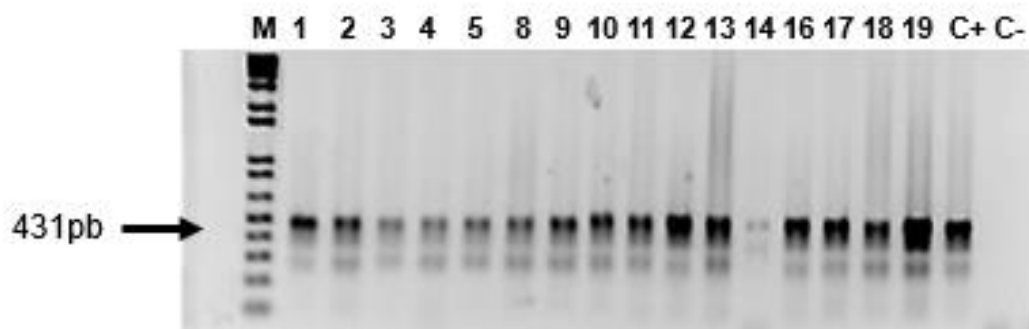
Deteccção do gene *bla_{oxa-61}* nos isolados de *C. jejuni* que apresentaram resistência fenotípica à ampicilina. M: marcador de peso molecular (ladder 1kb). 3, 4, 5, 8, 11, 12, 16, 19: isolados que apresentaram resistência fenotípica à ampicilina. C-: reação sem DNA. C+: controle positivo *C. jejuni* 100



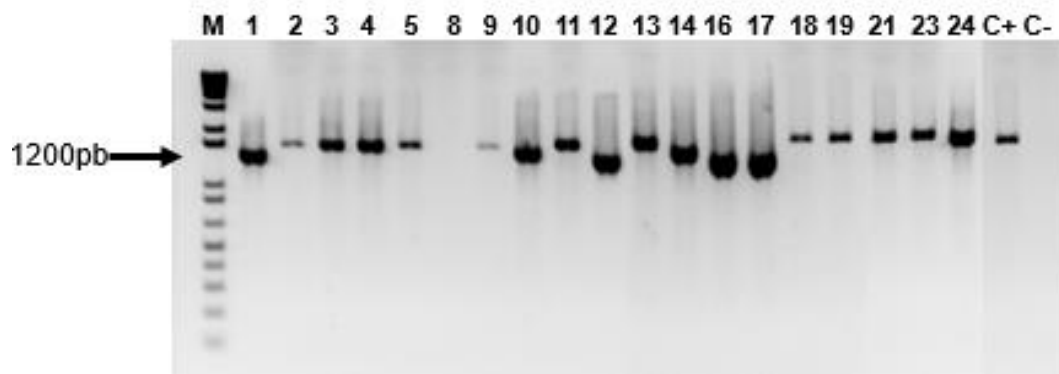
Detecção do gene *cmeA* nos isolados de *C. jejuni* que apresentaram resistência fenotípica. M: marcador de peso molecular (ladder 1kb). 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 18: alguns dos isolados que apresentaram resistência fenotípica aos antimicrobianos. C-: reação sem DNA. C+: controle positivo *C. jejuni* 100.



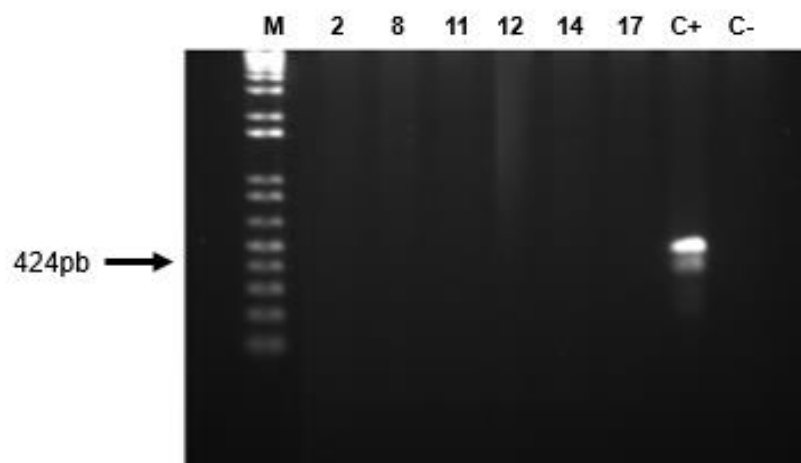
Detecção do gene *cmeB* nos isolados de *C. jejuni* que apresentaram resistência fenotípica. M: marcador de peso molecular (ladder 1kb). 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18: alguns dos isolados que apresentaram resistência fenotípica aos antimicrobianos. C-: reação sem DNA. C+: controle positivo *C. jejuni* 100.



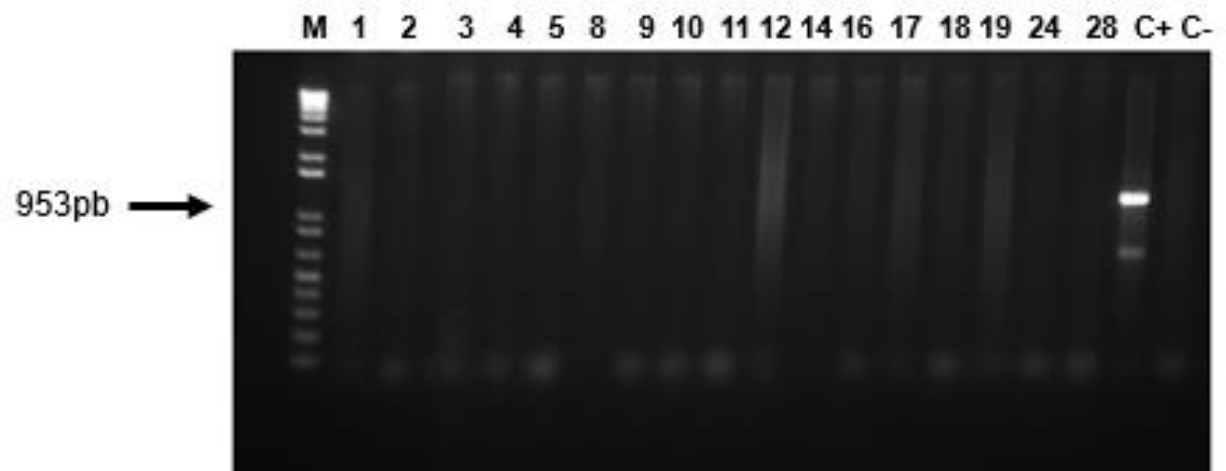
Detecção do gene *cmeC* nos isolados de *C. jejuni* que apresentaram resistência fenotípica. M: marcador de peso molecular (ladder 1kb). 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19: alguns dos isolados que apresentaram resistência fenotípica aos antimicrobianos. C-: reação sem DNA. C+: controle positivo *C. jejuni* 100.



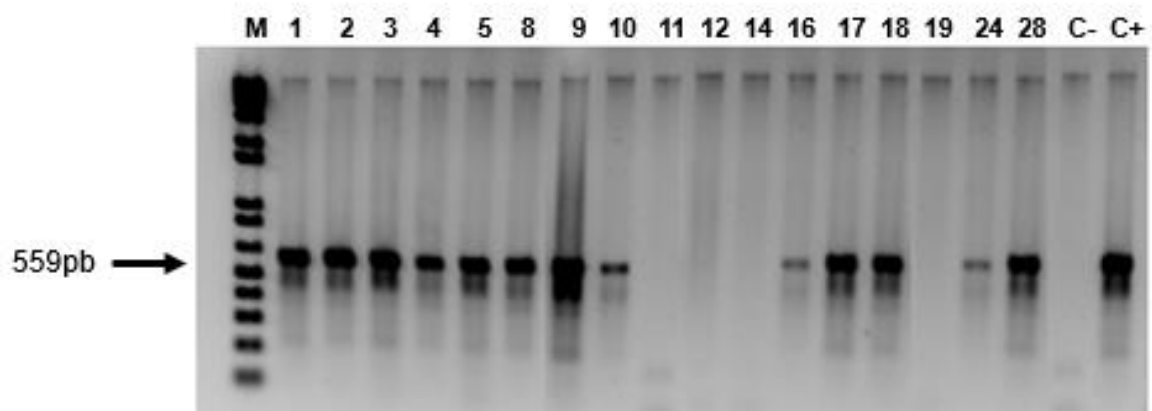
Deteccão do gene *cmeG* nos isolados de *C. jejuni* que apresentaram resistência fenotípica. M: marcador de peso molecular (ladder 1kb). 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 23, 24: alguns dos isolados que apresentaram resistência fenotípica aos antimicrobianos. C-: reação sem DNA. C+: controle positivo *C. jejuni* 100.



Deteccão do gene *ermB* nos isolados de *C. jejuni* que apresentaram resistência fenotípica aos macrolídeos. M: marcador de peso molecular (ladder 1kb). 2, 8, 11, 12, 13, 17: isolados que apresentaram resistência fenotípica aos macrolídeos. C+: controle positivo - isolado clínico de mastite *S. aureus* multirresistente. C-: reação sem DNA.

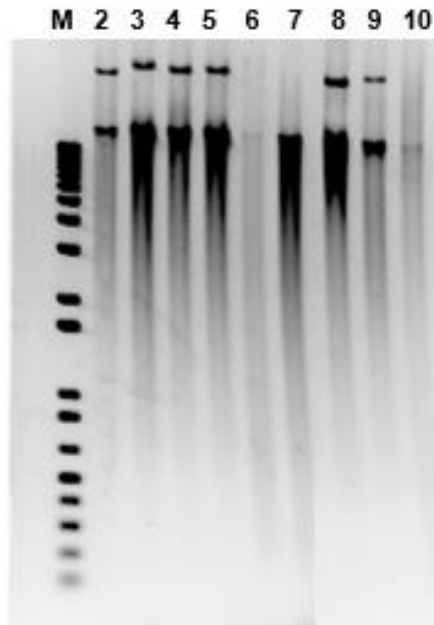


Deteccção do gene *tetA* nos isolados de *C. jejuni* que apresentaram resistência fenotípica as tetraciclínas. M: marcador de peso molecular (ladder 1kb). 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 17, 18, 19, 24, 28: isolados que apresentaram resistência fenotípica as tetraciclínas. C+: controle positivo – isolado de abatedouro suíno *Salmonella* Typhimurium 22C. C-: reação sem DNA.



Deteccção do gene *tetO* nos isolados de *C. jejuni* que apresentaram resistência fenotípica as tetraciclínas. M: marcador de peso molecular (ladder 1kb). 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 17, 18, 19, 24, 28: isolados que apresentaram resistência fenotípica as tetraciclínas. C+: controle positivo – isolado *C. jejuni* 17. C-: reação sem DNA.

Apêndice B: Foto do gel de agarose com as bandas obtidas após a extração de DNA plasmidial



Bandas obtidas após a corrida eletroforética em gel de agarose do DNA plasmidial de alguns dos isolados de *C. jejuni*. M: marcador de peso molecular (ladder 1kb). Isolados de *C. jejuni*: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10.