

## INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas temos vindo a assistir a várias crises alimentares (dioxinas, encefalopatia espongiforme bovina, nitrofuranos em frangos, etc.) que colocam em risco a saúde dos consumidores mas ao mesmo tempo despertam a atenção dos mesmos para várias questões relacionadas com a segurança dos alimentos consumidos. Estas crises alimentares não têm sido indiferentes também a entidades da UE, que tendem a investigar e legislar de modo a aumentar a segurança alimentar e ao mesmo tempo recuperar os níveis de confiança dos consumidores.

Segundo dados publicados durante o ano de 2009 pela Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar, *Campylobacter* é o agente etiológico mais frequentemente isolado em patologia gastrointestinal aguda em seres humanos por toda a Europa e, segundo outras fontes bibliográficas, esta é uma problemática que também é verificada nos outros continentes (Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar [EFSA], 2009). Alguns estudos referem que, em países desenvolvidos, estas bactérias causam gastroenterite com uma frequência 2 a 7 vezes maior que bactérias como *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella* spp. ou mesmo *Salmonella* spp., agentes etiológicos que, ao contrário do que acontece com *Campylobacter* spp., aparecem com maior destaque porque estão frequentemente associados a surtos (Allos, 2001). Para além de ser o agente patogénico mais frequentemente isolado em gastroenterites, a incidência de campilobacteriose humana tem vindo a aumentar, tanto em países desenvolvidos como em países em vias de desenvolvimento. Acresce a isto o facto de estarem a surgir cada vez mais estirpes de *Campylobacter* spp. resistentes a antibióticos, com evidências que sugerem o uso frequente deste tipo de fármacos como promotores de crescimento em animais de produção, em particular de fluoroquinolonas e macrólidos. Estas estirpes resistentes têm a sua virulência aumentada uma vez que possuem uma maior capacidade de provocar doença e mesmo levar à morte. Assim, torna-se importante testar várias estirpes de *Campylobacter* spp. e averiguar a sua susceptibilidade a vários antibióticos utilizados em medicina humana para o tratamento de infecções mais graves.

Este trabalho integra-se num conjunto de estudos que pretende, além de determinar a frequência de estirpes de *Campylobacter* spp. em diferentes tipos de amostras, caracterizá-las geneticamente identificando as espécies predominantes *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* e avaliar se são resistentes a um conjunto de antibióticos comumente utilizados em medicina humana para tratar doentes com infecções provocadas por este agente. Neste trabalho foram seleccionadas algumas estirpes isoladas e caracterizadas em trabalhos anteriores e foi avaliada a antibiorresistência das mesmas utilizando o método de difusão em disco. Com estes resultados pretendeu-se caracterizar e determinar quais as antibioresistências apresentadas pelas estirpes de *Campylobacter* spp., isoladas de

amostras de frangos de produção intensiva colhidas num matadouro, e averiguar se as frequências de antibioresistencia apresentadas serão ou não semelhantes às observadas em alguns países, visto serem muito escassos actualmente dados publicados relativos a antibioresistências de *Campylobacter*spp. isolados de fontes alimentares em Portugal.

## 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Actualmente bactérias pertencentes ao género *Campylobacter* spp. constituem, entre os microrganismos causadores de toxinfecções alimentares uma das principais prioridades em termos de saúde pública (EFSA, 2005). No início do ano de 2009, a EFSA apresentou os resultados relativos às notificações realizadas pelos estados membros durante o ano de 2007. Nesta publicação, a EFSA referiu que as gastroenterites causadas por *Campylobacter* spp. foram mais uma vez a doença zoonótica mais notificada na União Europeia, com 200507 casos confirmados reportados. A maioria dos estados membros reportou um aumento dos casos relativamente aos obtidos no ano anterior (EFSA, 2009). A salmonelose continua com o 2.º lugar do mesmo ranking, sendo apresentados 151995 casos confirmados mas com uma tendência de diminuição no número de notificações fornecidos pelos EM nos últimos 4 anos (EFSA, 2009).

A Comissão Europeia já legislou no sentido de controlar agentes patogénicos como a *Salmonella* spp., com o objectivo de diminuir os alvos ao longo da cadeia alimentar, principalmente ao nível das populações animais. Foram estabelecidos programas nacionais de controlo deste agente patogénico para diminuir a prevalência ao nível das populações animais e conseqüentemente reduzir a presença destes agentes ao longo de toda a cadeia alimentar (EFSA, 2005).

Actualmente ainda existem poucos dados acerca da melhor maneira de prevenir infecções por *Campylobacter* spp. ao nível da produção primária, dificultando assim o estabelecimento de objectivos reais e o desenho de programas de controlo (EFSA, 2005).

### 1.1 *Campylobacter*spp. – Perspectiva microbiológica

Bactérias do género *Campylobacter*spp. são bastonetes curvos em forma de S ou em forma de espiral que possuem entre 0,2 a 0,8µm de espessura e 0,5-8µm de comprimento. São bactérias Gram negativas não formadoras de esporos, que podem formar corpos esféricos ou cocoides em culturas velhas ou nas expostas ao ar por períodos prolongados. Possuem um flagelo polar em uma ou em ambas as extremidades que lhes confere motilidade. As várias espécies são microaerófilas, com um metabolismo do tipo respiratório oxidase positivo. Entre outras características reduzem nitratos, são incapazes de oxidar ou fermentar hidratos de carbono e a maior parte das espécies reduz nitritos (*Microbiological Safety of Food Funders Group* [MSFFG], 2008). A temperatura óptima de crescimento varia entre os 35 e os 37°C. No geral, são bactérias de crescimento lento (Allos, 2001).

## 1.2 Infecção por *Campylobacter*spp. em humanos

Existem 16 espécies e 6 subespécies de *Campylobacter* spp. conhecidas. Destas, várias são conhecidas por poderem causar patologia no ser humano mas as espécies termotolerantes, *C. jejuni* subespécie *jejuni*, *C. coli* e *C. lari* são consideradas as mais importantes. Destas a *C. jejuni* é a responsável pela maioria dos casos de gastroenterite, considerando-se que a *C. coli* seja responsável somente por 3 a 5% dos casos (EFSA, 2005)

A infecção por *Campylobacter* spp. em humanos é referida ao longo da bibliografia como campilobacteriose. Os sinais clínicos geralmente associados a esta infecção incluem: dor abdominal, febre e diarreia, e por vezes vem ainda acompanhada de vômito. A dor abdominal e a febre geralmente precedem a diarreia. Esta pode variar entre profusa, aquosa e poderá ou não vir acompanhada de sangue. Apesar da diarreia poder ser severa, a desidratação poderá ser a única consequência da infecção em indivíduos sem alterações no funcionamento do sistema imunitário.

Clinicamente não é possível distinguir uma infecção por *Campylobacter* spp. de outra infecção gastrointestinal aguda como aquela produzida por outras bactérias como *Salmonella*, *Shigella* e *Yersinia* (Allos, 2001). O período de incubação varia entre 2 a 7 dias e a doença poderá ter uma duração similar. Mesmo na ausência de sinais clínicos, o microrganismo é excretado nas fezes durante várias semanas.

A bacteriemia como consequência de infecção por *Campylobacter* spp. é rara e na generalidade os doentes afectados por esta toxinfecção alimentar não necessitam de tratamento. Repouso e fluidoterapia são indicados para reverter a maior parte da sintomatologia desta doença, que acaba por ser autolimitante.

O recurso a antibióticos é raro e fica reservado para o tratamento de situações mais severas. Os macrólidos são geralmente o grupo de antibióticos de eleição para o tratamento desta infecção mas as fluoroquinolonas estão também indicadas (Aarestrup & Engberg, 2001). Em muitos dos casos de gastroenterite, as fluoroquinolonas são preferidas quando se suspeita de infecção por *Shigella* spp.. No caso de bacteriemia severa por *Campylobacter* spp. assim como em muitas infecções sistémicas, o tratamento de eleição são aminoglicosídeos intravenosos (Aarestrup & Engberg, 2001). No entanto, o aumento da ocorrência de *Campylobacter* spp. resistentes a macrólidos e a fluoroquinolonas tem vindo a ser reportada em vários países e nestes casos outros antimicrobianos são usados para tratamento. A resistência de determinadas estirpes isoladas principalmente a fluoroquinolonas, tem vindo a ser evidenciado sendo considerado um problema médico

As complicações associadas a campilobacteriose surgem raramente. No entanto, cerca de 1% dos doentes poderão vir a ter manifestações clínicas mais severas ocorrendo estas com maior frequência em jovens e idosos.

A morte como consequência de campilobacteriose é rara mas pode acontecer quando há generalização da doença em indivíduos imunocomprometidos ou em pacientes muito jovens ou idosos. Estudos revelaram que a fatalidade das infecções por *Campylobacter* spp. anda na ordem dos 0,05 casos por cada 1000 infecções (Allos, 2001). Podem também ocorrer sequelas pós-infecção como síndrome de Guillain-Barré e artrite reactiva (Allos, 2001).

Actualmente a síndrome de Guillain-Barré é reconhecida como uma complicação pós infecção por *Campylobacter jejuni* mas a sua incidência é inferior a 1 caso por cada 1000 infecções (Allos, 2001). Esta síndrome é caracterizada pela desmielinização aguda dos nervos do sistema nervoso periférico e, nos Estados Unidos da América afecta cerca de 1-2 pessoas por cada 100000 habitantes (Allos, 2001). Estudos revelaram que o facto de sofrer de uma infecção por *Campylobacter jejuni* aumenta o risco de vir a desenvolver a Síndrome de Guillain-Barré (SGB) mas sabe-se já que a probabilidade de ocorrência desta complicação é mais provável quando associada à infecção do indivíduo por um determinado serótipo de *C. jejuni* (Allos, 2001). A SGB que ocorre na sequência de uma infecção por *C. jejuni* é geralmente mais severa que a SGB que não tem relação com esta infecção, e manifesta-se clinicamente com lesão axonal extensa com possibilidade de vir a necessitar de ventilação assistida e com um aumento da probabilidade do dano neurológico poder vir a ser irreversível (Allos, 2001). Em contraste, a severidade da infecção por *C. jejuni* não está associada com um aumento da possibilidade do paciente vir a sofrer da SGB. Os sinais neurológicos que caracterizam o SGB surgem tipicamente cerca de 1 a 3 semanas após o início da sintomatologia associada à infecção por *C. jejuni*, daí pensar-se que exista um mimetismo entre os glicolípidos da membrana axonal ou das proteínas da mielina do neurónio e alguma estrutura nos lipopolissacarídeos da *Campylobacter jejuni* que causou a doença (Allos, 2001). Neste contexto, interessa sempre a identificação até ao nível da espécie do isolado de *Campylobacter* spp. que causou a gastroenterite. Sabe-se já que uma infecção por *C. jejuni* surge como um factor de risco para um paciente vir a sofrer de complicações como SGB ou artrite reactiva, enquanto que uma infecção por *C. coli* não se encontra na lista de factores de risco para qualquer uma das complicações associadas à campilobacteriose (Röner, Engvall, Andersson & Kaijser, 2004).

Nos casos em que se suspeita de campilobacteriose, para verificar se a gastroenterite é ou não causada por *Campylobacter* spp. e sabendo que este é excretado nas fezes, utiliza-se como método o seu isolamento directamente das fezes do doente (Allos, 2001). Existe a possibilidade de utilizar uma outra metodologia baseada na reacção de polimerase em cadeia (PCR), com extracções da amostra fecal, mas este método de diagnóstico ainda não é utilizado como rotina (Allos, 2001) Tendo conhecimento do facto da *C. jejuni* ser resistente à cefalotina (um antibiótico ao qual a maior parte das outras bactérias que constituem a flora gastrointestinal é susceptível), um método muito comum para o seu

isolamento em amostras fecais é adicionar cefalotina ao meio de cultura. Há no entanto, estirpes de *Campylobacter* spp., especialmente as que não pertencem à espécie *C. jejuni*, que são susceptíveis à cefalotina e nestes casos utiliza-se o método de filtração para um meio sem cefalotina. Neste caso é utilizado um filtro de 0,45-0,65µm que bloqueia a passagem da maior parte das bactérias da flora gastrointestinal, deixando passar somente bactérias pequenas, como é o caso da *Campylobacter*spp. (Allos, 2001).

A campilobacteriose é causada pela invasão do trato gastrointestinal por bactérias do género *Campylobacter* spp. Este microrganismo entra em contacto com o ser humano sobretudo através da ingestão de alimento ou água contaminada. Vários estudos referem que a ingestão de líquidos auxilia no *bypass* pelo estômago fazendo com que um número superior de microrganismos viáveis atinja o intestino delgado, facilitando a ocorrência de doença. O mecanismo pela qual *C. jejuni* e *C. coli* causam diarreia poderá ser explicado pelos sinais clínicos. No caso de a diarreia ser secretória ou aquosa poderá ser causada pela adesão destas bactérias à mucosa na parte proximal do intestino delgado e também pela formação de uma enterotoxina. No caso de o doente apresentar sangue fresco nas fezes e células inflamatórias isto sugere invasão da mucosa intestinal e inflamação colorrectal. Estudos anatomopatológicos têm detectado em vários doentes *Campylobacter* spp. na região proximal do intestino delgado e lesões no jejuno, edema da mucosa, hiperémia e ulceração do cólon (International Commission on Microbiological Specifications of Foods [ICMSF], 1996)

Tanto *C. jejuni* como *C. coli*, quando isoladas de fontes animais, clínicas (doentes com campilobacteriose) ou fontes alimentares, produzem uma enterotoxina citotónica termoestável com um peso molecular de 70000Da. Sabe-se também que cerca de 70% das espécies de *C. jejuni* e *C. coli* produzem também uma citotoxina que poderá ser importante na patogenicidade da diarreia com sangue. Aos factores de virulência citados (enterotoxina citotónica e citotoxina) acrescem ainda a motilidade rápida e a forma espiralada da *C. jejuni* que poderão ajudar a penetrar na barreira mucosa gastrointestinal (*International Commission on Microbiological Specifications of Foods* [ICMSF], 1996).

A verdadeira incidência de campilobacteriose não é conhecida e considera-se que seja 8 a 100 vezes superior ao número de casos reportado, uma vez que casos que apresentem sintomatologia clínica menos severa ficam muitas vezes por declarar, sem que seja realizado o isolamento da bactéria ou que o indivíduo chegue a ser consultado por um médico (EFSA, 2005).

A elevada incidência de sintomatologia clínica associada a infecção por *Campylobacter* spp., assim como a duração da mesma e o possível aparecimento de sequelas coloca esta toxinfecção alimentar na frente de todas as outras em importância, quando analisada numa perspectiva de saúde pública, e com um impacto socioeconómico significativo que deve ser tomado em linha de conta (EFSA, 2005).

### 1.3 *Campylobacter*spp. em animais

Os frangos são frequentemente colonizados por *C. jejuni* (65 a 95%), menos frequentemente por *C. coli* e raramente por outras estirpes de *Campylobacter* spp. A colonização dos broilers está relacionada com a idade. A maior parte dos bandos é negativa para este microrganismo até às 2 semanas de idade e, uma vez ocorrida a colonização por *Campylobacter* spp., a transmissão por coprofagia é extremamente rápida podendo 100% dos frangos ser colonizados num período de 72 horas. (*Office International des Epizooties* [OIE], 2008).

Os bovinos, suínos e ovinos são também frequentemente colonizados por estirpes de *Campylobacter* spp., e essa colonização é maior para animais jovens do que para animais mais velhos. Nestes últimos, os microrganismos são ocasionalmente detectados nas fezes, provavelmente devido aos baixos níveis de colonização ou então à possível excreção intermitente. Os bovinos e ovinos são primariamente colonizados por *C. jejuni*, *C. coli*, *C. hyointestinalis* e *C. fetus*, enquanto que os suínos são predominantemente colonizados por *C. coli* (OIE, 2008).

### 1.4 Epidemiologia

A epidemiologia da transmissão de *Campylobacter* spp. é considerada complexa e, uma vez que este género de bactéria pode ser transmitida de animais para seres humanos e também destes para os animais, a doença causada pela infecção por esta bactéria é considerada uma zoonose (EFSA, 2009).

Várias bactérias do género *Campylobacter* spp. fazem parte da flora intestinal de muitos dos animais de produção, como galinhas, perus, suínos, bovinos e ovinos, sendo estes capazes de alojar tanto *C. coli* como *C. jejuni* sem sinais aparentes de doença. A transmissão deste tipo de bactéria para seres humanos ocorre principalmente através do consumo de alimentos que contenham frango, leite não pasteurizado ou outro tipo de carnes (Yan, Pendrak, Foley & Powers, 2005).

Um estudo realizado na Dinamarca onde foram recolhidas amostras ao nível de matadouro avaliando-se a presença de *Campylobacter* spp., verificou-se que 47% dos bovinos, 46% dos suínos e 36% dos frangos estavam contaminados por este agente patogénico. Outro estudo realizado no Reino Unido, demonstrou uma prevalência de 32% para *C. jejuni* em amostras de fezes colhidas de vacas leiteiras saudáveis. Estes animais contaminados por *Campylobacter* spp. poderão dar origem à contaminação do leite produzido nestas explorações (Yan *et al.*, 2005).

Sabe-se que 90% das infecções por *Campylobacter* spp. em humanos foram causadas ou por *C. jejuni* ou por *C. coli*, sendo a frequência com que o primeiro causa



A maior parte dos casos de campilobacteriose são esporádicos. No entanto, têm sido reportados casos de infecção por *Campylobacter* spp. que surgiram por surtos. Resultados de vários estudos demonstraram que alimentos de origem animal provenientes dos grupos de distribuição alimentar estão na origem da maior parte das infecções (Yan *et al.*, 2005). Foi também demonstrado que cerca de 60% dos produtos contendo carne de frango recolhidos a este nível da fileira comercial estavam contaminados com *Campylobacter* spp. Estas bactérias são ainda capazes de sobreviver em carne congelada mesmo após longos períodos de congelação, o que torna este tipo de alimentos uma fonte de contaminação potencial no caso dos mesmos não serem adequadamente preparados antes de serem consumidos. Em muitos países, o elevado nível de contaminação que frangos e alimentos derivados apresentam aquando da sua exposição ao consumidor final contribui para o elevado número de casos de campilobacteriose reportado por todo o mundo. Deste modo, o consumo de carne de frango contaminada com *Campylobacter* spp. é referido como a causa principal de campilobacteriose esporádica. (Yan *et al.*, 2005)

A contaminação cruzada de alimentos prontos a consumir por manipuladores e consumidores, particularmente a contaminação com origem em produtos oriundos de frango cru, também parece ter um papel significativo no número de casos esporádicos verificados. Comprovou-se que a *Campylobacter* spp. é capaz de sobreviver por mais de 1 hora nas bancadas e em panos de cozinha e capaz de passar para outros alimentos que entrem em contacto com estas superfícies (Yan *et al.*, 2005).

No que se refere aos surtos, a fonte de infecção parece ser variável. Têm sido reportados surtos com origem em consumo de carne de frango, de carne de outros animais e de água ou leite contaminados com *Campylobacter* spp. (Yan *et al.*, 2005).

Segundo dados produzidos pela EFSA (2009), a transmissão de campilobacteriose é diferente atendendo ao grau de desenvolvimento de um país. Assim, em países em vias de desenvolvimento, as vias de transmissão são complexas e multifactoriais e em países desenvolvidos a campilobacteriose é considerada uma toxinfecção alimentar cuja principal fonte são os frangos (EFSA, 2005).

A contribuição das várias fontes de transmissão dentro da União Europeia é dependente do país que se considerar e segue determinada sazonalidade, principalmente devido ao clima, padrões de consumo, distribuição de água destinada ao consumo humano, sistemas de produção de alimentos e implementação de medidas de controlo.

A relação dose-resposta é complexa e ainda não há dados científicos capazes de a compreenderem completamente (Nauta *et al.*, 2009). Sabe-se que existe uma grande variação na capacidade das estirpes de *Campylobacter* spp. causarem infecção e doença. A composição do bolo alimentar e o estado do sistema imunitário do consumidor pode ter um grande impacto na probabilidade de ocorrência de doença após a ingestão de uma certa quantidade de *Campylobacter* spp. (Nauta *et al.*, 2009). Há no entanto autores que referem

que a dose infectante é baixa, sendo necessário um número de *Campylobacter* spp. na ordem das centenas, o suficiente para provocar doença (EFSA, 2005).

Uma vez que o calor mata as bactérias *Campylobacter* spp. viáveis, o consumo de carne de frango bem cozinhada parece ser uma boa medida de controlo para evitar infecções por esta bactéria (Allos, 2001).

### **1.5 *Campylobacter*spp. no contexto Europeu**

O sistema Comunitário para a monitorização e colheita de informação nos estados membros da União Europeia sobre agentes zoonóticos, resistência antimicrobiana e surtos de toxinfecção alimentar, é baseado na Directiva 2003/99/EC do Parlamento Europeu e do Conselho, sendo nela referida a obrigatoriedade para a reunião anual de dados relevantes e comparáveis nos temas acima citados. Os dados referentes a seres humanos são fornecidos pelos estados membros ao Centro de Prevenção e Controlo de Doenças (ECDC) que posteriormente os cede à EFSA. Esta entidade compila e publica anualmente os resultados do sistema de epidemiovigilância comunitário para as zoonoses sempre que possível, relacionando-os com os dados fornecidos pelo ECDC. Os dados fornecidos incluem os dos 27 estados membros e de 4 países europeus não pertencentes à União Europeia: Noruega, Suíça, Islândia e Liechtenstein.

A EFSA organiza os dados em 3 publicações, uma onde são compiladas as informações relativas às zoonoses e aos agentes zoonóticos, outra onde sumarizam as informações relativas aos surtos de toxinfecções alimentares e uma última onde se fala da resistência de agentes patogénicos a antibióticos. No ano de 2009 foram já publicados os dados referentes a zoonoses e a surtos de toxinfecção alimentar referentes aos dados de 2007, estando os dados referentes a resistência antimicrobiana ainda por publicar.

Nas publicações acima referidas, os dados apresentados pela EFSA para o nosso país são escassos a ausentes para a maior parte dos tópicos abordados. Não foram apresentados dados acerca dos casos de campilobacteriose reportados em humanos entre 2003 e 2007. Foram reportados dados referentes a *Campylobacter* spp. em carne de frango mas não em outro tipo de produto.

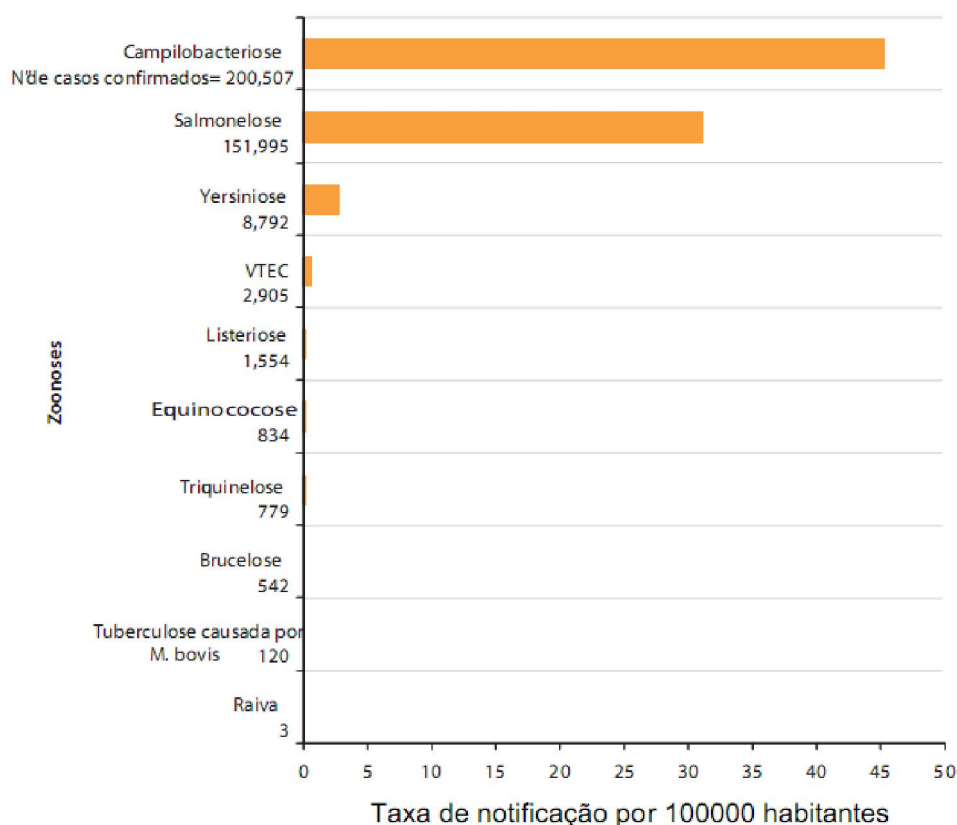
Os dados de diferentes países produzidos pela EFSA resultam de métodos de amostragem e de isolamento diferentes o que os tornam não comparáveis.

Segundo dados publicados pela EFSA em Janeiro de 2009 no documento *Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007*, em 2007 a infecção por *Campylobacter* spp. em humanos continua, à semelhança do que foi verificado em anos anteriores, a ser a zoonose mais frequentemente notificada no contexto da União Europeia (UE) e, de um modo geral, o número de notificações desta doença tem vindo a aumentar desde 2003. A salmonelose continua a ser em 2007, a segunda doença zoonótica

com maior número de notificações mas, ao contrário do que tem sido reportado para *Campylobacter* spp., nos últimos 4 anos, verificou-se uma tendência para a diminuição do número de casos reportados.

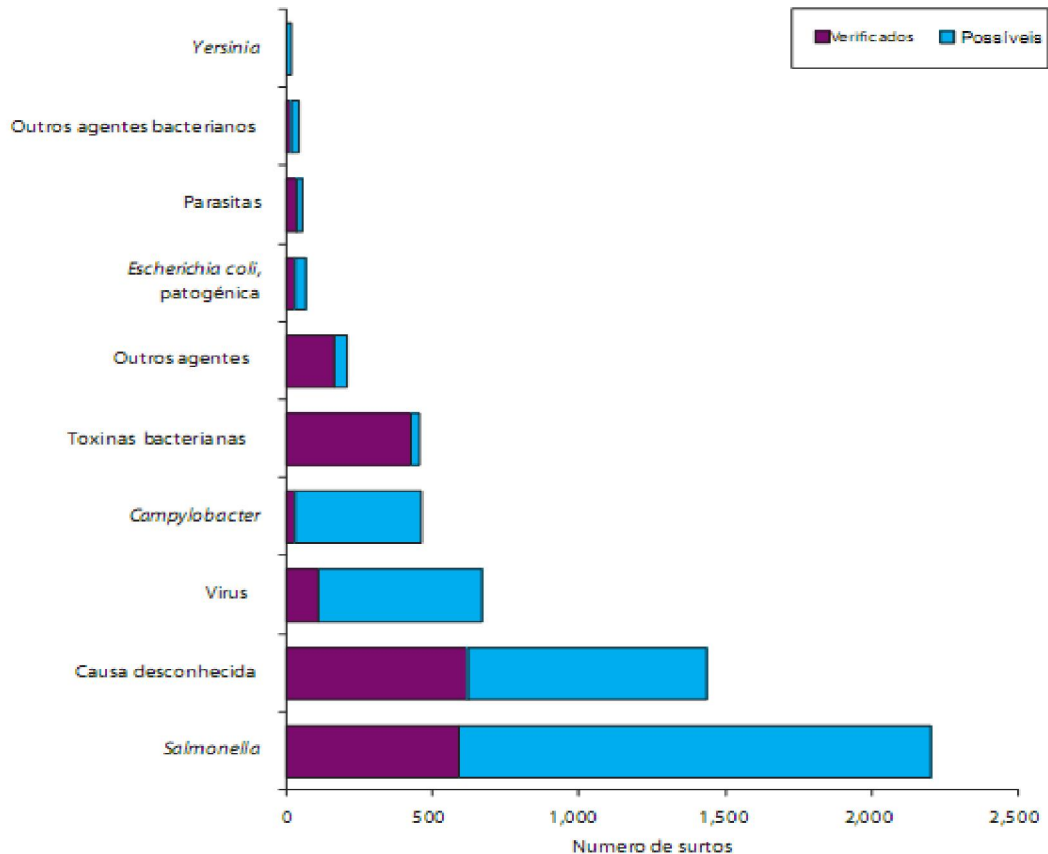
As Figuras 2 e 3 representam o enquadramento das infecções de *Campylobacter* spp. no homem e como agente etiológico de surtos de toxinfecções pelas seguintes publicações da EFSA de 2009 *The community summary report on food-borne outbreaks in the European Union in 2007* e *The community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in the European Union in 2007*.

**Figura 2 – Taxa de notificação de zoonoses em casos confirmados de humanos no contexto da UE durante o ano de 2007 (adaptado de: EFSA, 2009)**



Na publicação onde se discutem as principais causas de surtos de toxinfecção alimentar no contexto europeu, casos originados por *Salmonella* spp., por causa desconhecida ou com origem viral surgem à frente dos surtos provocados por *Campylobacter* spp. (EFSA, 2009). Em 2007, *Salmonella* spp. foi responsável por 39,2% de todos os surtos reportados (comprovados e suspeitos) com um decréscimo significativo desde 2006, onde figurava como responsável por 53,9% dos surtos reportados. Se tivermos somente em conta os casos confirmados, no contexto europeu, a *Salmonella* foi responsável por 29,1% dos surtos, enquanto que a *Campylobacter* spp. foi o agente etiológico de 8,2% de todos os surtos reportados e de 6,5% dos surtos confirmados.

**Figura 3 - Agentes etiológicos de surtos de toxinfecções alimentares no contexto da UE (Adaptado de: EFSA, 2009)**



Por outro lado, as infeções por *Campylobacter* spp. lideram o ranking de notificação de zoonoses em 2007 tal como pode ser observado na Figura 2. O diferente posicionamento das infeções causadas por *Campylobacter* spp. nos documentos referidos pode facilmente ser justificado pelo facto das infeções causadas por este microrganismo serem muito mais frequentes em casos isolados do que em surtos.

Como podemos observar na Tabela 1, de um modo geral, ao nível da União Europeia a notificação de casos confirmados de *Campylobacter* spp. tem vindo a aumentar desde 2003, tendo-se verificado um aumento significativo de 2006 para 2007. O ano de 2006 foi uma excepção, com a diminuição do número de casos confirmados reportados, em grande parte devido à diminuição dos casos reportados pela Alemanha e pela República Checa.

**Tabela 1 – Casos de campilobacteriose reportados em humanos entre 2003 e 2007 e taxas de notificação para o ano de 2007 (adaptado de EFSA, 2009)**

	Número de casos	Casos confirmados	Casos confirmados por 100.000 habitantes	Casos confirmados			
				2007	2006	2005	2004
<b>Total UE</b>	200889	200507	452	175561	195426	183479	139581

O aumento global das notificações desta toxinfecção alimentar pode ser explicado pelo aumento do número de estados membros a notificar esta patologia, como consequência do alargamento da União Europeia. Pensa-se também que este aumento seja devido ao aumento de notificação por ano de cada um dos estados membros. Este, por sua vez, poderá não estar relacionado com um efectivo aumento do número de casos de *Campylobacter* spp. em cada um dos países da EU, mas sim com uma consciencialização que advém em parte do aumento crescente do conhecimento em torno desta bactéria, dos síndromes pós infecção associados e dos níveis crescentes de antibiorresistência que se têm observado (EFSA, 2009).

Em 2007, e pela observação da Tabela 2, a EFSA refere que houve uma diminuição dos casos de campilobacteriose considerados importados assim como uma diminuição dos casos de origem desconhecida.

**Tabela 2- Distribuição do número de casos de campilobacteriose confirmados em humanos pela origem (domésticos/importados) no ano de 2007 (adaptado de EFSA, 2009)**

	Domésticos (%)	Importados (%)	Origem desconhecida (%)	Total (N)
<b>Total EU</b>	61,6	6,8	31,6	200507

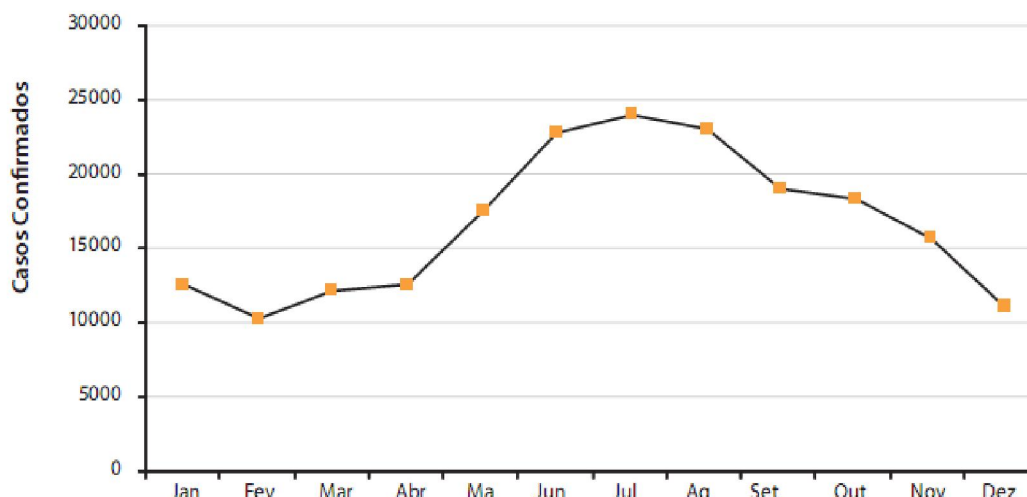
Já no que concerne aos casos domésticos, é referido um aumento significativo comparativamente ao observado em 2006. Países como a Suécia, Finlândia, Noruega e Islândia reportaram o maior número de casos de campilobacteriose com origem importada, isto é com origem em pacientes com nacionalidade sueca, finlandesa, norueguesa ou islandesa mas adquiridos fora do país de origem do doente (EFSA, 2009).

Apesar dos dados fornecidos pela EFSA serem alarmantes, sabe-se que existe ainda um grande número de casos que continua a não ser reportado uma vez que o quadro clínico de campilobacteriose é frequentemente moderado, não chegando os doentes a recorrer aos serviços dos profissionais de saúde. Crianças com menos de 5 anos têm as maiores taxas

de notificação quando comparados com outros níveis etários com cerca de 120 casos por cada 100000 habitantes (EFSA, 2009).

Relativamente à sazonalidade e tal como seria de esperar, os dados da EFSA referentes a 2007 (Figura 4) demonstraram que existe uma maior incidência de campilobacteriose nos meses de verão, de Junho a Agosto.

**Figura 4- Número de casos confirmados de campilobacteriose em humanos reportados por mês no ano de 2007 (adaptado de EFSA, 2009)**



Em 2007, a estirpe *C. jejuni* foi mais uma vez a estirpe mais isolada em casos de campilobacteriose ao nível dos estados membros (Tabela 3).

**Tabela 3- Distribuição dos isolamentos por estirpe de *Campylobacter* spp. em amostras de humanos no ano de 2007 (adaptado de EFSA, 2009)**

	<i>C. jejuni</i> (%)	<i>C. coli</i> (%)	Outras estirpes identificadas (%)	Estirpe desconhecida (%)
<b>Total EU</b>	44,3	2,7	6,9	46

Em géneros alimentícios, os dados obtidos pela EFSA em 2007 não alteram o que já tinha sido concluído em anos anteriores. Assim, a maior proporção de amostras contaminadas por *Campylobacter* spp. foi mais uma vez reportada em carne de frango fresca, com uma frequência de 26% em amostras de frango, obtida de resultados de contaminação que variavam entre 0 a 85%. O mesmo foi verificado em amostras de outro tipo de aves demonstrando que as mesmas podem também ser consideradas como um veículo de transmissão de *Campylobacter* spp. para seres humanos. Verificou-se mais uma vez em 2007 que a prevalência de *Campylobacter* spp. em frangos só diminui ligeiramente do animal vivo para a carcaça, havendo uma manutenção dos valores durante processamento e até à venda da carne ao consumidor final.

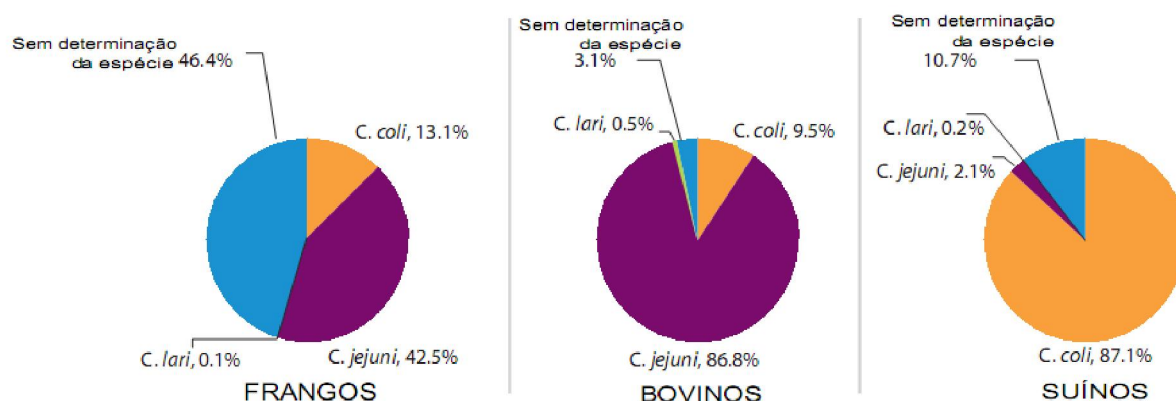
Em bovinos e em suínos não se verificou esta tendência de contaminação. Nestas amostras foram detectadas grandes teores de *Campylobacter* spp. ao nível do animal vivo mas verificou-se uma grande diminuição logo após o abate e, frequência de isolamento mantém-se baixa quando se fala de amostras de carne de bovino e de suíno prontas para consumo. Em 2007, a ocorrência de *Campylobacter* spp. em carne de porco fresca variou entre 0 a 1,1%. Isto sugere que tanto as carcaças de bovinos como as de suínos são menos contaminadas com material fecal ao nível de matadouro e/ou que as estirpes de *Campylobacter* spp. encontram condições para a sua sobrevivência desfavoráveis nas carcaças destes animais. Noutro tipo de fontes alimentares esta bactéria foi apenas ocasionalmente detectada (EFSA, 2007).

Ao nível das explorações, a frequência de *Campylobacter*spp. em populações de aves e suínos é elevada. Foram no entanto detectadas frequências mais baixas em bandos de frango criados em alguns países nórdicos e bálticos ficando a noção de que haverá métodos de produção que conseguiram diminuir a frequência deste agente ao nível da exploração. Pode também encontrar-se *Campylobacter* spp. em explorações de bovinos mas sempre com uma prevalência inferior à detectada em suínos e em aves (EFSA, 2007).

Vários estados membros testaram outro tipo de géneros alimentícios. Para o leite de vaca não pasteurizado a ocorrência de *Campylobacter*spp. foi baixa (< 1%) na generalidade das amostras testadas. Foram analisados vários tipos de pescado e nenhum deles se apresentou contaminado.

Nos dados apresentados pela EFSA, entre as amostras provenientes de animais a *C. jejuni* é claramente a estirpe com maior frequência de isolamento em frangos e em bovinos e a *C. coli* foi a estirpe mais isolada em suínos (Figura 5).

**Figura 5 - Distribuição das estirpes de *Campylobacter* isoladas em frangos, suínos e bovinos, 2007 (adaptado de EFSA zoonoses, 2009)**



O consumo de leite cru e de água contaminada têm sido identificados como os agentes causais de grandes surtos.

## **1.6 *Campylobacter*spp. caracterização do posicionamento Português**

A situação portuguesa no que diz respeito à prevalência e à antibiorresistência em estirpes de *Campylobacter* spp. não está completamente caracterizada. Existem poucos estudos e os seus resultados não são directamente comparáveis ou porque o método laboratorial escolhido foi diferente ou mesmo porque, apesar de serem relativos a *Campylobacter* spp., cada um tem um objectivo que não se cruza com o dos restantes. Os primeiros estudos conhecidos, realizados por Cabrita *et al.* (1992) relatam prevalências de 60,2% em 59 amostras de frango, 59,1% em 65 amostras de suínos e demonstraram resistências a vários antibióticos mais baixas do que as verificadas em estudos mais recentes realizados por Mena *et al.* (2008). Apesar de serem escassos os estudos verificou-se um aumento da percentagem de estirpes resistentes a vários antibióticos, assim como da frequência de *Campylobacter*spp. ao nível das explorações.

Outro estudo realizado em vários hospitais portugueses em 2008 por Vicente *et al.*, 2008 demonstrou uma grande percentagem de estirpes resistentes a 3 fluoroquinolonas testadas (ciprofloxacina 80,5%, moxifloxacina 51,2%, gatifloxacina 47,2%). Os autores observaram que das 123 amostras testadas 110 correspondiam a isolados de *C. jejuni* e 13 a isolados de *C. coli*, o que foi de encontro aos resultados apresentados noutros países.

Durante este último ano têm vindo a surgir vários estudos a nível nacional na sequência do disposto na Directiva 2003/99/CE, e o Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (LNIV), envolveu-se num estudo base sobre a vigilância harmonizada da prevalência de *Campylobacter* spp. e das resistências antimicrobianas das estirpes isoladas em bandos de frango na UE, a fim de ponderar a necessidade, a viabilidade, o custo e os benefícios de medidas de controlo a nível comunitário (Gomes, 2009).

## **1.7 *Campylobacter*spp. e resistência a antibióticos**

A resistência de vários tipos de bactérias patogénicas a agentes antimicrobianos frequentemente utilizados constitui uma problemática actual que é alvo de discussão tanto no contexto de medicina veterinária como no de medicina humana. A ocorrência de estirpes resistentes a um ou mais antibióticos tem vindo a reduzir a eficácia deste tipo de fármacos, limitando cada vez mais as opções terapêuticas no maneio de doenças infecto-contagiosas. As principais consequências do aparecimento de resistências em bactérias que causam doenças em humanos incluem o aumento da frequência de falhas terapêuticas e da severidade das infecções, o que pode ser manifestado pelo aumento da duração da doença, aumento do número de manifestações sistémicas, aumento dos casos que levam a hospitalização e ainda por um aumento da mortalidade.

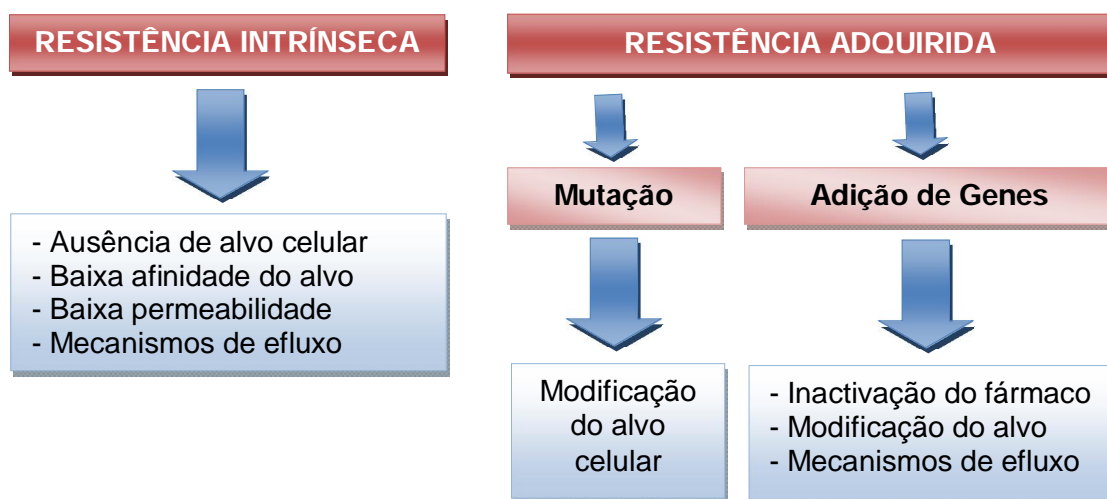
São necessárias 2 condições para que uma bactéria desenvolva resistência a antibióticos. Por um lado, o microrganismo tem que entrar em contacto com o antibiótico e por outro tem que desenvolver um mecanismo de resistência ao mesmo antibiótico e transmiti-lo ou às células que o rodeiam ou às células filhas afectando as gerações futuras.

Cada antibiótico possui o seu modo de actuação. Há antibióticos que têm como alvo a parede bacteriana (bacitracina, cefalosporinas e penicilinas), outros atingem a membrana celular (polimixinas), outros actuam sobre componentes que intervêm na síntese proteica (aminoglicosídeos, cloranfenicol, tetraciclínas), ou sobre o RNA (rifamicina), ou DNA (ácido nalidixico e quinolonas) ou ainda sobre algumas vias bioquímicas como a síntese de folato (sulfonamidas). Assim, quando surgem bactérias resistentes, estas normalmente possuem resistência para um grupo de antibióticos específico (Khachatourians, 1998).

De um modo geral, a rápida evolução da resistência antimicrobiana é uma resposta das bactérias às alterações dramáticas no seu ambiente introduzidas pelo uso de antibióticos (EFSA, 2005). As bactérias podem apresentar 2 tipos de resistência a antimicrobianos. Quando a resistência a antibióticos é inerente a determinada espécie de bactérias e é partilhada por todos os elementos dessa espécie é designada por resistência intrínseca ou resistência natural. Nestes casos, o mecanismo de resistência está relacionado com a baixa afinidade do antibiótico pelas moléculas alvo das bactérias, pela ausência de moléculas alvo, pela diminuição da entrada de antibiótico para a célula bacteriana ou pela acumulação ou efluxo do fármaco para o exterior da célula bacteriana. Por outro lado, quando uma estirpe é tipicamente susceptível a determinado grupo de antimicrobianos e deixa de o ser diz-se que a resistência é adquirida (EFSA, 2005).

Tal como pode ser visualizado na Figura 6, as bactérias partilham 3 tipos de mecanismos de resistência adquirida: a inactivação directa da molécula activa, perda da susceptibilidade bacteriana ao antibiótico por modificação do alvo de acção e a redução da concentração do fármaco que atinge a molécula alvo sem modificação do composto em si.

**Figura 6 – Mecanismos de resistência a antimicrobianos apresentados por bactérias (adaptado de EFSA, 2005)**



Apesar de ser razoável assumir que a transferência de genes de microrganismos viáveis ocorre para outros microrganismos em ambiente como o trato gastrointestinal, presume-se que a resistência intrínseca possui um potencial mínimo de transmissão horizontal, enquanto que a resistência adquirida mediada pela adição de genes é considerada como tendo um maior potencial de transmissão horizontal (EFSA, 2005).

As bactérias possuem vários mecanismos para transmitir a outras bactérias (da mesma espécie ou de espécie diferente) os genes que codificam para as resistências. Estes genes encontram-se em 2 locais específicos da célula bacteriana: no cromossoma e no material genético extra-cromossoma como plasmídeos e transposões (Khachatourians, 1998).

A resistência adquirida ocorre através da adição de genes (aquisição de genes pela bactéria através da incorporação de DNA exógeno) ou através da mutação dos genes bacterianos indígenas. As mutações cromossômicas podem resultar em resistência a antibióticos por vários mecanismos. As mais frequentes são as mutações em genes que codificam para as moléculas alvo dos antibióticos, geralmente alterando o local de ligação do antibiótico. Como exemplo deste tipo de mutações temos as que alteram o gene que codifica para o local de ligação das penicilinas o que resulta num elevado nível de resistência para as penicilinas, mutações nos genes que codificam para as subunidades 16S e 23S do rRNA tornando, por exemplo, *Helicobacter pylori* e *Streptococcus pneumoniae* resistentes, respectivamente, a tetraciclinas e eritromicina.

Mutações em regiões de genes reguladores podem vir a contribuir para a resistência a antimicrobianos levando à sobreprodução de determinantes intrínsecos de resistência como as bombas de efluxo ou mesmo do local de ligação do antibiótico. Este tipo de mutação pode levar à total inibição da acção do antibiótico sobre a bactéria.

De um modo geral, a aquisição de resistência por mutação de genes do cromossoma bacteriano representam um baixo nível de propagação horizontal.

A adição de genes ao genoma bacteriano surge como resultado da troca de material genético entre bactérias. Apesar dos mecanismos de resistência associados à adição de genes se traduzirem, na maioria dos casos, em modificações de origem enzimática que inactivam a molécula, como é o caso da produção de  $\beta$ -lactamases ou de acetiltransferases, essa adição pode codificar também para outros mecanismos como a modificação dos locais de ligação ou o efluxo do fármaco.

A presença de genes adicionados que codifiquem para resistência a antibióticos, particularmente quando têm origem em elementos genéticos móveis (plasmídeos), representam um potencial muito significativo para a disseminação horizontal de resistência a antibióticos (EFSA, 2005).

Existem vários mecanismos conhecidos para a transferência horizontal de genes de resistência a antibióticos. Estudos demonstram que a transferência horizontal de genes pode ser amplamente responsável pelas rápidas alterações das características ecológicas e patogênicas das estirpes bacterianas (Ochman, Lawrence & Groisman, 2000). A aquisição e a perda de grandes frações de material genético pode introduzir variabilidade no genoma bacteriano em muito pouco tempo. De entre os fragmentos de DNA capazes de serem transmitidos horizontalmente podemos referir plasmídeos, ilhas genômicas, bacteriófagos, assim como transposões e sequências de inserção (Velge *et al.*, 2005). Todos estes elementos genéticos móveis podem conferir vantagens ao microrganismo que deles puderem usufruir, principalmente em condições particulares de alteração do ambiente que o rodeia (Ochman *et al.*, 2000).

Tal como já foi referido, o desenvolvimento de resistência a um ou mais antibióticos surge como consequência da aquisição de material genético do exterior da célula ou, da mutação de um ou mais genes do genoma bacteriano. No entanto, são consideradas efectivas as alterações do material genético bacteriano que originam modificações metabólicas e/ou estruturais, capazes de tornar o microrganismo mais resistente ao grupo de agentes antimicrobianos que está a exercer pressão selectiva. Vários estudos realizados neste âmbito sugerem que o uso de antibióticos encoraja a selecção de estirpes resistentes e, ao mesmo tempo, a disseminação das resistências adquiridas entre as várias estirpes bacterianas permitindo o seu crescimento e multiplicação mesmo na presença de antibióticos (Aarestrup & Engberg, 2001; Khachatourians, 1998; Phillips *et al.*, 2004, Yan *et al.*, 2005).

Apesar da primeira suspeita relativa ao aparecimento de estirpes bacterianas resistentes a antibióticos em humanos recair sobre o uso, ou melhor, uso excessivo de antibióticos em medicina humana, rapidamente surgiu a necessidade de realizar estudos em animais onde se demonstrasse a existência de estirpes resistentes, e qual era o papel do uso de antibióticos em medicina veterinária no aparecimento das mesmas. Faltava a isto tudo relacionar as estirpes resistentes oriundas das explorações pecuárias com as isoladas em seres humanos não sendo possível fazer a mesma avaliação em géneros alimentícios de origem animal.

A área que estabelece a relação entre o uso de antibióticos em medicina veterinária e o efeito nas bactérias que contaminam alimentos na cadeia alimentar é muito complexa. Têm vindo a surgir vários estudos que evidenciam que o uso de antibióticos em animais, tanto como agentes terapêuticos como promotores de crescimento, leva a uma aumento do risco de ocorrerem transferências de populações de bactérias resistentes a antibióticos, provenientes dos animais de produção e capazes de resistir ao longo da comercialização dos géneros alimentícios de origem animal até entrarem em contacto com o ser humano,

colocando-o em risco de ser infectado por estas estirpes (Luangtongkum, 2006; MSFFG, 2007)

Até à publicação do Regulamento (CE) n.º1831/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 22 de Setembro de 2003, relativo aos aditivos destinados à alimentação animal, vários antibióticos eram administrados em explorações pecuárias como promotores de crescimento, isto é, eram continuamente adicionadas baixas concentrações destes fármacos ao alimento dos animais, permitindo aumentar o ganho de peso vivo diário e consequentemente a produtividade. Neste Regulamento esta prática foi sujeita a regras, uma vez que a partir de 1 de Janeiro de 2006, os antibióticos que não fossem coccidiostáticos não estariam autorizados para utilização como aditivos na alimentação animal.

Também a Directiva 2003/99/CE relativa à monitorização de zoonoses e agentes zoonóticos se refere à problemática da resistência a antimicrobianos. Esta Directiva obriga os estados membros da União Europeia a monitorizar a resistência antimicrobiana em agentes zoonóticos e em outros agentes no caso de ter sido comprovado que estes colocam em risco a saúde pública. Obriga ainda à monitorização da evolução da antibiorresistência para *Salmonella* spp., e para *Campylobacter* spp. em bovinos, suínos, aves e produtos destes derivados.

No caso das bactérias do género *Campylobacter* spp., há estirpes que são intrinsecamente resistentes a um determinado tipo de antibiótico e outras que adquirem essa resistência através de mutações ou aquisição de genes que codificam vários tipos de mecanismos de resistência a antimicrobianos. *C. coli* e *C. jejuni* eram, até há alguns anos atrás, caracterizadas por serem invariavelmente susceptíveis ao ácido nalidíxico, um antibiótico pertencente ao grupo das fluoroquinolonas, sendo esta característica muitas vezes utilizada a nível laboratorial para caracterizar este tipo de bactérias (Aarestrup & Engberg, 2001). No entanto, a resistência a antibióticos, nomeadamente às fluoroquinolonas tem vindo a aumentar nos últimos anos. Aarestrup & Engberg (2001) reportaram o isolamento de estirpes resistentes a vários grupos de antibióticos mas, os resultados que obtiveram especificamente para o grupo das fluoroquinolonas foram alarmantes.

Desde os anos 80 que na Europa são reportados casos de resistência a antibióticos em *C. jejuni*. Estudos de vários países demonstraram uma relação entre a aprovação do uso de fluoroquinolonas em animais de produção e o desenvolvimento de resistência a fluoroquinolonas em *Campylobacter* spp. isolados de animais e de seres humanos (MSFFG, 2008; Aarestrup & Engberg, 2001).

Surgiu na Holanda o primeiro estudo onde se documentou a ligação entre o uso veterinário de fluoroquinolonas e o aparecimento de estirpes de *Campylobacter* spp. resistentes tanto em animais como em seres humanos (Aarestrup & Engberg, 2001). Neste país, iniciou-se em 1987 a utilização de enrofloxacin na produção animal. Enquanto que,

entre 1982 e 1983, não foram detectadas resistências a fluoroquinolonas em estirpes provenientes de frangos, em igual período e em 1985 também não foram isoladas estirpes resistentes em humanos. Em 1987/1988 surgiram os primeiros estudos onde se reportavam percentagens de estirpes resistentes na ordem dos 8,7% isoladas em amostras provenientes de frangos. Estes resultados foram sendo seguidos de perto e, das amostras de frango analisadas, em 1989, 14% das estirpes isoladas demonstravam resistência às fluoroquinolonas. Três anos mais tarde surgiram já frequências de 29%. A emergência e aumento das estirpes resistentes isoladas em produtos alimentares avícolas e broilers foi seguida pela emergência e subsequente aumento das estirpes resistentes isoladas em humanos: 8% em 1988, 11% em 1989 e 29% em 1997 (Aarestrup & Engberg, 2001). Esta tendência foi também verificada em países como Áustria, Dinamarca, Finlândia, França, Itália, Espanha, Tailândia, Reino Unido e Estados Unidos da América.

A ideia de que a resistência a fluoroquinolonas tem vindo a aumentar entre os animais de produção, como consequência do uso deste tipo de antibióticos nas explorações pecuárias, é uma realidade. As estirpes resistentes presentes nos géneros alimentícios com origem nestes animais podem entrar em contacto com o ser humano, provocando infecções cujo tratamento poderá ser dificultado.

O aparecimento de resistências em estirpes de *Campylobacter* spp. a antibióticos do grupo dos macrólidos foi reportado por vários autores (Aarestrup & Engberg, 2001; Engberg *et al.*, 2001; MSFFG, 2007; Yan *et al.*, 2005). Foram detectados níveis mais elevados de resistência para estes antibióticos em estirpes de *C. coli* isoladas de suínos. As estirpes isoladas de humanos demonstraram o mesmo tipo de resistência. Os motivos associados ao aparecimento desta resistência antimicrobiana ainda não estão bem esclarecidos, no entanto, pensa-se que poderão estar associados com a existência de uma frequência de mutação muito superior em estirpes de *C. coli*, quando comparada com a de *C. jejuni*, ou com a elevada pressão selectiva exercida pelo uso excessivo deste tipo de antibióticos nas explorações, nomeadamente nas suiniculturas onde a frequência de isolamento de *C. coli* é muito superior à de *C. jejuni* (Aarestrup & Engberg, 2001). De facto, nas suiniculturas um pouco por todo o mundo foi prática comum utilizar a tilosina tanto como promotor de crescimento como agente terapêutico. A sua utilização indiscriminada poderá estar relacionada com o aparecimento da resistência a macrólidos que se tem vindo a observar em estirpes de *Campylobacter* spp. (Aarestrup & Engberg, 2001).

Relativamente às resistências apresentadas pelas estirpes de *Campylobacter* spp. sabe-se que a sua ocorrência é geralmente maior para *C. coli* do que para *C. jejuni* particularmente para macrólidos (Aarestrup & Engberg, 2001; Engberg *et al.*, 2001; MSFFG, 2007; Yan *et al.*, 2005). No que concerne aos vários grupos de antibióticos, é consensual que, entre as estirpes destas bactérias, a percentagem de resistência a macrólidos e fluoroquinolonas é elevada e que o mesmo acontece com os -lactâmicos, trimetoprim e

sulfonamidas, enquanto que para outros antibióticos como as tetraciclinas, aminoglicosídeos e cloranfenicol a percentagem de estirpes resistentes é relativamente baixa (Aarestrup & Engberg, 2001; Engberg *et al.*, 2001; MSFFG, 2007; Yan *et al.*, 2005).

### 1.7.1 Resistência a fluoroquinolonas

As fluoroquinolonas são classificadas em 4 gerações de modo a definir o seu espectro de acção. As quinolonas de segunda geração, designadas por fluoroquinolonas têm origem nas quinolonas de primeira geração e têm uma acção mais efectiva que as de primeira geração sobre bactérias Gram-negativas. O seu modo de actuação baseia-se na inibição de 2 das enzimas envolvidas na síntese de DNA bacteriano: a DNA girase e topoisomerase IV (Lambert, 2005).

Existem 3 mecanismos que podem conferir o fenótipo de resistência a fluoroquinolonas em bactérias Gram-negativas: mutações no local de ligação do antibiótico; redução da acumulação do antibiótico no interior da célula bacteriana (ou por diminuição da permeabilidade da membrana externa ou por aumento do efluxo do fármaco) e pela protecção do alvo do antibiótico mediada por uma proteína *Qnr*. O gene *qnr* que tem origem em plasmídeos confere baixo nível de resistência para fluoroquinolonas mas não está descrito para estirpes de *Campylobacter*spp. (Payot *et al.*, 2006).

Em bactérias Gram-negativas, a DNA girase (também conhecida como topoisomerase II) e a topoisomerase IV são, respectivamente, os alvos primário e secundário das fluoroquinolonas. Estas enzimas são estruturas proteicas quaternárias de grandes dimensões e são constituídas por 2 pares de 2 subunidades GyrA e GyrB, no caso da DNA girase e, por 2 pares das 2 subunidades ParC e ParE para o caso da topoisomerase IV. A resistência às fluoroquinolonas surge pela substituição de aminoácidos nas topoisomerasas, nomeadamente no local de ligação das fluoroquinolonas, designado na bibliografia por QRDR (*quinolone resistance determining region*). Para que uma estirpe bacteriana se torne resistente a fluoroquinolonas basta uma mutação no gene que codifica para uma das subunidades das topoisomerasas II e IV, no entanto, mutações adicionais no gene que codifica para *gyrA*, *gyrB* ou *parC* podem ir aumentando o nível de resistência da estirpe. No caso das estirpes de *Campylobacter* spp., o alvo secundário das fluoroquinolonas (topoisomerase IV) parece estar ausente. Esta ausência leva a que, tanto para *C. jejuni* como para *C. coli*, uma mutação no QRDR da subunidade GyrA seja suficiente para conferir o fenótipo resistente a fluoroquinolonas (Luangtongkum *et al.*, 2009; Payot *et al.*, 2006). Até ao momento, não foram encontradas em estirpes de *Campylobacter* spp. mutações nos genes que codificam para a subunidade GyrB que confirmam resistência a fluoroquinolonas. Como já foi referido, os genes que codificam para a topoisomerase IV (*parC/parE*) estão também envolvidos na resistência a fluoroquinolonas, mas estes genes não estão presentes nas estirpes de *Campylobacter* spp. e como tal não têm nenhum papel na aquisição de

resistência neste tipo de microrganismo (Luangtongkum *et al.*, 2009). Isto implica que, ao contrário do que acontece com outras estirpes bacterianas (como *Salmonella* ou *Escherichia coli*) onde a aquisição de elevados níveis de resistência a fluoroquinolonas só é possível após a acumulação de mutações nos genes *gyrA* e *parC*, em estirpes de *Campylobacter* spp. basta uma mutação ao nível do gene que codifica para QRDR da GyrA para reduzir susceptibilidade da estirpe às fluoroquinolonas.

A modificação da permeabilidade da membrana externa como um mecanismo de resistência a fluoroquinolonas ainda não foi descrita para *Campylobacter* spp. No entanto, um sistema de efluxo, o sistema CmeABC, que confere resistência intrínseca a múltiplos antibióticos (incluindo fluoroquinolonas, eritromicina, ampicilina, tetraciclina e cloranfenicol), desinfetantes e corantes (incluindo o brometo de etídio) tem vindo a ser caracterizado por vários autores neste género de bactérias. O operão *cmeABC* está amplamente distribuído em diferentes estirpes de *Campylobacter* spp. e é expresso constitutivamente nas estirpes selvagens. Esta bomba de efluxo actua em sinergia com a mutação no gene *gyrA* para conferir alto nível de resistência a fluoroquinolonas. Foi caracterizado o regulador de transcrição *CmeR* da bomba de efluxo CmeABC que actua como um repressor. Uma mutação deste gene regulador leva a uma sobreexpressão da bomba de efluxo CmeABC originando altos níveis de resistência a fluoroquinolonas, bastando apenas a deleção de um único nucleótido. Resta salientar que os isolados com uma sobreexpressão da bomba de efluxo CmeABC acumulam menos fluoroquinolona no seu citoplasma. (Alfredson & Korolik, 2007; Belanger & Shryock, 2007; Quinn *et al.*, 2007; Luangtongkum *et al.*, 2009).

Todos os determinantes de resistência a fluoroquinolonas em estirpes de *Campylobacter* spp. são codificados ao nível do cromossoma. Determinantes de resistência a este grupo de antibióticos mediados por plasmídeos não foram reportados neste género de bactérias (Luangtongkum *et al.*, 2009).

As fluoroquinolonas inibem a actividade da DNA girase e, na maior parte das estirpes bacterianas a resistência é devida a mutações nos genes que codificam para esta enzima ou dos genes que codificam para a topoisomerase IV. No caso das estirpes de *Campylobacter* spp., a resistência parece ser devida principalmente a mutações do gene *gyrA* que codifica parte da subunidade A da DNA girase. Estudos demonstraram que as mutações no gene *gyrA* nas posições Thr-86, Asp-90 e Ala-70 poderão ser responsáveis pela resistência (Aarestrup & Engberg, 2001; Yan *et al.*, 2005).

A utilização de fluoroquinolonas ou como agente terapêutico ou como promotor de crescimento actua como uma pressão selectiva que tende a aumentar o aparecimento de estirpes de *Campylobacter* spp. resistentes. No entanto, a não utilização deste tipo de antibióticos não leva à extinção destas estirpes, que podem continuar a competir com as estirpes não resistentes permanecendo a sua população estável (Luangtongkum, 2006).

### 1.7.2 Resistência a macrólidos

Os macrólidos inibem o crescimento microbiano através da inibição da síntese proteica que é provocada pela ligação destes antibióticos à subunidade 50S dos ribossomas bacterianos, impedindo, somente pelo bloqueio físico provocado pela sua presença, a alongação das cadeias polipeptídicas que estão a ser transcritas uma vez que provoca a libertação precoce do peptidil-tRNA ao nível do túnel de entrada do ribossoma (Payot *et al.*, 2006; Belanger & Shryock, 2007).

A resistência de bactérias a este tipo de antibióticos pode estar relacionada com os seguintes mecanismos: modificação do antibiótico (por hidrólise do anel lactona do macrólido); modificação do local de ligação do antibiótico por mutação ou metilação e efluxo do antimicrobiano para o exterior da célula microbiana. A modificação do antibiótico ocorre por actividade de esterases e/ou fosfotransferases e foi identificada em *Staphylococci*. Para bactérias do género *Campylobacter* spp. somente os últimos 2 mecanismos foram descritos (Aarestrup & Engberg, 2001; Yan *et al.*, 2005; Payot *et al.*, 2006).

A modificação do local de ligação dos macrólidos pode ser realizada através de metilação mediada por enzimas codificadas nos genes *erm* (*erythromycin ribosome methylase*) ou através de mutação de genes que codificam para o referido local de ligação dos macrólidos. Este último mecanismo é mais frequentemente verificado em microrganismos e as estirpes de *Campylobacter* spp. utilizam-no em detrimento da metilação dos locais de ligação dos macrólidos (Payot *et al.*, 2006). O local de ligação dos macrólidos ao nível da subunidade 50S do ribossoma é constituído por porções de rRNA proveniente da subunidade 23S e por 2 proteínas ribossomais designadas por L4 e L22 que formam parte do túnel de saída da cadeia polipeptídica em formação (Payot *et al.*, 2006; Alfredson & Korolik, 2007; Luangtongkum *et al.*, 2009). Assim, as bactérias adquirem resistência a este grupo de antibióticos quando os genes que codificam para o local de ligação dos macrólidos ao nível da subunidade 50S do ribossoma bacteriano sofrem uma mutação que impeça a ligação dos mesmos. Nas estirpes de *Campylobacter* spp., mutações no gene que codifica para a região peptidiltransferase do domínio V da subunidade 23S do rRNA ao nível dos nucleótidos 2074 e 2075 têm um papel importante no desenvolvimento de altos níveis de resistência a macrólidos (Concentrações mínimas inibitórias (MIC) 128mg/L). (Belanger & Shryock, 2007; Gibreel & Taylor, 2006; Alfredson & Korolik, 2007; Luangtongkum *et al.*, 2009). Cerca de 78 a 100% dos isolados resistentes alojam a mutação A2075G, nos restantes casos a mutação A2074C é a mais frequentemente encontrada. Em bactérias que contenham mais do que um gene que codifica para a subunidade 23S do rRNA, o nível de resistência a macrólidos fica dependente do número de alelos mutantes. No caso das estirpes de *Campylobacter* spp. que contêm 3 genes que codificam para a subunidade 23S do rRNA há também indicações de que o número de alelos mutantes influencia a MIC. É sabido que a maior parte dos isolados clínicos de *Campylobacter* spp.

com elevados níveis de resistência a macrólidos contêm 3 cópias do alelo mutado. (Belanger & Shryock, 2007)

Em algumas estirpes bacterianas, mutações nos genes que codificam para as proteínas ribossomais L4 e L22 que afectam também a ligação dos macrólidos à subunidade 50S do ribossoma podem vir a originar fenótipos resistentes. As mutações mais significativas nestas proteínas são as que afectam os aminoácidos das posições 63 a 74 da proteína L4 e as modificações da extremidade C da *-hairpin* (ou unidade beta-beta) da proteína L22. Algumas das estirpes de *Campylobacter* spp. resistentes a macrólidos que contêm mutações ao nível do gene que codifica para o rRNA da subunidade 23S contêm também mutações ao nível dos genes que codificam para as proteínas ribossomais L4 e L22, no entanto, estas mutações parecem não estar relacionadas com o fenótipo resistente a macrólidos uma vez que foi demonstrado que muitas das mutações encontradas nos genes que codificam para estas proteínas não têm repercussão nos locais de ligação dos macrólidos e estas mutações foram encontradas em algumas estirpes que apresentavam resistência a macrólidos mas também em estirpes não resistentes (Payot *et al.*, 2006; Belanger & Shryock, 2007).

O local de ligação dos macrólidos ao nível do ribossoma bacteriano coincide com o local de ligação de outros antibióticos, nomeadamente lincosamida e estreptogramina B e a modificação do local de ligação destes antibióticos pode originar o fenótipo MLS<sub>B</sub> que implica resistência aos 3 tipos de antibióticos citados. Em estirpes de *Campylobacter* spp., as mutações que conferem resistência para macrólidos, conferem resistência para lincosamidas mas não para as estreptogramina B, uma vez que este género de bactérias é intrinsecamente resistente a este antibiótico. Esta resistência cruzada que se verifica em *Campylobacter* spp. para macrólidos e lincosamidas permite depreender que o uso de um destes antibióticos poderá originar resistência ao outro. Neste contexto, a prevalência de estirpes de *Campylobacter* spp. resistentes isoladas do trato gastrointestinal de animais de produção poderá ser o resultado tanto do uso de macrólidos como do uso de lincosamidas. No entanto, a extensão com que isto acontece está dependente da espécie e do tempo durante o qual o antibiótico é usado. (Belanger & Shryock, 2007)

A bomba de efluxo da família CmeABC que é indicada na bibliografia como estando envolvida tanto na resistência adquirida como na intrínseca a fluoroquinolonas, inclui muitas vezes macrólidos no grupo de fármacos que é capaz de retirar do interior da célula bacteriana. (Payot *et al.*, 2006; Belanger & Shryock, 2007). Um estudo refere que o bloqueio desta bomba de efluxo torna a estirpe de *Campylobacter* spp. testada susceptível a macrólidos, indicando isto que, neste género de bactérias, a bomba de efluxo poderá ter um papel importante na resistência a este tipo de antibióticos (Payot *et al.*, 2006). No que diz respeito especificamente à eritromicina, um aumento da expressão deste tipo de bomba de efluxo confere baixos níveis de resistência em *Campylobacter* spp. (MIC 8-16mg/L). Em

isolados de *Campylobacter* spp. com altos níveis de resistência para macrólidos o aumento da expressão de bombas de efluxo relacionado com mutações nos genes que codificam para o rRNA da subunidade 23S revelaram um aumento das MICs de macrólidos. Apesar de existirem alguns dados, o papel das bombas de efluxo na resistência a macrólidos em estirpes de *Campylobacter* spp. está ainda para ser completamente esclarecida. Sabe-se já que em estirpes altamente resistentes que possuam tanto alterações ribossômicas como um aumento do efluxo dos macrólidos, é efectivamente a mutação ao nível do gene que codifica para a subunidade 23S do rRNA que é responsável pelo fenótipo de resistência, uma vez que a inibição química do efluxo nestas estirpes acaba por diminuir a MIC mas não é capaz de restaurar a susceptibilidade (Payot *et al.*, 2006; Belanger & Shryock, 2007). Isto demonstra que a bomba de efluxo actua em sinergia com a mutação ao nível do gene que codifica para a subunidade 23S do rRNA para conferir um elevado nível de resistência a macrólidos. Estudos genéticos realizados (por MLST *multilocus sequence typing* e por AFLP *amplified fragment length polymorphism*) referem que podem existir reservatórios de *Campylobacter* spp. resistentes a macrólidos, independentes das fontes animais mais conhecidas. Pensa-se que a transmissão de humano para humano de estirpes *Campylobacter* spp. resistentes a macrólidos e de estirpes susceptíveis existe e que ocorre com uma frequência maior do que seria de esperar. (Belanger & Shryock, 2007)

### **1.7.3 Resistência ao cloranfenicol**

A resistência de estirpes bacterianas ao cloranfenicol é normalmente mediada pela formação de enzimas que adicionam um grupo acetil ao antibiótico impedindo a sua ligação ao ribossoma bacteriano. A formação desta enzima está associada à presença de um gene *cat* (cloranfenicol acetiltransferase). Actualmente a resistência ao cloranfenicol ainda não está difundida entre estirpes de *Campylobacter* spp. (Aarestrup & Engberg, 2001)

### **1.7.4 Resistência a sulfonamidas**

As sulfonamidas são análogos estruturais do ácido p-aminobenzoico (PABA) e competem com este na utilização da enzima dihidropteroato sintetase (DHPS) impedindo que o PABA seja incorporada no ácido fólico (Aarestrup & Engberg, 2001).

A resistência às sulfonamidas em bactérias Gram-negativas é normalmente devida à aquisição de uma variante da DHPS resistente a fármacos por transferência horizontal (plasmídeo R) entre bactérias. A resistência de *C. jejuni* a sulfonamidas está associada à substituição mutacional de 4 resíduos de aminoácidos na DHPS, resultando na diminuição da afinidade para este tipo de antibiótico (Aarestrup & Engberg, 2001; Yan *et al.*, 2005)

### **1.7.5 Resistência a tetraciclinas**

A resistência às tetraciclinas poderá ser mediada por 4 mecanismos: efluxo do fármaco para o exterior da bactéria, modificação das tetraciclinas, alteração do local de ligação deste antibiótico e mutação da subunidade 16S do rDNA. No entanto, a resistência às tetraciclinas em estirpes de *Campylobacter* spp. é conferida pelo gene *tet(O)*, que está

presente na maior parte dos isolados desta bactéria de animais de produção. O gene *tet(O)* codifica para uma proteína de protecção ribossomal que reconhece a abertura A do ribossoma bacteriano e se liga a este, de tal modo que induz uma alteração da conformação que resulta na libertação da molécula de tetraciclina que se encontrava aqui ligada. Esta alteração da conformação do ribossoma mantém-se por um largo período de tempo permitindo que a etapa de alongação da cadeia polipeptídica continue sem interrupções (Mazi *et al.*, 2008, Luangtongkum *et al.*, 2009). O gene *tet(O)* foi estudado utilizando várias técnicas moleculares e atendendo à sua constituição pensa-se que tenha sido adquirido por transferência horizontal de bactérias como *Enterococci*, *Streptococci* e *Streptomyces* spp. sugerindo que este gene terá tido origem em bactérias Gram positivas (Aarestrup & Engberg, 2001; Luangtongkum *et al.*, 2009). Na maior parte das estirpes de *Campylobacter* spp. o gene *tet(O)* é codificado em plasmídeos, mas foram já detectadas estirpes onde uma cópia do gene se encontrava no cromossoma. A resistência a tetraciclina em *C. jejuni* está também associada a bomba de efluxo CmeABC (Luangtongkum *et al.*, 2009).

#### **1.7.6 Resistência ao trimetoprim**

A actuação do trimetoprim baseia-se na ligação e inibição da enzima dihidrofolato reductase. A resistência a este antibiótico é devida à aquisição de genes *dfr* originários de transferência horizontal que não são inibidos pelo trimetoprim.

Em estirpes de *Campylobacter* spp. foram detectados 2 tipos de genes que são considerados responsáveis por mediar a resistência às tetraciclina (*dfr1* e *dfr9*). Estes genes foram encontrados no cromossoma das bactérias tanto em transposões como em integrões. Tanto a *dfr1* como a *dfr9* foram encontradas em bactérias Gram-negativas, principalmente em *Enterobacteriaceae* indicando que estirpes de *Campylobacter* spp. podem adquirir genes através deste grupo de bactérias. (Aarestrup & Engberg, 2001)

#### **1.7.7 Resistência a aminoglicosídeos**

A resistência de *Campylobacter* spp. a aminoglicosídeos está relacionada com a produção de 3 tipos de enzimas: aminoglicosídeo fosfotransferase, aminoglicosídeo adeniltransferase ou aminoglicosídeo acetiltransferase que são codificadas em vários genes deste microrganismo. Estes genes são adquiridos por transferência horizontal entre bactérias (Aarestrup & Engberg, 2001; Yan *et al.*, 2005).

#### **1.7.8 Resistência a $\beta$ -lactâmicos**

Algumas estirpes pertencentes ao género *Campylobacter* spp. são intrinsecamente resistentes a alguns antimicrobianos, como é o caso dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, penicilinas e cefalosporinas. A produção de  $\beta$ -lactamases por algumas destas estirpes permite que a fragmentação do anel  $\beta$ -lactâmico impeça o efeito letal do antibiótico sobre a bactéria (Yan *et al.*, 2005). Além da produção das enzimas  $\beta$ -lactamases, outros mecanismos de resistência como a alteração das proteínas de ligação das penicilinas e a impermeabilidade da bactéria, poderão ser responsáveis pelo aparecimento de estirpes

resistentes a este grupo de antibióticos. No entanto, a produção de  $\beta$ -lactamases parece ser responsável pela resistência das estirpes a antibióticos como amoxicilina, ampicilina e ticarcilina.

No caso da penicilina G, piperacilina e cefalosporinas, o mecanismo de resistência apresentado pelas *C. coli* e *C. jejuni* é primariamente dependente da capacidade que estes antibióticos têm em se ligar às proteínas de ligação das penicilinas e a sua baixa permeabilidade (Aarestrup & Engberg, 2001; Yan *et al.*, 2005).

As estirpes de *Campylobacter* spp. apresentam elevados níveis de resistência principalmente para antibióticos do grupo das fluoroquinolonas, dos macrólidos e também para antibióticos como a vancomicina, rifampin, trimetoprim, amoxicilina, ampicilina, metronidazol, cefalosporinas e tetraciclina (Aarestrup & Engberg, 2001; Allos, 2001). Para aminoglicosídeos e cloranfenicol, a frequência de aparecimento de estirpes resistentes é no geral baixa (Aarestrup & Engberg, 2001). Sabe-se que a resistência a macrólidos e a fluoroquinolonas é mediada por mutações cromossômicas e não por genes adquiridos por transmissão horizontal o que poderá indicar que as estirpes de *Campylobacter* spp. não possuem em grande extensão genes de resistência adquiridos horizontalmente de outras bactérias. No entanto, a possibilidade de aquisição horizontal de material genético de outras bactérias existe e vários autores já identificaram genes pertencentes às bactérias *Campylobacter* spp., os quais existem naturalmente em outras estirpes de bactérias tanto Gram-positivas como Gram-negativas.

Em *C. jejuni* e *C. coli* os mecanismos de resistência mais frequentemente reportados para fluoroquinolonas e macrólidos são, respectivamente, a mutação no gene *gyrA* e a mutação no gene que codifica para a subunidade 23S do rRNA. Sabe-se no entanto que o efluxo de antibióticos para o exterior da célula mediado pelo sistema CmeABC também é utilizado por algumas estirpes de *Campylobacter* spp. e que pode agir em sinergia com as mutações acima referidas para conferir um elevado nível de resistência a fluoroquinolonas e a macrólidos. A sobreexpressão deste sistema de efluxo pode conferir à *Campylobacter* spp. um fenótipo de multirresistência e mutações associadas com esta sobreexpressão são designadas no repressor e na região operador do mesmo repressor. Para além dos mecanismos de resistência em estirpes de *Campylobacter* spp. acima referidos existem outro tipo de mutações e de sistemas de efluxo capazes de contribuir para o fenótipo de resistência a vários antibióticos, no entanto, necessitam de ser melhor caracterizados em estudos futuros.

#### **1.7.9 Multirresistência**

O aparecimento de estirpes multirresistentes, nomeadamente de bactérias Gram-negativas, constitui actualmente uma problemática muito discutida em medicina humana. Vários mecanismos têm vindo a ser considerados responsáveis pela multirresistência

apresentada por várias estirpes bacterianas, no entanto, uma família de 3 sistemas de efluxo pouco selectivos, têm vindo a ser reconhecidos como determinantes tanto para a apresentação de multirresistência intrínseca como adquirida nestes microrganismos (Poole, 2004)

Tipicamente a multirresistência resulta da acumulação de múltiplas mutações solitárias e/ou de genes que codificam para resistências (integrões), no entanto, estados de crescimento específicos como os biofilmes e mutações solitárias que originam directamente alterações na membrana celular externa ou expressão directa do sistema de efluxo de fármacos, podem também dar origem à expressão fenotípica de multirresistência (Poole, 2004)

Dada a grande quantidade de substratos com que estes sistemas de efluxo são capazes de lidar, é possível que estes sejam capazes de eliminar do interior da célula bacteriana antibióticos que ainda nem sequer foram descobertos. Neste sentido, o futuro da terapêutica antimicrobiana terá que ser dirigida para este sistema de efluxo sob pena de se esgotarem alternativas terapêuticas que poderão nunca atingir as concentrações ideais no citoplasma bacteriano de modo a ter efeito.

### **1.8 Métodos para isolamento e identificação de *Campylobacter* spp.**

Em mamíferos e aves, a detecção de colonização intestinal por *Campylobacter* spp. é baseada no isolamento do microrganismo nas fezes, zaragoas rectais e/ou conteúdos do ceco (OIE, 2008). A utilização de antibióticos selectivos no agar é necessária para permitir o seu isolamento neste tipo de amostras. Um método alternativo ao apresentado, que explorando a motilidade que caracteriza as estirpes de *Campylobacter* spp., é a técnica de filtração. Técnicas que contemplem o enriquecimento não são rotineiramente utilizadas para fazer isolamento de amostras fecais. Uma confirmação preliminar pode ser realizada recorrendo ao microscópio óptico, onde podem ser observados microrganismos pequenos em forma de S, se forem observados na sua fase de crescimento logarítmica, enquanto que em colónias já envelhecidas são observadas predominantemente formas cocoides. (OIE, 2008). Observando este microrganismo em microscópio de contraste de fase, podem ser observados os movimentos em espiral que a caracterizam. A identificação fenotípica é baseada em reacções de crescimento sob diferentes condições. Podem também ser utilizados testes bioquímicos e moleculares para caracterizar a estirpe até ao nível da espécie. Para a determinação directa ao nível da espécie, *C. jejuni* ou *C. coli*, pode recorrer-se a variantes da técnica de PCR. Os testes serológicos não são utilizados por rotina para detectar a colonização por estes microrganismos (OIE, 2008).

Existem 2 procedimentos ISO (*International Organization for Standardization*) para detecção de *Campylobacter* spp.: o método horizontal para detecção de *Campylobacter* spp.

termotolerante em alimentos para animais e para humanos e método de isolamento deste microrganismo em águas.

### **1.8.1 Isolamento de *Campylobacter* spp.**

O isolamento de *Campylobacter* spp. pode ser realizado utilizando meios de cultura selectivos ou o método de filtração passiva. Para o isolamento de *Campylobacter* spp. de amostras fecais, cecais ou intestinais não há necessidade de realizar nenhum pré-tratamento. As amostras podem simplesmente ser semeadas num meio selectivo ou num meio não selectivo quando se utiliza o método de filtração. O enriquecimento está recomendado quando é necessário aumentar a sensibilidade do método e geralmente é utilizado em amostras de animais que apresentam baixas quantidades deste microrganismo nas fezes (bovinos, suínos, ovinos) ou quando se pretende isolar este microrganismo em amostras onde se considere que possa ter estado sujeito a condições ambientais stressantes (alimentos e condições de refrigeração). A enumeração de *Campylobacter* spp. pode depois ser realizada tanto pelo método do número mais provável como através da contagem directa em placa.

Estão descritos na literatura vários meios de cultura para *Campylobacter* spp. Estes meios podem ser divididos em 2 grupos: os que contêm sangue e os que contêm carvão. Estes componentes, carvão e sangue, são utilizados para remover os derivados tóxicos de oxigénio, uma vez que as bactérias do género *Campylobacter* spp. são sensíveis ao peróxido de hidrogénio e aos aniões super óxido produzidos nos meios de cultura. Os meios utilizados são muitas vezes suplementados com antibióticos, geralmente cefalosporinas, vancomicina ou trimetoprim, e com antifúngicos (ciclohexemida ou anfotericina B) (OIE, 2008).

A utilização do método de filtração pressupõe a mistura da amostra com um meio não selectivo, como o peptone broth suspension, numa diluição de 1:10 de modo a obter uma suspensão. 100µl dessa suspensão deverão ser filtrados num filtro de malha de 0.45 a 0.65µm, durante 30 a 45 minutos a 37°C. O filtrado obtido é depois semeado e incubado em atmosfera microaeróbia a 42°C.

### **1.8.2 Incubação**

Os requisitos para que o crescimento de *Campylobacter* spp. seja optimizado incluem:

#### **i. Atmosfera**

Atmosfera contendo ambiente microaeróbio (5-10% de oxigénio e 5-10% de dióxido de carbono) é necessária para o crescimento óptimo destes microrganismos.

#### **ii. Temperatura de incubação**

As placas para o isolamento de *Campylobacter* spp. poderão ser incubadas a 37 ou a 42°C mas a temperatura mais frequentemente utilizada são os 42°C uma vez

que a esta temperatura se minimiza o crescimento de contaminantes ao mesmo tempo que se fornecem condições óptimas para o isolamento de *C. jejuni* e *C. coli*.

### iii. Tempo

Tanto *C. jejuni* como *C. coli* têm crescimento lento em meio sólido e por este motivo o tempo de incubação é normalmente de 48h. No entanto, há protocolos onde se cultivam as placas somente 24h.

### 1.8.3 Identificação de *Campylobacter* spp. ao nível da espécie

As bactérias do género *Campylobacter* spp. são fastidiosas o que as torna bioquimicamente inactivas. Elas obtêm a sua energia de aminoácidos ou intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos em vez de obterem energia directamente do metabolismo de carboidratos. Isto faz com que muitos dos testes bioquímicos utilizados para caracterizar outras bactérias até ao nível da espécie não tenham a mesma utilidade quando falamos de *Campylobacter* spp. No entanto, é possível sujeitar as colónias suspeitas a alguns testes bioquímicos como: catalase, oxidase, redução de nitratos, hidrólise de hipurato, crescimento microaeróbio a 25 e a 42°C, crescimento aeróbio a 37°C. Poderá ainda ser testada a susceptibilidade das estirpes ao ácido nalidíxico e à cefalotina. A susceptibilidade ao ácido nalidíxico foi uma das características mais exploradas a nível laboratorial para caracterizar estirpes de *Campylobacter* spp., no entanto, com o aparecimento de resistências a este antibiótico, os resultados obtidos são cada vez mais difíceis de interpretar e a utilização deste teste caiu em desuso. Nas tabelas que se seguem (Tabela 4 e 5) são referenciados os principais testes bioquímicos e os seus resultados para chegar à espécie de *Campylobacter* spp. isolada. Nestas podemos verificar que a propriedade fenotípica de hidrólise do hipurato permite distinguir na maior parte das vezes *C. jejuni* de *C. coli*, no entanto, existem *C. jejuni* incapazes de hidrolisar hipurato e nestas somente é possível determinar a que espécies pertencem utilizando métodos moleculares (OIE, 2008; Röner et al, 2004).

**Tabela 4 – Testes de confirmação para *Campylobacter* spp.  
(adaptado de OIE, 2008)**

Teste de confirmação	Resultados para <i>Campylobacter</i> spp. termofílica
Morfologia	Pequenos bacilos em forma de S
Motilidade	Presente e característica (muito móveis e movimentos serpenteantes e de cambalhota)
Oxidase	Positivo
Crescimento aeróbio a 42°C	Negativo
Crescimento microaeróbio a 25°C	Negativo

**Tabela 5 - Características fenotípicas de estirpes de *Campylobacter* spp. responsáveis por toxinfecções em humanos (adaptado de OIE, 2008)**

Características	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>
Hidrólise do hipurato	+	-	-
Hidrólise do acetato de indoxil	+	+	-

#### 1.8.4 Métodos baseados em genética molecular

A utilização de testes bioquímicos para caracterizar uma estirpe de *Campylobacter* spp. ao nível da espécie pode ser suplementada, ou mesmo substituída por métodos moleculares. Actualmente estão disponíveis várias técnicas moleculares que permitem detectar *Campylobacter* spp. em vários tipos de amostras e determinar a que espécie determinado isolado pertence. Como métodos moleculares são referidos na bibliografia, entre outros, a utilização do pleomorfismo do tamanho do segmento de restrição do rRNA da subunidade 23S, a análise da sequência do gene que codifica para a GTPase, o PCR multiplex para *C. jejuni* e *C. coli*, a detecção por PCR baseado em DNA, a análise da região variável da subunidade 16S do rRNA, a hibridização de DNA e técnicas que combinam PCR e métodos de hibridização (Röner *et al.*, 2004).

#### 1.8.5 Testes imunológicos

Os testes serológicos não são utilizados por rotina para detectar a contaminação por estes microrganismos. No entanto, já se encontram disponíveis testes ELISA para serem utilizados em amostras de fezes com origem humana (OIE, 2008)

#### 1.9 Testes de Susceptibilidade a Antibióticos (TSA)

Na maioria dos casos de gastroenterite causada por *Campylobacter* spp. não há necessidade de recorrer a antibioterapia, uma vez que o curso da doença é muitas vezes auto-limitante (Allos, 2001). No entanto, há possibilidade da patologia se tornar sistémica ou no caso do aparecimento de complicações pós-infecção é necessário muitas vezes recorrer a antibioterapia. Além disso, pacientes com défices de acção no sistema imunitário como grávidas, portadores do vírus da imunodeficiência humana HIV ou com sintomatologia severa deverão ser tratadas com antibióticos.

Em geral são utilizados 2 métodos para avaliar a susceptibilidade microbiana a antibióticos: os métodos de difusão e os de diluição (Aarestrup & Engberg, 2001). Ao avaliar vários tipos de estudos realizados um pouco por todo o mundo verificamos que variantes de ambos os métodos são utilizadas. Estão disponíveis vários protocolos normalizados para a execução de testes de susceptibilidade microbiana a antibióticos para vários tipos de microrganismos mas as linhas de orientação fornecidas pelo *Clinical and Laboratory*

*Standards Institute* (CLSI), anteriormente designado por *National Committee Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), são as mais frequentemente utilizadas. Devido aos requisitos específicos de crescimento das estirpes de *Campylobacter* spp., nomeadamente o ambiente microaeróbio para o seu crescimento, ainda não são conhecidos protocolos internacionalmente aceites para a realização de TSA padrão por parte de nenhuma entidade reconhecida para o efeito. Como consequência, nos estudos consultados e para o objectivo de determinação da susceptibilidade a antimicrobianos em estirpes de *Campylobacter* spp. foram utilizados vários métodos de difusão (em disco, em tablets e o E-test) e de diluição (micro e macrodiluição em caldo e diluição em agar). Na maior parte da bibliografia consultada recomenda-se a utilização de ambiente microaeróbio e suplementação do meio de cultura com 5% de sangue e, quanto ao tipo de método a utilizar, a maior parte refere a diluição em agar e o método de difusão em placa (Aarestrup & Engberg, 2001).

Actualmente o método mais usado é o diluição em agar suplementado com 5% de sangue cultivado em condições de microaerobiose. No entanto, como este método requer muito tempo para a realização da técnica laboratorial, não é realizado numa primeira abordagem. O teste E é um método que permite obter uma concentração inibitória mínima e, para alguns microrganismos até é considerado como o teste standard. No entanto, este método não tem uma performance aceitável quando trabalhamos com *Campylobacter* spp. devido às condições de microaerobiose necessárias para o crescimento deste microrganismo. A microdiluição em caldo tem sido usada com sucesso em estirpes de *Campylobacter* spp. para determinar as concentrações mínimas inibitórias (MIC), no entanto, o método de difusão em disco oferece a conveniência de ser mais fácil de realizar ao mesmo tempo que permite diminuir o tempo gasto com a técnica e é na generalidade considerado um bom teste para realizar um rastreio a várias estirpes, tanto com relevância clínica, como epidemiológica e diagnóstica.

Existe um esforço comum para fornecer documentos de orientação e critérios de avaliação das antibioresistências. Contudo, no caso de *Campylobacter* spp. muitos dos *breakpoints* para as MIC e diâmetros dos halos de inibição estão em discussão.

## **2. PARTE EXPERIMENTAL**

### **2.1. Objectivos do trabalho**

Com este trabalho pretendeu-se avaliar a susceptibilidade de várias estirpes de *C. coli* e *C. jejuni* isoladas de amostras de frangos de produção intensiva recolhidas em matadouro, a um grupo de 11 antibióticos utilizando o teste de difusão em disco, de modo a determinar a percentagem de estirpes resistentes a cada um dos antibióticos e averiguar se o padrão de antibiorresistência é o mesmo para *C. coli* e *C. jejuni*.

Com os resultados deste trabalho pretende-se caracterizar e determinar quais as antibioresistências apresentadas pelas estirpes de *Campylobacter* spp., e averiguar se as frequências de antibioresistencia apresentadas serão ou não semelhantes às observadas em alguns países, visto serem muito escassos actualmente dados publicados relativos a antibioresistências de *Campylobacter*spp. isolados de fontes alimentares em Portugal.

### **2.2. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **2.2.1 Isolados bacterianos**

Foram isolados um grupo de *C. coli* e *C. jejuni* de amostras de frango recolhidas em matadouro entre Dezembro de 2007 e Outubro de 2008. Considerando a rastreabilidade do bando, a amostragem foi realizada em amostras de intestinos (cecos), carcaças (peles de pescoço) e carne de peito num matadouro de frangos broiler em diferentes dias de trabalho. A detecção e isolamento das estirpes de *Campylobacter* spp. foi realizada segundo a norma EN/ISO 10272-1:2006 e as estirpes foram identificadas através de PCR multiplex (Dennis *et al.*, 1999). Do grupo de estirpes isoladas foram seleccionadas 78 para serem caracterizadas quanto à resistência a um grupo de agentes antimicrobianos. Destas, 49 correspondiam a *C. coli* e 29 a *C. jejuni*. As estirpes seleccionadas para este ensaio pertenciam a 5 bandos de criadores diferentes e foram recolhidas 4 isolados de amostras do bando 1, 12 isolados do bando 2, 20 do bando 3, 19 do bando 4 e 23 do bando 5. Quanto ao tipo de amostra, das estirpes seleccionadas 18 correspondiam a amostras de cecos, 21 de carcaças (peles de pescoço) e 39 de peitos.

Os isolados encontravam-se conservados em meio *Brain Heart Infusion* (Sharlau, Espanha) com 15% glicerol (Merck, Alemanha) a -80°C, tendo sido posteriormente cultivadas em placa Colômbia agar sangue (Biomerieux, França) e incubadas a 42°C, durante 48 horas em condições de microaerobiose produzida por gerador (GENbox microaer: BioMerieux, França).

#### **2.2.2. Antibióticos utilizados**

No teste de difusão em disco foram escolhidos 11 antibióticos frequentemente utilizados em medicina humana para o tratamento de campilobacteriose e outros usados em

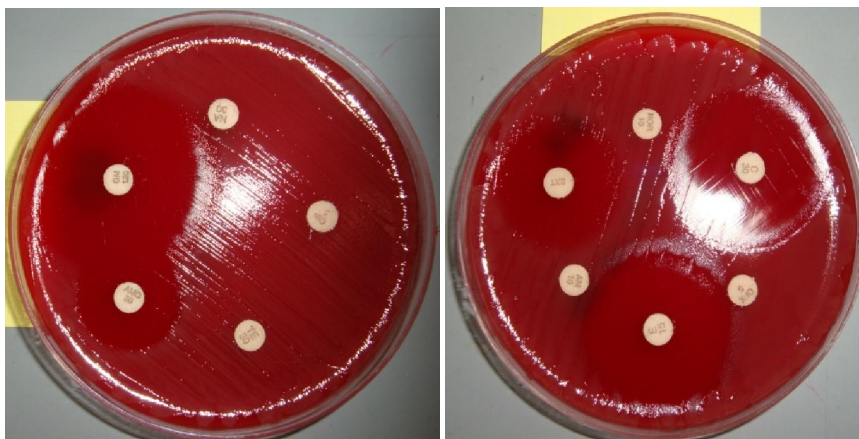
sistemas de monitorização da resistência a antibióticos entre estirpes de *Campylobacter* spp.: ampicilina (10µg), tetraciclina (30µg), cloranfenicol (30µg), eritromicina (15µg), gentamicina (120µg,) ciprofloxacina (5µg), norfloxacina (5µg), ácido nalidíxico (10µg), ofloxacina (5µg), amoxicilina+ácido clavulânico (20+10µg) e trimetoprim-sulfametoxazol (25µg) (BioMerieux, França).

### 2.2.3. Teste de susceptibilidade a antibióticos (TSA)

O teste de susceptibilidade a antibióticos foi realizado utilizando o método de difusão em disco em agar de Mueller-Hinton suplementado com 5% de sangue de ovelha (BioMerieux, França). O inóculo foi preparado utilizando colónias frescas das estirpes seleccionadas e diluídas em soluto fisiológico estéril de modo a obter um padrão de MacFarland 3. A suspensão de *Campylobacter* spp. obtida foi inoculada à superfície, com auxílio de uma zaragatoa esterilizada, de modo uniforme utilizando malha apertada, nas placas de agar de Mueller-Hinton sangue. As placas foram incubadas a 42°C, durante 48 horas em microaerofilia (10% CO<sub>2</sub>/ 6% O<sub>2</sub>) produzida por um gerador de microaerofilia (GENbox microaer: BioMerieux, França). Posteriormente foram medidos e registados os diâmetros dos halos de inibição para cada um dos antibióticos e para cada uma das estirpes analisadas.

*Staphylococcus aureus* 25923 ATCC e *Enterococcus faecalis* 29212 ATCC foram usados como controlo de qualidade. A categorização da susceptibilidade foi realizada de acordo com as linhas de orientação dos seguintes documentos *Performance Standards for Antimicrobial Disc and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals* do *National Committee of Clinical Laboratory Standards - NCCLS* (2002), *Comite de la AntibioGramme de la Societe Française de Microbiologie – Recommendations 2008* da *Societé Française de Microbiologie* (2008).

**Figura 7 – Halos de inibição apresentados por uma das estirpes de *Campylobacter* spp. analisadas**



#### 2.2.4 Análise estatística

Para o tratamento descritivo dos resultados obtidos nos testes de antibioresistência e o cálculo das percentagens de acordo com a estirpe (*C. coli*, *C. jejuni*), a proveniência da amostra (peito, pele de pescoço, intestino) e o bando de origem (1, 2, 3, 4 e 5) foi utilizado o programa Microsoft Office Excel 2007 e SPSS Statistics 17.0.

### 2.3 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Após a realização do trabalho laboratorial os dados obtidos foram agrupados tendo em conta várias perspectivas de modo a possibilitar uma análise mais abrangente do grupo que deu origem à população amostral. Assim, agruparam-se os dados evidenciando a estirpe (*C. coli*, *C. jejuni*), a proveniência da amostra (peito, pele de pescoço, intestino) e o bando de origem (1, 2, 3, 4 e 5). Posteriormente e sob uma perspectiva mais global da amostra organizaram-se os dados de modo a averiguar se haveriam estirpes que apresentavam resistências múltiplas.

Os resultados do trabalho no que diz respeito à avaliação da susceptibilidade das estirpes de *Campylobacter* spp. aos 11 antibióticos avaliados são apresentados na Tabela 6. Nas 78 estirpes de *Campylobacter* spp. avaliadas foram observados frequências de resistência próximas dos 100% para os antibióticos do grupo das fluoroquinolonas. Para antibióticos como ampicilina, tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol e eritromicina as estirpes apresentaram níveis de resistência intermédios. As estirpes demonstraram também alguma susceptibilidade à amoxicilina potenciada com ácido clavulânico uma vez que os níveis de resistência observados foram baixos. Tal como pode ser averiguado nas tabelas 6,8 e 10 de apresentação de resultados nenhuma das estirpes utilizadas neste trabalho demonstrou resistência nem à gentamicina nem ao cloranfenicol.

A Tabela 6 permitiu-nos avaliar a susceptibilidade aos antibióticos sob uma perspectiva da estirpe. Assim, dos 49 isolados de *C. coli*, foram encontrados níveis mais elevados de resistência para as fluoroquinolonas testadas (norfloxacin, ofloxacin, ácido nalidíxico e ciprofloxacina). Para este grupo de antibióticos os isolados de *Campylobacter coli* demonstraram 100% de resistência. Neste mesmo grupo de isolados, a frequência de resistência apresentada foi variável, 87,76% para a tetraciclina, 83,67% para a ampicilina, 59,18% para o trimetoprim-sulfametoxazol, 46,94% para a eritromicina e 6,12% para a amoxicilina+ácido clavulânico. Tal como pode ser observado na Tabela 6, relativamente aos 29 isolados de *C. jejuni*, os níveis mais elevados de resistência foram observados para os antibióticos das fluoroquinolonas mas os níveis de resistência observados foram inferiores aos detectados para as estirpes de *C. coli*. Ainda relativamente às estirpes de *C. jejuni*, as frequências de resistência aos restantes antibióticos foi variável, 62,07% para a ampicilina e

tetraciclina, 31,03% para o trimetoprim-sulfametoxazol e 20,69% para a eritromicina. Para este grupo de isolados não foram detectadas resistências para os antibióticos cloranfenicol, gentamicina e amoxicilina + ácido clavulânico.

**Tabela 6 - Número e frequência de estirpes de *Campylobacter*spp. isoladas em frangos resistentes a vários antibióticos.**

Antibiótico	<i>C. coli</i>		<i>C. jejuni</i>		Total	
	(n=49)	%	(n=29)	%	(n=78)	%
Ampicilina	41	83,67	18	62,07	59	75,64
Trimetoprim-sulfametoxazol	29	59,18	9	31,03	38	48,72
Norfloxacina	49	100,00	26	89,66	75	96,15
Cloranfenicol	0	0,00	0	0,00	0	0,00
Ofloxacina	49	100,00	27	93,10	76	97,44
Eritromicina	23	46,94	6	20,69	29	37,18
Amoxicilina+ ácido clavulânico	3	6,12	0	0,00	3	3,85
Tetraciclina	43	87,76	18	62,07	61	78,21
Ciprofloxacina	49	100,00	26	89,66	75	96,15
Ácido Nalidíxico	49	100,00	27	93,10	76	97,44
Gentamicina	0	0,00	0	0,00	0	0,00

A Tabela 7 agrupa os resultados de forma a evidenciar qual a estirpe que tem maior frequência de isolamento em cada tipo de amostra. A análise desta tabela permite-nos evidenciar que as estirpes de *C. coli* são isoladas com uma frequência semelhante nas amostras testadas (30.62% para amostras de intestino, 36.73% para amostras de peito e 32.65% para amostras de pele de pescoço), enquanto mais de 70% das estirpes de *C. jejuni* foram isoladas de amostras de peito.

**Tabela 7 – Frequência de isolamento de *C. coli* e *C. jejuni* por tipo de amostra**

Amostra	<i>C. coli</i>		<i>C. jejuni</i>		Total	
	(n=49)	%	(n=29)	%	(n=78)	%
Intestino (ceco)	15	30,62	3	10,34	18	23,08
Carcaça (pele de pescoço)	16	32,65	5	17,24	21	26,92
Peito	18	36,73	21	72,42	39	50,00

Na Tabela 8 está evidenciada a resistência a antibióticos na perspectiva da amostra que deu origem à estirpe isolada. Esta tabela permite-nos observar que as 18 amostras de intestino analisadas demonstraram 100% de resistência às fluoroquinolonas. Nas amostras de pele de pescoço e peito os níveis de resistência às fluoroquinolonas são igualmente elevados e variam entre 95,24-100% e 94,87-97.44%, respectivamente. As amostras de ceco apresentaram para todos os antibióticos testados um nível mais elevado de resistência

do que os outros 2 tipos de amostra. As estirpes provenientes de amostras de carcaça apresentaram um nível de resistência à maior parte dos antibióticos superior em percentagem quando comparadas com as provenientes de amostras de peito. O nível de resistência das estirpes provenientes de amostras de peito foi superior ao das estirpes provenientes de amostras de carcaça somente para os antibióticos: eritromicina e ácido nalidíxico.

**Tabela 8 – Distribuição (%) das estirpes de *Campylobacter* spp. resistentes de acordo com o tipo de amostra (ceco, pele de pescoço e peito)**

Antibiótico	Intestino (ceco)		Carcaça (pele de pescoço)		Peito		Total	
	(n=18)	%	(n= 21)	%	(n=39)	%	(n=78)	%
Ampicilina	14	77,78	16	76,19	29	74,36	59	75,64
Trimetoprim-sulfametoxazol	14	77,78	9	42,86	15	38,46	38	48,72
Norfloxacina	18	100,00	20	95,24	37	94,87	75	96,15
Cloramfenicol	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
Ofloxacina	18	100,00	21	100,00	37	94,87	76	97,44
Eritromicina	10	55,56	6	28,57	13	33,33	29	37,18
Amoxicilina+ácido clavulânico	1	5,56	1	4,76	1	2,56	3	3,85
Tetraciclina	16	88,89	17	80,95	28	71,79	61	78,21
Ciprofloxacina	18	100,00	20	95,24	37	94,87	75	96,15
Ácido Nalidíxico	18	100,00	20	95,24	38	97,44	76	97,44
Gentamicina	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00

Nas Tabelas 9 e 10 os dados encontram-se organizados de acordo com o bando que deu origem ao isolado.

Pelos resultados apresentados na Tabela 9 e 10 podemos caracterizar cada bando quanto à frequência de isolamento de cada uma das estirpes de *Campylobacter* spp e quanto às resistências apresentadas para cada um dos antibióticos. Assim, nesta população de amostras, a frequência de isolamento de *C. coli* foi superior à frequência de isolamento de *C. jejuni*. Esta tabela permite-nos ainda salientarmos que a frequência de isolamento de *C. coli* foi superior em todos os bandos com a exceção do bando 3 onde o isolamento de *C. jejuni* predominou largamente e do bando 2 onde a frequência de isolamento de *C. coli* e *C. jejuni* foi igual.

Da análise da tabela 10 salientamos que nos bandos 1, 2 e 5 a frequência de isolados resistentes às fluoroquinolonas foi de 100%. Ainda relativamente a este grupo de antibióticos, isolados do bando 4 apresentaram os valores mais baixos de resistência. Para a ampicilina foram os bandos 2, 3 e 4 que apresentaram maiores níveis de resistência. Relativamente ao antibiótico trimetoprim-sulfametoxazol, isolados dos bandos 4 e 5

apresentaram os maiores níveis de resistência. O bando 4 destaca-se por apresentar a maior parte das estirpes resistentes à eritromicina, o que pode ser observado quando comparamos 52,63% de estirpes resistentes deste bando com o valor apresentado pela totalidade da amostra, 37,18%. No que concerne à tetraciclina, o bando 3 destaca-se pois apresentam uma frequência de isolados resistentes valor acima da média da população amostral.

**Tabela 9 - Distribuição (%) das estirpes de *Campylobacter*spp. de acordo com o bando de origem**

Estirpe	Bando										Total	
	1		2		3		4		5		(n=78)	
	(n=4)	%	(n=12)	%	(n=20)	%	(n=19)	%	(n=23)	%	(n=78)	%
<i>C. coli</i>	4	100	6	50	6	30	16	84,21	17	73,91	49	62,82
<i>C. jejuni</i>	0	0	6	50	14	70	3	15,79	6	26,09	29	37,18

**Tabela 10 - Distribuição (%) das estirpes de *Campylobacter*spp. resistentes de acordo com o bando de origem**

Antibiótico	Bando									
	1		2		3		4		5	
	(n=4)	%	(n=12)	%	(n=20)	%	(n=19)	%	(n=23)	%
Ampicilina	2	50,00	10	83,33	17	85,00	16	84,21	14	60,87
Trimetoprim-sulfametoxazol	0	0,00	5	41,67	9	45,00	11	57,89	13	56,52
Norfloxacina	4	100,00	12	100,00	19	95,00	17	84,21	23	100,00
Cloranfenicol	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
Ofloxacina	4	100,00	12	100,00	19	95,00	18	84,21	23	100,00
Eritromicina	3	75,00	0	0,00	9	45,00	10	52,63	7	30,43
Amoxicilina+ ácido clavulânico	0	0,00	0	0,00	1	5,00	0	0,00	2	8,70
Tetraciclina	4	100,00	8	66,67	18	90,00	16	84,21	15	65,22
Ciprofloxacina	4	100,00	12	100,00	19	95,00	17	89,47	23	100,00
Ácido Nalidíxico	4	100,00	12	100,00	20	100,00	17	89,47	23	100,00
Gentamicina	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00

Na Tabela 11 pretende-se evidenciar a existência de estirpes de *Campylobacter* spp. com resistência múltipla a antibióticos. A resistência a todas as fluoroquinolonas é um factor que é comum a 96,15% dos isolados. Por outro lado a resistência conjunta às fluoroquinolonas testadas e a tetraciclina é uma característica que é partilhada por 78,21% dos isolados. Como já foi referido nenhuma das estirpes testadas apresenta resistência a todos os antibióticos testados. Há no entanto 2 estirpes que apresentaram resistência a todos os antibióticos com a excepção do cloranfenicol e da gentamicina. Estas 2 estirpes correspondem a isolados de *C. coli*. Quando comparamos as 2 estirpes *C. coli* e *C. jejuni*

quanto ao padrão de multirresistência verificamos que a *C. jejuni* tende a ter frequências de multirresistência marcadamente inferior aos da *C. coli* em todos os tipos de multirresistência avaliados. Podemos ainda salientar que muitas das estirpes de *C. coli* apresentaram resistência simultânea às fluoroquinolonas e à eritromicina, antibióticos utilizados muitas vezes no tratamento de infecções por estas bactérias em humanos (Allos, 2001). O mesmo também pode ser encontrado em estirpes de *C. jejuni* mas em frequências significativamente mais baixas.

**Tabela 11 - Distribuição (%) das estirpes de *Campylobacter* spp. que apresentam resistência a vários antibióticos**

Multirresistência	<i>C. coli</i>		<i>C. jejuni</i>		Total	
	(n=49)	%	(n=29)	%	(n=78)	%
NA, CIP	49	100,00	26	89,66	75	96,15
NA, CIP, NOR	49	100,00	26	89,66	75	96,15
NA, CIP, NOR, OFX	49	100,00	26	89,66	75	96,15
NA, CIP, NOR, OFX, ERI	23	46,94	6	20,69	29	37,18
NA, CIP, NOR, OFX, TETRA	43	87,76	18	62,07	61	78,21
NA, CIP, NOR, OFX, ERI, AM	21	42,86	6	20,69	27	34,62
NA, CIP, NOR, OFX, ERI, TETRA	23	46,94	5	17,24	28	35,90
NA, CIP, NOR, OFX, ERI, TETRA, AMC	2	4,08	0	0,00	2	2,56
NA, CIP, NOR, OFX, ERI, TETRA, AM	21	42,86	5	17,24	26	33,33
NA, CIP, NOR, OFX, ERI, TETRA, STX	13	26,53	2	6,90	15	19,23
NA, CIP, NOR, OFX, ERI, TETRA, AM, STX	11	22,45	2	6,90	13	16,67
NA, CIP, NOR, OFX, ERI, TETRA, AMC, AM, STX	2	4,08	0	0,00	2	2,56
Todos os antibióticos testados	0	0,00	0	0,00	0	0,00

## 2.4 DISCUSSÃO

A produção animal moderna cria condições favoráveis para a emergência e para a disseminação de bactérias zoonóticas como as do género *Campylobacter* spp. A utilização de grandes quantidades de antibióticos como agentes terapêuticos para o controlo de infecções tende a seleccionar estirpes de bactérias zoonóticas resistentes aos antibióticos utilizados colocando em risco a saúde do ser humano (Aarestrup & Engberg, 2001). Esta tendência tem vindo a difundir-se e parece continuar a aumentar. Este estudo fornece alguns dados que permitem caracterizar a situação portuguesa actual no que diz respeito à resistência de estirpes de *Campylobacter* spp., isoladas de amostras de frango broiler na linha de um matadouro, a um grupo de antibióticos.

Os níveis de antibiorresistência observados neste estudo são alarmantes. Foram detectados elevados níveis de resistência das estirpes para os antibióticos do grupo das fluoroquinolonas e em apenas 2 dos 11 antibióticos testados não foram detectadas resistências (cloranfenicol e gentamicina). Os resultados deste estudo incluíram-se apenas isolados de frangos provenientes de explorações de carácter intensivo e parecem reflectir os obtidos por outros estudos nomeadamente os recentemente realizados em Portugal (Gomes *et al.*, 2009). Aquando da análise dos resultados na perspectiva do bando de origem verificamos que existe um padrão para cada um dos bandos. Se analisarmos a tabela 10 rapidamente se cria a percepção que é no bando 2 que se verifica a maior frequência de isolados resistentes. Ainda nesta tabela verificamos que no mesmo bando 100% das estirpes foram resistentes a qualquer uma das 4 fluoroquinolonas testadas. Já no bando 4 foram detectados os menores valores de resistência para as fluoroquinolonas e que esse valor variou dependendo do tipo de fluoroquinolona testada. Estas diferenças de ocorrência de estirpes resistentes entre bandos poderá estar relacionada com o uso de agentes antimicrobianos na exploração de origem dos frangos (Luangtongkum *et al.*, 2006). O maior ou o menor uso destes agentes cria uma pressão de selecção bacteriana onde somente as estirpes capazes de sobreviver aos antibióticos utilizados serão capazes de transmitir as características de resistência à descendência (Röner *et al.*, 2004).

Os resultados apresentados na Tabela 3 e 4 permitem-nos concluir que as características de antibiorresistência e as estirpes de *Campylobacter* spp. são diferentes em cada um dos bandos analisados. Há bandos como o 1, 4 e 5 onde é clara a predominância de *C. coli* e outros como o bando 3 onde é indiscutível a predominância de *C. jejuni*. É interessante observar que, apesar de este bando ser constituído maioritariamente por *C. jejuni* e de vários autores referirem que *C. coli* apresenta geralmente maiores percentagens de estirpes resistentes (Engberg *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 2005), ele não apresenta menores frequências de estirpes com resistência a antibióticos comparativamente a outros bandos.

Relativamente à antibiorresistência apresentada pelas estirpes de *Campylobacter* spp., os resultados variaram consoante o antibiótico testado. Os resultados obtidos neste trabalho sobre antibióticos do grupo das fluoroquinolonas tendem a confirmar o que já está documentado por outros estudos realizados noutros países, isto é, as estirpes de *Campylobacter* spp. testadas apresentam um elevado nível de resistência às fluoroquinolonas (Aarestrup & Engberg, 2001; Andersen *et al.*, 2006; Engberg *et al.*, 2001; EFSA, 2005; Fallon *et al.*; MSFFG, 2007; Röner *et al.*, 2004; Sáenz *et al.*, 2000; Yan *et al.*, 2005).

O presente estudo apresentou resultados de 100% de resistência para *C. coli* e frequências de resistência que variam entre 89,66% e 93,10% para *C. jejuni*, resultados similares aos documentados em Espanha por Sáenz *et al.* (2000), onde foram reportadas 98,7% e 100% de resistência a fluoroquinolonas em isolados de *C. jejuni* e *C. coli* em

amostras de frango. A frequência encontrada no nosso estudo de resistência a fluoroquinolonas foi maior para *C. coli* do que para *C. jejuni* indo também de encontro ao reportado por vários autores (Aarestrup & Engberg, 2001; Andersen *et al.*, 2006; Engberg *et al.*, 2001; EFSA, 2005; Fallon *et al.*; MSFFG, 2007; Röner *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2005). A frequência de resistência a fluoroquinolonas é maior em amostras colhidas do intestino dos frangos. Este facto poderá estar relacionado com uma maior pressão selectiva das bactérias existentes ao nível do trato gastrointestinal aquando da ingestão de alimento medicado. Luangtongkum *et al.* (2006) observou, à semelhança do que foi descrito para as tetraciclina, que existiam bandos onde nunca foram utilizadas fluoroquinolonas mas que os níveis de resistência para este tipo de antibiótico eram muito similares aos encontrados em bandos onde existia um histórico de utilização deste antibiótico no passado. Assim, a utilização por si só de antibióticos numa exploração avícola poderá não ser o único factor responsável pelo aparecimento de estirpes de bactérias resistentes a fluoroquinolonas (Luangtongkum *et al.*, 2006). Estas observações sugerem que a população de *Campylobacter spp.* resistentes é estável e é capaz de ser transmitida entre bandos, persistindo nos mesmos, mesmo na ausência da pressão selectiva causada pelo uso de fluoroquinolonas na exploração. O conjunto de dados que o estudo de Luangtongkum *et al.* (2006) fornece revela a complexidade que é inerente à ocorrência e disseminação de padrões de antibiorresistência de estirpes de *Campylobacter spp.* Mais, fica o alerta para as dificuldades que se irão sentir em tentativas de eliminação ou diminuição da frequência de estirpes de *Campylobacter spp.* resistentes às fluoroquinolonas.

O nível de resistência das estirpes testadas para a ampicilina foi muito elevado, 75,64%, resultados superiores aos observados em estudos realizados noutros países (Andersen *et al.*, 2006; Engberg *et al.*, 2001; Fallon *et al.*; Röner *et al.*, 2004). A resistência de estirpes de *Campylobacter spp.* a este antibiótico está relacionada com a produção de  $\beta$ -lactamases por muitas das estirpes de *Campylobacter spp.*, no entanto, outros mecanismos de resistência à ampicilina podem ocorrer em simultâneo como a modificação das proteínas de ligação de penicilinas e cefalosporinas e, conseqüentemente a impermeabilidade da bactéria a este antibiótico. A existência de uma bomba de efluxo de antibióticos para o exterior das bactérias pode ser considerado um terceiro método de resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Fallon *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2005).

Verificámos que a percentagem de isolados resistentes entre os diferentes locais de colheita da amostra não foi diferente, sendo contudo maior para isolados de *C. coli* do que para os de *C. jejuni*. Observou-se que o bando 5 apresentou uma percentagem de estirpes resistentes à ampicilina inferior à dos restantes bandos. Estes resultados poderão reflectir a elevada utilização de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos na maior parte dos bandos estudados o que originou um aumento da pressão selectiva sobre as estirpes que não possuem resistência a estes antibióticos.

De um modo geral, ampicilina e outros  $\beta$ -lactâmicos não estão recomendados para o tratamento de infecções por *Campylobacter* spp. devido à elevada frequência de isolados resistentes a esta família de antibióticos (Fallon *et al.*, 2003). Se compararmos a percentagem de resistência de ambos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos testados no estudo, ampicilina 75,64% e amoxicilina+ácido clavulânico 3,85%, verificamos que a potenciação da amoxicilina com ácido clavulânico permite diminuir significativamente a percentagem de estirpes resistentes a este grupo de antibióticos. Todas as estirpes de *C. jejuni* foram sensíveis à amoxicilina + ácido clavulânico e a frequência de resistência apresentada pelas *C. coli* foi baixa, 6,12%.

Este estudo não revelou estirpes de *Campylobacter* spp. resistentes ao cloranfenicol ou à gentamicina sendo coincidente com os resultados apresentados por outros autores (Fallon *et al.*, 2003; Luangtongkum *et al.*, 2006; Röner *et al.*, 2004). No entanto, Sáenz *et al.* (2000) referenciaram que os níveis de resistência à gentamicina entre as estirpes de *Campylobacter* spp. isoladas de frangos em Espanha foi de 25%. Os baixos níveis de resistência apresentados pelos isolados no presente trabalho para a gentamicina poderão ser justificados pelo facto deste antibiótico não ser utilizado por rotina na produção de frangos uma vez que é normalmente utilizado na forma injectável pois a sua absorção no trato gastrointestinal é muito reduzida. Assim, e uma vez que as *Campylobacter* spp. colonizam o intestino, a rara utilização da gentamicina permite que a pressão selectiva neste tipo de bactérias seja baixa conferindo baixas frequências de resistência a este antibiótico. O mesmo acontece com o cloranfenicol. Em Portugal, o uso deste antibiótico não é permitido em produção animal daí que não tenham sido observados casos de estirpes resistentes.

As tetraciclinas eram referidas no passado como uma alternativa terapêutica para o tratamento de infecções por *Campylobacter* spp. em humanos. Vários autores referem que eram também utilizadas à escala mundial, tanto em doses terapêuticas como em doses subterapêuticas, em alimentos para animais de produção (Aarestrup & Engberg *et al.*, 2001, Allos *et al.*, 2001; Fallon *et al.*, 2003; World Health Organization [WHO], 2001). Neste estudo foram detectados níveis de resistência a tetraciclina na ordem dos 78,21% para a globalidade da amostra e 87,76% entre as estirpes de *C. coli* e 62,07% entre as de *C. jejuni*. Uma vez mais a percentagem de resistência foi maior entre as estirpes de *C. coli*. Observando os resultados obtidos na perspectiva da amostra que lhes deu origem verificamos que a percentagem de estirpes isoladas de intestino apresentaram um valor de resistência maior do que as amostras com outra origem. Este facto poderá ser justificado pela utilização deste tipo de antibióticos na forma de alimento medicado expondo a flora gastrointestinal dos frangos a uma pressão selectiva muito grande, o que originou um grande número de estirpes resistentes (Luangtongkum *et al.*, 2006). Podemos ainda observar que o padrão de resistência à tetraciclina é bastante diferente entre os bandos

estudados. Infelizmente não nos foi possível obter o histórico de utilização de antibióticos na exploração de origem do bando, o que não nos permite relacionar os dados obtidos no estudo com uma maior ou menor utilização de determinado tipo de antibióticos. Vários estudos revelaram que estirpes de *Campylobacter* spp. resistentes às tetraciclinas não são exclusivas das produções avícolas, tendo sido também detectadas em explorações de vacas leiteiras (Luangtongkum *et al.*, 2006). Além disso, foram detectadas estirpes de *Campylobacter* spp. resistentes a tetraciclina em explorações avícolas de produção biológica onde nunca tinham sido utilizados este tipo de antibióticos. Luangtongkum *et al.* (2006) referem que uma vez que as tetraciclinas foram utilizadas durante décadas como aditivos alimentares tanto em doses terapêuticas como em doses subterapêuticas, é possível que ao longo do tempo, algumas estirpes de *Campylobacter* spp. possam ter evoluído no sentido de ter adquirido resistência intrínseca que transmitem verticalmente entre gerações, originando a dispersão deste tipo de bactérias por vários tipos de explorações animais.

O padrão de resistência que foi observado para a tetraciclina é similar ao observado para o trimetoprim-sulfametoxazol, quando observamos os vários tipos de amostra, apesar dos níveis de resistência à tetraciclina serem superiores aos observados para o trimetoprim-sulfametoxazol. Para este último antibiótico, detectamos níveis de resistência na ordem dos 48,72% para a globalidade da amostra e 46,94% entre as estirpes de *C. coli* e 20,69% entre as de *C. jejuni*. Uma vez mais foram detectados níveis de resistência superiores para *C. coli*. Observando os resultados obtidos na perspectiva da amostra que deu origem à estirpe verificamos que a percentagem de estirpes isoladas de intestino foi maior do que as amostras com outra origem. Ocorreram também algumas diferenças entre os bandos de origem das estirpes.

A eritromicina é considerada pelos vários autores consultados o agente terapêutico de eleição para o tratamento de infecções por *Campylobacter* spp. (Engberg *et al.*, 2001; Luangtongkum *et al.*, 2006). Neste estudo para os isolados de *Campylobacter* spp. foram detectados níveis de resistência para a eritromicina na ordem dos 37,18% sendo resistentes e 46,94% entre as estirpes de *C. coli* e 20,69% as de *C. jejuni*. Tal como foi constatado por estudos realizados noutros países (Fallon *et al.*, 2003; Luangtongkum *et al.*, 2006; Röner *et al.*, 2004; Sáenz *et al.*, 2000), observamos que a percentagem de resistência foi maior para as estirpes de *C. coli*. Os resultados obtidos na perspectiva da amostra que lhes deu origem permitiram aferir que a percentagem de estirpes isoladas de intestino foi maior do que as amostras com outra origem. Estas observações podem ser justificadas pela possível utilização de eritromicina na forma de alimento medicado expondo a flora gastrointestinal dos frangos a uma pressão selectiva muito grande, o que originou um grande número de estirpes resistentes.

Os primeiros sinais de estirpes resistentes à eritromicina surgiram ainda nos anos 90 e, de modo a travar a disseminação desta tendência foi banido, desde Julho de 1999, o uso de macrólidos como promotores de crescimento, nos países pertencentes à UE. (Fallon *et al.*, 2003; Sáenz *et al.*, 2000). Pezzotti *et al.* (2003) referem que em Itália a percentagem de estirpes resistentes para eritromicina era de 31% para a *C. jejuni* e 45% para *C. coli*, resultados similares aos obtidos no presente estudo para as estirpes de *C. coli*.

Num estudo realizado na Suécia por Röner *et al.* (2004) observou-se que nenhuma das 100 estirpes isoladas de frangos e testadas para a eritromicina demonstraram resistência. Na Dinamarca, Ardersen *et al.* (2006) obtiveram resultados semelhantes. Estudos como o realizado por Röner *et al.*, 2004 demonstraram que o enveredar por políticas onde se restringe o uso de antibióticos na produção animal poderá resultar numa diminuição drástica da prevalência de estirpes de *Campylobacter* spp. resistentes a antibióticos. Este estudo foi realizado na Suécia, onde a proibição da utilização de antibióticos como promotores de crescimento nas explorações pecuárias existe desde 1986, e demonstrou claramente que a maior prevalência de estirpes resistentes a antibióticos provém de pacientes que viajaram para fora da Suécia, nomeadamente para o sudeste da Europa e para a Tailândia. Além disso, as medidas preventivas implementadas neste país podem ter contribuído para a baixa prevalência de estirpes resistentes a antibióticos como as fluoroquinolonas e tetraciclina, tanto provenientes de amostras colhidas em frangos como em amostras colhidas de humanos com campilobacteriose (33% no ano de 2004) (Röner *et al.*, 2004). Voltando ao caso da eritromicina, o padrão de antibiorresistência para este antibiótico é variável entre os países europeus enquanto em países nórdicos parece existir uma tendência para a diminuição ou mesmo desaparecimento de estirpes de *Campylobacter* spp. resistentes a este antibiótico.

Em Portugal, interessa apostar na epidemiovigilância de modo a verificar se a tendência é para a diminuição ou para o aumento de estirpes de *Campylobacter* spp. resistentes à eritromicina uma vez que interessa manter esta alternativa terapêutica para as infecções graves causadas por esta bactéria.

No grupo de estirpes testado verificou-se que a frequência de isolamento de *C. coli* foi maior que a de *C. jejuni*, tal como ocorreu num estudo realizado na Itália mas contrariando a tendência encontrada na maioria dos estudos referenciados (Pezzotti *et al.*, 2003).

Este estudo partiu de amostras com estirpes já identificadas tendo sido caracterizada a frequência de *Campylobacter* spp. na população por Fraqueza *et al.* (2009). Neste estudo verificámos que o padrão de antibiorresistência para *C. jejuni* é diferente do padrão observado para a *C. coli*. Tal como verificado por Pezzotti *et al.* (2004), Aarestrup e Engberg (2001) e por Sáenz *et al.* (2000), as estirpes de *C. coli* apresentam um nível mais elevado de resistência para todos os antibióticos testados. Aquando da avaliação da resistência em simultâneo para um grupo de fármacos, verificámos que para qualquer das combinações

testada a percentagem de resistência das estirpes de *C. coli* foi sempre superior à das *C. jejuni*. Mais, 2 das 78 estirpes testadas apenas demonstraram susceptibilidade à gentamicina e ao cloranfenicol. Estas estirpes representam 2 isolados de *C. coli*.

O padrão de multirresistência observado ao nível das estirpes de *C. coli* poderá estar relacionado com a pressão selectiva exercida no global da população. Assim, os dados poderão indicar que uma maior frequência de isolamento para uma estirpe poderá estar associada a um maior número de bactérias sujeitas há mesma pressão selectiva o que terá como consequência uma maior percentagem de estirpes resistentes a vários antibióticos (Lungtonghum *et al.*, 2006). Esta teoria deverá ser testada em estudos posteriores onde será avaliada inicialmente a prevalência para cada uma das estirpes a serem posteriormente testadas quanto à antibiorresistência.

A resistência em simultâneo a vários tipos de antibiótico é considerada relativamente rara (Fallon *et al.*, 2003). Quando existe, pensa-se que esteja relacionada com a presença de uma bomba não selectiva que permita o fluxo dos antibióticos para o exterior da bactéria (Fallon *et al.*, 2003). Num estudo realizado durante 2002, foi identificada e caracterizada uma *C. jejuni* que continha uma bomba de fluxo de fármacos para o exterior codificada no gene *cme B*. Quando a mesma bactéria não possuía o gene *cme B* verificava-se um aumento da susceptibilidade da estirpe para ampicilina, ciprofloxacina, eritromicina e tetraciclina, que variava entre 2 e 4 vezes (Fallon *et al.*, 2003). No estudo verificámos que 96,15% das estirpes testadas demonstraram resistência a pelo menos 4 antibióticos. Como já foi referido acima, 2 isolados de *C. coli* demonstraram resistência a 9 dos antibióticos testados. Estas 2 estirpes deverão ser sujeitas a uma análise cuidada de modo a determinar qual o mecanismo de resistência por elas apresentado.

Neste trabalho foi recolhido um grande número de amostras num único matadouro. O período de recolha de amostras foi alargado o que permitiu a recolha de amostras de vários bandos provenientes de diferentes produtores. Apesar disso, e devido a constrangimentos financeiros e de tempo, este estudo utilizou apenas 78 amostras de entre muitas que poderiam ter sido testadas. Estas amostras foram seleccionadas aleatoriamente e somente depois foram caracterizadas quanto ao tipo de amostra que deu origem ao isolado, quanto ao bando de origem e quanto à estirpe de *Campylobacter* spp. isolada. Este critério de selecção foi utilizado no sentido de poder extrapolar os resultados obtidos para as restantes amostras e ao mesmo tempo definir o melhor desenho para estudos futuros envolvendo as restantes amostras. No que concerne a estudos futuros, a avaliação da antibiorresistência poderá ser realizada utilizando um menor número de antibióticos de modo a facilitar o trabalho laboratorial e a aumentar o número de amostras a serem processadas. Uma vez que 100% das estirpes utilizadas demonstraram o mesmo padrão de antibiorresistência para as 4 fluoroquinolonas utilizadas, de futuro poderia ser utilizado apenas um antibiótico deste mesmo grupo. Das estirpes que mostraram susceptibilidade a alguma das fluoroquinolonas

todas correspondiam a isolados de *C. jejuni*. Atendendo a este facto e consultando bibliografia recente, onde se utiliza a ciprofloxacina na maior parte dos estudos, numa futura extensão deste trabalho às restantes amostras disponíveis, na nossa opinião poderá ser testado apenas um antibiótico do grupo das fluoroquinolonas .

Uma vez que para os antibióticos cloranfenicol e gentamicina não foi detectada nenhuma estirpe resistente, os mesmos poderão não ser utilizados no seguimento deste estudo. Assim, e utilizando o teste de difusão em disco, numa futura extensão deste estudo utilizaria 6 antibióticos (ciprofloxacina, ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol, eritromicina, amoxicilina+ácido clavulânico e tetraciclina) antecipando a utilização de uma única placa de Petri por estirpe testada e incluindo os antibióticos para onde foram detectados diferentes padrões de resistência quando analisados os dados nas várias perspectivas (bando de origem, tipo de amostra, estirpe de *Campylobacter spp.*) de modo a melhor caracterizar a população amostral em cada uma das suas vertentes.

A realização de testes de susceptibilidade a antibióticos em bactérias com os requisitos de crescimento tão específicos como os das estirpes de *Campylobacter spp.* ainda não se encontra padronizado o que torna por vezes difícil escolher qual a melhor metodologia de avaliação e os critérios para interpretação dos resultados obtidos. Entidades como o CLSI estão actualmente a trabalhar para fornecer tais orientações. Esta padronização é da maior relevância visto que a monitorização dos padrões de antibiorresistência e a sua evolução é baseada na comparação de dados que deveriam ser obtidos utilizando um protocolo laboratorial semelhante. Importa referir que o *Comite de l'antibiogramme de la Societe Francaise de Microbiologie* emitiu recomendações em 2008 específicas para *Campylobacter spp.* que foram já foram seguidas para a realização deste trabalho. O CLSI reconhece para além do método de diluição em agar como método padrão o método de difusão em disco, para a avaliação *in vitro* da susceptibilidade a antibióticos em estirpes de *Campylobacter spp.* (CLSI, 2006; Luangtongkum, *et al.*, 2007; McDermott *et al.*, 2005). No entanto, este método necessita que se invista muito tempo na execução da técnica laboratorial, além de necessitar de equipamento específico e de experiência na execução de técnicas laboratoriais mais complexas. Apesar das desvantagens apresentadas, são também apontadas vantagens à utilização deste método, nomeadamente o ser considerado um método fiável, produzir dados facilmente reproduzíveis e originar MIC quantitativas. Como alternativa a este método surge o teste de difusão em disco que é caracterizado por utilizar uma técnica laboratorial de fácil execução ao mesmo tempo que consome menos recursos financeiros comparativamente aos testes de diluição. Além disso, estudos recentes demonstram que pode produzir resultados reproduzíveis se utilizada uma técnica laboratorial padronizada e os controlos de qualidade correctos. Luangtongkum *et al.* (2007) revelaram que existe um elevado nível de correlação entre os dados obtidos pelo método de diluição em agar e o método de difusão em disco para aminoglicosídeos e

fluoroquinolonas. Revelou ainda que o grau de correlação para outros antibióticos testados como a ampicilina, a tetraciclina e a eritromicina é relativamente baixo.

## 2.5 CONCLUSÕES

De acordo com a amostra e bando de origem das estirpes e o presumível maior ou menor uso de agentes antimicrobianos na exploração podem ser observados diversos padrões de resistência antimicrobiana. Foi detectada uma elevada frequência de resistência a fluoroquinolonas entre as estirpes de *Campylobacter* spp. testadas, em particular para as estirpes de *C. coli* (100% de resistência a norfloxacin, ofloxacin, ácido nalidixico e ciprofloxacina). Mais de 60% das estirpes isoladas demonstraram resistência a tetraciclina e ampicilina. Neste estudo, *C. coli* demonstrou frequência de resistência superiores para eritromicina (46.9%) que as estirpes de *C. jejuni* (20.7%). Quase todas as estirpes isoladas demonstraram susceptibilidade à amoxicilina potenciada com ácido clavulânico. Os antibióticos cloranfenicol e gentamicina demonstraram serem activos contra as estirpes de *Campylobacter* spp. testadas.

Relativamente aos bandos estudados, podemos verificar que a frequência de resistência aos diferentes antibióticos testados foi diferente para cada um dos bandos, o que poderá estar relacionado com o uso mais ou menos frequente de antibióticos ao nível da exploração de origem.

Os resultados obtidos relativos às estirpes resistentes às fluoroquinolonas e há já grande percentagem de resistência apresentada por *C. coli* à eritromicina é preocupante uma vez que para além de o consumo de alimentos contaminados por *Campylobacter* spp. colocarem em risco a saúde do consumidor poderá ser cada vez maior o desafio de tratar pessoas com infecção por este tipo de bactérias. Perante este cenário, impõe-se um uso cada vez mais restritivo de antibióticos ao nível das explorações pecuárias portuguesas e ao mesmo tempo a criação de mecanismos de vigilância epidemiológica onde seja caracterizado o padrão e a evolução da resistência antimicrobiana e da prevalência de estirpes de *Campylobacter* spp. Este sistema de epidemiovigilância deveria estender-se a todos os pontos da cadeia alimentar assim como a amostras recolhidas em humanos infectados com esta patologia, de modo a caracterizar a situação portuguesa no que diz respeito a esta doença e ao mesmo tempo criar estratégias de controlo devidamente fundamentadas nestes dados com o objectivo de travar a evolução desta zoonose. Além disso, os mecanismos de vigilância epidemiológica deverão utilizar critérios semelhantes aos utilizados nos restantes países da União Europeia de modo a contextualizar a situação portuguesa no seio de uma Europa onde muitas vezes as tendências são diferentes da realidade nacional.

## 2.6 PERSPECTIVAS FUTURAS

É notório o realce que é dado aos frangos como o principal factor de risco associado ao aparecimento de campilobacteriose em humanos (EFSA, 2009). Na nossa opinião, e uma vez que a situação portuguesa ainda não está devidamente caracterizada, seria interessante estender este estudo a outro tipo de explorações pecuárias envolvendo a caracterização da situação tanto em matadouros como nas explorações de origem dos animais. Assim, as suiniculturas, as explorações de bovinos de corte, as explorações leiteiras (bovinos, ovinos e caprinos) portuguesas necessitam de ser caracterizadas quanto à prevalência de estirpes de *Campylobacter* spp. com potencial patogénico e quanto à caracterização do padrão de antibiorresistência, sendo que no caso das explorações leiteiras o estudo deveria caracterizar tanto a população animal como o leite.

Seria ainda interessante comparar os resultados obtidos com a situação encontrada para os isolados recolhidos ao nível bandos de broilers analisados ao nível da exploração. Além disso, seria relevante avaliar os mesmos parâmetros nos produtos de origem animal comercializados pelos grupos de distribuição alimentar portugueses de modo a verificar as características das estirpes de *Campylobacter* spp. a que os consumidores portugueses estão realmente expostos.

De modo a acompanhar todo o trajecto que este microrganismo pode percorrer, seria importante envolver os médicos portugueses nestes estudos. A caracterização das estirpes isoladas em pacientes com campilobacteriose e do padrão de antibiorresistência apresentado pelo microrganismo responsável por esta patologia só será possível com a colaboração destes profissionais de saúde. Nesta fase seria importante caracterizar as estirpes que originam os casos mais graves de campilobacteriose, nomeadamente quando é necessário recorrer ao internamento ou quando a infecção culmina com a morte do paciente.

Muitos dos estudos que referimos anteriormente têm vindo a ser realizados em vários países mas na maior parte deles não se contemplam todas as fases citadas. Na nossa opinião, seria interessante criar um sistema de epidemiovigilância efectivo em Portugal onde se produzissem dados acerca da prevalência de *Campylobacter*spp. e dos seus padrões de antibiorresistência, onde fossem produzidos e analisados dados em todos os pontos da cadeia alimentar acima referidos, assim como em humanos já infectados com esta patologia, de modo a caracterizar a situação portuguesa no que diz respeito a esta doença e ao mesmo tempo criar estratégias de controlo devidamente fundamentadas nestes dados com o objectivo de travar a evolução desta zoonose.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aarestrup, F., Engberg, J. (2001). Antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter*. *Veterinary Research*, 32, 311-321.
- Alfredson, D., Korolik, V. (2007) Antibiotic resistance and resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Federation of European Microbiological Societies; Microbiological Letters*, 227, 123-132
- Allos, B.M. (2001) *Campylobacter jejuni* infections: update on emerging issues and trends. *Clinical Infectious Diseases*, 32, 1201–1206.
- Andersen, S., Saadbye, P., Shukri, N., Rosenquist, H., Nielsen, N., Boel, J. (2006) Antimicrobial resistance among *Campylobacter jejuni* isolated from raw poultry meat at retail level in Denmark. *International Journal of Food Microbiology*, 107, 250-255
- Andersen, S., Saadbye, P., Shukri, N., Rosenquist, H., Nielsen, N., Boel, J. (2006) Antimicrobial resistance among *Campylobacter jejuni* isolated from raw poultry meat at retail level in Denmark. *International Journal of Food Microbiology*, 107, 250-255.
- Angulo, F., Nargung, V., Chiller, T. (2004) Evidence of an association between use of antimicrobial agents in food animals and antimicrobial resistance among bacteria isolated from humans and the human health consequences of such resistance. *Journal of Veterinary Medicine*, 51, 374-379
- Belanger, A., Shryock, T. (2007) Macrolid-resistant *Campylobacter*: the meat of the matter. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60, 715-723.
- Cabrita, J., Pires, I., Vlaes, L., Coignau, H., Levy, J., Goossens, H., Gonçalves, AP., de Mol, P., Butzler, JP. (1992) *Campylobacter* enteritis in Portugal: Epidemiological features and biological markers [abstract]. *European Journal Epidemiology*, 8 (1), 22-26
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2006) Meeting of the CLSI Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility testing. 22-24 Janeiro. Florida
- Commission Decision of 19 July 2007: 2007/516/EC, concerning a financial contribution from the Community towards a survey on the prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. in broiler flocks and on the prevalence of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* spp. in broiler carcasses to be carried out in the Member States. *Official Journal of the European Union*, 190, 25-37. Bruxelas
- Directiva 2003/99/CE Do Parlamento Europeu e do Conselho de 17 de Novembro de 2003 relativa à vigilância das zoonoses e dos agentes zoonóticos. *Jornal Oficial da União Europeia*, 325, 31-40. Bruxelas
- Denis, M., Soumet, C., Rivoal, K., Ermel, G., Blivet, D., Salvat, G., Colin, P. (1999). Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Letters in Applied Microbiology* 29(6), 406-410
- Engberg, J., Aarestrup, F., Taylor, D., Gerner-Smidt, P., Nachamkin, I. (2001) Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates. *Emerging Infectious Diseases*, 7(1), 24-34.
- European Food Safety Authority (2005) Opinion of the scientific panel on biological hazards on the request from the Commission related to *Campylobacter* in animals and foodstuffs. The EFSA Journal (2005) 173, 1-10. Disponível em:

[http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa\\_locale-1178620753812\\_1178620776955.htm](http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178620776955.htm)

European Food Safety Authority (2007) The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2006. *The EFSA Journal*, 130, 107-132. Disponível em: [http://www.efsa.eu.int/EFSA/efsa\\_locale-1178620753812\\_1178671312912.htm](http://www.efsa.eu.int/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178671312912.htm)

European Food Security Authority (2009) The community summary report on food-borne outbreaks in the European Union in 2007. *The EFSA Journal*, 27, 17-50. Disponível em: [http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa\\_locale-1178620753812\\_1211902515341.htm](http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1211902515341.htm)

European Food Security Authority (2009) The community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in the European Union in 2007. *The EFSA Journal*, 223, 109-134. Disponível em: [http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa\\_locale-1178620753812\\_1211902269834.htm](http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1211902269834.htm)

Fàbrega, A., Sánchez-Céspedes, J., Soto, S., Villa, J. (2008) Quinolone resistance in the food chain. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31, 307-315

Fallon, R., O'Sullivan, N., Maher, M., Carroll, C. (2003) Antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from broiler chickens isolated at an Irish poultry processing plant. *Letters in Applied Microbiology* 36, 277-281

Fraqueza, M. (2009) Ocorrência de *Campylobacter* em Portugal: contribuição para a caracterização de um perigo emergente em segurança alimentar. In M., Fraqueza. III Ciclo de Conferências de Saúde Pública Veterinária: saúde animal e saúde humana uma única saúde. 3 e 4 de Julho de 2009. Porto

Gibreel, A., Taylor, D. (2006) Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58, 243-255.

Gomes, C. (2009). Estudo da prevalência de *Campylobacter* spp. In C., Gomes. III Ciclo de Conferências de Saúde Pública Veterinária: saúde animal e saúde humana uma única saúde. 3 e 4 de Julho de 2009. Porto

International Commission on Microbiological Specifications of Foods (ICMSF) (1996) Microorganisms in food - microbiological specifications of food pathogens. Londres: Blackie Academy & Professional.

Khachatourians, G. (1998). Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. *Canadian Medical Association*, 159 (9), 1129-1136.

Lambert, P. (2005) Bacterial resistance to antibiotics: modified target sites. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 1471-1485.

Luangtongkum, T., Morishita, T., Ison, A., Huang, S., McDermott, P., Zhang, Q. (2006) Effect of conventional and organic production practices on the prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. in poultry. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), 3600-3607.

Luangtongkum, T., Morishita, B., El-Tayeb, A., Ison, A., 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.

Luangtongkum, T., Jeon, B., Han, J., Plummer, P., Logue, C., Zhang, Q. (2009) Antibiotic resistance in *Campylobacter*. emergence, transmission and persistence. *Future Microbiology*, 4(2), 189-200.

Mazi, W., Senok, A., Al-Mahmeed, A., Arzase, A., Bindayna, K., Botta, G. (2008) Trends in antibiotic sensitivity pattern and molecular detection of tet(O)-mediated tetracycline resistance in *Campylobacter jejuni* isolates from human and poultry sources. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 61, 82-84

McDermott, P., Bodies-Jones, S., Fritsche, T. Jones, R., Walkers, R. (2005) Broth microdilution susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and determination of quality control ranges for fourteen antimicrobial agents. *Journal of Clinical Microbiology*. 43(12), 6136-6138.

Mena, C., Rodrigues, D., Silva, J., Gibbs, P., Teixeira, P. (2008) Occurrence, identification and characterization of *Campylobacter* species isolated from Portuguese poultry samples collected from retail establishments. *Poultry Science*. 87, 187-190.

Microbiological Safety of Food Funders Group (MSFFG) (2007). UK publicly funded research on microbial antibiotic resistance in relation to the safety food. Acedido em 10 de Outubro 2009, disponível em:  
<http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/microbialantiresist2007.pdf>

Microbiological Safety of Food Funders Group (MSFFG) (2008). UK publicly funded research relating to *Campylobacter*. update 2007. Acedido em 10 de Outubro 2009, disponível em:  
<http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/Campylobacter2.PDF>

Nauta, M., Hill, A., Rosenquist, H., Brynestad, S., Fetsch, A., Logt, P., Fazil, A., Christensen, B., Katsma, E., Borck, B., Havelar, A. (2009) A comparison of risk assessments on *Campylobacter* in broiler meat. *International Journal of Food Microbiology*. Disponível em: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.001

National Committee Clinical Laboratory Standards (2002). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals approved standard. Second Edition. M31-A2. National Committee Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.

Office International des Epizooties (2008). *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. In OIE Terrestrial Manual 2008. Chapter 2.9.3., 1185-1191.

Payot, S., Bolla, J., Corcoran, D., Fanning, S., Mégraud, F., Zhang, Q. (2006) Mechanism of fluoroquinolone and macrolide resistance in *Campylobacter* spp. *Microbes and Infection*, 8, 1967-1971.

Pezzoti, G., Serafin, A., Luzzi, I., Mioni, R., Milan, M., Perin, R. (2003) Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in animals and meat in northeastern Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 82, 281-287.

Phillips, I., Casewell, M., Cox, T., Groot, B., Friis, C., Jones, R., Nightingale, C., Preston, R., Waddell, J. (2004) Does the use of antibiotics in foods animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53, 28-52.

Poole, K. (2004) Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 10, 12-26.

Quinn, T., Bolla, J., Pagés, J., Fanning, S. (2007) Antibiotic-resistant *Campylobacter*. could efflux pump inhibitors control infection? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 59, 1230-1236.

Regulamento (CE) n.º1831/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 22 de Setembro de 2003 sobre aditivos a serem usados na alimentação animal. Jornal Oficial da União Europeia. 268, 29-43. Bruxelas.

Röner, A., Engvall, E., Andersson, L., Kaijser, B. (2004) Species identification by genotyping and determination of antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from humans and chickens in Sweden. *International Journal of Food Microbiology*, 96, 173-179.

Sáenz, Y., Zarazaga, M., Lantero, M., Gastañares, M., Baquero, F., Torres, C. (2000). Antibiotic resistance in *Campylobacter* strains isolated from animals, foods and humans in Spain in 1997-1998. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(2), 267-271.

Senok, A., Yousif, A., Mazi, W., Sharaf, E., Bindayna, K., Elnima, E., Botta, G. (2007) Pattern of antibiotic susceptibility in *Campylobacter jejuni* isolates of human and poultry origin. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 60, 1-4.

Société Française de Microbiologie. (2008). Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommendations 2008

Steinhauserova, I., Či esšikova, J., Fojtikova, K., Obrovská, I. (2001) Identification of thermophilic *Campylobacter* spp. by phenotypic and molecular methods. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 470-475.

Vicente, A., Barros, R., Florinda, A., Silva, A., Hanscheid, T. (2008) High rates of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* in Portugal - Need for surveillance. *Eurosurveillance*. 13, 6. Disponível em: <http://eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=8031>

Wang, G., Clark, C., Taylor, T., Pucknell, C., Barton, C., Price, L., Woodward, D., Rodgers, F. (2002) Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*. *Journal of clinical microbiology*, 40 (12), 4744-4747.

World Health Organization and Food and Agriculture Organization (2001). Hazard identification, hazard characterization and exposure assessment of *Campylobacter* spp. in broiler chickens. Disponível em: [www.who.int/foodsafety/micro/jemra/assessment/campy/en/](http://www.who.int/foodsafety/micro/jemra/assessment/campy/en/)

World Health Organization (2001). The increasing incidence of human *Campylobacteriosis*. Report and Proceedings of a WHO Consultation of Experts Copenhagen. Denmark, 21-25 November 2000. Disponível em: [Http://whqlibdoc.who.int/hq/2001/WHO\\_CDS\\_CSRAPH\\_2001.7.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2001/WHO_CDS_CSRAPH_2001.7.pdf)

Yan, S., Pendrak, M., Foley, S., Powers, J. (2005) *Campylobacter* infection and Guillain-Barré syndrome: public health concerns from a microbial food safety perspective. *Clinical and Applied Immunology Reviews*, 5, 285-305.

Young, K., Davis, L., DiRita, V. (2007). *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*. 5, 665-679.