



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Vigilância de base laboratorial da Campilobacteriose - transição do
fenótipo para o genótipo**

Selma Domingos de Amadeu Marques

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS
BIOMÉDICAS, ESPECIALIDADE EM BIOLOGIA MOLECULAR EM SAÚDE
TROPICAL E INTERNACIONAL

Abril, 2024



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Vigilância de base laboratorial da Campilobacteriose - transição do
fenótipo para o genótipo**

Autora: Selma Domingos de Amadeu Marques

Orientadora: Doutora Mónica Alexandra de Sousa Oleastro, Laboratório Nacional de Referência das Infecções Gastrointestinais, do Departamento de Doenças Infeciosas, do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

Dissertação apresentada para o cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas, especialidade em Biologia Molecular em Saúde Tropical e Internacional

Apoio financeiro da Fundação Calouste Gulbenkian (Nr processo 257373)

Filipenses 4:13

Tudo posso naquele que me fortalece.

Agradecimentos

À **Deus** por ser o meu Pai da vida, à **Jesus** por ser o meu caminho da vida e ao **Espírito Santo** por ser meu Ajudador.

À Fundação Calouste Gulbenkian por ter me beneficiado com uma bolsa de estudos para realizar o Mestrado em Portugal, uma oportunidade que antes era um sonho mas que atualmente tornou-se realidade, o meu muito obrigada.

Ao Instituto de Higiene e Medicina Tropical, em especial a todos os professores pela formação académica que me proporcionaram.

À minha orientadora Doutora Mónica Oleastro, por ter aceite o desafio de me orientar sem me conhecer antes, pela sua constante disponibilidade, atenção, pelos conhecimentos que me transmitiu e pelo empenho na resolução dos problemas que surgiram ao longo desta caminhada, verdadeiramente serei eternamente grata.

Ao Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), em especial à Doutora Alexandra Nunes pelas análises de bioinformática feitas neste trabalho, o meu coração será eternamente grato.

Ao Nashon Dussin por ter-me apresentado a ideia de me aventurar no “mundo” das bactérias.

Ao meu amado pai Domingos Marques (*in memoriam*) e a minha querida e amada mãe Amina Marques, pelo apoio incondicional, por terem me proporcionado e criado condições ideais para a realização dos meus sonhos na vida.

À minha amada, companheira, amiga, irmã e “alma” gémea Nina, por estar sempre comigo em todos os momentos da minha vida.

Ao meu amado irmão Ló e cunhada Vyvien pelo suporte e encorajamento em todos os sonhos que desejo aventurar.

À equipa do Laboratório Nacional de Referência das Infecções Gastrointestinais, em especial à Carla, Greice e Leonor por terem me acolhido tão bem e sempre prontas a ajudarem-me em qualquer dúvida que eu tivesse durante a realização deste trabalho.

À Carolina, Mónica Azevedo, Manuel Gimo e Cândido Luís por disponibilizarem do seu tempo para partilharem seus ricos conhecimentos que engradeceram este trabalho.

À minha crew “*The burning of bread*”, vocês são uma benção na minha vida e tornaram esta jornada num outro país menos solitária.

À todos que direta ou indiretamente apoiaram-me para que esta jornada tivesse sido concluída, o meu muito obrigada.

E por fim, obrigada Jesus Cristo por andar comigo.

Resumo

A campilobacteriose é desde 2005 a doença zoonótica de origem alimentar mais frequentemente notificada em humanos na União Europeia. *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) e *Campylobacter coli* (*C. coli*) são as principais espécies causadoras desta doença, sendo as aves os principais reservatórios destes agentes patogénicos. A resistência de *Campylobacter* spp. aos antibióticos tem alcançado níveis alarmantes em Portugal segundo os últimos dados dos relatórios europeus oficiais.

A sequenciação total do genoma (em inglês *Whole Genome Sequencing*- WGS) é um importante meio de tipagem molecular no qual muita informação genómica pode ser inferida se comparada com os métodos de tipagem convencionais.

Sendo assim, o presente estudo teve como principal objetivo gerar dados relevantes para suportar a transição do uso de métodos fenotípicos para genotípicos, na vigilância epidemiológica de base laboratorial da campilobacteriose em Portugal, com especial foco na vigilância da resistência aos antibióticos.

Um total de 643 estirpes clínicas de *Campylobacter* spp. foram estudadas. Foram isoladas de amostras de fezes e sangue de pacientes com gastroenterite, provenientes da rede de vigilância da campilobacteriose (laboratórios clínicos primários) em Portugal, durante o período de Janeiro de 2022 a Maio de 2023. As estirpes de *Campylobacter* spp. foram caracterizadas fenotipicamente pelo teste de susceptibilidade aos antibióticos, e genotipicamente pelo método de WGS.

Do total das 643 estirpes clínicas de *Campylobacter* spp., 542 (84,3%) eram *C. jejuni* e 101 (15,7%) eram *C. coli*. As crianças dos 1-4 anos de idade [*C. jejuni*: 31,2% e *C. coli*: 26,7% (p=0.114)] e os indivíduos do género masculino [58,3% (p<0,001)] foram os mais afetados pela campilobacteriose. Picos de infeção por *C. jejuni* foram observados no período de Inverno e por *C. coli* no Verão.

Para ambos *C. jejuni* e *C. coli*, níveis altos-muito altos de resistência foram observados, para os antibióticos ciprofloxacina (98% vs 93,7%) e tetraciclina (92,1% vs 64,1%), sendo que para a eritromicina apenas *C. coli* apresentou uma taxa de resistência mais preocupante (29,7% vs 1,6%). Mutações pontuais no gene *gyrA* e na subunidade 23S do *RNAr* e a presença do gene *tet(O)* foram os principais determinantes associados a resistência à ciprofloxacina, eritromicina e tetraciclina, respetivamente em isolados de *Campylobacter* spp.

A análise dos dados de WGS também permitiu identificar os perfis de *Multilocus Sequence Typing* (MLST). 66 STs diferentes foram detetados em *C. jejuni* sendo os ST10846 (17,1%), ST50 (9,2%), ST607 (7,3%), ST6461 (7%), ST354 (6,7%) e ST122 (6%), os mais comuns. Estirpes de *C. coli* apresentaram 30 STs diferentes com os ST10042 (25,7%), ST832 (9,9%), ST855 (6,9%), ST1595 (5,9%), ST3017 (5,9%), ST5659 (5,9%) e ST827 (5%), sendo os mais comuns. Uma análise de cluster aos STs mais frequentes em cada espécie, ST10846 e ST10042 permitiu identificar clusters genéticos de diversas dimensões, que sugerem a ocorrência de possíveis surtos de infeções, não detetados pelo sistema de notificação em curso em Portugal.

Os resultados deste estudo mostram a relevância de uma vigilância laboratorial com base em dados de WGS e suportam a recomendação da transição da vigilância da campilobacteriose com base em dados fenotípicos para genotípicos em Portugal.

Palavras-chaves: *Campylobacter* spp., epidemiologia, sazonalidade, resistência antimicrobiana, WGS, genótipos, determinantes genéticos de resistência.

Abstract

Since 2005, campylobacteriosis has been the most frequently reported foodborne zoonotic disease in humans in the European Union. *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) and *Campylobacter coli* (*C. coli*) are the main species causing this disease, with birds being the main reservoirs of these pathogens. The resistance of *Campylobacter* spp. antibiotics has reached alarming levels in Portugal according to the latest data from official European reports.

Whole Genome Sequencing (WGS) is an important means of molecular typing in which much genomic information can be inferred compared to conventional typing methods.

Therefore, the main objective of the present study was to generate relevant data to support the transition from the use of phenotypic to genotypic methods in laboratory-based epidemiological surveillance of campylobacteriosis in Portugal, with a special focus on the surveillance of antibiotic resistance.

A total of 643 clinical strains of *Campylobacter* spp. were studied. They were isolated from stool and blood samples from patients with gastroenteritis, from the campylobacteriosis surveillance network (primary clinical laboratories) in Portugal, during the period from January 2022 to May 2023. The *Campylobacter* spp. were characterized phenotypically by antibiotic susceptibility testing, and genotypically by the WGS method.

Of the total of 643 clinical strains of *Campylobacter* spp., 542 (84.3%) were *C. jejuni* and 101 (15.7%) were *C. coli*. Children aged 1-4 years [*C. jejuni*: 31.2% and *C. coli*: 26.7% (p=0.114)] and males [58.3% (p<0.001)] were the most affected by campylobacteriosis. Peaks of infection by *C. jejuni* were observed in the winter period and by *C. coli* in the summer.

For both *C. Jejuni* and *C. coli*, very high-high levels of resistance were observed, for the antibiotics ciprofloxacin (98% vs 93.7%) and tetracycline (92.1% vs 64.1%), and for erythromycin only *C. coli* showed a more worrying resistance rate (29.7% vs 1.6%). Point mutations in the *gyrA* gene and the 23S *RNAr* subunit and the presence of the *tet(O)* gene were the main determinants associated with resistance to ciprofloxacin, erythromycin and tetracycline, respectively in isolates of *Campylobacter* spp.

Analysis of WGS data also allowed the identification of Multilocus Sequence Typing (MLST) profiles. 66 different STs were detected in *C. jejuni*, being ST10846 (17,1%), ST50 (9,2%), ST607 (7,3%), ST6461 (7%), ST354 (6,7%) and ST122 (6%), the most common. *C. coli* strains presented 30 different STs with ST10042 (25,7%), ST832 (9,9%), ST855 (6,9%), ST1595 (5,9%), ST3017 (5,9%) , ST5659 (5,9%) and ST827 (5%), being the most common.

A cluster analysis of the most frequent ST in each species, ST10846 and ST10042, allowed the identification of genetic clusters of different sizes, which suggest the occurrence of possible outbreaks of infections, not detected by the current notification system in Portugal.

The results of this study show the relevance of laboratory surveillance of campylobacterioses based on WGS data, and support the recommendation to transition from surveillance based on phenotypic data to genotypic data in Portugal.

Keywords: *Campylobacter* spp., epidemiology, seasonality, antimicrobial resistance, WGS, genotypes, genetic determinants of resistance.

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract	iv
Índice de figuras	viii
Índice de tabelas	x
Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos	xi
1 Introdução.....	1
2 Revisão bibliográfica de Campilobacteriose e <i>Campylobacter</i> spp.	3
2.1 Contexto histórico	3
2.2 Características gerais do género <i>Campylobacter</i>	4
2.3 Métodos de Isolamento	5
2.4 Identificação e confirmação	6
2.5 Reservatórios e vias de transmissão	7
2.6 Tratamento	9
2.7 Resistência antibiótica em <i>Campylobacter</i> spp. na Europa	9
2.8 Epidemiologia da resistência em <i>Campylobacter</i> spp. às fluoroquinolonas, macrólidos, tetraciclinas, aminoglicosídeos e beta-lactâmicos	10
2.9 Mecanismos de resistência aos antibióticos em <i>Campylobacter</i> spp.	13
2.10 Mecanismos de resistência às Fluoroquinolonas	13
2.11 Mecanismos de resistência aos Macrólidos	14
2.12 Mecanismos de resistência às Tetraciclinas	14
2.13 Mecanismos de resistência aos Aminoglicosídeos	15
2.14 Mecanismos de resistência aos Beta-lâctamicos	15
2.15 <i>Whole Genome Sequencing</i> em vigilância epidemiológica do <i>Campylobacter</i> spp. 16	
3 Objetivos.....	19
3.1 Objetivo geral.....	19
3.2 Objetivos específicos	19
4 Materiais e Métodos	21

4.1	Estirpes clínicas.....	21
4.2	Isolamento de <i>Campylobacter</i> spp. a partir de amostras de fezes de animais	22
4.3	Cultura das estirpes de <i>Campylobacter jejuni</i> e <i>Campylobacter coli</i>	22
4.4	Identificação por MALDI-TOF MS.....	23
4.5	Teste de Suscetibilidade aos Antibióticos.....	23
4.6	Whole Genome Sequence	24
5	Resultados.....	28
5.1	Vigilância de <i>Campylobacter</i> spp.	28
5.2	Distribuição temporal de casos de infecção por <i>Campylobacter</i> de 2009 a 2023 ...	29
5.3	Distribuição de casos de infecção por <i>Campylobacter jejuni</i> e <i>Campylobacter coli</i> de acordo com as características demográficas e clínicas.....	30
5.4	Variações sazonais no número de casos de infecção por <i>Campylobacter jejuni</i> e <i>Campylobacter coli</i>	33
5.5	Resistência antimicrobiana de <i>Campylobacter</i> spp.....	34
5.6	Evolução temporal da resistência aos antibióticos em <i>Campylobacter</i> spp.....	37
5.7	Resistência aos antibióticos: comparação entre fenótipo e genótipo em <i>Campylobacter</i> spp.....	39
5.8	Genotipagem de <i>Campylobacter</i> spp. por <i>Whole Genome Sequencing</i>	42
6	Discussão	58
7	Conclusão	74
8	Referências bibliográficas	76

Índice de figuras

Figura 1. Visão geral da campilobacteriose (em números) na Europa.	2
Figura 2. Visão geral dos reservatórios e rotas de transmissão da infecção pelo <i>Campylobacter</i> spp. (Ali e Alsayeqh, 2022).....	7
Figura 3. Frequência de infecções por <i>Campylobacter jejuni</i> e <i>Campylobacter coli</i> por região geográfica.....	30
Figura 4. Distribuição dos casos de infecção por <i>Campylobacter jejuni</i> e <i>Campylobacter coli</i> de acordo com o género da população em estudo.	31
Figura 5. Frequência de <i>Campylobacter jejuni</i> e <i>Campylobacter coli</i> em relação a faixa etária, em anos da população em estudo.....	32
Figura 6. Distribuição do número de infecções por <i>Campylobacter</i> spp., por <i>Campylobacter jejuni</i> e por <i>Campylobacter coli</i> , de acordo com o mês de colheita de amostra, no período entre Janeiro de 2022 a Maio de 2023.	34
Figura 7. Perfil de resistência (%) aos diferentes antibióticos testados em <i>Campylobacter jejuni</i> (n=315).	35
Figura 8. Perfil de resistência (%) aos diferentes antibióticos testados em <i>Campylobacter coli</i> (n=101).....	36
Figura 9. Proporção de estirpes de <i>Campylobacter jejuni</i> e <i>Campylobacter coli</i> totalmente suscetíveis, multiresistentes e diferentes combinações de dois antibióticos.	37
Figura 10. Evolução das taxas de resistências em <i>Campylobacter jejuni</i> (A) e <i>Campylobacter coli</i> (B) para os antibióticos prioritários (CIP, E, TET e CN), de Janeiro de 2013 até Maio de 2023.	39
Figura 11. Frequência de tipo de ST em estirpes de <i>Campylobacter jejuni</i>	42
Figura 12. Frequência de tipo de ST em estirpes de <i>Campylobacter coli</i>	43
Figura 13. Distribuição de STs de <i>Campylobacter jejuni</i> durante o período em estudo, Janeiro de 2022 a Maio de 2023.....	44
Figura 14. Frequência de ST em <i>Campylobacter coli</i> durante o período de estudo, 2022 a 2023.	47
Figura 15. Relação genética entre 54 estirpes humanas de <i>Campylobacter jejuni</i> com o ST10846, isoladas entre Janeiro de 2022 a Maio de 2023 em Portugal.	54

Figura 16. Relação genética entre 26 estirpes humanas de *Campylobacter coli* com o ST10042, isoladas entre Janeiro de 2022 e Maio de 2023 em Portugal.56

Índice de tabelas

Tabela 1. Distribuição do número de infecções por <i>Campylobacter jejuni</i> e <i>Campylobacter coli</i> por ano de vigilância.....	29
Tabela 2. Frequência de <i>Campylobacter jejuni</i> e <i>Campylobacter coli</i> em relação as características clínicas da população em estudo.....	33
Tabela 3. Genes que conferem resistência antimicrobiana e mutações pontuais cromossômicas detectadas em <i>Campylobacter jejuni</i> e <i>Campylobacter coli</i> pela plataforma ResFinder.....	41
Tabela 4. Distribuição de STs de <i>Campylobacter jejuni</i> de acordo com a região de colheita de amostra.....	45
Tabela 5. Distribuição de ST em relação a faixa etária e o gênero da população de estudo.....	46
Tabela 6. Distribuição de STs de <i>Campylobacter coli</i> de acordo com a região de colheita de amostra.....	48
Tabela 7. Distribuição de ST em relação a faixa etária e o gênero da população de estudo.....	49
Tabela 8. Distribuição dos STs em relação ao fenótipo de resistência para CIP, TET e E.....	50
Tabela 9. Distribuição dos STs em relação ao fenótipo de resistência para CIP, TET, E e CN.....	51
Tabela 10. Descrição dos determinantes genéticos de resistência em estirpes de <i>Campylobacter coli</i> isoladas humanas e animais com um perfil de resistência MDR.....	52

Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

AAC	Aminoglicosídeo acetiltransferases
AAD ou ANT	Aminoglicosídeo adeniltransferases
APH	Aminoglicosídeo fosfotransferases
AMP	Ampicilina
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
AUG	Amoxicilina + Ácido clavulânico
β-láctamicos	Beta-láctamicos
CEB	Caldo de enriquecimento de <i>Campylobacter</i>
CGE	<i>Center for Genomic Epidemiology</i>
CMI	Concentração mínima inibitória
CN	Gentamicina
COS	Columbia agar
CP	Ciprofloxacina
GBS	Guillain-Barré
GEA	Gastroenterite Aguda
E	Eritromicina
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
ETP	Ertapenemo
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
EURL-AR	<i>EU Reference Laboratory - Antimicrobial Resistance</i>
FWD	<i>Food and Waterborne Diseases and Zoonoses network</i>
INSA	Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
MALDI-TOF MS	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time of Flight Mass Spectrometry</i>
mCCD agar	<i>Modified charcoal cefoperazone deoxycholate agar</i>
MDR	Multirresistentes
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>

NGS	<i>Next-Generation Sequencing</i>
QRDR	Região Determinante da Resistência em Quinolonas
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCR-RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
ST	<i>Sequence Type</i>
TET	Tetraciclina
TSA	Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos
TSB	<i>Trypticase Soy Broth</i>
UE	União Europeia
URGI	Laboratório Nacional de Referência das Infecções Gastrointestinais
WGS	<i>Whole Genome Sequencing</i>

Introdução

1 Introdução

A doença diarreica aguda, também denominada gastroenterite aguda (GEA), é uma doença caracterizada por sintomas como diarreia, vômitos, febre e dor abdominal (Allos *et al.*, 2013; Igwaran e Okoh, 2019).

A diarreia é considerada um dos grandes problemas de saúde pública em todo o mundo, responsável pelas altas taxas de morbidade e mortalidade e é uma das principais causas de consultas em ambulatório e hospitalizações em pessoas de todas as idades. Cerca de 1.6 milhão de mortes anualmente em todo o mundo é devido a esta doença (Naghavi *et al.*, 2017; GBD, 2018).

Campilobacteriose é uma gastroenterite aguda que acomete os seres humanos, causada por duas principais espécies de bactérias do género *Campylobacter* spp., *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) e *Campylobacter coli* (*C. coli*) (Liu *et al.*, 2018).

Segundo dados do Relatório da União Europeia (UE) sobre Zoonoses, a campilobacteriose em 2022 foi a zoonose mais reportada em humanos na Europa. No total, entre 27 estados membros da UE, Reino Unido (Irlanda do Norte) e 3 estados não membros da UE, houve reporte de 137 107 casos confirmados de campilobacteriose em 2022, sendo a taxa global de notificação de 43,1 casos por 100 000 habitantes em cada estado membro da UE (Figura 1) (EFSA, 2023a).

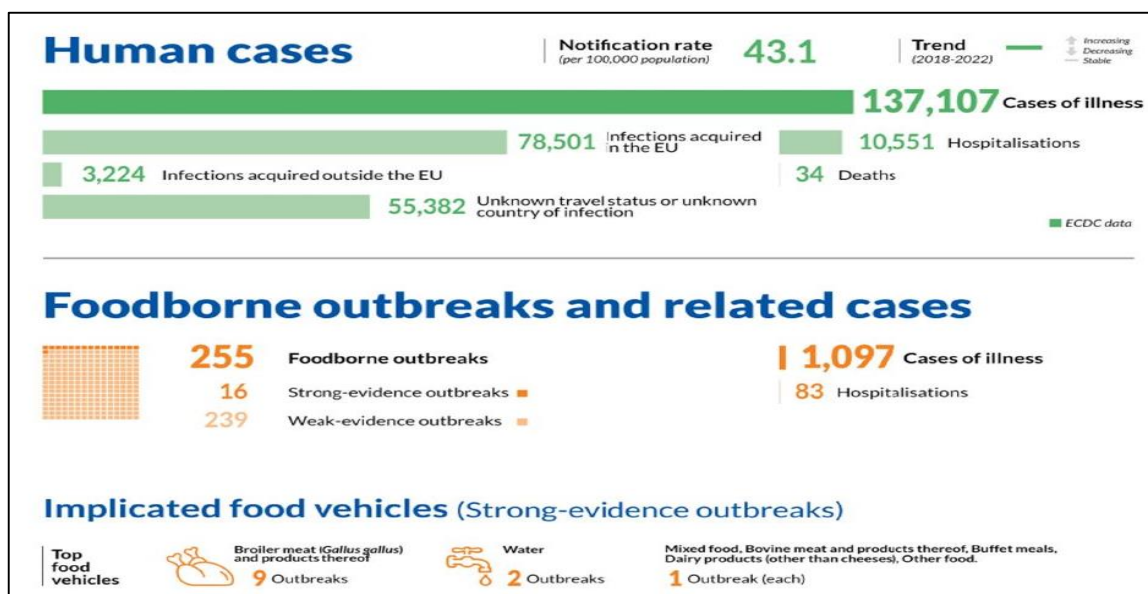


Figura 1. Visão geral da campilobacteriose (em números) na Europa.

Fonte: EFSA. (2023a). The European Union One Health 2022 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 21(12). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.8442>.

C. jejuni é reconhecido mundialmente como a bactéria zoonótica transmitida por alimentos que mais causa gastroenterites em humanos (Fitzgerald, 2015; Hsieh e Sulaiman, 2018; Seguino *et al.*, 2018). Cerca de 90% de todos os casos de campilobacteriose no mundo são causados por *C. jejuni* (Epps *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2022), sendo *C. coli* responsável por cerca de 10% dos casos de campilobacteriose (Crim *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2022). Outras espécies de *Campylobacter* como *C. upsaliensis*, *C. lari*, *C. fetus*, *C. rectus*, *C. curvus*, *C. hyointestinalis*, *C. ureolyticus* e *C. concisus* também já foram relatadas como causa da campilobacteriose, embora numa frequência muito baixa (Yuwono *et al.*, 2021).

C. jejuni e *C. coli* são bactérias colonizadoras do trato gastrointestinal de diferentes animais, tais como aves domésticas e selvagens, bovinos, ovinos, cães e porcos, sendo as aves o principal reservatório natural (Dearlove *et al.*, 2016).

A campilobacteriose é uma doença zoonótica cuja principal rota de transmissão ao homem é a via fecal-oral, a qual pode ocorrer de diversas formas, sendo que as principais são o contacto do indivíduo com as fezes excretadas por estes animais no ambiente (Igwaran e Okoh, 2019), pelo contacto direto com animais de estimação que estejam infetados ou

colonizados (Westermarck, 2016), pelo consumo de carne mal cozinhada contaminada e consumo de alimentos contaminados, água não tratada e leite não pasteurizado (Nileshkumar *et al.*, 2015), bem como manuseamento de carne contaminada que leva a contaminação cruzada de outros alimentos. Os principais grupos de risco acometidos por esta doença são crianças menores de 5 anos de idade, pessoas mais idosas e pessoas com idade entre os 15-44 anos (Butzler, 2004).

Para além de causar uma infeção gastrointestinal no homem, caracterizada por diarreia aguda aquosa ou com sangue, febre e cólicas abdominais, a infeção por *Campylobacter* spp. pode ter manifestações extragastrointestinais, podendo apresentar diversas formas tais como, artrite reativa, síndrome de Guillain-Barré (GBS), síndrome de Miller Fisher, bacteremia, septicemia, artrite séptica, endocardite, sepsis neonatal, osteomielite e meningite (Kaakoush *et al.*, 2015; Igwaran e Okoh, 2019; Liu *et al.*, 2022).

2. Revisão bibliográfica de Campilobacteriose e *Campylobacter* spp.

2.1 Contexto histórico

Até à década de 1970, *Campylobacter* spp., ainda era desconhecido como um agente causador de doença (Butzler, 2004).

Em 1906, em pesquisas para descoberta das causas dos abortos ocorridos em ovelhas, os veterinários britânicos de nome McFadyean e Stockman relataram o primeiro isolamento de *Campylobacter* spp., ainda desconhecido nessa altura, em fetos abortados, tendo a bactéria características morfológicas semelhantes a um vibrio (Skirrow, 2006). Uma década mais tarde, em 1919, os dois investigadores americanos, Smith e Taylor, chamaram de “Vibrio fetus” às bactérias isoladas de fetos abortados de bovinos, pois eram semelhantes morfológicamente ao vibrio anteriormente descoberto pelos veterinários britânicos (Smith e Taylor, 1919).

Após vários estudos sucessivos, Jones *et al.*, em 1931, e mais tarde por Doyle em 1944, nomearam *Vibrio jejuni* e *Vibrio coli* como causadores de disenteria que ocorria no inverno em bezerras e disenteria em suínos, respectivamente (Jones *et al.*, 1931). O primeiro relato documentado de infeção humana causada por *Campylobacter* spp., mas ainda desconhecido pela comunidade científica, ocorreu no estado americano de Illinois em 1938, envolvendo

um surto de diarreia causado por leite contaminado num estabelecimento prisional (Butzler, 2004).

O primeiro isolamento laboratorial de um suposto “vibrio”, mais tarde reconhecido como *C. jejuni*, a partir das fezes e sangue de uma paciente com diarreia severa e febre de 40° C, ocorreu em 1968 na Bélgica (Dekeyser *et al.*, 1972), dando início a uma série de investigações laboratoriais para pesquisa de *Campylobacter* spp. Esta investigação culminou no desenvolvimento do primeiro meio seletivo para a cultura de *C. jejuni* e *C. coli* a partir de fezes, designado meio de Skirrow, em 1977 (Skirrow, 1977).

2.2 Características gerais do género *Campylobacter*

C. jejuni e *C. coli* pertencem ao género *Campylobacter*, superfamília VI rRNA, família *Campylobacteraceae*, ordem *Campylobacterales*, classe Epsilonproteobacteria e filo Proteobacteria (Allos, 2013; Kaakoush *et al.*, 2015).

Atualmente, o género *Campylobacter* possui 40 espécies (Liu *et al.*, 2018), sendo elas caracterizadas por serem bacilos gram-negativos, curvos ou espiralados, possuem motilidade por meio de flagelos polares ou flagelos bipolares, no entanto, existem algumas espécies que não possuem flagelos, as colónias geralmente possuem uma tonalidade creme ou acinzentada (Pal, 2017).

Estas bactérias não formam esporos, têm um tamanho de aproximadamente 0,2 a 0,8 por 0,5 a 5 µm, são indol negativos, oxidase positivo, catalase positivo, hipurato positivo ou negativo (*C. coli*), e reductoras de nitratos; a sua fonte de energia não provém da fermentação e oxidação de hidratos de carbono, mas sim de aminoácidos ou intermediários do ciclo do ácido tricarbóxico, sendo designados de quimiorganotróficos (Vandamme *et al.*, 2005; Pal, 2017).

Quanto ao crescimento, *C. jejuni* e *C. coli* são termotolerantes pois o seu desenvolvimento e multiplicação dá-se a uma temperatura ótima de 42° C, num período de 24h a 48h ou até cinco dias a partir de amostra biológica. São considerados organismos fastidiosos uma vez que o seu crescimento só ocorre em condições restritas de microaerofilia, onde as concentrações de oxigénio são muito baixas e com grande concentração de dióxido de carbono (5% de O₂, 10% de CO₂ e 85% de N₂), estas características, para além dos meios

de cultura complexos, tornam a cultura laboratorial de *C. jejuni* e *C. coli* exigente (Franco, 1995; Gharst *et al.*, 2013).

2.3 Métodos de Isolamento

Em mamíferos e aves, a detecção de colonização intestinal por *Campylobacter* spp. é baseada no isolamento do microrganismo nas fezes, zaragatoas retais e/ou conteúdos do ceco (WOAH, 2008).

Atualmente, vários métodos microbiológicos encontram-se disponíveis para o isolamento de *C. jejuni* e *C. coli*. O isolamento de *C. jejuni* e *C. coli* pode ser realizado utilizando meios de cultura seletivos ou o método de filtração passiva (Franco, 1995; Gharst *et al.*, 2013).

Os meios selectivos contêm antibióticos e antifúngicos com o objetivo de inibir o crescimento de outros géneros de bactérias ou fungos que possam estar presentes nas amostras, e deste modo permitir o crescimento de estirpes de *Campylobacter* spp. Os antibióticos comumente adicionados aos meios de cultura seletivos são: trimetoprim, vancomicina, cefalotina, polimixina B, cefoperazona, rifampicina e anfoteracina B (Line, 2002; Brasil, 2011).

Alguns componentes, tais como sulfato ferroso, metabissulfito e piruvato de sódio, hemina, sangue e carvão bacteriológico, são adicionados em alguns meios de cultura para remover os derivados tóxicos de oxigénio, e deste modo promover a viabilidade das estirpes de *Campylobacter* spp. (Gharst *et al.*, 2013). Exemplos de meios seletivos contendo estes agentes seletivos redutores de oxigénio são o meio CAMPY-BAP, meio Butzler, mCCDA (*modified charcoal cefoperazone deoxycholate agar*) e Preston agar (Franco, 1995; Gharst *et al.*, 2013).

Quando se trata de isolamento de *C. jejuni* e *C. coli* a partir de amostras de animais (fezes, conteúdo intestinal ou carne), onde as bactérias tendem a estar em menor concentração, ou quando se pretende fazer o isolamento a partir de amostras que se prevê que estiveram sujeitas a condições ambientais stressantes, por exemplo: condições de armazenamento, alterações na temperatura, privações de nutrientes, desidratação ou exposição a ambiente aeróbico, recomenda-se fazer primeiramente o enriquecimento dessas amostras, seguido de

sementeira nos meios de cultura sólidos e seletivos para aumentar a taxa de recuperação ou sobrevivência destes microrganismos (WOAH 2008; Gharst *et al.*, 2013).

Os meios de enriquecimento comumente usados são a) Caldo Bolton que no geral, contém na sua composição: peptonas, extrato de levedura, ácido alfa-cetoglutárico, hemina e antibióticos (cefoperazona, vancomicina, trimetoprim e cicloheximida; b) Caldo Preston contém: extratos de carne bovina, peptonas, cloreto de sódio, sulfato de ferro (II), metabissulfito de sódio, piruvato de sódio, polimixina B, rifampicina, lactato de trimetoprima, cicloheximida, água destilada ou deionizada e sangue de cavalo lisado; c) Caldo de enriquecimento de *Campylobacter* (CEB) contém: peptonas, hidrolisado de lactalbumina, extrato de levedura, hemina, sangue de cavalo lisado, cloreto de sódio, piruvato de sódio, metabissulfito de sódio, carbonato de sódio e adiciona-se cefoperazona, cicloheximida, trimetoprim e vancomicina como agentes seletivos para amostras altamente contaminadas (Franco, 1995; Brasil, 2011; Gharst *et al.*, 2013).

O método de filtração passiva é uma alternativa para o isolamento de *Campylobacter* spp. em amostras de fezes ou de alimentos, com o objetivo de separá-lo da restante flora bacteriana existente, com base no tamanho inferior de *Campylobacter* spp. relativamente aos outros agentes entéricos (Baggerman e Koster, 1992; Lastovica *et al.*, 2000).

2.4 Identificação e confirmação

A confirmação preliminar dos isolados pode ser feita usando testes fenotípicos baseados na morfologia e motilidade das espécies de *Campylobacter* spp. e os mesmos podem ser complementados com identificação presuntiva destes microrganismos (Brasil, 2011).

Colônias suspeitas geralmente são incolores com uma tonalidade acinzentada, creme ou com brilho metálico. Após coloração de Gram, apresentam-se como bacilos de Gram-negativo, delgados, curvos ou em forma de “S”, com grande mobilidade; em culturas menos frescas podem apresentar-se sob a forma cocoides (Keener *et al.*, 2004; Vandamme *et al.*, 2005).

Atualmente, existem vários métodos de identificação das espécies do género *Campylobacter* spp, sendo que eles podem ser agrupados em métodos bioquímicos e moleculares (Gharst *et al.*, 2013). Nos métodos bioquímicos, podem ser usados alguns testes

como: catalase, oxidase, redução de nitratos, fermentação da glicose, produção de H₂S, hidrólise de hipurato (diferenciação entre *C. jejuni* e *C. coli*), testes de sensibilidade aos antibióticos (cefalotina e ácido nalidíxico) (Lastovica, 2000).

Devido ao carácter quimiorganotrófico das espécies de *Campylobacter* spp., e pela grande vantagem de serem rápidos e apresentarem alta sensibilidade e especificidade, os métodos baseados em biologia molecular tendem a ser os mais usados para a identificação e diferenciação específica desses microrganismos em vários tipos de amostra, sendo essenciais para vigilância em saúde pública e investigações de surtos (MacCannell, 2013; Sabat *et al.*, 2013). A literatura apresenta-nos vários métodos moleculares, dentre eles, os mais destacados são: multiplex PCR destinada principalmente para a diferenciação entre *C. jejuni* e *C. coli*, PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), MLST (*Multilocus Sequence Typing*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) (Wassenaar, 2000; Wang *et al.*, 2002).

Para além das técnicas laboratoriais mencionadas acima, a *Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time of Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS) é uma técnica analítica muito empregue nos laboratórios de diagnóstico clínico, para identificar bactérias patogénicas ao nível de espécie, de acordo com a composição proteica destes microrganismos (Rychert, 2019). Nesta técnica, partículas são ionizadas e separadas de acordo com sua relação massa-carga e o espectro resultante da medição do tempo que as partículas chegam no receptor é comparada a um banco de dados de espectros de organismos conhecidos (Jurinke *et al.*, 2004).

2.5 Reservatórios e vias de transmissão

Campylobacter spp. são comensais do trato gastrointestinal de uma grande variedade de animais tais como, aves domésticas e selvagens (galinhas, patos, pombos e gaivotas), bovinos, ovinos, suínos, cães e gatos. As aves são consideradas como o principal reservatório natural e a principal fonte de infeções e contaminações nos países industrializados, sendo os frangos de corte o principal veículo de transmissão (Kaakoush *et al.*, 2015; Dearlove *et al.*, 2016). De notar que *Campylobacter* spp. também pode ser encontrado nos aviários, ambiente

circundante, como solo, e também em fontes de água (Ellis-Iversen *et al.*, 2012). O consumo de carne de frangos de corte, peru, pato, avestruzes bem como carne bovina e suína e seus derivados contaminada ou mal cozinhada são a principal fonte de transmissão de *C. jejuni* e *C. coli* (Epps *et al.*, 2013; Igwaran e Okoh, 2019).

O consumo de leite, sobretudo não pasteurizado, e alguns produtos laticínios como queijo e iogurte contaminados também têm sido relatados como uma das vias comuns de transmissão de *Campylobacter* spp. em humanos (El-Zamkan e Hameed, 2016). O consumo de água não desinfetada também contribui como uma via comum de transmissão de *C. jejuni* e *C. coli*, tendo sido relatada como responsável por causar surtos em alguns países (Hänninen *et al.*, 2003; Richardson *et al.*, 2007). O contacto direto com animais de estimação, como cães, e animais de fazenda, como o gado, colonizados por *Campylobacter* spp. e/ou suas fezes podem ser um risco de infecção por *Campylobacter* spp. (Hansson *et al.*, 2018) (figura 2), estando o pessoal trabalhador de fazendas e matadouros, que não praticam corretos hábitos de higiene pessoal como a lavagem das mãos e de segurança alimentar, em maior risco de adquirir a infecção e disseminá-la na comunidade (Igwaran e Okoh, 2019).

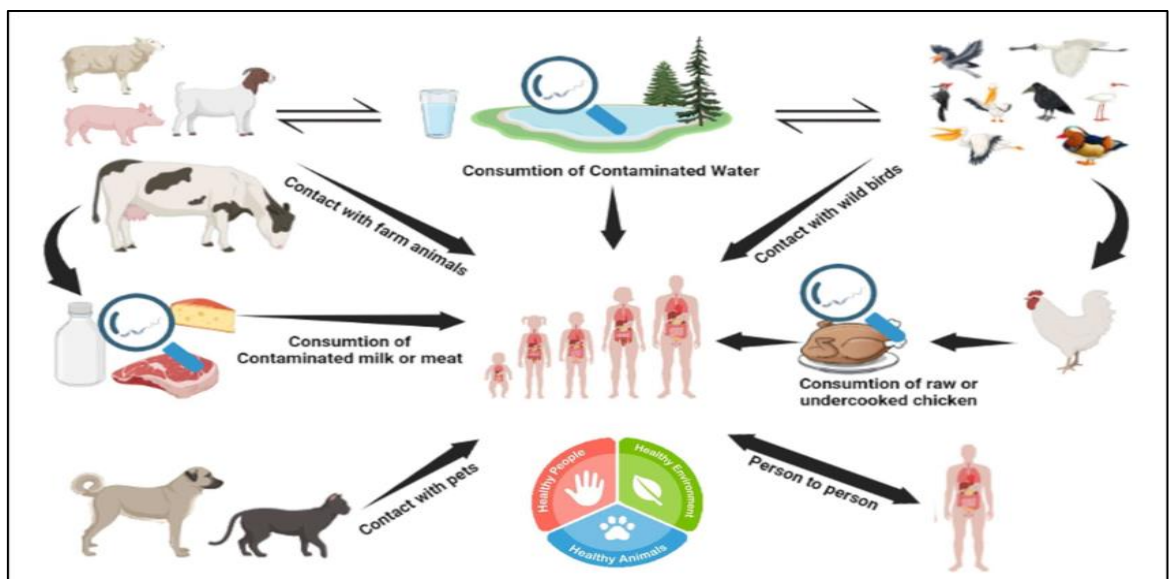


Figura 2. Visão geral dos reservatórios e rotas de transmissão da infecção por *Campylobacter* spp. (Ali e Alsayeqh, 2022).

2.6 Tratamento

A campilobacteriose cursa normalmente com sintomatologia pouco grave e auto-limitada, sendo caracterizada principalmente por diarreia aguda aquosa ou com sangue, febre e cólicas abdominais. Nos casos de doença auto-limitada menos grave, não é necessário o tratamento com antibióticos, recomendando-se apenas a administração de uma terapia oral de reposição de fluídos e electrólitos para prevenir a desidratação e como medida de reforço para o tratamento desta doença (Allos, 2001; CDC, 2019).

Casos graves da doença podem ocorrer em pacientes imunocomprometidos, crianças pequenas, pessoas com 65 anos ou mais e mulheres grávidas, sendo nestes casos, necessário administrar antibioterapia (Allos, 2001; Reddy e Zishiri, 2017; CDC, 2019). Ciprofloxacina e tetraciclina foram os antibióticos de escolha usados como a primeira linha de tratamento da campilobacteriose, no entanto, o aumento das taxas de resistência a estes antibióticos tem comprometido a eficácia destes fármacos (Sproston, 2018). Atualmente, a primeira linha de tratamento são os macrólidos, nomeadamente a azitromicina (Guerrant *et al.*, 2001; Dai *et al.*, 2020). No entanto, em casos de infeções sistémicas por linhagens de *C. coli* e *C. jejuni* multirresistentes (incluindo macrólidos, fluoroquinolonas e tetraciclina) devem ser administrados aminoglicosídeos (Aarestrup e Engberg, 2001; Whitehouse *et al.*, 2018) ou mesmo os carbapenemos (Hakanen *et al.*, 2003).

2.7 Resistência antibiótica em *Campylobacter spp.* na Europa

A resistência antimicrobiana é um grave problema de saúde pública que tem vindo a ganhar proporções alarmantes nos últimos anos, estimando-se que cerca de 5 milhões de mortes a cada ano sejam devido a infeções causadas por agentes patogénicos resistentes aos antibióticos (WHO, 2022).

A crescente resistência de *Campylobacter spp.* aos antibióticos usados para o tratamento da campilobacteriose tem-se tornado uma emergência de saúde pública da atualidade tanto em países desenvolvidos e não desenvolvidos (Mattheus *et al.*, 2012; Wiczorek e Osek, 2015; Nguyen *et al.*, 2016), tornando o uso dos habituais antibióticos de escolha limitado para o tratamento desta infeção (De Vries *et al.*, 2018).

Devido ao carácter zoonótico da campilobacteriose, a Comissão Europeia desenvolveu em 2017 um plano de acção estratégico com base em uma abordagem *One Health* para combater a resistência aos antibióticos (EFSA 2022a).

A monitorização da resistência antimicrobiana em bactérias isoladas de animais produtores de alimento e de carnes provenientes destes animais na Europa é baseado na Diretiva 2003/99/EC do Parlamento Europeu e do Conselho da União Europeia (UE). Esta diretiva define como obrigatoriedade, que todos os estados membros e não membros da EU, recolham anualmente dados relevantes e comparáveis da resistência antimicrobiana verificada em bactérias zoonóticas e indicadoras e de surtos de origem alimentar.

Em relação à resistência antimicrobiana em bactérias isoladas de seres humanos, incluindo *Campylobacter* spp., a UE e os países não membros (Reino Unido, Irlanda do Norte, Albânia, Islândia, República da Macedônia do Norte, Noruega e Suíça) devem implementar uma vigilância epidemiológica seguindo as diretrizes de um protocolo europeu harmonizado desenhado pelo ECDC em colaboração com o *Food and Waterborne Diseases and Zoonoses network* (FWD) (EFSA, 2023b).

Os Laboratórios Nacionais de Referência em Saúde Pública de cada país devem implementar uma vigilância epidemiológica segundo o protocolo europeu, realizando testes de susceptibilidade aos antibióticos para *Campylobacter* spp. e outras bactérias, interpretando os dados com base nas diretrizes da *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) e o *EU Reference Laboratory - Antimicrobial Resistance* (EURL-AR) e de seguida reportar os dados obtidos ao ECDC (EFSA, 2023b).

Todos os dados são compilados e analisados pelas duas entidades Europeias, *European Food Safety Authority* (EFSA) e *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) e publicados sob a forma de um relatório anual (*EU Summary Report*) (EFSA, 2023b).

2.8 Epidemiologia da resistência em *Campylobacter* spp. às fluoroquinolonas, macrólidos, tetraciclina, aminoglicosídeos e beta-lactâmicos

A primeira classe de antibióticos usada para o tratamento da campilobacteriose foram as fluoroquinolonas, destacando-se a ciprofloxacina como o antibiótico de eleição. No

entanto, logo após a sua introdução em 1980, estirpes de *Campylobacter* spp. resistentes à ciprofloxacina surgiram na Europa, tornando o uso do mesmo ineficaz para o tratamento (Aarestrup e Engberg, 2001).

Pensa-se que o surgimento e rápido aumento de estirpes de *Campylobacter* spp. resistentes às fluoroquinolonas deveu-se ao uso desta classe de antibióticos na medicina veterinária, como os antibióticos enrofloxacina e danofloxacina, no controlo de infeções causadas por *Campylobacter* spp. em aves, como as galinhas, bem como no tratamento de doenças respiratórias nas mesmas, ao nível da produção animal (Nachamkin *et al.*, 2002).

Os dados do último relatório divulgado pela EFSA, *The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2020/2021* (2023), indicam que a resistência à ciprofloxacina em *C. coli* isolados de humanos foi maior do que em relação aos isolados humanos de *C. jejuni*. Níveis de resistência à ciprofloxacina em *C. jejuni* isolados de humanos esteve em torno de 27,6% a 100% com um nível médio de 64,5% a nível da UE. Para *C. coli*, o nível de médio de resistência foi de 69,6%. Os dados mais recentes publicados, referentes ao ano de 2021, apontam Portugal como um dos países europeus com níveis extremamente elevados de resistência em *C. coli* (100%) e em *C. jejuni* (92,5%) em humanos a nível do continente europeu (100%) (EFSA, 2023b).

Em oposição, na Austrália, onde o uso da ciprofloxacina não estava aprovado na produção animal, a resistência é rara, em torno de 2% (Unicomb *et al.*, 2006).

Desde a sua descoberta, a eritromicina tem sido usado tanto na medicina humana como na veterinária para o tratamento de várias doenças, sendo um dos principais antibióticos usado como segunda linha de tratamento de infeções causadas por bactérias de Gram-positivo (Gibreel e Taylor, 2006).

Na UE, a resistência à eritromicina em isolados humanos de *C. jejuni* foi muito baixa com um nível médio de 1,1% e o nível médio de resistência em isolados humanos de *C. coli* à eritromicina foi maior com 8,5%, com grande variabilidade entre os países europeus. Portugal ultrapassa em muito esta média, tendo sido reportadas taxas de resistência de 5,4% para *C. jejuni* e 55,3% para *C. coli* (EFSA, 2023b).

As tetraciclinas são uma classe de antibióticos que foram descobertos na década de 1940 e têm sido usados desde então no tratamento de diversas infecções bacterianas, sendo de amplo-espectro contra bactérias de Gram-negativo e de Gram-positivo, bem como para microrganismos intracelulares como a clamídia (Iovine, 2013). No entanto, o uso generalizado das tetraciclinas na medicina humana e veterinária resultou no rápido aparecimento de resistências em *Campylobacter spp.*, limitando o uso do mesmo para tratamento da campilobacteriose (Iovine, 2013).

Na UE, os níveis médios de resistência às tetraciclinas em *C. jejuni* isolados de humanos foram elevados (45,3%), sendo extremamente elevados em *C. coli* (70,3%) e Portugal apresentando a maior taxa de resistência às tetraciclinas em *C. coli* (100%) (EFSA, 2023b).

Os aminoglicosídeos são uma classe de antibióticos usados em infecções sistêmicas, como bacteremia, ou quando existe falha terapêutica com os antibióticos de primeira linha (Zhang *et al.*, 2021). A resistência de *Campylobacter spp.* a esta classe de antibióticos é de grande preocupação para a saúde pública devido a sua importância. Na UE em geral e em Portugal, foram reportados níveis baixos de resistência à gentamicina em *C. jejuni* (0,7% e 0,4% respetivamente) e *C. coli* (2,13% e 2,4%, respetivamente), sendo a exceção neste caso a Espanha que apresentou as maiores taxas de resistência, 9,6% em *C. jejuni* e 11,9% em *C. coli* (EFSA, 2023b).

A ampicilina tem atividade contra a *Campylobacter spp.* mas não é recomendada para o tratamento da campilobacteriose pois os níveis de resistência são muito altos o que impede de serem usados (Sierra-arguello *et al.*, 2015). A amoxicilina + ácido clavulânico e o ertapenemo têm sido vistos como uma alternativa para o tratamento desta doença, sobretudo nas formas invasivas, pois a resistência a estes antibióticos é quase rara (EFSA, 2022; EFSA, 2023).

A maioria dos países europeus não reportaram dados de resistência aos beta-lactâmicos (amoxicilina + ácido clavulânico, ampicilina e ertapenemo), dos poucos países que reportaram, níveis baixos de resistência à amoxicilina + ácido clavulânico em *C. jejuni* e *C. coli* de humanos foi observada, excepto Alemanha que apresentou as maiores taxas 41.9% e 44%, respetivamente (EFSA, 2023b). Dados de ampicilina e ertapenemo não se

encontram disponíveis pois estes antibióticos não estão incluídos no painel prioritário para a monitorização da resistência em *Campylobacter* spp. isolados de humanos.

Em relação aos animais, níveis mais altos de resistência à ciprofloxacina na UE foram observados em *C. coli* do que em *C. jejuni*, à semelhança dos isolados humanos. Perus de engorda (80,4%) e bezerros (79,7%) foram os animais que registaram níveis mais elevados de resistência à ciprofloxacina, seguido de frangos (61,9%) e porcos de engorda (51,7%) (EFSA, 2023b).

Nos animais, tal como nos isolados humanos, a resistência à eritromicina foi superior em *C. coli* na UE [isolados de bezerros (35,7%), perus de engorda (21,5%), suínos de engorda (12,3%) e frangos de corte (4,4%)] em relação a *C. jejuni*, onde os níveis foram muito baixos chegando a serem indetetáveis em alguns países. Quanto à gentamicina e ao ertapenemo, níveis moderados de resistência foram observados em *C. coli* isolado de bezerros com 12,4% e 29,1%, respetivamente (EFSA, 2023b).

2.9 Mecanismos de resistência aos antibióticos em *Campylobacter* spp.

Campylobacter spp. é um microrganismo altamente adaptável à pressão seletiva de antibióticos, tendo desenvolvido vários mecanismos de resistência às diversas classes de antibióticos (Tang *et al.*, 2017). De entre eles, destacam-se a destruição enzimática ou inativação do antibiótico, alteração do alvo do antibiótico e/ou sua expressão (mutações que ocorrem no gene que codifica para a DNA Girase), alteração da permeabilidade da membrana, alteração da estrutura do ribossoma, alteração de vias metabólicas, e alteração do efluxo do antibiótico (Tang *et al.*, 2017; Aleksic *et al.*, 2021).

2.10 Mecanismos de resistência às Fluoroquinolonas

As fluoroquinolonas são antibióticos com ação bactericida contra a maioria das bactérias de Gram-negativo e de Gram-positivo, tendo como mecanismo inibir a ação de duas enzimas intracelulares, a DNA girase, também designada de topoisomerase II (codificada pelos genes *gyrA* e *gyrB*) e a topoisomerase IV (codificada pela *parC* e *parE*), enzimas essenciais para a replicação, transcrição, recombinação e reparação do DNA bacteriano (Iovine, 2013; Wiczorek e Osek, 2013).

A resistência às fluoroquinolonas é atribuída a dois mecanismos que atuam juntos sinergicamente, são eles, a 1) inativação do alvo do antibiótico pela alteração de um ou mais aminoácidos na estrutura da DNA girase e topoisomerase IV e 2) efluxo do antibiótico pelas bombas de efluxo (Luo *et al.*, 2003; Ge *et al.*, 2005).

A resistência às fluoroquinolonas em *C. jejuni* e *C. coli* é ocasionada particularmente por mutações pontuais, que originam a substituição de um ou mais aminoácidos na Região Determinante da Resistência em Quinolonas (QRDR) do gene *gyrA* (Iovine, 2013). As principais mutações relacionadas com a resistência já reportadas nesta região são Thr86Ile, Asp90Asn, Thr86Lys, Thr86Ala, Thr86Val e Asp90Tyr, sendo que a mutação mais frequente envolvida na resistência é a Thr86Ile, conferindo alta resistência para esta classe de antibióticos (Ge *et al.*, 2005; Payot *et al.*, 2006).

2.11 Mecanismos de resistência aos Macrólidos

Os macrólidos são uma classe de antibióticos amplamente usada para o tratamento de infecções causadas por uma variedade de bactérias de Gram-negativo, como *Campylobacter* spp., e de Gram-positivo (Dinos, 2017). Os macrólidos actuam inibindo a síntese proteica através da ligação à subunidade 50S do ribossoma bacteriano, sendo os principais mecanismos de resistência, a modificação do alvo, bombas de efluxo e alteração da permeabilidade da membrana (Cagliero *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2007). Em *Campylobacter* spp., a modificação do sítio de ligação ao alvo do ribossoma por mutação da subunidade 23S do RNAr constitui o principal mecanismo de resistência aos macrólidos, devido à mutações nos resíduos de adenina nas posições 2074 e 2075 em todas as três cópias do gene 23S RNAr (operação *rrnB*) em *C. jejuni* e *C. coli* (Vacher *et al.*, 2005; Jeon *et al.*, 2008). Estas mutações conferem resistência à eritromicina bem como à azitromicina.

2.12 Mecanismos de resistência às Tetraciclinas

As tetraciclinas atuam inibindo a síntese proteica, ligando-se à subunidade 30S do ribossoma bacteriano, bloqueando a ligação do complexo tRNA-aminoácido (aa-tRNA) ao sítio A do ribossoma e deste modo, não permitindo o alongamento durante a síntese proteica (Chopra e Roberts, 2001). Os principais mecanismos de resistência, bem conhecidos e

detalhados, para esta classe de antibióticos são: a proteção do sítio de ligação ao ribossoma mediada por genes, principalmente o gene *tet(O)* e as bombas de efluxo (Chopra e Roberts, 2001, Iovine, 2013).

O gene *tet(O)* é o gene responsável por conferir resistência às tetraciclinas em *C. jejuni* e *C. coli*, e o mesmo encontra-se localizado no cromossoma, ou em plasmídeos conjugativos ou transposons que transportam o gene *tet(O)*, facilitando a disseminação deste gene por transferência horizontal de genes (Chopra e Roberts, 2001; Auerbach *et al.*, 2007).

2.13 Mecanismos de resistência aos Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são uma classe de antibióticos que inibem a síntese de proteínas de várias bactérias de Gram-negativo e de Gram-positivo. Existem dois mecanismos principais pelos quais os aminoglicosídeos exercem a sua atividade antimicrobiana: (1) interferência com a translocação da cadeia nascente do péptido do sítio A para o sítio P no ribossoma, levando a terminação prematura, e (2) interferência com a atividade de correção de erros, levando à incorporação de erros e à incorreta incorporação de aminoácidos e produção de uma proteína disfuncional (Iovine, 2013).

Em *Campylobacter* spp., a resistência aos aminoglicosídeos é atribuída principalmente a enzimas que actuam modificando estes antibióticos, diminuindo a afinidade dos aminoglicosídeos ao sítio-A do RNAr (Llano-Sotelo *et al.*, 2002; Ramirez e Tolmasky, 2010). Estas enzimas são divididas em três grupos segundo a reação que medeiam, são eles: aminoglicosídeo fosfotransferases (APH), aminoglicosídeo adeniltransferases (AAD ou ANT) e aminoglicosídeo acetiltransferases (AAC) (Shaw *et al.*, 1993; Iovine, 2013). Destes três grupos, as APH são as consideradas como o maior grupo de enzimas modificadoras dos aminoglicosídeos já identificadas em *Campylobacter* spp., sendo responsáveis pela fosforilação do grupo 3' hidroxil de vários aminoglicosídeos (Ramirez e Tolmasky, 2010).

2.14 Mecanismos de resistência aos Beta-láctamicos

Os beta-láctamicos (β -láctamicos) são uma classe de antibióticos de amplo espectro que inibem a síntese do peptidoglicano da parede celular das bactérias, ligando-se às transpeptidases do peptidoglicano, essenciais para catalisar a etapa final da biosíntese da

parede celular, inibindo deste modo o crescimento bacteriano e levando à morte celular das mesmas (Iovine, 2013; Shen *et al.*, 2018).

Encontram-se reportados na literatura três mecanismos identificados pelos quais as bactérias conseguem inibir a ação dos β -lactâmicos, são eles: 1) a inativação enzimática por β -lactamases, 2) absorção reduzida devido a porinas na membrana externa e 3) bombas de efluxo (Zeng *et al.*, 2014).

Segundo alguns estudos publicados, a β -lactamase OXA-61 é a única enzima já identificada e estudada que confere resistência à ampicilina em *Campylobacter* spp., nomeadamente foi descrita uma mutação na região promotora desta enzima, a transversão G57T, que foi identificada em estirpes de *C. jejuni* e *C. coli* resistentes, e está ausente nas estirpes susceptíveis à ampicilina (Griggs *et al.*, 2009; Zeng *et al.*, 2014; Deforet *et al.*, 2023).

2.15 Whole Genome Sequencing em vigilância epidemiológica do *Campylobacter* spp.

A primeira geração de sequenciação a ser desenvolvida foi a sequenciação de Sanger em 1977 por Frederick Sanger, no qual o método utiliza fragmentos de DNA radiomarcados parcialmente digeridos (Sanger *et al.*, 1977).

Pela demanda de recursos financeiros que o método de Sanger exige e sua ineficiência para sequenciar seqüências longas de DNA, foram desenvolvidos métodos de sequenciação que pudessem maximizar as pesquisas laboratoriais. A Sequenciação de Nova Geração, comumente conhecido como *Next-Generation Sequencing* (NGS) foi introduzido na prática laboratorial por ser possível sequenciar bilhões de fragmentos, pela rapidez e custo cada vez mais baixo verificado nos últimos anos (Besser *et al.*, 2018; Qin, 2019).

Uma dessas tecnologias de NGS é a Sequenciação do Genoma Completo (do inglês, *Whole Genome Sequencing* - WGS), importante tecnologia de alto rendimento em pesquisas biomédicas, recomendado para uso em testagem de rotina em vários países (Gilmour *et al.*, 2010; Chin *et al.*, 2011; Carrillo *et al.*, 2012).

No campo das doenças infecciosas, o WGS tem sido utilizado, entre outros, em investigação e definição de casos esporádicos e dos surtos, rastreamento, vigilância e atribuição de fonte de infecção em investigações de surtos, detecção de pequenos e grandes surtos, identificação e caracterização de agentes patogênicos, identificação de determinantes

genéticos de resistência e perfis de virulência. Tem mostrado ser uma ferramenta muito útil na identificação de relações clonais entre isolados, aumento da compreensão da dinâmica evolutiva e epidemiológica de agentes patogénicos e no auxílio à intervenções de prevenção e controlo de doenças infecciosas em saúde pública (Carrillo *et al.*, 2012; Besser *et al.*, 2018; Ferdinand *et al.*, 2021; Diplock, 2022).

Em vários países do mundo, a epidemiologia da infeção por *C. jejuni* e *C. coli* em seres humanos, animais, alimentos e água tem vindo a ser estudada com base em dois principais métodos de tipagem, a PFGE e o MLST, no entanto, para implementação da vigilância de rotina, estes métodos são limitados na sua capacidade de avaliar a clonalidade e diversidades destes agentes (Biggs *et al.*, 2011; Llarena *et al.*, 2016; FDA, 2018).

Através do WGS, é possível determinar a diversidade genómica de *C. jejuni* e *C. coli* e deste modo, avaliar a relação genética entre os isolados (Llarena *et al.*, 2017; Grant *et al.*, 2018). Investigações de surtos de campilobacteriose através da identificação de isolados clonais de *C. jejuni* também tem sido uma das aplicabilidades do WGS, que pode ser incluída na vigilância de rotina como uma estratégia de intervenção direcionada para a prevenção e controlo da campilobacteriose (Llarena *et al.*, 2017).

Para além da grande vantagem de ser possível monitorizar a diversidade genética e identificar e investigar surtos por meio do WGS, é possível também mensurar informações muito mais robustas para o contexto da campilobacteriose, tais como identificar genes que conferem resistência aos antibióticos, para monitorização da emergência de resistência aos antibióticos e dinâmica de transmissão da resistência a nível local, regional e global, bem como para fornecer dados para o desenvolvimento de novos antibióticos para o tratamento da campilobacteriose (Besser *et al.*, 2018; Grant *et al.*, 2018).

Uma vez que infeções por *C. jejuni* e *C. coli*, ocorrem numa escala global, por meio de várias plataformas disponibilizadas com acesso livre aos dados gerados pelo WGS, é possível fazer uma comparabilidade de dados moleculares gerados em diferentes países ao redor do mundo (Llarena *et al.*, 2017).

A plataforma *Center for Genomic Epidemiology* (CGE) é um recurso que fornece análises de bioinformática num website de fácil uso e gratuito para detetar genes de resistência, mutações pontuais, identificar espécies de um determinado patógeno e *sequence*

type (ST) e outras predições *in silico*. O mesmo pode ser usado por utilizadores com pouca ou nenhuma experiência em bioinformática, em laboratórios de investigação e laboratórios centrais em países de baixo e médio rendimento (Florensa *et al.*, 2022).

Países como os EUA e a Inglaterra implementaram a vigilância epidemiológica de rotina de *Salmonella enteritidis* desde 2017 (Turcotte *et al.*, 2022) e *Listeria monocytogenes* desde 2013 (Jackson *et al.*, 2016), e *Salmonella enteritidis*, *E. coli* produtora da toxina Shiga (STEC), *Shigella*, *Listeria*, *Campylobacter* spp., desde 2014 respetivamente, com base em dados de WGS (Grant *et al.*, 2018).

Em Portugal, a infeção por *Campylobacter* spp. é a principal causa da gastroenterite aguda na comunidade, sendo também o país da EU com níveis mais elevados de resistência, segundo dados da vigilância dos últimos anos (EFSA, 2018; EFSA, 2022; EFSA, 2023).

Devido as inúmeras vantagens no uso do WGS para a saúde pública, a EFSA em colaboração com ECDC têm vindo a recomendar aos países europeus para a transição de uma vigilância de rotina que se baseia em dados fenotípicos para genotípicos usando dados gerados pelo WGS (EFSA, 2016).

Sendo assim, com este trabalho, pretende-se gerar evidência científica da aplicabilidade do WGS para a vigilância epidemiológica de base laboratorial da campilobacteriose e contribuir para o seu estabelecimento de forma rotineira em Portugal.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

- Gerar evidência científica da aplicabilidade do *WGS* para a vigilância epidemiológica de base laboratorial da campilobacteriose em Portugal.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a população em estudo e estudar a associação entre dados demográficos e a infecção por *Campylobacter* spp;
- Determinar o fenótipo de resistência antimicrobiana de estirpes de *C. jejuni* e *C. coli* isoladas de casos clínicos de campilobacteriose;
- Identificar determinantes de resistência com base nos dados de *WGS*;
- Estudar a distribuição geográfica e temporal dos perfis de *MLST*, e identificar clones persistentes e dominantes;
- Determinar a correlação entre fenótipo e genótipo de resistência;
- Aplicar os dados de *WGS* para proceder à identificação de potenciais surtos;
- Determinar fenotipicamente e genotipicamente a frequência de resistência aos antimicrobianos em *C. jejuni* e *C. coli* isolados de frangos e suínos provenientes de matadouros da região de Lisboa entre Novembro de 2022 a Março de 2023;
- Comparar dados genotípicos entre amostras humanas e animais - abordagem *One Health*.

Materials e Métodos

4 Materiais e Métodos

4.1 Estirpes clínicas

O Laboratório Nacional de Referência das Infecções Gastrointestinais (URGI) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) é o laboratório responsável por realizar a vigilância da campilobacteriose em Portugal, numa base laboratorial anual. A rede de laboratórios clínicos primários e hospitalares é constituída por 9 centros hospitalares públicos, 3 hospitais públicos e 2 grupos de laboratórios clínicos privados, que enviam os isolados clínicos e informação epidemiológica para a URGI. Os mesmos encontram-se distribuídos entre as três principais regiões de Portugal, Lisboa e Vale do Tejo (LVT) (2 centros hospitalares, 2 hospitais e 2 laboratórios clínicos privados), Centro (1 centro hospitalar e 1 laboratório clínico privado) e Norte (6 centros hospitalares, 2 hospitais e 2 laboratórios clínicos privados).

O presente trabalho foi realizado com estirpes clínicas de *C. jejuni* e de *C. coli*, recolhidas em laboratórios hospitalares que fazem parte da rede de vigilância de base laboratorial da campilobacteriose em Portugal, no período de Janeiro de 2022 a Maio de 2023.

A nível hospitalar, o diagnóstico é realizado em amostras de fezes colhidas de pacientes de todas as faixas etárias, de ambos os géneros e que são atendidos nas consultas de triagem com um quadro clínico de GEA. Nos casos mais graves, em doentes internados, pode haver isolamento da bactéria em amostras de sangue.

No laboratório hospitalar, após a colheita das amostras, é feito o isolamento e respetiva identificação bioquímica ou por MALDI-TOF MS, para a deteção de *C. jejuni* e *C. coli*. Após o isolamento e a identificação, os hospitais enviam as estirpes isoladas para o URGI do INSA para confirmação/identificação de espécie e para a realização do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos, juntamente com informação demográfica, microbiológica e clínica (género, idade, local de colheita de amostra, tipo de amostra, sintomas e origem de caso). As estirpes são enviadas em placa ou tubo contendo meio de transporte. No laboratório de referência é realizada a confirmação de espécie, teste de susceptibilidade aos antibióticos e genotipagem.

4.2 Isolamento de *Campylobacter* spp. a partir de amostras de fezes de animais

Em paralelo com a vigilância de base laboratorial da campilobacteriose, com o objetivo de avaliar possíveis reservatórios e rotas de transmissão da campilobacteriose, determinar a frequência de isolados multirresistentes (MDR) e caracterizar a resistência dos isolados MDR aos antibióticos, visto ser uma doença zoonótica, foram estudadas 209 amostras de fezes de suínos colhidas em dois matadouros portugueses e 90 amostras de conteúdo cecal de frangos colhidas em seis matadouros portugueses para a identificação de *Campylobacter* spp. Todas as amostras foram colhidas entre os meses de Novembro de 2022 a Março de 2023.

O isolamento de *Campylobacter* spp. foi feito usando a técnica do filtro, no qual todas as amostras foram pré-enriquecidas com um caldo de enriquecimento seletivo, o caldo Bolton com sangue de cavalo, de seguida as amostras foram incubadas a 37° C por um período de 4-6 horas (ou 1 hora), seguido de um período de 48 horas a 42° C, em atmosfera de microaerofilia. Após este período, algumas gotas de suspensão de cada amostra foram depositadas sobre a membrana de um filtro de celulose (0,45 mm ou 0,65 mm) que foi colocada sobre a superfície de uma placa de meio de cultura sólido seletivo (Baggerman e Koster, 1992). De seguida, a placa foi incubada em um meio aeróbio à temperatura ambiente por 30 minutos a 1 hora. Retirou-se o filtro de celulose e incubou-se a placa numa atmosfera de microaerofilia a 42° C por 48h. Colónias de *Campylobacter* spp. cresceram e migraram pelos poros do filtro e se depositaram sobre a placa enquanto que os outros microrganismos de tamanho superior ao poro da membrana ficaram retidos na superfície do filtro (Gharst *et al.*, 2013).

4.3 Cultura das estirpes de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*

Com o objetivo de recuperar em cultura as estirpes enviadas dos hospitais, em palca ou meio de transporte, a cultura foi enriquecida com 2 a 3 gotas do caldo de *brucella* e com o auxílio de uma ansa bacteriológica estéril de 10 µl de diâmetro (Normax, Portugal) foram plaquedas por esgotamento em estrias na superfície do meio de cultura COS (*Columbia agar* + 5% *sheep blood*, bioMérieux) e incubaram-se as placas em atmosfera de microaerofilia (6% O₂, 5% H₂, 10% CO₂, restante N₂) gerado pelo equipamento *Anoxomat* (*Advanced*

Instruments Inc., Países Baixos) a 42° C por 24h. Todas as estirpes identificadas como *C. jejuni* e *C. coli* incluídas no estudo foram conservadas em 1 ml de *Trypticase Soy Broth* (TSB) com 20% de glicerol, a - 80° C num biobanco do INSA.

4.4 Identificação por MALDI-TOF MS

Estirpes não identificadas como *C. jejuni* e *C. coli* por parte dos hospitais, ou colónias que após a incubação apresentaram características morfológicas duvidosas foram identificadas e confirmadas pela técnica de MALDI-TOF MS, usando o equipamento VITEK® MS, segundo as instruções do fabricante (bioMérieux, Portugal).

4.5 Teste de Suscetibilidade aos Antibióticos

Para a determinação do perfil de susceptibilidade dos isolados de *C. jejuni* e *C. coli* aos antibióticos foi utilizado o método de difusão em meio sólido, concretamente a técnica de *Kirby-Bauer*, usando os antibióticos em disco e cargas recomendados segundo as diretrizes do ECDC, antibióticos prioritários: ciprofloxacina (CIP) (5 µg), eritromicina (E) (15 µg), tetraciclina (TET) (30 µg) e gentamicina (CN) (10 µg); antibióticos opcionais: amoxiciclina + ácido clavulânico (AMC) (30 µg), ampicilina (AMP) (10 µg), ertapenemo (ETP) (10 µg) (Oxoid).

Foi preparada uma suspensão em soro fisiológico, de densidade equivalente a Mac Farland 0,5. Os inóculos foram semeados por estrias apertadas em placa de Mueller-Hinton agar suplementado com 5% de sangue desfibrinado de cavalo (Oxoid) e β-NAD (Sigma) (bioMérieux Portugal).

Os discos de antibióticos foram aplicados sobre a superfície do meio inoculado e as placas foram incubadas em ambiente de microaerofilia gerado pelo equipamento *Anoxomat* (*Advanced Instruments Inc.*, Países Baixos) a 42° C por 24h. Após 24h de incubação, mediram-se manualmente os diâmetros das zonas de inibição com um paquímetro digital. Com base nestes diâmetros, as estirpes foram classificadas em suscetível ou resistente, de acordo com a classificação do *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), para os antibióticos ciprofloxacina, eritromicina e tetraciclina, e do

Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie para a gentamicina, ampicilina, amoxicilina+ácido clavulânico e ertapenemo.

Para as estirpes que foram classificadas como resistentes para eritromicina, amoxiciclina + ácido clavulânico e ertapenemo pela técnica de *Kirby-Bauer*, procedeu-se a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) por gradiente de difusão, com tiras E-test (bioMérieux, Portugal)

A estirpe de referência *C. jejuni* ATCC 33560 foi utilizada como controlo de qualidade para todos os testes para o antibiograma, de acordo com as normas do EUCAST.

4.6 Whole Genome Sequence

Extração de DNA

Para a extração de DNA, 200 µl de suspensões bacterianas de densidade equivalente a Mc Farland 1 foram preparadas e a extração foi realizada usando o extrator automático MagNa Pure 96 (Roche Diagnostics, Portugal), utilizando-se o kit MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit (Roche Diagnostics), de acordo com as instruções do fabricante.

Quantificação do DNA

A concentração de DNA foi determinada usando o aparelho Qubit e o kit dsDNA Quantitation, Broad Range (Thermo Fisher Scientific, Portugal), e posteriormente fez-se a diluição com água livre de dNases para obter uma concentração final de DNA de 5 µg/µl de acordo com o protocolo de preparação da biblioteca para a sequenciação.

Sequenciação do DNA

Após extração do DNA total, as amostras foram quantificadas por fluorometria (Qubit™, ThermoFisher Scientific, Portugal) e, foram preparadas bibliotecas (Nextera XT Illumina) para sequenciação total do genoma (WGS). A sequenciação paired-end (2x150bp) foi realizada na Unidade de Tecnologia e Inovação do Departamento de Genética Humana do INSA, num equipamento NextSeq 550 ou NextSeq 2000 da Illumina.

Análise bioinformática *in silico* de genes e perfil de resistência aos antimicrobianos e *sequence type* (STs)

Os dados gerados (*raw reads*) foram depois sujeitos a *assembly de novo* usando o software INNUca v4.2.3 (<https://github.com/B-UMMI/INNUca>), uma pipeline de bioinformática integrativa que consiste em vários módulos integrados para avaliar e melhorar a qualidade dos *reads* (FASTQC, Trimmomatic), confirmação da espécie (KRAKEN), *assembly de novo* (SPAdes) e polimento dos genomas obtidos (Pilon).

Com base nos dados de WGS, foi determinada *in silico* a especiação, determinação de perfil de MLST e determinantes de resistência, utilizando os programas KmerFinder 3.2 (<https://cge.food.dtu.dk/services/KmerFinder/>), MLST 2.0 (<https://cge.food.dtu.dk/services/MLST/>) e ResFinder 4.1 (<https://cge.food.dtu.dk/services/ResFinder/>), respetivamente, reunidas na plataforma *Center for Genomic Epidemiology* (CGE: <https://www.genomicepidemiology.org>), recomendada pelo ECDC. Para a determinação de novos perfis de MLST em que o CGE não conseguiu identificar, usou-se a plataforma PubMLST (<https://pubmlst.org/organisms/campylobacter-jejunicoli>).

A relação genética entre isolados de *C. coli* com ST10042 (n=26) e entre isolados de *C. jejuni* com ST10846 (n=54) foi avaliada por análise comparativa gene-a-gene, usando o software chewBBACA v.3.1.2 com os esquemas de wgMLST de *C. coli* e *C. jejuni* do INNUENDO (<https://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/en-1498>), os quais são compostos por um painel de 2477 e 2794 loci, respetivamente. Para ambos os casos, o software ReporTree (<https://github.com/insapathogenomis/ReporTree>) foi aplicado para (i) realizar uma análise filogenética (*minimum spanning tree*-MST) baseada no número de alelos compartilhados e (ii) identificar potenciais clusters genéticos (*cut-off* de ≤ 5 distâncias alélicas) (Besser *et al.*, 2019; Joensen *et al.*, 2020). Esta análise foi realizada com o apoio da Unidade de Bioinformática do Departamento de Doenças Infeciosas do INSA.

Análise estatística

Para a análise estatística dos dados obtidos foi utilizado o pacote de software estatístico SPSS 28.0 para Windows (SPSS. Chicago. IL. EUA). Foram utilizados o teste de

Qui-quadrado e Exato de Fisher para avaliar a associação entre as variáveis de estudo. $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Considerações éticas

O presente estudo foi desenvolvido no âmbito da Vigilância de Base Laboratorial da Campilobacteriose, não sendo necessário a aprovação ética para o mesmo, uma vez que foram usados dados obtidos como parte da rotina de vigilância.

Os dados do presente estudo bem como as amostras clínicas foram utilizados apenas para os objectivos traçados e processados de acordo com as normas éticas nacionais e internacionais.

Resultados

5 Resultados

5.1 Vigilância de *Campylobacter* spp.

O presente estudo foi desenvolvido no âmbito da vigilância de base laboratorial da campilobacteriose em Portugal, que teve início em 2009 no INSA, com o objectivo de se conhecer a diversidade genética da população de *Campylobacter* spp., estabelecer as principais fontes de infeção e vias de transmissão ao homem e determinar a nível nacional, as taxas de resistências a antimicrobianos.

O presente trabalho teve como base o período temporal de Janeiro de 2022 a Maio de 2023. Durante o ano de 2022, de Janeiro a Dezembro, o laboratório recebeu 852 estirpes clínicas e respetivos inquéritos epidemiológicos. Deste total, foram selecionadas aleatoriamente cerca de 50% das amostras por representatividade geográfica, género e faixa etária, perfazendo um total de 431 casos, dos quais 350 são amostras identificadas como *C. jejuni* e 81 amostras identificadas como *C. coli*. Com base nos resultados da especiação por MALDI-TOF MS ou com base nos dados de WGS, cerca de 95% das amostras vem corretamente identificadas dos laboratórios primários, sendo as restantes sem identificação ou com identificação errónea. No período de Janeiro a Maio de 2023, o laboratório recebeu 423 amostras com o igual número de inquéritos, tendo sido incluídas para o estudo 212 amostras e seu respetivos inquéritos; destas, 192 são *C. jejuni* e 20 *C. coli*. No total, o estudo incluiu 643 estirpes, 542 (84,3%) *C. jejuni* e 101 (15,7%) *C. coli*.

5.2 Distribuição temporal de casos de infecção por *Campylobacter* de 2009 a 2023

De modo a avaliar a evolução temporal e proporção de infeções entre *C. jejuni* e *C. coli*, foram comparados o número e proporção de casos desde o início da vigilância, em 2009 (informação relativa ao período de 2009 até 2021 encontra-se disponível no artigo de Duarte *et al.*, 2023) até Maio de 2023. Neste período, a frequência dos casos de infecção por *C. jejuni* esteve entre 83,9% a 92,3%, consideravelmente alta em relação as infeções por *C. coli* observadas no mesmo período, no qual as frequências variaram entre 7,7% a 18,8% (Tabela 1).

Entre 2009 e 2017, o número de infeções por *C. jejuni* aumentou gradualmente, tendo o pico de infeções ocorrido no período entre 2016 a 2017. No entanto, é possível observar um decréscimo gradual no número de infeções nos períodos de 2017-2018, 2018-2019 e 2019-2020 e de seguida, um ligeiro aumento no período de 2020-2021 e 2021-2022 (Tabela 1).

Relativamente a *C. coli*, observou-se um aumento no número de infeções nos períodos de 2013-2014 e 2014-2015 com o seu pico no período de 2012-2022 (excepto ano de 2020) conforme dados da Tabela 1.

Tabela 1. Distribuição do número de infeções por *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* por ano de vigilância.

	Ano															Total
	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023 (Jan-Maio)	
<i>C. jejuni</i> n (%)	112 (86,8)	208 (83,9)	300 (86,5)	294 (89,6)	393 (92,3)	388 (88,8)	394 (85,5)	474 (88,3)	626 (91,4)	591 (89,8)	311 (85,4)	221 (85,0)	278 (85,5)	350 (81,2)	192 (90,6)	5132 (87,8)
<i>C. coli</i> n (%)	17 (13,2)	40 (16,1)	47 (18,5)	34 (10,4)	33 (7,7)	49 (11,2)	67 (14,5)	63 (11,7)	59 (8,6)	67 (10,2)	53 (14,6)	39 (15,0)	47 (14,5)	81 (18,8)	20 (9,4)	716 (12,2)
Total N	129	248	347	328	426	437	461	537	685	658	364	260	325	431	212	5848

5.3 Distribuição de casos de infeção por *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* de acordo com as características demográficas e clínicas

No que concerne a região geográfica de colheita de amostra da população de estudo (Janeiro de 2022 a Maio de 2023), a região Norte do país foi a região que apresentou o maior número de casos de *C. jejuni* (n=232/542; 42,8%) e a região de LVT teve o maior número de casos de *C. coli* (n=42/101; 41,6%) em relação as restantes regiões do país. De seguida, encontramos as regiões de LVT e Norte do país com o maior número de casos de *C. jejuni* (n=229; 42,3%) e *C. coli* (n=35; 34,7%) (Figura 3). Não se observou, no entanto, diferença estatisticamente significativa entre a região geográfica e a infeção por *C. jejuni* ou *C. coli* (p=0,066).

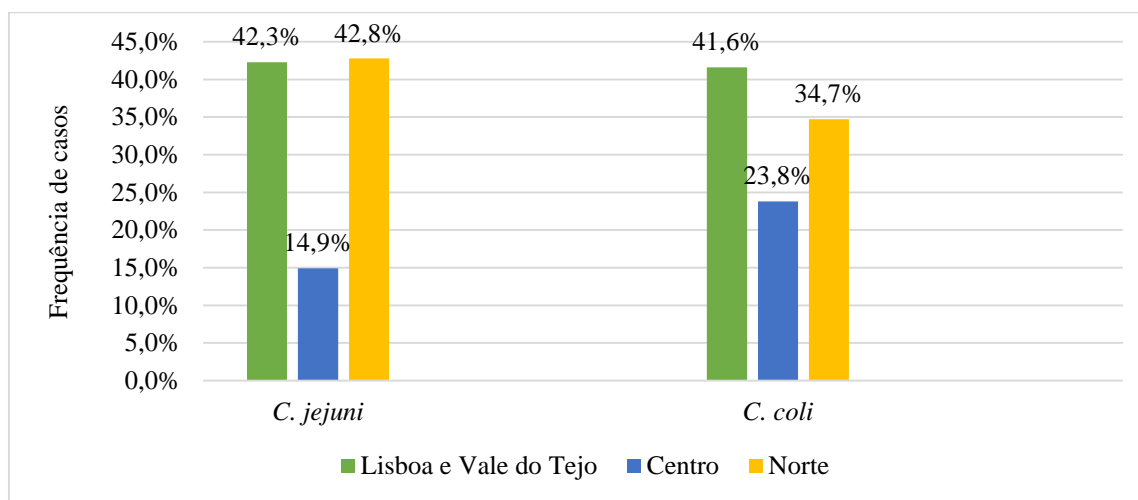


Figura 3. Frequência de infeções por *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* por região geográfica.

Dos 643 casos, não foi possível obter informação do género para seis indivíduos. Do total de infeções causadas por *Campylobacter* spp., o maior número de infeções foi observado nos indivíduos do género masculino 375 (58,3%) em relação aos indivíduos do género feminino 262 (40,7%). Observou-se uma associação estatisticamente significativa entre o género e infeções causadas por *Campylobacter* spp. (p<0,001). O mesmo resultado foi observado para as infeções causadas por *C. jejuni* e *C. coli*, no qual o maior número de casos

foi observado nos indivíduos do género masculino 320 (59%) e 55 (54,5%), respetivamente, em relação ao género feminino (Figura 4).

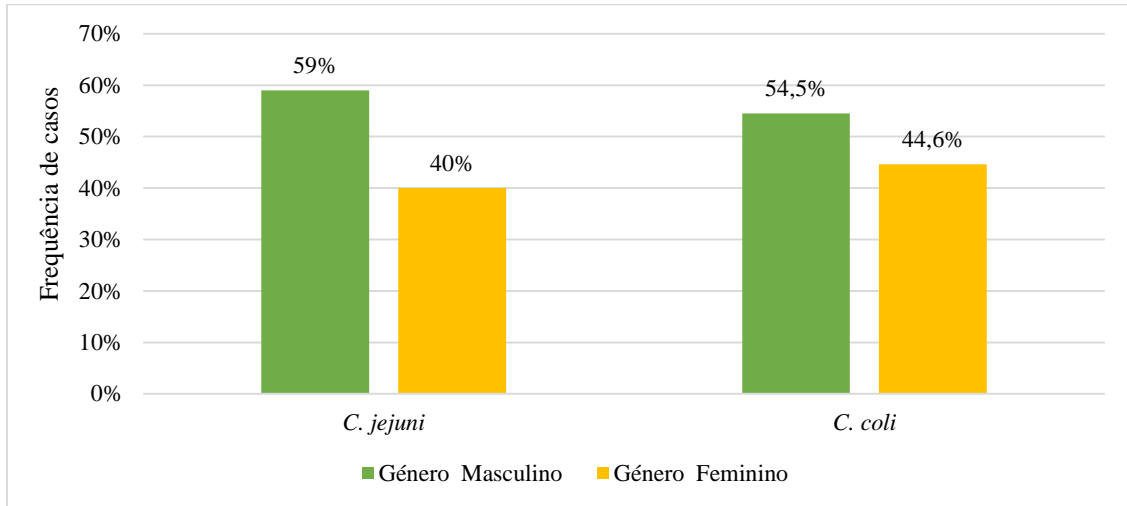


Figura 4. Distribuição dos casos de infeção por *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* de acordo com o género da população em estudo.

Do total de casos estudados, a variável idade era conhecida para 625 casos. De acordo com a distribuição dos casos pelas faixas etárias previamente definidas (Figura 5), observou-se que a maior frequência de infeções por *C. jejuni* encontrada no estudo foi no grupo de crianças na faixa etária entre os 1-4 anos de idade 31,2% (n=169). A menor frequência de *C. jejuni* foi observada no grupo de indivíduos entre os 45-64 anos de idade (n=33; 6,1%). Notou-se também, que o grupo de crianças dos 1-4 anos de idade teve a maior frequência de *C. coli* de entre todas as outras faixas etárias com 26,7% (n=27). A menor frequência de *C. coli* no estudo foi observada no grupo de indivíduos na faixa etária dos 10-14 anos de idade (n=4; 4%). Não se observou associação estatisticamente significativa entre faixa etária e a infeção por *C. jejuni* ou *C. coli* (p=0,114). Informações detalhadas podem ser encontradas na figura abaixo. No entanto, de realçar que a partir dos 15 anos, a frequência de infeções a *C. coli* foi igual ou superior à de *C. jejuni*, um contraste com as faixas etárias mais jovens.

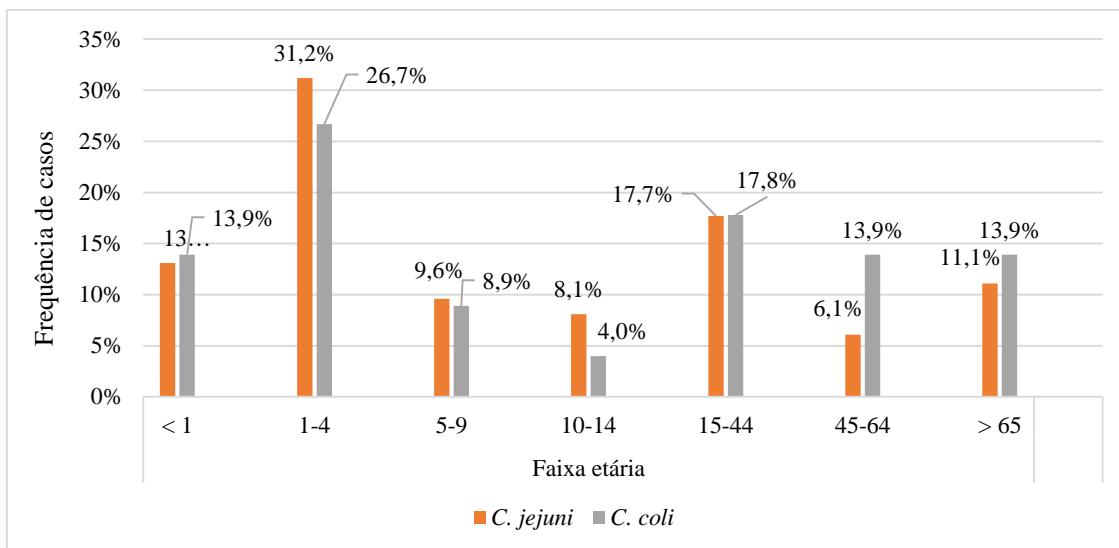


Figura 5. Frequência de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* em relação a faixa etária, em anos da população em estudo.

Em relação às variáveis clínicas e epidemiológicas, a informação estava disponível em menos de 50% dos inquéritos. Relativamente à amostra clínica do isolamento primário, determinou-se que mais de 88% das estirpes foram isoladas de amostras de fezes. A diarreia com sangue foi o sintoma clínico mais frequente em infecções por *C. jejuni* observado no estudo (32,2%). A maioria dos casos de infecção por *Campylobacter* recebidos no laboratório (203 de 208 casos) eram casos esporádicos segundo os dados dos inquéritos preenchidos (*C. jejuni*: 99,4% e *C. coli*: 87,5%) enquanto uma pequena proporção de casos reportados estavam associados a surtos para *C. coli* (4 de 208 casos) sendo que de acordo com os dados obtidos das análises estatísticas, observou-se uma associação estatisticamente significativa entre a campilobacteriose e a informação epidemiológica ($p < 0,001$) (Tabela 2). No entanto, relativamente a esta variável, há que considerar que a maioria dos casos não tinha esta informação e, portanto, esta diferença deverá ser interpretada com precaução.

Tabela 2. Frequência de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* em relação as características clínicas da população em estudo.

Características	Categoria	<i>C. jejuni</i> % (n/N)	<i>C. coli</i> % (n/N)	p-value
Amostra clínica	Fezes	98% (492/502)	98,9% (88/89)	0,576
	Sangue	2% (10/502)	1,1% (1/89)	
Informação clínica	Diarreia	20,3% (29/143)	15,4% (4/26)	0,793
	Diarreia com sangue	32,2% (46/143)	30,8% (8/26)	
	Outros*	47,6% (68/143)	53,8% (14/26)	
Informação epidemiológica	Caso isolado	99,4% (175/176)	87,5% (28/32)	<0,001
	Surto	0,6% (1/176)	12,5% (4/32)	

SI - Sem informação; *Outros inclui: febre, vômitos, dor abdominal, mialgias, diarreia com muco, náuseas e dispneia.

5.4 Variações sazonais no número de casos de infecção por *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*

O número total de casos de infecções por isolados de *Campylobacter* spp. variou ao longo dos meses de Janeiro de 2022 a Maio de 2023. Para o período de Janeiro a Dezembro de 2022, verificou-se um aumento de casos durante o período de inverno, primavera e verão com uma ligeira queda no número de infecções observada entre os meses de Setembro a Dezembro. No entanto, o início de 2023 foi marcado por um alto aumento de casos de *Campylobacter* logo no início de Janeiro, com o pico estendendo-se até Março (Figura 6).

Relativamente ao número de casos por *C. jejuni* no ano de 2022, o pico foi observado nos meses de Março e Maio (n=40 e n=38, respetivamente), sendo essa época correspondente a finais de inverno e durante a primavera. O início de 2023 foi marcado por um alto aumento de casos de *C. jejuni*, observado nos meses de Janeiro e Fevereiro (n=42 e n=44, respetivamente). Para *C. coli*, a distribuição do número de casos de infecção também

apresentou uma certa sazonalidade, tendo-se observado um pico nos meses de Julho e Agosto de 2022 (n=10 e n=15, respetivamente), correspondendo à época de verão. Em contraste, os meses de Fevereiro e Março de 2023 foram marcados por um decréscimo no número de infeções em relação aos outros meses (n=2 e n=3, respetivamente) (Figura 6). Estes dados sugerem diferentes sazonalidades, de acordo com a espécie. No geral, foi observada uma associação estatisticamente significativa entre o número de infeções por *C. jejuni* e *C. coli* e o mês de colheita de amostra (p=0.008).

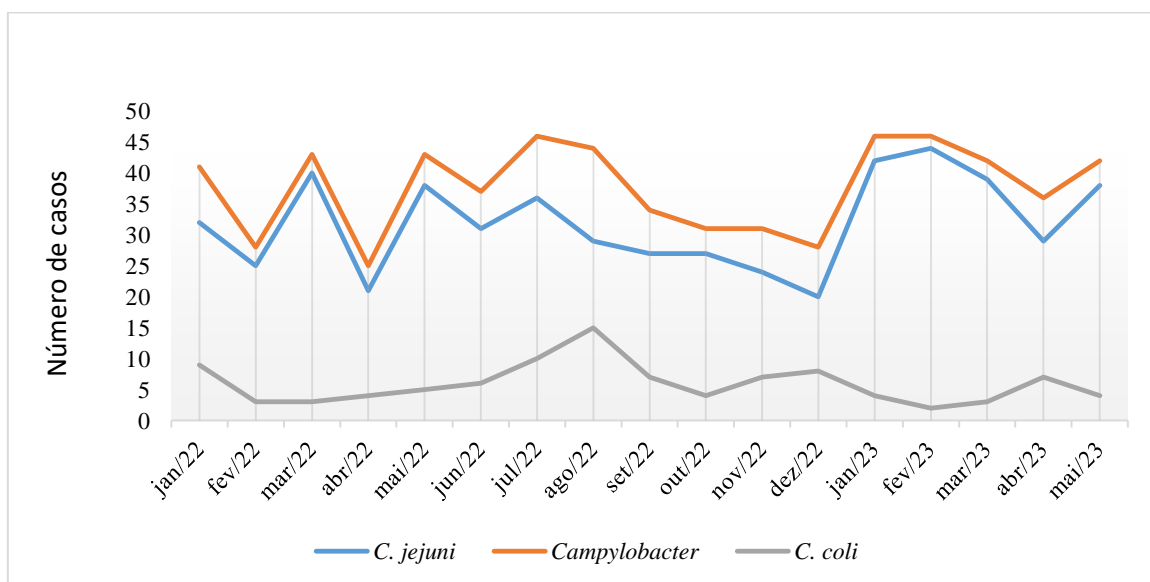


Figura 6. Distribuição do número de infeções por *Campylobacter* spp., por *Campylobacter jejuni* e por *Campylobacter coli*, de acordo com o mês de colheita de amostra, no período entre Janeiro de 2022 a Maio de 2023.

5.5 Resistência antimicrobiana de *Campylobacter* spp.

A resistência antimicrobiana nas estirpes de *Campylobacter* spp. foi realizada para os quatro antibióticos considerados prioritários pelo ECDC: ciprofloxacina (CIP), eritromicina (E), tetracilina (TET) e gentamicina (CN). Do total de 643 estirpes de *C. jejuni* e *C. coli* incluídas no estudo, submetidas à caracterização fenotípica, 416 estirpes de *Campylobacter* spp. (315 estirpes *C. jejuni* e 101 estirpes *C. coli*) foram selecionadas para a caracterização genotípica por WGS, com o objetivo de se fazer uma comparação entre os dados fenotípicos

obtidos pelo teste de susceptibilidade aos antibióticos e os dados genotípicos obtidos pelo WGS.

Resistência em *Campylobacter jejuni*

Observou-se uma alta frequência de resistência à CIP (93,7%) nas estirpes de *C. jejuni*, sendo esta a maior frequência de resistência dentre outros antibióticos em estudo. A segunda maior frequência de resistência foi observada para TET (64,1%). Verificou-se uma baixa frequência de resistência à E (1,6%), e todas as estirpes foram susceptíveis a gentamicina (Figura 7).

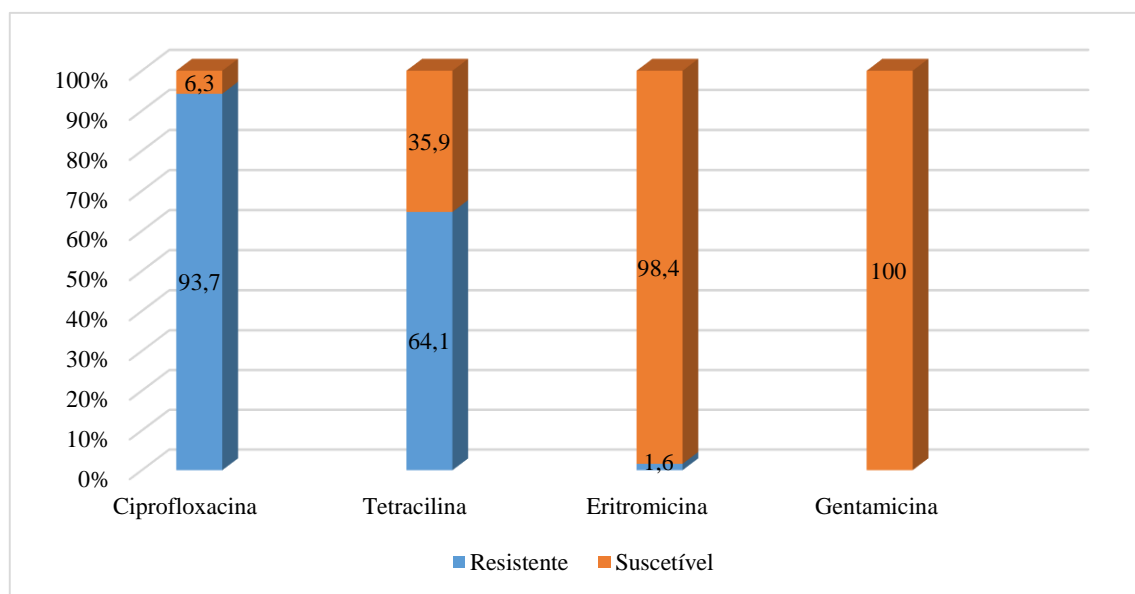


Figura 7. Perfil de resistência (%) aos diferentes antibióticos testados em *Campylobacter jejuni* (n=315).

Resistência em *Campylobacter coli*

O perfil de resistência aos antibióticos para estirpes de *C. coli* foi semelhante às estirpes de *C. jejuni* no que concerne a alta frequência de resistência à CIP (98%). Em contraste, destacam-se para *C. coli* taxas de resistência relevantemente mais altas quer à TET (92,1% vs 64,1%), quer à E (29,7% vs 1,6%) e muito baixa a CN (1%). Os resultados do teste de susceptibilidade aos antibióticos para *C. coli* estão ilustrados na figura 8.

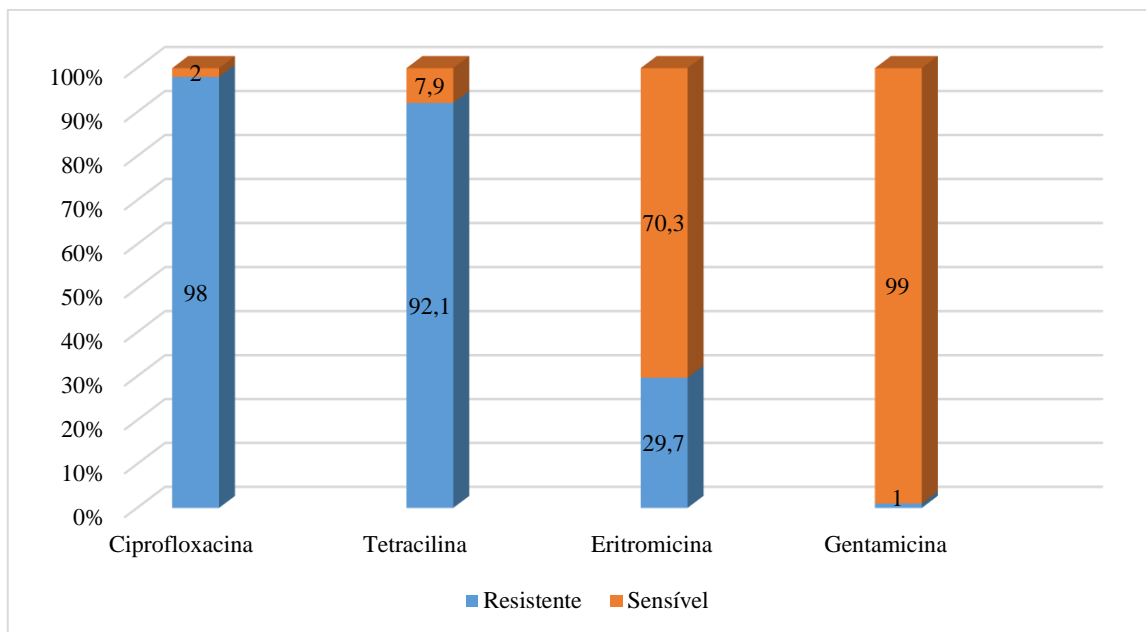


Figura 8. Perfil de resistência (%) aos diferentes antibióticos testados em *Campylobacter coli* (n=101).

Multiresistência, resistência combinada e completa susceptibilidade

A multiresistência (MDR) em *C. jejuni* e *C. coli* foi definida como a resistência combinada para os antibióticos CIP, TET e E.

Observou-se uma frequência muito baixa de isolados de *C. jejuni* multiresistentes (1,6%), sendo a resistência combinada à CIP e TET um dos perfis de resistência de destaque (64,4%). Por outro lado, a resistência combinada à CIP e E foi muito baixa (1,6%). Estes dados mostram que todas as estirpes resistentes à E são também resistentes à CIP e à TET. A completa susceptibilidade foi observada em apenas 5,7% das estirpes estudadas (Figura 9). Sendo assim, considerando os quatro antibióticos de prioridade clínica, o perfil de resistência mais comum foi CIP e TET.

A frequência de isolados multiresistentes foi consideravelmente mais elevada em *C. coli* se comparado com os valores observados em *C. jejuni* (26,7% vs 1,6%). A resistência combinada à CIP e TET foi bastante elevada, sendo observada em torno de 87,1%. Por outro lado, a resistência combinada à CIP e E foi de 28,7%. Todas as estirpes resistentes à E são também resistentes à CIP e à TET, tal como descrito para *C. jejuni*. Apenas 1 isolado de *C.*

C. coli apresentou completa susceptibilidade para estes três antibióticos, sendo a frequência (1%) inferior em comparação com a frequência de *C. jejuni* (5,7%) (Figura 8). Sendo assim, considerando os quatro antibióticos de prioridade clínica, o perfil de resistência mais comum em *C. coli* foi CIP e TET.

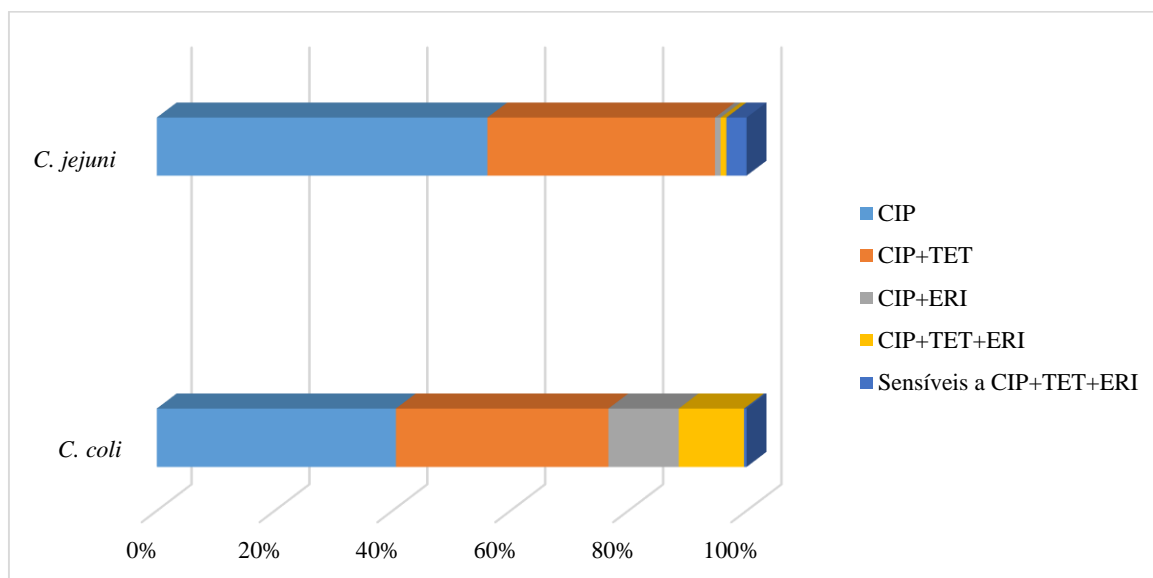


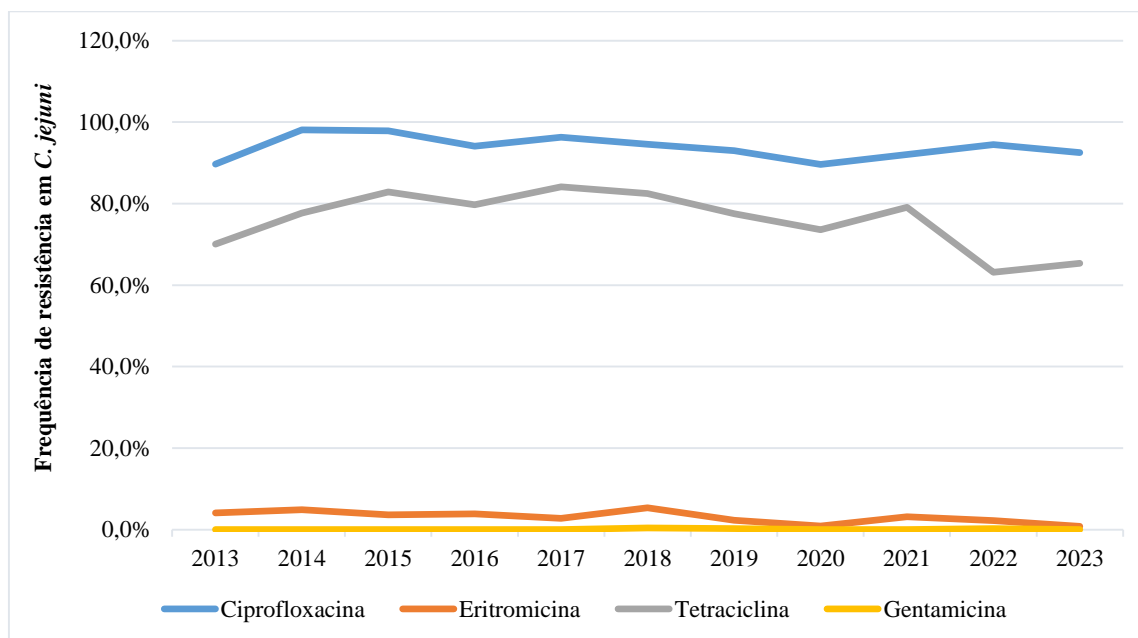
Figura 9. Proporção de estirpes de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* totalmente suscetíveis, multiresistentes e diferentes combinações de dois antibióticos.

5.6 Evolução temporal da resistência aos antibióticos em *Campylobacter* spp.

Os dados da resistência aos quatro antibióticos prioritários, CIP, E, TET e CN, no período estudado no presente trabalho, foram comparados com os dados da URGI disponíveis desde 2013. A evolução temporal da resistência aos antibióticos em *Campylobacter* spp. de 2013 a Maio 2023 mostra que, para ambas as espécies, o nível de resistência aos quatro antimicrobianos prioritários manteve-se relativamente constante ao longo dos 11 anos considerados. No entanto, de realçar dois decréscimos pontuais importantes na resistência de *C. coli* à E, antibiótico de primeira linha no tratamento da campilobacteriose. O primeiro decréscimo ocorreu em 2020 (36,1%), tendo retomado um valor na média em 2021 (53,2%), e novo decréscimo acentuado em 2022 (27,2%), para voltar a uma tendência crescente em 2023 (40,0 %). Para *C. jejuni* observa-se o que parece ser uma tendência de decréscimo para a TET a partir de 2020.

De um modo geral, a resistência à CIP manteve-se muito alta ($\geq 90\%$) em todos os anos considerados, para ambas as espécies, sendo que para *C. jejuni*, nos anos de 2015, 2016 e 2021 observaram-se taxas extremamente altas de resistência à CIP (100%). Para TET, *C. jejuni* apresentou nível de resistência muito alto em alguns anos ($>80\%$) e *C. coli* nível extremamente alto atingindo 100% no ano de 2021. Em relação a CN, embora o nível de resistência tenha sido reduzido para as ambas as espécies, a diferença também foi visível quando comparamos *C. coli* e *C. jejuni*. *C. coli* apresentou níveis baixos de resistência que variam de 1-9% e *C. jejuni* abaixo de 1%. Também para o antibiótico da classe de primeira linha, E, é bem notória a diferença entre as duas espécies, com *C. coli* a apresentar níveis de resistência bastante superiores comparativamente a *C. jejuni*, em todo o período considerado (Figura 10 A e 10 B).

A.



B.

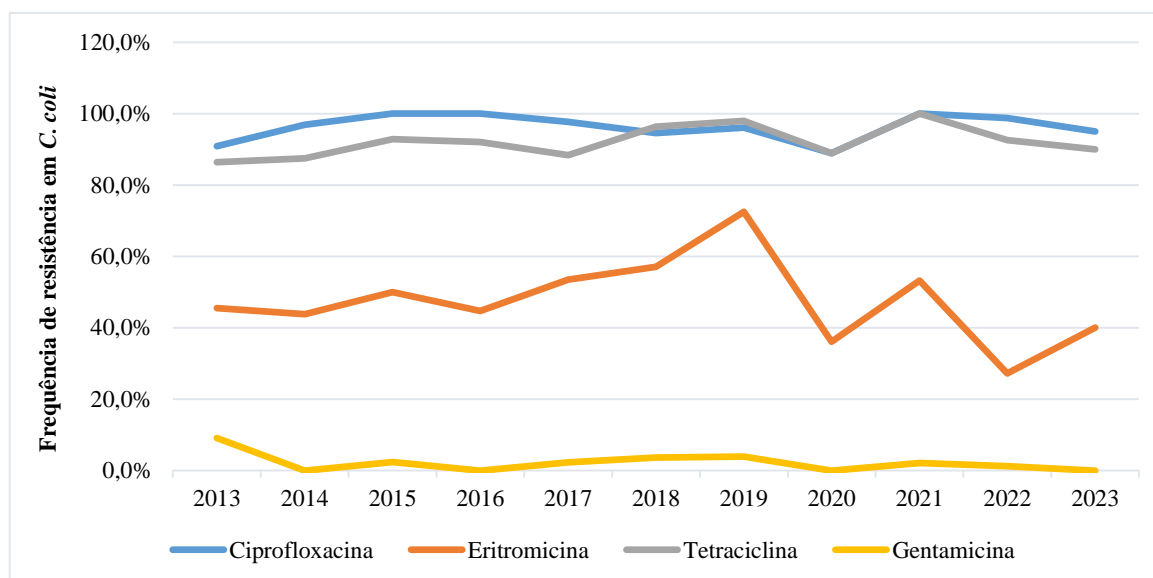


Figura 10. Evolução das taxas de resistências em *Campylobacter jejuni* (A) e *Campylobacter coli* (B) para os antibióticos prioritários (CIP, E, TET e CN), de Janeiro de 2013 até Maio de 2023.

A resistência antimicrobiana nas estirpes de *Campylobacter* spp. também foi determinada para três antibióticos opcionais incluídos: ampicilina (AMP), amoxiciclina + ácido clavulânico (AMC) e ertapenemo (ETP). Todos os isolados de *C. jejuni* e *C. coli* foram susceptíveis a AMC. Para o ETP, verificou-se baixo nível de resistência, ou susceptibilidade reduzida para apenas uma fração de isolados de *C. jejuni* (n=12; 3,8%), exibindo valores de MIC entre 1,0 a 6,0 mg/L (cut-off é 1 mg/L), e total susceptibilidade para os isolados de *C. coli*. Quanto a AMP, foi observada uma alta frequência de resistência tanto em *C. jejuni* (76%) como em *C. coli* (81%).

5.7 Resistência aos antibióticos: comparação entre fenótipo e genótipo em *Campylobacter* spp.

Para a quase a totalidade das estirpes em estudo, 315 estirpes de *C. jejuni* e 101 de *C. coli*, foi feito WGS, o que permitiu fazer a análise *in silico* das resistências, através da identificação dos determinantes genéticos de resistência, e posterior comparação com os

dados fenotípicos. No geral, foi obtida uma boa correlação entre dados fenotípicos e genotípicos, ou seja, os dados obtidos a partir do teste de susceptibilidade e do WGS mostraram uma boa correlação entre as duas técnicas.

A resistência à ciprofloxacina observada nas estirpes de *C. jejuni* e *C. coli* foi associada a mutações na região QRDR do gene *gyrA*, uma das subunidades da DNA girase. A principal mutação identificada foi a troca de uma citosina por uma timina na posição 257 no gene *gyrA* (C257T) que provoca a substituição de uma treonina por uma isoleucina na posição 86 (Thr86Ile). Adicionalmente, foi identificada a mutação D90N na mesma região do gene *gyrA* em um isolado de *C. jejuni* e em um isolado de *C. coli*.

A resistência à eritromicina foi associada a uma mutação ao nível da subunidade 23S do gene *RNAr* na posição 2075 (A2075G), em todos os isolados de *C. jejuni* resistentes a este antibiótico. Todos os isolados de *C. coli* exibindo o fenótipo de resistência a eritromicina continham a mutação A2075G na subunidade 23S do gene *RNAr*, excepto uma estirpe de *C. coli* que continha o gene *ermN* comumente associado a resistência aos macrólidos, lincosamida e estreptogramina B (MLSB), e o mesmo foi responsável por também conferir resistência a eritromicina neste isolado.

Todos os isolados de *C. jejuni* e *C. coli* exibindo o fenótipo de resistência à tetraciclina continham o gene *tet(O)*.

Em relação à classe dos aminoglicosídeos, foi identificado o gene *apmA* no único isolado de *C. coli* fenotipicamente resistente à gentamicina. Vários genes associados com a resistência a alguns antibióticos da classe dos aminoglicosídeos foram identificados em 22,8% de isolados de *C. coli* e 11,7% de isolados de *C. jejuni*, tais como os genes *aadB*, *aadE-Cc*, *ant(6)-Ia*, *Inu(C)* e *aph(3')-III* que conferem resistência a amicacina e tobramicina, estreptomicina, estreptomina, canamicina, amicacina, neomicina, butirosina, isepamicina, lividomicina, paromomicina e ribostamicina, respetivamente.

Em relação à ampicilina, detetou-se a presença do gene *blaOXA-61* responsável por conferir resistência a ampicilina (quando mutado no promotor) em apenas 3 (0,9%) isolados de *C. jejuni* resistentes fenotipicamente à ampicilina. No entanto, todas as estirpes resistentes à ampicilina fenotipicamente continham pelo menos um gene que codifica para uma putativa β -lactamase, da mesma família de *blaOXA-61*, sendo a mais frequente a *blaOXA-193*,

estando presente em 69,3% das estirpes *C. coli* e 72,9% das estirpes *C. jejuni*. Em algumas estirpes fenotipicamente suscetíveis a ampicilina (n=40; 36,7%) foram detetados os genes *blaOXA-193* e *blaOXA-489*.

Para o caso do ETP, não foram encontradas mutações no gene *porA* que codifica a porina major de *C. jejuni*, em nenhum dos *C. jejuni* com suscetibilidade diminuída (3,8%).

A tabela 3 apresenta um resumo dos resultados relativos aos determinantes de resistência encontrados em *C. jejuni* e *C. coli* neste estudo.

Tabela 3. Genes que conferem resistência antimicrobiana e mutações pontuais cromossômicas detectadas em *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* pela plataforma ResFinder.

Classe de antimicrobianos	Antibióticos	Determinantes de resistência encontrados
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	<i>C. jejuni</i> : gyrA:p.T86I; gyrA_2:p.T86I; gyrA:p.D90N <i>C. coli</i> : gyrA:p.T86I; gyrA:p.T86I + gyrA_2:p.D90N (dupla mutação)
Tetraciclinas	Tetraciclina	<i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> : tet(O/32/O)
Macrólidos	Eritromicina	<i>C. jejuni</i> : 23S:g.2075A>G <i>C. coli</i> : 23S:g.2075A>G; ermN
Aminoglicosídeos	Vários	<i>aadB</i> (amicacina e tobramicina) * <i>aadE-Cc</i> (estreptomicina) * <i>ant(6)-la</i> (estreptomicina) * <i>aph(3')-III</i> (Canamicina, amicacina, neomicina, butirosina, isepamicina, lividomicina, paromomicina, ribostamicina)* <i>ampA</i> (gentamicina)
Outras classes	x	<i>Inu(C)</i> (Lincosamida) * <i>blaOXA-61</i> e <i>blaOXA-193</i> (β-lactâmicos) *

*: Antibióticos não testados, resultados da análise *in silico* pela ferramenta ResFinder.

5.8 Genotipagem de *Campylobacter* spp. por *Whole Genome Sequencing*

A partir da análise dos dados de WGS, foi possível identificar o perfil de MLST (ST, *sequence type*) para cada estirpe estudada.

A genotipagem *in silico* de 315 isolados de *C. jejuni* permitiram detetar um total de 66 perfis de ST diferentes, o que mostra uma grande variedade de genótipos a circular. O ST10846 foi o mais frequentemente detetado (54 estirpes; 17,1%) e o segundo mais frequente foi o ST50 com 29 estirpes (9,2%). Os ST122, ST354, ST607 e ST6461 foram detetados em mais de 5% das estirpes de *C. jejuni* estudadas (Figura 11). Um total de 33 STs diferentes foram detetados apenas uma vez.

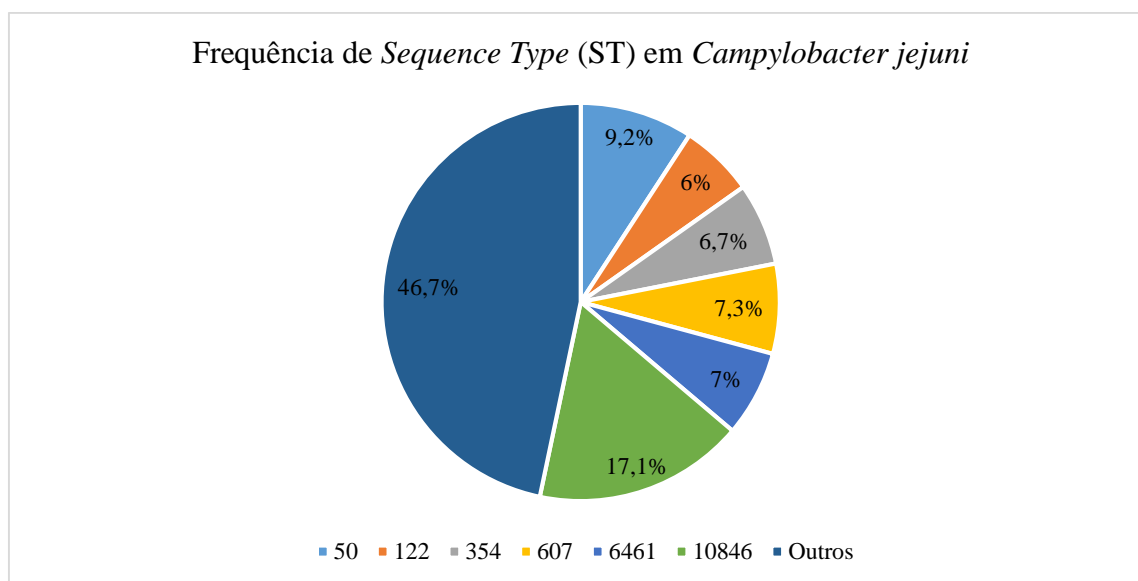


Figura 11. Frequência de tipo de ST em estirpes de *Campylobacter jejuni*.

Outros inclui STs com menos de 5% de frequência: 21, 22, 41, 44, 45, 47, 48, 49, 52, 53, 107, 137, 148, 201, 227, 262, 356, 403, 464, 475, 531, 534, 572, 583, 824, 859, 882, 883, 917, 990, 1044, 1074, 1707, 2042, 2153, 2180, 2258, 3172, 3630, 3769, 6522, 6532, 6561, 7355, 7517, 8332, 8579, 9887, 10298, 10622, 11411, 13829, 13830, 13831, 13832, 13833, 13834, 13835 e 13836.

De entre todos os 101 isolados de *C. coli*, 30 STs diferentes foram identificados, sendo o mais frequentemente identificado o ST10042 (26 estirpes; 25,7%), seguido do ST832 (10 estirpes; 9,9%). Para além dos STs anteriormente mencionados, os outros STs de destaque são ST827, ST855, ST1595, ST3017 e ST5659, tendo sido identificados em mais de 5% das estirpes de *C. coli* (Figura 12). Um total de 19 STs foram detetados apenas uma vez entre todas as estirpes de *C. coli* sequenciadas.

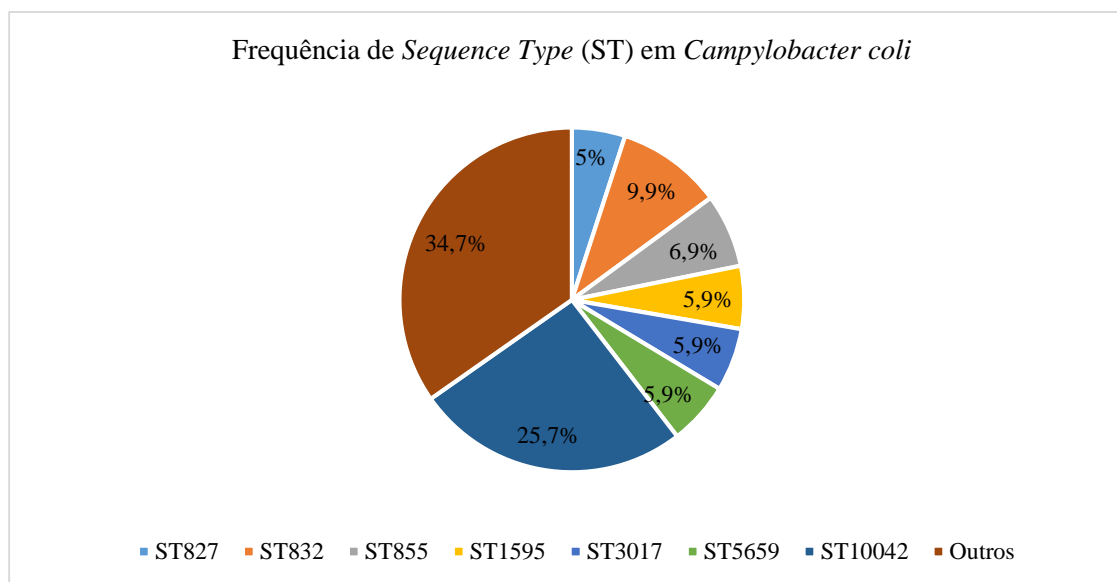


Figura 12. Frequência de tipo de ST em estirpes de *Campylobacter coli*.

Outros inclui STs com menos de 5% de frequência: 825, 828, 829, 830, 860, 1016, 1107, 1624, 2177, 3016, 6183, 6690, 6817, 8104, 8518, 9987, 10838, 11467.

Distribuição temporal e por dados demográficos dos STs mais prevalentes

Campylobacter jejuni

Os STs mais frequentes no estudo (ST50, ST122, ST354, ST607, ST6461 e ST10846) foram detetados entre Janeiro de 2022 a Maio de 2023. O período de estudo de 2022, sobretudo no mês de Agosto de 2022 e entre Fevereiro a Maio de 2023, foi o período onde houve maior circulação do ST dominante nesta espécie, o ST10846, perfazendo 53,7% dos

casos. O mesmo fenómeno foi observado para o ST354 que também teve o maior número de casos no período entre Janeiro a Maio de 2023 (57,1%) (Figura 13). Já os ST122, ST354 e ST6461 tiveram maior circulação em 2022. Nenhuma associação estatisticamente significativa foi observada ($p=0,210$).

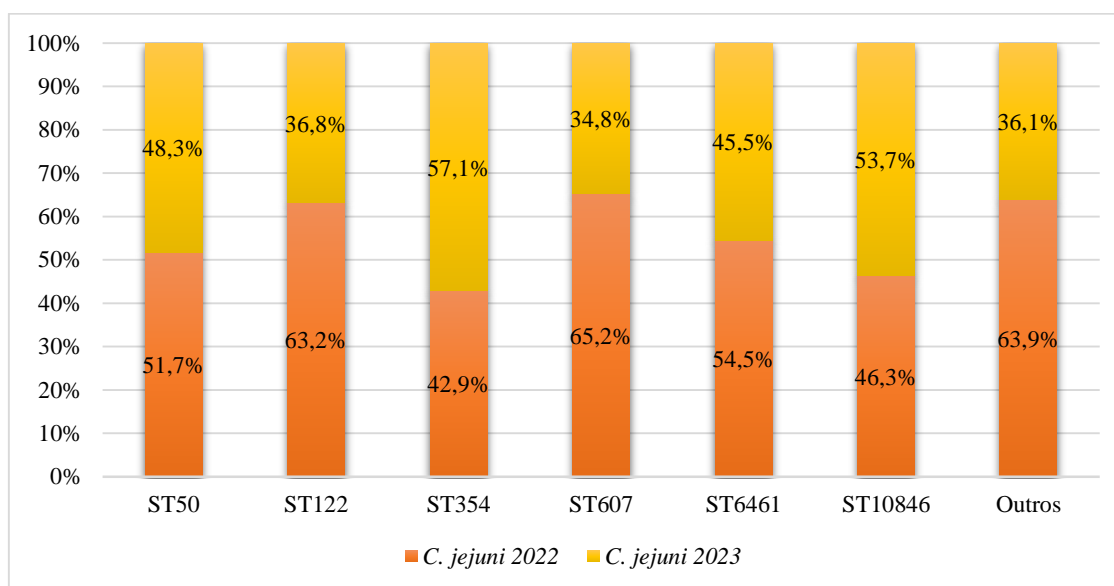


Figura 13. Distribuição de STs de *Campylobacter jejuni* durante o período em estudo, Janeiro de 2022 a Maio de 2023.

A região do país com o maior número de diversidade de STs foi a região de LVT com 45 STs diferentes em 127 estirpes, e a segunda região com mais diversidade de STs foi o Norte do país com 35 STs diferentes (145 estirpes). O ST10846 foi identificado em todas as regiões, mas com maior predominância na região Norte do país (Tabela 4). É interessante verificar que a maior diversidade de STs não coincidiu com o maior número de isolados.

Tabela 4. Distribuição de STs de *Campylobacter jejuni* de acordo com a região de colheita de amostra.

Região geográfica	Número de isolados	Sequence Type (ST)
Lisboa e Vale do Tejo	127	50 (13), 122 (3), 354 (5), 607 (7), 6461 (10), 10846 (21), outros STs= 3172, 2258, 3630, 403, 10298, 1044, 464, 21, 824, 148, 1074, 8105, 8579, 883, 49, 19, 8332, 2180, 859, 583, 882, 356, 3769, 10622, 9887, 990, 262, 531, 227, 45, 534, 917, 572, 52, 22, 2042, 47, 6532, 6522 (68)*
Centro	43	50 (4), 122 (3), 354 (4), 607 (2), 6461 (3), 10846 (7), outros STs= 41, 44, 49, 107, 148, 883, 917, 990, 1074, 10622, 8579, 464, 2180, 6522, 137, 6561, 3769 (20)*
Norte	145	50 (12), 122 (13), 354 (12), 607 (14), 6461 (9), 10846 (26), outros STs= 19, 47, 48, 49, 148, 572, 824, 2180, 1074, 917, 990, 356, 53, 464, 6522, 7517, 10785, 2153, 7355, 8579, 10622, 3172, 201, 8332, 883, 475, 11411, 3769, 1707 (59)*

Outros STs: identificados com menos de 5% de frequência. Valores entre parêntesis são o número de isolados em que foi identificado o respetivo ST. *: número de isolados em que foram identificados os outros STs.

Quanto à frequência de ST em relação à faixa etária da população de estudo, o ST10846 (11 estirpes; 20,4%) e o ST607 (11 estirpes; 47,8%) apresentaram maior frequência nos casos de campilobacteriose por *C. jejuni* em crianças com idades compreendidas entre 1-4 anos, no entanto, não se observou uma associação de significância estatística entre estas duas variáveis ($p=0,131$).

Os ST10846 (29 estirpes; 22,7%) e ST50 (17 estirpes; 13,3%) apresentaram a maior frequência de deteção nos indivíduos do género feminino em comparação com o género masculino. Contudo, tal como para a faixa etária, não se observou uma associação de significância estatística entre estas duas variáveis ($p=0,136$). Para os restantes STs, a frequência de deteção foi maior no género masculino. Informações detalhadas sobre a distribuição de STs em relação a faixa etária e o género dos indivíduos constam na tabela abaixo.

Tabela 5. Distribuição de ST em relação a faixa etária e o gênero da população de estudo.

<i>Características</i>	<i>Sequence Type (ST)</i>						
	50	122	354	607	6461	10846	Outros
<i>Gênero</i>							
Masculino	12 (6,5%)	10 (5,4%)	12 (6,5%)	19 (10,3%)	13 (7,0%)	25 (13,5%)	94 (50,8%)
Feminino	17 (13,3%)	9 (7,0%)	9 (7,0%)	4 (3,1%)	9 (7,0%)	29 (22,7%)	51 (39,8%)
<i>Faixa etária (em anos)</i>							
< 1	5 (17,2%)	1 (5,3%)	3 (14,3%)	6 (26,1%)	3 (13,6%)	9 (16,7%)	14 (9,5%)
1-4	5 (17,2%)	6 (31,6%)	5 (23,8%)	11 (47,8%)	9 (40,9%)	11 (20,4%)	42 (28,6%)
5-9	0 (0,0%)	1 (5,3%)	1 (4,8%)	2 (8,7%)	3 (13,6%)	5 (9,3%)	15 (10,2%)
10-14	4 (13,8%)	2 (10,5%)	1 (4,8%)	2 (8,7%)	1 (4,5%)	4 (7,4%)	13 (8,8%)
15-44	11 (37,9%)	5 (26,3%)	5 (23,8%)	1 (4,3%)	3 (13,6%)	10 (18,5%)	26 (17,7%)
45-64	0 (0,0%)	2 (10,5%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (4,5%)	7 (13,0%)	12 (8,2%)
+ 65	4 (13,8%)	2 (10,5%)	6 (28,6%)	1 (4,3%)	2 (9,1%)	4 (7,4%)	21 (14,3%)

Outros STs: identificados com menos de 5% de frequência (21, 22, 41, 44, 45, 47, 48, 49, 52, 53, 107, 137, 148, 201, 227, 262, 356, 403, 464, 475, 531, 534, 572, 583, 824, 859, 882, 883, 917, 990, 1044, 1074, 1707, 2042, 2153, 2180, 2258, 3172, 3630, 3769, 6522, 6532, 6561, 7355, 7517, 8332, 8579, 9887, 10298, 10622, 11411).

Campylobacter coli

Relativamente ao ST dominante nesta espécie, o ST10042 com o total de 26 estirpes, foi detetado no início do período da vigilância, Janeiro de 2022, e continuou presente durante todo o ano de 2022, com o pico de infecções no mês de Agosto. Em contraste, apenas um caso

de infecção com este ST foi detetado em 2023, no mês de Maio. Em relação ao segundo ST mais frequente, ST832, este também foi detetado no início do ano de 2022, tendo variado a frequência ao longo do período de 2022 e 2023. Os ST855 e o ST1595 não foram detetados durante os meses de Janeiro a Julho de 2022, e o ST5659 somente foi detetado a partir do mês de Setembro de 2022. Todas as estirpes *C. coli* com o ST827 foram detetadas somente no ano de 2022 (Figura 14). Nenhuma associação estatisticamente significativa para a distribuição temporal dos STs de *C. coli* foi observada ($p=0,187$).

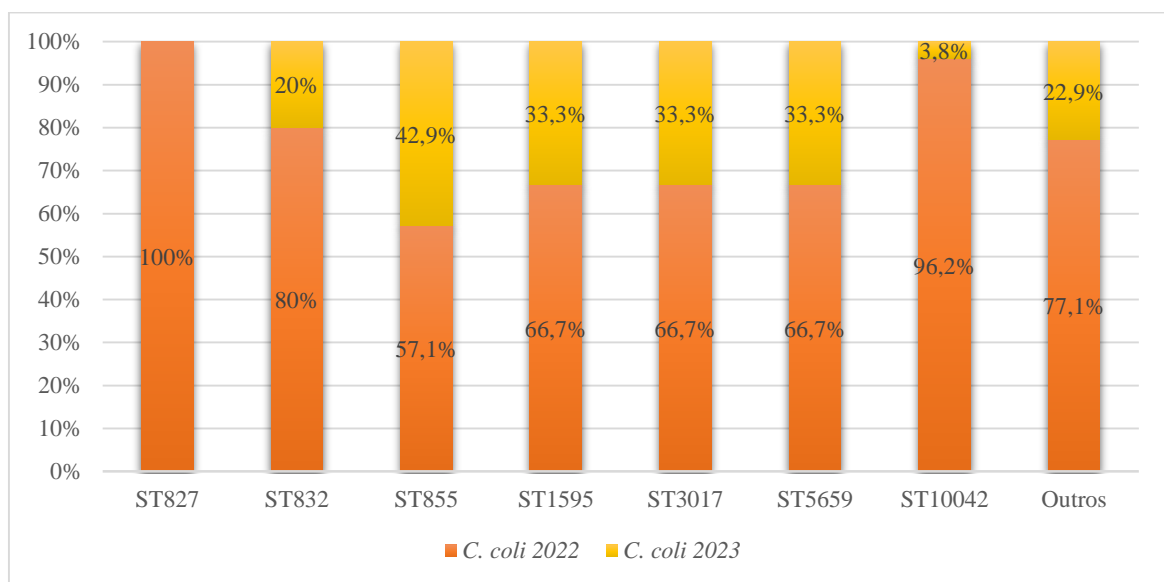


Figura 14. Frequência de ST em *Campylobacter coli* durante o período de estudo, 2022 a 2023.

Para *C. coli*, a região do país que apresentou maior diversidade de STs foi também a região de LVT com 18 STs diferentes (43 estirpes). O ST mais frequente, o ST10042 (26 estirpes), foi identificado em todas as regiões do país, com maior predominância também na região de LVT (Tabela 6). No caso de *C. coli*, ao contrário de *C. jejuni*, houve uma relação entre a diversidade de STs e o número de isolados de cada região.

Tabela 6. Distribuição de STs de *Campylobacter coli* de acordo com a região de colheita de amostra.

Região geográfica	Número de isolados	Sequence Type (ST)
Lisboa e Vale do Tejo	43	827 (2), 832 (4), 855 (1), 1595 (2), 3017 (1) 5659 (2), 10042 (12), Outros STs= 828, 9987, 6183, 8518, 3016, 11467, 825, 8104, 1016, 1624, 8292 (19)*
Centro	24	827 (1), 832 (4), 855 (2), 1595 (3), 3017 (1), 5659 (2), 10042 (5), Outros STs= 8518, 825, 829, 890, 6690 (6)*
Norte	34	827 (2), 832 (2), 855 (4), 1595 (1), 3017 (4), 5659 (2), 10042 (9), Outros STs= 828, 6817, 830, 2177, 10838, 3016, 1107 (10)*

Outros STs: identificados com menos de 5% de frequência. Valores entre parêntesis são o número de isolados em que foi identificado o respetivo ST. *: número de isolados em que foram identificados os outros STs.

A frequência do ST10042 em relação as crianças na faixa etária dos 1 aos 4 anos de idade foi maior (9 estirpes; 34,6%), em comparação com os indivíduos de outras idades. Indivíduos na faixa etária dos 1-4 anos e maiores de 65 anos de idade foram mais infetados com estirpes do ST832. No entanto, esses dados não mostram uma associação estatisticamente significativa ($p=0,573$).

Quanto à relação entre ST e a variável género, observou-se que o ST10042 foi mais frequente nos indivíduos do género masculino (31,5%) do que indivíduos do género feminino (19,6%). Para os restantes STs, não se observou grande variabilidade na frequência de ST entre os dois géneros, não se observando no geral, uma associação estatisticamente significativa entre as variáveis ($p=0.271$) (Tabela 7).

Tabela 7. Distribuição de ST em relação a faixa etária e o gênero da população de estudo.

<i>Características</i>	<i>Sequence Type (ST)</i>							
	827	832	855	1595	3017	5659	10042	Outros
<i>Gênero</i>								
Masculino	3 (5,6%)	4 (7,4%)	2 (3,7%)	2 (3,7%)	5 (9,3%)	4 (7,4%)	17 (31,5%)	17 (31,5%)
Feminino	2 (4,3%)	5 (10,9%)	5 (10,9%)	4 (8,7%)	1 (2,2%)	2 (4,3%)	9 (19,6%)	18 (39,1%)
<i>Faixa etária (em anos)</i>								
< 1	1 (20,0%)	1 (10,0%)	1 (14,3%)	0 (0,0%)	3 (50,0%)	1 (16,7%)	6 (23,1%)	2 (5,7%)
1-4	0 (0,0%)	3 (30,0%)	4 (57,1%)	2 (33,3%)	1 (16,7%)	1 (16,7%)	9 (34,6%)	6 (17,1%)
5-9	1 (20,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2 (33,3%)	1 (16,7%)	0 (0,0%)	2 (7,7%)	3 (8,6%)
10-14	1 (20,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (3,8%)	2 (5,7%)
15-44	0 (0,0%)	1 (10,0%)	1 (14,3%)	2 (33,3%)	0 (0,0%)	1 (16,7%)	4 (15,4%)	9 (25,7%)
45-64	1 (20,0%)	2 (20,0%)	1 (14,3%)	0 (0,0%)	1 (16,7%)	2 (33,3%)	1 (3,8%)	6 (17,1%)
+ 65	1 (20,0%)	3 (30,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (16,7%)	2 (7,7%)	7 (20,0%)

Outros STs: identificados com menos de 5% de frequência: (825, 828, 829, 830, 860, 1016, 1107, 1624, 2177, 3016, 6183, 6690, 6817, 8104, 8518, 9987, 10838, 11467).

Distribuição dos STs mais prevalentes de acordo com o perfil de susceptibilidade aos antibióticos prioritários

Campylobacter jejuni

A resistência à CIP encontrava-se disseminada por todos os STs detetados no estudo, o que está de acordo com a elevada taxa de resistência a este antibiótico. A resistência à TET

foi detetada em estirpes com os principais ST10846 (n=54; 100%); ST50 (n=18; 62,1%), ST607 (n=8; 34,8%), ST354 (n=19; 90,5%), ST6461 (n=22; 100%) e em alguns STs menos frequentes. A resistência à E foi detetada em STs muito pouco frequentes, o ST883 (uma estirpe) e o ST10622 (quatro estirpes). O perfil MDR também esteve disseminado entre estes STs. As 18 estirpes totalmente suscetíveis pertenceram aos ST122, ST824, ST583, ST917, ST262, ST45, ST534, ST22, ST48, ST21 (Tabela 8).

Tabela 8. Distribuição dos STs em relação ao fenótipo de resistência para CIP, TET e E.

Perfil de resistência	Sequence Type (ST)
CIP (n=295)	50, 122, 354, 607, 6461, 10846, outros*
TET (n=202)	50, 122, 354, 607, 6461, 10846, outros*
E (n=5)	10622, 883
CIP+TET (n=203)	50, 122, 354, 607, 6461, 10846, outros*
CIP+E (n=5)	10622, 883
CIP+TET+E (n=5)	10622, 883
Suscetível a todos (n=18)	122, 824, 583, 917, 262, 45, 534, 22, 48, 21

Outros*: inclui STs com menos de 5% de frequência: 21, 22, 41, 44, 45, 47, 48, 49, 52, 53, 107, 137, 148, 201, 227, 262, 356, 403, 464, 475, 531, 534, 572, 583, 824, 859, 882, 883, 917, 990, 1044, 1074, 1707, 2042, 2153, 2180, 2258, 3172, 3630, 3769, 6522, 6532, 6561, 7355, 7517, 8332, 8579, 9887, 10298, 10622, 11411. Números a *bold* indica mais do que um isolado para aquele ST.

Campylobacter coli

Tal como para *C. jejuni*, também em *C. coli* a resistência à CIP encontrava-se disseminada por todos os STs detetados no estudo. Porém, ao contrário de *C. jejuni*, o perfil de E, foi observado entre os quatro STs mais prevalentes, ST832 (n=9; 90%), ST1595 (n=1; 16,7%), ST3017 (n=1; 16,7%), ST10042 (n=1; 3,8%) e em alguns STs menos prevalentes (ST828, ST9987, ST6817, ST3016, ST860, ST2177, ST1107, ST1624, ST6690) (Tabela 9). O conhecimento dos dados de genótipos permitiu perceber a dinâmica dos clones resistentes

e justificar a diminuição da resistência à E em 2022, visto ter circulado um clone dominante (ST10042), que apresentou sensibilidade a este antibiótico.

Tabela 9. Distribuição dos STs em relação ao fenótipo de resistência para CIP, TET, E e CN.

Perfil de resistência	<i>Sequence Type (ST)</i>
CIP (n=99)	827, 832, 855, 1595, 5659, 3017, 10042, outros*
TET (n=93)	827, 832, 855, 1595, 5659, 3017, 10042, outros*
E (n=30)	832, 1595, 3017, 10042, 828, 860, 2177, 1107, 1624, 3016, 6690, 9987, 6817, 10838
CN (n=1)	1595
CIP+TET (n=88)	827, 832, 855, 1595, 5659, 3017, 10042, outros*
CIP+E (n=29)	832, 1595, 3017, 10042, outros*
CIP+TET+E (n=27)	832, 1595, 3017, 10042, 828, 9987, 6817, 3016, 860, 2177, 1107, 1624, 6690
Suscetível a todos (n=1)	13858

Outros*: inclui STs com menos de 5% de frequência: 825, 828, 829, 830, 860, 1016, 1107, 1624, 2177, 3016, 6183, 6690, 6817, 8104, 8518, 9987, 10838, 11467. Números a **bold** indica mais do que um isolado para aquele ST.

Comparação de dados genotípicos entre estirpes isoladas de amostras humanas e animais - abordagem *One Health*

No período de Novembro de 2022 a Março de 2023, foram identificadas sete (7,8%) estirpes de *C. coli* isoladas de amostras de conteúdo cecal de frangos colhidas em seis matadouros diferentes, sendo a maioria, frangos provenientes de aviários da região Centro do país. Foram identificadas também 11 (91%) estirpes de *C. coli* isoladas de amostras de fezes de suínos colhidas em dois matadouros, sendo a maioria dos suínos, provenientes da região de LVT.

A resistência à ciprofloxacina observada nas estirpes animais fenotipicamente estava associada a mutação no gene *gyrA*. A resistência fenotípica à eritromicina estava associada a mutação ao nível da subunidade 23S do *RNAr* na posição 2075 (A2075G). Todos os isolados

exibindo o fenótipo de resistência a tetraciclina tinham o gene *tet(O)*. Algumas estirpes foram detetadas tendo a presença dos genes *aadE-Cc* e *ant(6)-la* que conferem resistência a estreptomicina. Nas estirpes com o fenótipo de resistência a ampicilina detetou-se a presença da *blaOXA-193*. Todas as estirpes foram suscetíveis ao ertapenemo e a gentamicina. Verificasse com estes dados genotípicos que os determinantes de resistência aos antibióticos identificados em animais, foram os mesmos que circulam nas estirpes clínicas.

Os genomas de 6 estirpes MDR (CIP-ERI-TET-AMP) de *C. coli* de frangos e 2 estirpes MDR (CIP-ERI-TET) de *C. coli* de suínos isolados entre Novembro de 2022 a Março de 2023 foram comparados com 6 estirpes com um perfil MDR (CIP-ERI-TET) de *C. coli* isolados de humanos também no mesmo período entre Novembro de 2022 a Março de 2023. De acordo com os resultados obtidos pelo WGS, em frangos MDR foi identificado apenas o ST832 e em suínos foram identificados os ST1624 e ST1109. Apenas dois STs coincidiram com os STs já identificados em humanos neste presente estudo: ST832 e ST1624. Os resultados encontram-se resumidos na tabela 10.

Tabela 10. Descrição dos determinantes genéticos de resistência em estirpes de *Campylobacter coli* isoladas humanas e animais com um perfil de resistência MDR.

Estirpe	Determinantes de Resistência					
	Origem	ST	CIP	E	TET	AMP
<i>C. coli</i>	Frangos	832	<i>gyrA_2:p.T86I</i>	<i>23S:g.2075A>G</i>	<i>tet(O)</i>	<i>blaOXA-193</i>
<i>C. coli</i>	Frangos	832	<i>gyrA_2:p.T86I</i>	<i>23S:g.2075A>G</i>	<i>tet(O)</i>	<i>blaOXA-193</i>
<i>C. coli</i>	Frangos	832	<i>gyrA_2:p.T86I</i>	<i>23S:g.2075A>G</i>	<i>tet(O)</i>	<i>blaOXA-193</i>
<i>C. coli</i>	Frangos	832	<i>gyrA_2:p.T86I</i>	<i>23S:g.2075A>G</i>	<i>tet(O)</i>	<i>blaOXA-193</i>
<i>C. coli</i>	Frangos	832	<i>gyrA_2:p.T86I</i>	<i>23S:g.2075A>G</i>	<i>tet(O)</i>	<i>blaOXA-193</i>
<i>C. coli</i>	Frangos	832	<i>gyrA_2:p.T86I</i>	<i>23S:g.2075A>G</i>	<i>tet(O)</i>	<i>blaOXA-193</i>
<i>C. coli</i>	Suínos	1624	<i>gyrA_2:p.T86I</i>	<i>lnu(C)</i> ¹	<i>tet(O/32/O)</i>	-
<i>C. coli</i>	Suínos	1109*	<i>gyrA_2:p.T86I</i>	<i>23S:g.2075A>G</i>	<i>tet(O)</i>	-
<i>C. coli</i>	Humana	832 (n=10)	<i>gyrA_2:p.T86I</i>	<i>23S:g.2075A>G</i>	<i>tet(O)</i>	<i>blaOXA-193</i>
<i>C. coli</i>	Humana	1624 (n=1)	<i>gyrA_2:p.T86I</i>	<i>23S:g.2075A>G</i>	<i>tet(O)</i>	-

*Não detetado em estirpes humanas.

¹ Resistência à lincosamida.

Análises filogenéticas e detecção de *clusters* genéticos

Campylobacter jejuni

De modo a avaliar a existência de clusters genéticos que podem indicar surtos de infecções, foi realizada uma análise filogenética com base num esquema de wgMLST para as 54 estirpes do ST mais frequente, ST10846.

Considerando o *cut-off* de ≤ 4 distâncias alélicas, foram observados 10 clusters distintos, consistindo de \geq dois isolados por cluster (Figura 15). A maioria dos clusters ($n=6$) foram menores, consistindo de apenas dois isolados clínicos, tendo-se observado apenas um cluster maior, com 12 isolados (cluster 5).

De acordo com a data de colheita de amostra, a maioria dos clusters ocorreram durante os finais da época de inverno e estendendo-se até à primavera, nos dois anos de estudo e a maior concentração de clusters ocorreu na região Norte do país.

Em relação ao cluster 5, de maior dimensão, os dados indicam que estes isolados circularam uniformemente nas regiões de LVT e Norte do país. Com base nestes dados, pensa-se que possa ter ocorrido um surto não detetado pelo sistema de vigilância.

O cluster 1 incluiu 6 isolados que de acordo com os dados demográficos recolhidos, circularam nos dois anos do estudo, principalmente na região Norte do país, com a exceção de um isolado que foi colhido na região de LVT. Pensa-se que tenha ocorrido um possível surto também não detetado pelo sistema de vigilância.

Dezassete isolados apresentaram uma distância alélica maior em relação aos outros isolados, não estando deste modo, relacionados geneticamente. Estes casos esporádicos mostraram distribuição uniforme em todo o país, entre os meses de inverno e primavera, e com maior concentração no ano de 2023.

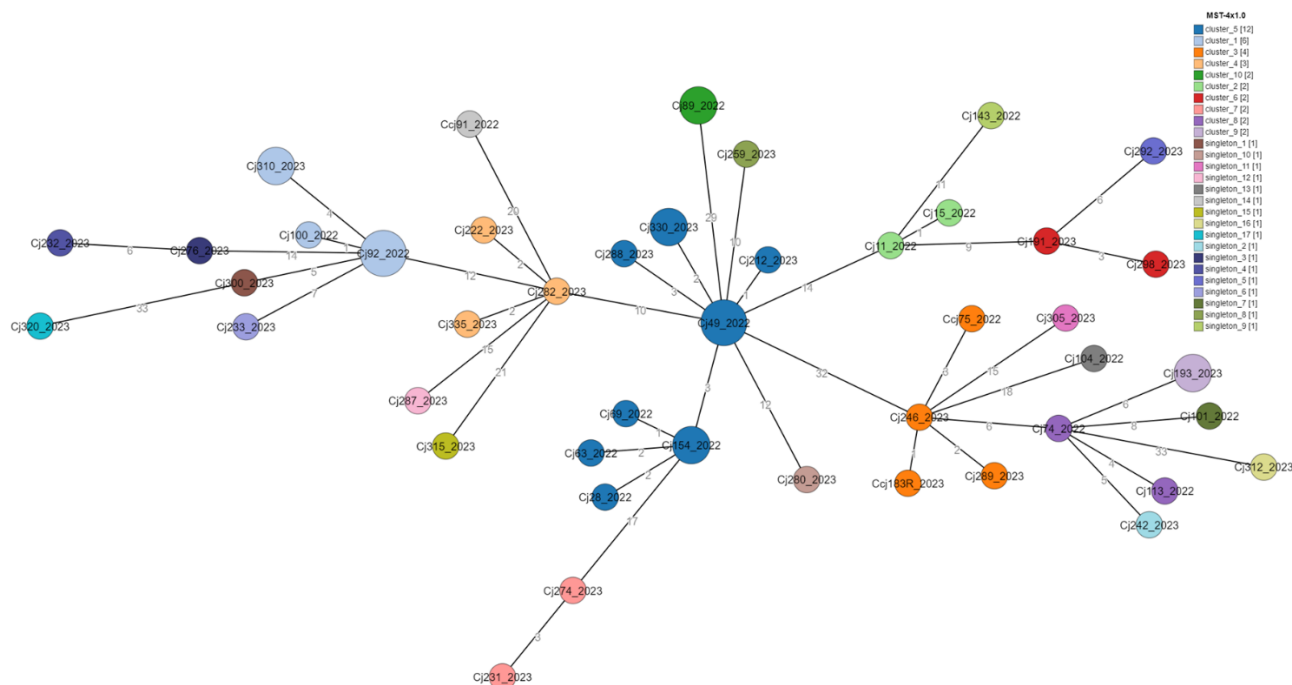


Figura 15. Relação genética entre 54 estirpes humanas de *Campylobacter jejuni* com o ST10846, isoladas entre Janeiro de 2022 a Maio de 2023 em Portugal. A MST foi gerada com base na diversidade alélica entre 722 genes partilhados entre os isolados validados. Cada círculo representa um perfil alélico único, estando coloridos de acordo com os clusters identificados. O tamanho de cada círculo é proporcional ao número de isolados que partilham o mesmo perfil alélico (0 distâncias alélicas). Os números a cinzento em cada ramificação representam distâncias alélicas entre isolados.

Campylobacter coli

A análise da relação filogenética entre os isolados de *C. coli* foi feita também para o ST mais frequente, neste caso o ST10042 (26 estirpes).

Considerando o *cut-off* de ≤ 3 distâncias alélicas, observou-se um cluster principal (cluster 1), constituído por 17 isolados e outro menor (cluster 2) com apenas dois isolados.

De acordo com a data de colheita de amostra, os dois clusters tiveram o seu pico de ocorrência nos meses de Maio e Agosto, circulando somente no ano de 2022 e ocorrendo na região de LVT.

O cluster 1 incluiu 17 isolados com distâncias alélicas curtas entre eles, valores ≤ 3 , indicando forte relação genética entre si. Além disso, verificou-se que seis desses isolados exibiam 0 distâncias alélicas entre si, apontando fortemente para uma fonte de infecção comum. De acordo com a data de colheita de amostra, estes 6 isolados foram colhidos em Maio, Junho e Agosto, com pico neste último mês. Estes dados sugerem que tenha ocorrido um surto não detectado naquela época, e que os isolados sejam originários de uma mesma fonte de infecção.

O cluster 2 foi formado por dois isolados geneticamente idênticos entre si, com uma distância alélica zero observada. Os dois isolados foram colhidos entre finais de Agosto e início de Setembro, na região de LVT e Centro do país.

Sete isolados apresentaram uma distância alélica > 4 em relação aos outros isolados, não estando deste modo, relacionados geneticamente. Estes casos esporádicos estiveram distribuídos uniformemente entre as regiões de LVT e Norte do país, concentrando-se no ano 2022 e somente 1 caso esporádico em 2023 (Figura 16).

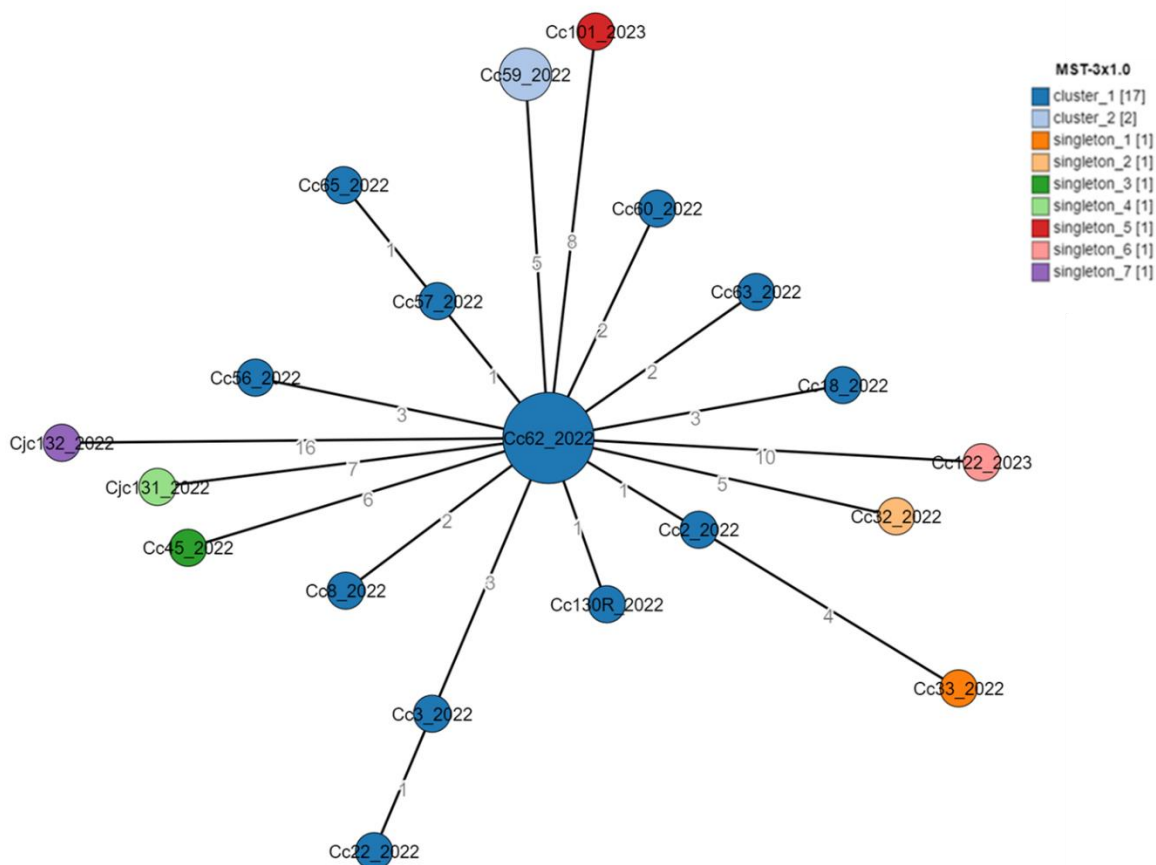


Figura 16. Relação genética entre 26 estirpes humanas de *Campylobacter coli* com o ST10042, isoladas entre Janeiro de 2022 e Maio de 2023 em Portugal. A MST foi gerada com base na diversidade alélica entre 898 genes partilhados entre os isolados validados. Cada círculo representa um perfil alélico único, estando coloridos de acordo com o cluster identificado. O tamanho de cada círculo é proporcional ao número de isolados que partilham o mesmo perfil alélico (0 distâncias alélicas). Os números a cinzento em cada ramificação representam distâncias alélicas entre isolados.

Discussão

6 Discussão

Até à presente data, este é o primeiro estudo em Portugal que fornece dados de importância científica sobre o uso das ferramentas do WGS para se implementar de forma rotineira na vigilância epidemiológica de base laboratorial da campilobacteriose.

No presente estudo, *C. jejuni* foi a espécie que causou o maior número de infeções em humanos (84,3%) em comparação com *C. coli* (15,7%). Estes dados reforçam o peso da campilobacteriose causada por *C. jejuni* em Portugal. Resultados similares foram encontrados ao nível dos países da UE entre 2017-2021 (ECDC, 2022) e 2022 (EFSA, 2022a).

Distribuição temporal de casos de infeção por *Campylobacter* de 2009 a 2023

O número de infeções por *C. jejuni* e *C. coli* reportados em Portugal variou ao longo dos anos, havendo uma tendência de declínio no número de infeções entre 2017 a 2019 com uma alta diminuição observada no ano de 2020, que coincide com o advento da pandemia da COVID-19. Provavelmente, a diminuição de casos em 2020 está relacionada com a situação pandémica de COVID-19, que terá originado uma menor exposição a *Campylobacter* spp., logo menor número de infeções. No entanto, no ano de 2021, o número de infeções voltou a aumentar para níveis semelhantes aos anos anteriores (ECDC, 2022).

Ao contrário de Portugal, alguns países como Bélgica, Finlândia, Hungria, Polónia, Eslovénia e Suécia observaram uma tendência de declínio acentuado no número de infeções por *Campylobacter* spp. no período de 2017-2021. Como causas do declínio reportado por estes países menciona-se a fraca afluência das pessoas com sintomas característicos de campilobacteriose na procura de cuidados de saúde devido ao risco de exposição ao SARS-CoV-2 nas instalações sanitárias, realocação de recursos laboratoriais e humanos para o combate a pandemia da COVID-19 em detrimento de outras patologias, aumento dos cuidados de higiene pessoal como a lavagem das mãos e restrições de circulação em restaurantes (ECDC, 2022).

Relativamente a *C. coli*, entre 2012-2022 (excepto ano de 2020), o número de casos registou um elevado aumento no ano de 2022 (n= 81; 18,8%) em Portugal. Pensa-se que esse aumento se tenha devido à ocorrência de um surto causado por estirpes de *C. coli* com o

ST10042, observado por meio de análises filogenéticas realizadas neste presente estudo com base em dados genómicos gerados pelo WGS. Este estudo permitiu pela primeira vez perceber a dinâmica de circulação de clones e constituir uma justificação para o aumento de casos. No geral da literatura, não estão descritos surtos de campilobacteriose associados à espécie *C. coli*. Este surto continua em investigação na URGI, tentando-se estabelecer associação com casos internacionais deste ST. Por tudo isto, este trabalho chama a atenção para a importância das infeções por *C. coli*.

Distribuição de casos de infeção por *Campylobacter* spp. de acordo com as características demográficas, clínicas e sazonais

A distribuição de casos de *C. jejuni* quanto a região geográfica de colheita de amostra mostrou níveis altos na região Norte do país (42,8%) e casos de *C. coli* foram mais frequentes na região de LVT (41,6%) em relação as restantes regiões do país. O centro do país foi a região com o menor número de casos de *C. jejuni* e *C. coli*, coincidente com o menor número de hospitais pertencentes à rede de vigilância. O número de casos de *Campylobacter* spp. é influenciado pelo número de habitantes de cada região, no entanto o maior número de casos de *C. coli* em LVT é preocupante para a saúde pública.

No presente estudo, as crianças com idades compreendidas entre 1-4 anos de idade foram as mais afetadas pela campilobacteriose, tanto nas infeções causadas por *C. jejuni* como por *C. coli*. Apesar destes resultados não apresentarem significância estatística ($p=0.114$), os mesmos estão de acordo com a maioria dos países da UE (ECDC, 2022; EFSA, 2022a) segundo o qual, crianças de menor idade são as mais acometidas por esta doença. Portugal também observou uma maior prevalência de campilobacteriose entre crianças com 1-4 anos de idade durante os anos de 2009 a 2021 segundo dados de um estudo retrospectivo que visava conhecer as mudanças demográficas, variações sazonais e resistência antimicrobiana em isolados de *Campylobacter* spp. (Duarte *et al.*, 2023).

Uma revisão retrospectiva de casos clínicos de doentes com campilobacteriose no Serviço de Urgência Pediátrica de um hospital de nível II reportou que o maior número de infeções causada por *Campylobacter* spp. foi observada em crianças menores de 5 anos de idade entre 2013-2017 ($n=243$; 55,1%) (Sá *et al.*, 2022). Resultados do estudo de Lévesque

et al., (2013) realizado no Canadá, mostram achados similares aos encontrados no presente estudo, no qual crianças menores de 4 anos foram mais afetadas por infecções por *Campylobacter* spp. do que outros grupos etários. Estes resultados fortalecem o conhecimento que se tem de que a campilobacteriose é uma doença pediátrica em países desenvolvidos. Por outro lado, também sugerem que será este grupo etário que mais recorre às urgências hospitalares por sintomatologia mais grave, sendo que os jovens ou adultos poderão ter uma doença que cursa mais leve. No entanto, é relevante a taxa de infecção nestes grupos etários de mais idade.

Uma associação estatisticamente significativa entre os indivíduos do género masculino e as infecções causadas por *Campylobacter* spp. foi observada no presente estudo ($p < 0,001$), demonstrando uma susceptibilidade aumentada dos homens à gastroenterite causada por *Campylobacter* spp., em relação as mulheres. Estes resultados estão em concordância com os descritos pela UE (ECDC, 2022; Duarte *et al.*, 2023). Esta vulnerabilidade por parte dos homens à infecção por *Campylobacter* spp. foi também comprovada por outros estudos que descrevem as diferenças entre género e sua relação com as taxas de incidência de campilobacteriose, e a conclusão que se chega é que a predominância da campilobacteriose no género masculino se deve às diferenças fisiológicas ou genéticas que os homens possuem em relação as mulheres e a maior exposição ou comportamentos de risco por parte dos homens (Strachan *et al.*, 2008; Green *et al.*, 2020).

Um dos sintomas característicos da campilobacteriose é a diarreia com sangue e esta característica clínica foi também observada na maioria das infecções tanto para *C. jejuni* e *C. coli* no presente estudo (63%). Encontra-se descrito pela literatura que a diarreia com sangue em casos de gastroenterite causada por *Campylobacter* spp. indica progressão da infecção no tecido do colon e do recto com conseqüente inflamação e danos na mucosa (Vliet e Ketley, 2001). Pensa-se que a presença do plasmídeo *pVir* considerado marcador de infecção invasiva é a causa da diarreia com sangue em indivíduos com campilobacteriose (Tracz *et al.*, 2005). Em um estudo *in vitro*, o plasmídeo *pVir* foi associado a adesão e invasão de células epiteliais intestinais em cultura (Bacon *et al.*, 2000). Mais estudos são necessários para comprovar efetivamente a associação de *pVir* como responsável da severidade da gastroenterite causada por *Campylobacter* spp.

Segundo a informação contida nos inquéritos, a maioria dos casos de infecção por *Campylobacter spp.* foram casos esporádicos (203 de 208 casos) e uma pequena proporção de casos reportados estavam associados a surtos para *C. coli* (4 de 208 casos) ($p < 0.001$). A campilobacteriose na maioria dos países europeus é uma doença esporádica, pois é difícil fazer uma associação entre alimentos e eventos coletivos de infecção, no entanto o número de surtos notificados têm vindo a aumentar (EFSA, 2022a), e os dados de WGS poderão ser muito importantes para a identificação de surtos de campilobacteriose, que de outra maneira passam completamente despercebidos. Esta mesma evidência foi demonstrada no presente estudo, onde a análise filogénica de dois STs, o ST10846 de *C. jejuni* e o ST10042 de *C. coli*, mostrou a ocorrência de fortes ligações genéticas entre diferentes isolados, altamente sugestivo de surtos.

Variações sazonais foram observadas na infecção por *Campylobacter spp.*, onde no geral, o aumento no número de infeções ocorreu no início do inverno até metade do verão. Julho e Agosto, que são meses correspondentes ao verão foram os meses marcados por um acentuado aumento no número de casos de *C. coli*, tendo sido um aumento estatisticamente significativo durante esse período ($p = 0.008$). Encontra-se comprovado pela literatura que em muitos países com clima temperado, a campilobacteriose causada por *C. jejuni* e *C. coli* está associada a época do verão, onde se verificam as temperaturas mais altas (Nylen *et al.*, 2002; ECDC, 2022). Um estudo realizado com o objetivo de avaliar a sazonalidade da campilobacteriose na Europa, desde 2008–2016, mostrou que alguns países da UE como Dinamarca, Suécia, Noruega e Finlândia apresentaram um pico acentuado no número de infeções entre os meses de Julho e Agosto, estando os resultados do presente estudo de acordo com os reportados por Lake (Lake *et al.*, 2019).

Os fatores que efetivamente contribuem para este pico sazonal ainda são desconhecidos mas algumas explicações têm sido propostas como determinantes deste pico, são eles: viagens devido a férias de verão, maior consumo de carne por causa do aumento dos churrascos de verão, mudanças nos padrões de colonização bacteriana em frangos de corte e mudanças sazonais em atividades recreativas (Lake *et al.*, 2019). O pico de inverno, principalmente no mês de Janeiro foi observado no presente estudo para *C. jejuni*. Na UE, picos de inverno têm sido observados também no mês de Janeiro nos últimos 10 anos (EFSA,

2023b). Possivelmente o maior consumo de carne de aves durante a época festiva do Natal e ano novo podem contribuir para a maior transmissão de *Campylobacter* spp. (Bless *et al.*, 2017; Rosner *et al.*, 2021).

Resistência antimicrobiana de *Campylobacter* spp.

A resistência antimicrobiana de *Campylobacter* spp. em humanos aos quatro antibióticos considerados prioritários pelo ECDC e utilizados no tratamento de infeções humanas: ciprofloxacina, tetraciclina, eritromicina e gentamicina foi mais alta em *C. coli* do que em *C. jejuni*, para ciprofloxacina (*C. jejuni*: 93,7% vs *C. coli*: 98%) e tetraciclina (*C. jejuni*: 64,1% vs *C. coli*: 92,1%). Mas a diferença muito relevante foi observada para o marcador da classe de antibióticos de primeira linha no tratamento, a eritromicina (*C. jejuni*: 1,6% vs *C. coli*: 29,7%). Esta tendência tem vindo a ser consistentemente reportada em Portugal desde 2013, em que há dados disponíveis de vigilância (Duarte *et al.*, 2023). Esta resistência é muito preocupante, pois está associada a perfis de multirresistência, e coloca em causa o tratamento da campilobacteriose em doentes imunocomprometidos ou em crianças. A boa notícia é que os dados do presente estudo parecem mostrar uma tendência de decréscimo da resistência à eritromicina em *C. coli*, necessitando no entanto, de mais anos de vigilância para se perceber melhor.

Ao analisarmos a resistência combinada entre ciprofloxacina+tetraciclina, ciprofloxacina+eritromicina, antibióticos extremamente importantes para o tratamento da campilobacteriose, verificamos que a resistência combinada entre ciprofloxacina+tetraciclina foi o perfil mais comum, em ambas as espécies. Os dados do último relatório da UE sobre a resistência antimicrobiana em bactérias zoonóticas e indicadoras em humanos e alguns outros estudos apontam também resultados similares aos encontrados neste presente estudo (Schreyer *et al.*, 2022; EFSA, 2023). No geral, Portugal é o país da Europa a reportar consistentemente taxas mais altas de resistência, sobretudo à ciprofloxacina+eritromicina em ambas as espécies, o que é muito preocupante (EFSA, 2023b).

Em alguns países da Europa, incluindo Portugal, a prevalência de *C. coli* na produção animal tem-se intensificado tanto quanto a prevalência de *C. jejuni* e uma vez que a

campilobacteriose é uma doença zoonótica, a presença de estirpes resistentes principalmente à ciprofloxacina e eritromicina na cadeia de produção animal contribui para a emergência de *C. coli* em infecções humanas (Wieczorek e Osek, 2013; Schreyer *et al.*, 2022; EFSA, 2023). No entanto, se consideramos a abolição da utilização de antimicrobianos como promotores de crescimento ou a limitação da sua utilização para fins profiláticos e metafiláticos, implementada há vários anos, podemos considerar que a atual circulação de clones resistentes é devida à propagação dos mesmos, por ausência de impacto da resistência no fitness da bactéria.

Como mencionado num dos capítulos anteriores, na Austrália o uso da ciprofloxacina não estava aprovado na produção animal e é infrequentemente prescrito como antibiótico para tratamento da diarreia, sendo a taxa de resistência rara, de cerca de 2% (Unicomb *et al.*, 2006).

A multiresistência em *C. coli* (26,7%) foi observada em um nível preocupante no presente estudo em relação a *C. jejuni* que foi baixa (1,6%). Resultados similares também foram encontrados em outros países europeus nos anos anteriores (EFSA, 2022b; EFSA, 2023). A explicação para esta diferença pode estar no tipo de determinantes de resistência associados, tal como explicado na secção seguinte da discussão.

Com os resultados obtidos no presente estudo, recomenda-se assim a necessidade de reforçar a vigilância epidemiológica de resistência aos antimicrobianos quer a nível das infecções humanas, quer a nível da cadeia de produção animal, cada vez mais aplicando-se o conceito *One Health*. Quanto aos β -lactâmicos, verificámos total susceptibilidade dos isolados de *Campylobacter* spp. à amoxicilina+ácido clavulânico no presente estudo. Apesar de alguns poucos países europeus terem relatado a ocorrência de resistência em isolados de *Campylobacter* spp. de humanos em 2021, os níveis de resistência continuam baixos, com níveis médios em torno de 6,6% e 9,2% em isolados de *C. jejuni* e *C. coli*, respetivamente. No entanto, Alemanha é o único país que apresenta níveis altos de resistência a amoxicilina+ácido clavulânico em *C. jejuni* (41,9%) e *C. coli* (44%) ao nível da UE, sem no entanto haver explicação para tal (EFSA, 2023b). Será necessário verificar se os determinantes recentemente descritos para *C. coli* (uma mutação G57T na região promotora da blaOXA-61 e deleção na região promotora da β -lactamase blaOXA-61, na posição A69)

(Deforet *et al.*, 2023) estão presentes nestes isolados de *C. coli*, sendo que para *C. jejuni* são desconhecidos, e também que as bases de dados tais como, AMRFinderPlus, ResFinder e CARD, sejam atualizadas para contemplarem já estes novos determinantes, permitindo a sua deteção automática.

Ao contrário de amoxicilina+ácido clavulânico, resistência à ampicilina foi elevada tanto para *C. jejuni* (76%) como para *C. coli* (81%). Comparando os níveis de resistência entre estas duas penicilinas, observamos que a amoxicilina associada ao ácido clavulânico potencia a acção bactericida do mesmo sendo que esta associação pode diminuir o número de estirpes resistentes às penicilinas.

Uma pequena percentagem de isolados de *C. jejuni* apresentaram suscetibilidade reduzida ao ertapenemo (3,8%). Apesar de ser uma pequena percentagem, este resultado é preocupante, uma vez que carbapenemos são usados na tratamento de casos severos de campilobacteriose com estirpes multirresistentes, que tornam ineficaz o tratamento com os antibióticos de primeira linha (Hakanen *et al.*, 2003). A identificação de determinantes de resistência nestas estirpes com suscetibilidade reduzida será alvo de estudos futuros, e deverá incluir alvos como os genes que codificam bombas de efluxo (Nunes *et al.*, 2023).

Evolução temporal da resistência aos antibióticos em *Campylobacter* spp. de 2013 a Maio de 2023

Ao analisarmos a evolução temporal da resistência aos antibióticos prioritários (ciprofloxacina, tetraciclina, eritromicina e gentamicina) em *Campylobacter* spp., verificamos leves flutuações nos níveis de resistência ao longo dos anos. Desde 2013, Portugal tem observado altas taxas de resistência a ciprofloxacina e tetraciclina em *Campylobacter* sp., sendo mais visível em *C. coli*, sendo um dos países europeus com maiores níveis de resistência a estes antibióticos prioritários, segundo dados dos últimos relatórios europeus sobre a resistência antimicrobiana em bactérias zoonóticas e indicadoras em humanos (EFSA, 2021; EFSA, 2022b; EFSA, 2023).

Resistência aos antibióticos: comparação entre fenótipo e genótipo em *Campylobacter* spp.

A genotipagem dos isolados de *Campylobacter* spp. pelo WGS mostrou que todos os isolados fenotipicamente resistentes à ciprofloxacina, tetraciclina e eritromicina possuíam os respectivos determinantes genéticos de resistência já previamente relatados em outros estudos.

Todos os isolados de *C. jejuni* e *C. coli* fenotipicamente resistentes à ciprofloxacina carregavam a mutação Thr86Ile no gene *gyrA*, uma das subunidades da DNA girase, conferindo um alto grau de resistência à ciprofloxacina. Num estudo conduzido pelo Laboratório de Saúde Pública da Irlanda, também foram encontrados resultados similares, no qual todos os isolados com o fenótipo de resistência à ciprofloxacina continham a mutação Thr86Ile no gene *gyrA*, havendo uma correlação boa entre fenótipo e genótipo tal como no presente estudo (Public Health Laboratory, 2019). Para além desta mutação, também foi identificada a mutação D90N em apenas um isolado de *C. jejuni* e um isolado de *C. coli*, juntamente com a mutação mais comum. Esta mutação é pouco comum não sendo associada aos níveis altos de resistência à ciprofloxacina (Wieczorek e Osek, 2013).

Uma total concordância entre fenótipo e genótipo também foi observada nos isolados de *Campylobacter* spp. resistentes à eritromicina. Todos os isolados resistentes à eritromicina tinham a mutação pontual A2075G na subunidade 23S do rRNA, (Gibreel *et al.*, 2005; Payot *et al.*, 2006; Schreyer *et al.*, 2022). No entanto, uma estirpe de *C. coli* continha o gene *ermN* que foi responsável por conferir resistência à eritromicina. O gene *erm*, que codifica para uma *Erythromycin-resistant methylase*, foi originalmente reportado em bactérias de Gram-positivo, sendo um dos principais mecanismos de resistência aos macrólidos nestas bactérias (Pechère, 2001). Este gene codifica para proteínas que metilam os resíduos adenina nas posições A2058/2059 na região da peptidil transferase no domínio V do rRNA 23S. A resultante alteração estrutural do rRNA previne a ligação dos macrólidos, permitindo que a síntese proteica continue e que a estirpe seja resistente quer aos macrólidos, quer às lincosamidas e à estreptogramina B (grupo MLSB) (Leclercq, 2002). Estes genes podem facilmente ser transmitidos por via horizontal para outros géneros bacterianos, incluindo de Gram-negativo, como *Campylobacter* spp. (Florez-Cuadrado *et al.*, 2017). Em *C. coli*, o gene

ermB já foi descrito como associado a resistência aos macrólidos, embora raramente (Wang *et al.*, 2014). Alguns estudos têm atribuído a presença destes determinantes como justificação para a taxa de resistência em *C. coli* ser superior à de *C. jejuni*. Por um lado, a presença do gene *ermB* apenas em *C. coli* potencia a transferência horizontal deste gene em estirpes de *C. coli* multiresistentes (Wang *et al.*, 2014). No entanto em Portugal, este gene nunca foi reportado e é raro na Europa (Elhadidy *et al.*, 2019). Já o gene *ermN*, reportado pela primeira vez em Portugal neste estudo, parece ser também ainda raro na Europa (Jehanne *et al.*, 2021) mas poderá ser uma causa de disseminação da resistência aos macrólidos num futuro próximo, exigindo uma vigilância contínua. Outra explicação para a diferença entre espécies é que a mutação que foi associada à resistência à eritromicina, 23S:g.2075A>G neste e noutros estudos, tem um *fitness cost* inferior em *C. coli* do que em *C. jejuni*, tal como descrito por Zeitouni *et al.*, (2012).

Todos os isolados de *Campylobacter* spp. fenotipicamente resistentes a tetraciclina continham o gene *tet(O)*, sendo a correlação entre fenótipo e genótipo totalmente concordante e similar encontrados em outros estudos (Public Health Laboratory, 2019; Schreyer *et al.*, 2022).

Em relação à gentamicina, foi identificado o gene *apmA* no único isolado resistente a este antibiótico, o que está de acordo com um estudo anterior, relativo à espécie e raridade desta mutação (Fabre *et al.*, 2018), agora pela primeira vez descrita em Portugal. Outros genes tais como: *aadB*, *aadE-Cc*, *ant(6)-Ia*, *Inu(C)* e *aph(3')-III* que conferem resistência a alguns antibióticos da classe dos aminoglicosídeos, mas não testados neste estudo, foram detetados. Estes dados apontam para uma grande diversidade de genes que conferem resistência a esta classe de antibióticos, o que pode impactar na sua fácil disseminação.

Quanto aos β -lactâmicos, uma elevada percentagem de isolados apresentaram resistência fenotípica à ampicilina, quer de *C. jejuni* (76%) quer de *C. coli* (81%). Todas as estirpes de *Campylobacter* spp. resistentes fenotipicamente à ampicilina continham genes *bla* OXA, quer do tipo *blaOXA-61* (*C. jejuni*: 0,9%), quer outras afins, como *blaOXA-193* (*C. jejuni*: 72,9% e *C. coli*: 69,3%). Contudo, estes genes também estavam presentes em estirpes suscetíveis à ampicilina fenotipicamente.

Segundo a literatura, níveis elevados de resistência a ampicilina em *C. jejuni* têm sido observados por todo o mundo e sabe-se hoje em dia que se deve à presença do gene *blaOXA-61*, entretanto, resultados contrários foram encontrados neste presente estudo. A hipótese para tentar explicar este resultado é que a resistência está associada não à presença destes genes mas sim a uma mutação específica, transversão G57T no promotor da *blaOXA-61* ou da 193 (Deforet *et al.*, 2023), pelo que sendo assim, seria desejável que esta mutação constasse nos programas de análise, como o ResFinder.

Adicionalmente, os genes que codificam estas enzimas também foram detetados em estirpes suscetíveis à ampicilina, pelo que é importante introduzir a mutação no promotor nas bases de dados, permitindo uma correta correlação fenótipo/genótipo. Uma outra hipótese é a possível presença de outros mecanismos que contribuem para a resistência a ampicilina ainda desconhecidos pela comunidade científica (Sithole *et al.*, 2021).

Relativamente ao carbapenemo ertapenemo, os mecanismos de resistência são ainda pouco conhecidos, e também foram descritas poucas estirpes resistentes. Recentemente, Nunes e colegas descreveram mutações no gene *porA*, que codifica a *porina major* de *C. jejuni*, PorA, em isolados de *C. jejuni* exibindo alto nível de resistência aos carbapenemos, tais como a inserção do codão GAC entre as posições 417 e 418, resultando na inserção de um resíduo extra do aminoácido Asp, e a mutação não sinónima G167A, que resulta na substituição Gly56Asp (Nunes *et al.*, 2023). No nosso estudo, estas mutações não foram encontradas pelo que se torna necessário aprofundar este tema, com pesquisa noutros alvos genéticos, como as bombas de efluxo.

Distribuição de ST em *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*

A diversidade genética encontrada no presente estudo diferencia-se do perfil de MLST reportado em isolados humanos de *Campylobacter* spp. em outros países (Sails *et al.*, 2003; Thakur *et al.*, 2009; De Haan *et al.*, 2010; Bravo *et al.*, 2021; Audu *et al.*, 2022). Observou-se uma grande variedade de genótipos de *C. jejuni* e *C. coli* a circularem em Portugal, com um total de 66 perfis de ST diferentes em *C. jejuni* e 30 perfis de ST diferentes em *C. coli*, respetivamente.

O ST10846 foi o mais frequentemente detetado em *C. jejuni*, representando 17,1% de todas as estirpes desta espécie. A alta frequência do ST10846 no estudo foi inesperada e é preocupante, uma vez que desde a sua descoberta em 2020 até o ano de 2023 apenas foram reportadas cinco estirpes de casos esporádicos de *C. jejuni* com este ST, no Luxemburgo e Reino Unido, segundo os dados submetidos na base de dados PubMLST (pubmlst.org/campylobacter/). Torna-se necessário haver monitorização da circulação deste ST e de possíveis reservatórios e fontes de infeção a nível nacional, com o estudo de estirpes de origem alimentar e animal, mais uma vez aplicando o conceito *One Health*.

Para *C. jejuni*, o segundo ST mais frequentemente detetado no estudo foi o ST50 (9,2%) e não o ST45 (apenas foi detetado numa estirpe) considerado o segundo mais frequente em *C. jejuni* em alguns países (Kovanen *et al.*, 2014; Bravo *et al.*, 2021). Outros países como Austrália (Mickan *et al.*, 2007), Bélgica (Habib *et al.*, 2009), Finlândia (De Haan *et al.*, 2010), Lituânia (Ramonaite *et al.*, 2017) e Irlanda (Public Health Laboratory, 2019) também encontraram o ST50 tanto em amostras humanas como em amostras de frango de corte. Os ST122, ST354 e ST607 também já foram detetados em estirpes isoladas de humanos e animais em Portugal mas em menor proporção (Duarte *et al.*, 2014) e em outros países como a Estónia (Tedersoo *et al.*, 2022). A presença de STs encontrados em frangos de corte indica que estes animais podem ser a principal fonte de contaminação causadora de campilobacteriose humana em Portugal. No entanto, esta associação carece de mais estudos, tal como já dito anteriormente.

Estirpes de *C. coli* apresentaram também uma alta diversidade de STs, mas com predomínio do ST10042, representando 25,7% de todas as estirpes de *C. coli*. Também este ST é raramente reportado, segundo a base de dados do PubMLST, sugerindo que a sua circulação em casos humanos em Portugal estará ligada a uma fonte de contaminação em Portugal. Num estudo conduzido pelo Laboratório de Saúde Pública da Irlanda, também foram encontrados resultados similares, com o ST10042 sendo o mais frequente (17,2%) (Public Health Laboratory, 2019). O ST10042 também já foi detetado em isolados de *C. coli* de humanos em Luxemburgo, Espanha e Inglaterra, mas muito raramente, e de águas ambientais em Luxemburgo (1 isolado) segundo dados submetidos no PubMLST. O segundo maior ST detetado foi o ST832 (9,9%), e o mesmo também foi detetado na Estónia em

amostras humanas e de carne fresca de frangos de corte (Tedersoo *et al.*, 2022), e noutros países da UE, segundo dados submetidos no PubMLST. A ocorrência dos ST832 e ST10042 tanto em estirpes de *C. coli* isolados de humanos, como em frangos e águas ambientais, indica que os mesmos podem ser potenciais reservatórios e/ou fontes de infeção para o ser humano. Os ST855, ST3017 e ST5659 também já foram anteriormente reportados em estirpes de *C. coli* isolados de humanos e animais em Portugal (Duarte *et al.*, 2014).

Distribuição temporal e por dados demográficos dos STs mais prevalentes

A ocorrência de 53,7% e de 57,1% de casos de gastroenterite em *C. jejuni* com o ST10846 e ST50, respetivamente de Janeiro-Maio 2023, ressalta a necessidade de uma contínua vigilância para monitorizar o padrão de circulação destes STs em Portugal. O mesmo pode ser também inferido para *C. coli*, com específica atenção ao ST10042, que foi maioritariamente observado no ano de 2022 (96,2%) indicando possível surto disseminado em Portugal.

A região de LVT foi a região de Portugal com a maior diversidade de STs tanto para *C. jejuni* (45 STs diferentes) e *C. coli* (18 STs diferentes). Notou-se também que o ST10846 foi o mais predominante no Norte do país e o ST10042 foi o mais predominante na região de LVT, apontando para fontes de infeção mais ao nível regional. Estes dados mostram mais uma vez a importância da vigilância por WGS, pois foi possível detetar a predominância de alguns STs, sendo importante no futuro realizar estudos visando conhecer potenciais fontes de infeção característicos destas regiões que potenciam a transmissão dos ST detetados no estudo, particularmente dos ST10846 e ST10042 em Portugal, sempre apoiados no conceito *One Health*.

Não houve diferenças significativas entre os STs detetados em isolados de *C. jejuni* e *C. coli* em relação à faixa etária ou género. Contudo, destaca-se que a frequência do ST10846 (11 estirpes; 20,4%) e ST607 (11 estirpes; 47,8%) foi maior em crianças com idades compreendidas entre 1-4 anos em comparação com outros STs, bem como os ST10846 (25 estirpes; 22,7%) e ST50 (17 estirpes; 13,3%) mais frequentes no género feminino em relação ao género masculino. Relativamente a *C. coli*, também se destaca uma importante observação, no qual o ST10042 esteve maioritariamente disseminado em crianças na faixa

etária dos 1-4 anos de idade (9 estirpes; 34,6%) em comparação com os indivíduos de outras idades, e ao contrário de *C. jejuni*, o ST10042, esteve mais disseminado no género masculino. Estudos sobre a relação dos STs com a idade e o género devem ser conduzidos com vista a perceber quais os fatores que contribuem para a maior predominância dos STs em determinadas idades e género.

Distribuição dos STs mais prevalentes de acordo com o perfil de susceptibilidade aos antibióticos prioritários

No presente estudo foi observada uma disseminação de STs identificados em todos os isolados de *C. jejuni* com um perfil de resistência à tetraciclina. O estudo de Habib *et al.*, (2009) encontrou resultados relativamente concordantes, comparativamente ao ST354, no qual todas as estirpes de *C. jejuni* com o ST354 isoladas de frangos eram resistentes a tetraciclina. Informação sobre os outros STs associados ao perfil de susceptibilidade a tetraciclina ainda é escassa. Estes resultados demonstram uma possível disseminação de clones de *C. jejuni* com o ST354 com alta resistência à tetraciclina em Portugal. Quanto a eritromicina, mais estudos devem ser realizados para investigar a possível relação dos ST883 e ST10622 com o perfil de resistência a eritromicina.

A disseminação de isolados de *C. coli* pertencentes ao complexo clonal ST828 com perfil de resistência à ciprofloxacina no presente estudo também foi observada no estudo de Stone *et al.*, (2013), no qual algumas estirpes de *C. coli* pertencentes ao complexo clonal ST828 exibiram um perfil de resistência à ciprofloxacina. O ST832 que faz parte do complexo clonal ST828, esteve bem disseminado entre estirpes de *C. coli* resistentes à eritromicina. Este resultado encontra-se parcialmente de acordo com os resultados dos estudos de Thakur *et al.*, (2009), no qual alguns STs diferentes dos detetados no presente estudo, mas pertencentes ao complexo clonal ST828 estiveram disseminados em estirpes de *C. coli* resistentes a eritromicina.

A disseminação de *Campylobacter* spp. entre os principais STs a circular em Portugal e as resistências aos antibióticos permitiu perceber a dinâmica de circulação de clones resistentes. O melhor exemplo foi a diminuição da resistência à eritromicina em *C. coli* observada no ano de 2022, devido à maior circulação do ST10042, suscetíveis a este

antibiótico. Estes resultados reforçam a importância da implementação de uma vigilância baseada em WGS em Portugal.

Comparação de dados genotípicos entre amostras humanas e animais

O perfil de MLST de estirpes animais MDR apresentou similaridades em relação ao perfil de MLST de algumas estirpes humanas MDR no presente estudo (ST832 e ST1624). Apesar do reduzido número de amostras estudadas, estes dados indicam que frangos e suínos que são usados para o consumo humano são um potencial reservatório e fonte de infeção para a campilobacteriose em Portugal, corroborando outros estudos (pubmlst.org/campylobacter/; Tedersoo *et al.*, 2022). Todas as estirpes de *C. coli* isoladas de frangos e suínos multirresistentes apresentaram os mesmos determinantes de resistência aos respetivos antibióticos encontrados em estirpes isoladas em humanos neste estudo.

Estes dados sugerem a transmissão de estirpes de *Campylobacter* spp. resistentes dos animais para humanos, através da alimentação. A existência de estirpes isoladas em animais que exibem um perfil de resistência aos três antibióticos, ciprofloxacina, eritromicina e tetraciclina observado no estudo, reforça a necessidade de identificar fatores que contribuem para a emergência e disseminação de bactérias multirresistentes e estabelecer estratégias de controlo mais adequadas uma vez que grandes quantidades de carne de frango e de suínos são consumidas em Portugal. Uma abordagem *One Health* que integre uma equipa multidisciplinar constituída por autoridades de saúde, setor pecuário e indústrias alimentares é necessária, uma vez que a campilobacteriose é uma zoonose e níveis altos de resistência aos antibióticos têm sido verificados ao longo dos anos.

Análises filogenéticas

As análises filogenéticas dos 54 isolados de *C. jejuni* mostraram uma tendência que as infeções por *C. jejuni* têm de formarem clusters e não casos esporádicos, com a possibilidade de os mesmos causarem surtos. Observou-se também que a maioria dos clusters continham entre 2-4 isolados cada (10 clusters). Este facto, pode desencadear eventualmente o surgimento de potenciais surtos. Esta tendência também foi observada num estudo

conduzido na Dinamarca para detetar surtos *C. jejuni* ocorridos entre 2015-2017, usando as ferramentas do WGS (Joensen *et al.*, 2020).

No presente estudo, foi definido um *cut-off* de 4 alelos de diferença para verificar a formação de potenciais surtos, no entanto, verificou-se uma ligeira dispersão dos isolados que formaram clusters colhidos em meses diferentes e locais diferentes, bem como falta de informação sobre possíveis fontes de infeção, dificultando fazer uma ligação epidemiológica exaustiva sobre a ocorrência de surtos. Porém, de acordo com o estudo acima citado, na ausência de informação epidemiológica, pode ser possível inferir efetivamente a ocorrência de surtos somente usando este *cut-off* de 4 alelos de diferença (Joensen *et al.*, 2020).

Quanto a *C. coli*, o valor de *cut-off* de 3 alelos de diferença indicou-nos clusters formados e potenciais surtos ocorridos. Apesar de não haver um valor de *cut-off* estabelecido para esta espécie, valores de *cut-off* baixos de distância genética permitem aumentar a sensibilidade de deteção de surtos e eliminar a possível inclusão nos clusters de casos não relacionados epidemiologicamente e geneticamente (Besser *et al.*, 2019).

Sendo assim, conclui-se que os valores de *cut-off* da distância genética entre isolados de *Campylobacter* spp. podem ser ferramentas muito úteis para deteção de clusters e definição de surtos usando WGS quando não se há informação epidemiológica robusta (Besser *et al.*, 2019; Joensen *et al.*, 2020).

Com bases nos resultados filogenéticos, observou-se que alguns clusters de *C. jejuni* e *C. coli* continham isolados geneticamente idênticos, partilhando nenhuma distância alélica no conjunto dos genes analisados, revelando uma possível forte ligação epidemiológica, bem como uma fonte de infeção comum. Este raciocínio está de acordo com as interpretações de Struelens, 1996 e Van Belkum *et al.*, 2007, no qual isolados bacterianos que tenham sido isolados em locais e períodos diferentes, mas que possuem semelhanças fenotípicas e genotípicas idênticas entre si, provavelmente tenham uma origem comum.

O facto da maioria dos clusters terem ocorrido em 2022, indica que Portugal teve surtos causados por *C. jejuni* e *C. coli* nesse período e que somente monitorizando o número de casos clínicos notificados não é suficiente para detetar surtos em tempo real. Verifica-se com estes resultados, a necessidade de se implementar o WGS em Portugal como importante

ferramenta de rastreio de surtos de *Campylobacter* spp. e na investigação de potenciais fontes de infeção.

7 Conclusão

O presente estudo abordou a vigilância das infecções humanas causadas por *C. jejuni* e *C. coli*, com ênfase na aplicação do WGS. Os resultados obtidos por meio da realização deste estudo são de grande importância para compreender a epidemiologia, os padrões de resistência antimicrobiana e a diversidade genómica deste agente patogénico, que é o principal agente da gastroenterite em Portugal e no mundo.

Ao longo dos anos, desde o início da vigilância implementada em 2009 até ao final do período deste estudo, Maio de 2023, Portugal apresentou variabilidade no número de infecções em humanos por *C. jejuni* e *C. coli*, sendo que em todos os anos, *C. jejuni* foi o principal causador da campilobacteriose em Portugal. No entanto, em 2022, o número de infecções por *C. coli* atingiu a frequência mais alta em relação aos outros anos. Através da aplicação do WGS, denotamos que este aumento esteve provavelmente relacionado com possíveis surtos associados ao ST10042.

A distribuição da infeção em *Campylobacter* spp. foi mais prevalente em crianças com 1-4 anos de idade, e o género masculino esteve fortemente associado à infeção por *Campylobacter* spp. Picos no número de infeções por *Campylobacter* spp. ocorreram nos meses de inverno, primavera e verão. Estes resultados epidemiológicos reforçam a necessidade de se criarem estratégias eficazes de prevenção e controlo contra as infeções por *Campylobacter* spp. considerando as variáveis críticas.

Os resultados sobre a resistência antimicrobiana de *Campylobacter* spp. em humanos revelam uma disseminação preocupante de estirpes resistentes à ciprofloxacina, tetraciclina e eritromicina, com principal foco em *C. coli*, comprometendo a eficácia dos tratamentos convencionais. O conhecimento dos determinantes genéticos da resistência antimicrobiana bem como da dinâmica de circulação dos clones resistentes, evidenciado pelo uso do WGS, pode fornecer informações relevantes para o desenvolvimento de estratégias preventivas e terapêuticas.

Para além da identificação minuciosa dos determinantes de resistência aos antibióticos, uma das contribuições significativas deste estudo foi a capacidade de caracterizar a diversidade genética de *Campylobacter* spp. circulante em Portugal através das

ferramentas do WGS, dados que não poderiam ser conhecidos apenas usando os métodos de tipagem convencionais. Aliada a essa extensa caracterização genética de estirpes de *Campylobacter* spp., alguns genótipos tais como o ST883 e o ST10622 estiveram disseminados em estirpes de *C. jejuni* com um perfil de MDR e de resistência à eritromicina e o ST832 do complexo clonal ST828 esteve disseminado em estirpes de *C. coli* com um perfil de resistência à eritromicina.

As análises filogenéticas dos STs mais prevalentes para *C. jejuni* e *C. coli*, ST10846 e ST10042, respetivamente, demonstraram que algumas estirpes estiveram agrupadas em clusters pequenos e de maiores dimensões, sugerindo possíveis surtos, que seria necessário confirmar com investigações epidemiológicas por parte das autoridades de saúde. Alguns clusters destes STs continham isolados muito próximos geneticamente, indicando uma possível origem comum. Informação epidemiológica robusta é necessária para identificar potenciais fontes de contaminação com vista a auxiliar na identificação e controlo de surtos e deste modo implementar medidas de prevenção e controlo específicas. Aqui a investigação com base no conceito *One Health*, incluindo isolados humanos, animais, alimentares e ambientais é crucial para estas investigações.

Em conclusão, os dados obtidos e gerados neste estudo mostram a relevância de uma vigilância laboratorial com base em dados de WGS, que permitiu inferir fenótipos de resistência com grande acuidade, detetar novos determinantes de resistência, perceber a diversidade genética e dinâmica de circulação de diferentes genótipos, incluindo de clones multiresistentes, e ainda detetar surtos de infeções, constituindo uma ferramenta poderosa para a vigilância da campilobacteriose e da resistência antimicrobiana de *Campylobacter* spp. em Portugal, a fim de orientar intervenções em saúde pública.

8 Referências bibliográficas

1. Aarestrup, F. M., e Engberg, J. (2001). Antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter*. *Veterinary Research*, 32(3–4): 311–321. <https://doi.org/10.1051/vetres:2001127>.
2. Aleksić, E., Miljković-Selimović, B., Tambur, Z., Aleksić, N., Biočanin, V. e Avramov, S. (2021). Resistance to Antibiotics in Thermophilic *Campylobacters*. *Front. Med.*, 8:763434. <https://doi:10.3389/fmed.2021.763434>.
3. Ali S and Alsayeqh AF (2022). Review of major meat-borne zoonotic bacterial pathogens. *Front. Public Health*, 10:1045599. doi: 10.3389/fpubh.2022.1045599.
4. Allos B. M. (2001). *Campylobacter jejuni* infections: update on emerging issues and trends. *Clin Infect Dis*, 32(8):1201–1206. [PubMed: 11283810].
5. Allos, B. M., Calderwood, S. B. e Baron, E. L. (2013). Clinical Manifestations, Diagnosis, and Treatment of *Campylobacter* Infection. UpToDate, Waltham, MA.
6. Audu, B. J., Norval, S., Bruno, L., Meenakshi, R., Marion, M., e Forbes, K. J. (2022). Genomic diversity and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. from humans and livestock in Nigeria. *Journal of Biomedical Science*, 29(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12929-022-00786-2>.
7. Auerbach, E. A., Seyfried, E. E., e McMahon, K. D. (2007). Tetracycline resistance genes in activated sludge wastewater treatment plants. *Water Research*, 41(5), 1143–1151. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.11.045>.
8. Bacon, D. J., Alm, R., Burr, D. H., Hu, L., Kopecko, D. J., Ewing, C. P., Trust, T. J., e Guerry, P. (2000). Involvement of a plasmid in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Infection and Immunity*, 68(8), 4384–4390. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.8.4384-4390.2000>.
9. Baggerman, W. I., e Koster, T. (1992). A comparison of enrichment and membrane filtration methods for the isolation of *Campylobacter* from fresh and frozen foods. *Food Microbiology*, 9(2), 87–94. [https://doi.org/10.1016/0740-0020\(92\)80016-W](https://doi.org/10.1016/0740-0020(92)80016-W).
10. Besser, J., Carleton, H. A., Gerner-smidt, P., Lindsey, R. L., e Trees, E. (2018). NGS and their Application to the Study and Control of Bacterial Infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 24(4), 335–341. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.10.013>.

Generation.

11. Besser, J. M., Carleton, H. A., Trees, E., Stroika, S. G., Hise, K., Wise, M., e Gerner-Smidt, P. (2019). Interpretation of Whole-Genome Sequencing for Enteric Disease Surveillance and Outbreak Investigation. *Foodborne Pathogens and Disease*, 16(7), 504–512. <https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2650>.
12. Biggs, P. J., Fearnhead, P., Hotter, G., Mohan, V., Collins-Emerson, J., Kwan, E., Besser, T. E., Cookson, A., Carter, P. E., e French, N. P. (2011). Whole-genome comparison of two campylobacter jejuni isolates of the same sequence type reveals multiple loci of different ancestral lineage. *PLoS ONE*, 6(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027121>.
13. Bless, P. J., Schmutz, C., e Mäusezahl, D. (2017). The recurrent campylobacteriosis epidemic over Christmas and New Year in European countries, 2006-2014. *BMC Research Notes*, 10(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2587-8>.
14. Brasil. Ministério de Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. (2011). Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial de Campylobacter: gênero Campylobacter: diagnóstico laboratorial clássico e molecular. Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolfo Lutz. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.
15. Bravo, V., Katz, A., Porte, L., Weitzel, T., Varela, C., Gonzalez-Escalona, N., e Blondel, C. J. (2021). Genomic analysis of the diversity, antimicrobial resistance and virulence potential of clinical campylobacter jejuni and campylobacter coli strains from chile. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 15(2), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009207>.
16. Butzler, J. P. (2004). Campylobacter, from obscurity to celebrity. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(10), 868–876. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.00983.x>.
17. Cagliero, C., Mouline, C., Cloeckaert, A. e Payot, S. (2006). Synergy between efflux pump CmeABC and modifications in ribosomal proteins L4 and L22 in conferring macrolide resistance in Campylobacter jejuni and Campylobacter coli. *Antimicrob Agents Chemother*, 50:3893-6. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00616-06>.
18. Carrillo, C. D., Kruczkiewicz, P., Mutschall, S., Tudor, A., Clark, C., e Taboada, E. N. (2012). A framework for assessing the concordance of molecular typing methods and the

- true strain phylogeny of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* using draft genome sequence data. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2(May), 57. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00057>.
19. CDC. Centers for Disease Control and Prevention (2019). Diagnosis and Treatment. Disponível em: <https://www.cdc.gov/campylobacter/diagnosis.html>. Acessado em 28/11/2023.
 20. Chin, C.-S., Sorenson, J., Harris, J. B., Robins, W. P., Charles, R. C., Jean-Charles, R. R., Bullard, J., Webster, D. R., Kasarskis, A., Peluso, P., Paxinos, E. E., Yamaichi, Y., Calderwood, S. B., Mekalanos, J. J., Schadt, E. E., e Waldor, M. K. (2011). The Origin of the Haitian Cholera Outbreak Strain. *New England Journal of Medicine*, 364(1), 33–42. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1012928>.
 21. Chopra, I., e Roberts, M. (2001). Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(2), 232–260. <https://doi.org/10.1128/membr.65.2.232-260.2001>.
 22. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, Recommandations. (2020).
 23. Crim S.M., Griffin P.M., Tauxe R., Marder E.P., Gilliss D., Cronquist A.B., Cartter M., Tobin-D'Angelo M. 2015. Centers for disease control and prevention. Preliminary incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food foodborne diseases active surveillance network, 10 U.S. Sites, 2006–2014. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, 64:495–499.
 24. Dai, L., Sahin, O., Grover, M., e Zhang, Q. (2020). New and alternative strategies for the prevention, control, and treatment of antibiotic-resistant *Campylobacter*. *Translational Research*, 223, 76–88. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2020.04.009>.
 25. De Haan, C. P. A., Kivistö, R., Hakkinen, M., Rautelin, H., e Hänninen, M. L. (2010). Decreasing trend of overlapping multilocus sequence types between human and chicken *campylobacter jejuni* isolates over a decade in finland. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(15), 5228–5236. <https://doi.org/10.1128/AEM.00581-10>.
 26. Dearlove, B. L., Cody, A. J., Pascoe, B., Méric, G., Wilson, D. J., e Sheppard, S. K. (2016).

Rapid host switching in generalist *Campylobacter* strains erodes the signal for tracing human infections. *ISME Journal*, 10(3), 721–729. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.149>.

27. Deforet, F., Jehanne, Q., Bénéjat, L., Aptel, J., Prat, R., Desbiolles, C., Ducournau, A., Jauvain, M., Bonnet, R., Vandenesch, F., Lemoine, J., e Lehours, P. (2023). Combined genomic-proteomic approach in the identification of *Campylobacter coli* amoxicillin-clavulanic acid resistance mechanism in clinical isolates. *Frontiers in Microbiology*, 14(November). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1285236>.
28. Dekeyser, P., Gossuin-Detrain, M., Butzler, J. P., e Sternon, J. (1972). Acute enteritis due to related vibrio: First positive stool cultures. *Journal of Infectious Diseases*, 125(4), 390–392. <https://doi.org/10.1093/infdis/125.4.390>.
29. De Vries, S. P., Vurayai, M., Holmes, M., Gupta, S., Bateman, M., Goldfarb, D., Maskell, D. J., Matsheka, M. I. e Grant, A. J. (2018). Phylogenetic analyses and antimicrobial resistance profiles of *Campylobacter* spp. from diarrhoea patients and chickens in Botswana. *PLoS One*, 13(3): 019448. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194481>.
30. Dinos, G. P. (2017). The macrolide antibiotic renaissance. *British Journal of Pharmacology*, 174(18), 2967–2983. <https://doi.org/10.1111/bph.13936>.
31. Diplock, B. K. (2022). Supporting foodborne outbreak investigations: A review of the use of whole genome sequencing and emerging technologies (Issue September).
32. Duarte, A., Pereira, L., Lemos, M., e Rodrigues, J. C. (2023). Epidemiological Data and Antimicrobial Resistance of *Campylobacter* spp in Portugal from 13 Years of Surveillance. <https://doi.org/10.20944/preprints202312.1387>.
33. Duarte, A., Santos, A., Manageiro, V., Martins, A., Fraqueza, M. J., Caniça, M., Domingues, F. C., e Oleastro, M. (2014). Human, food and animal *Campylobacter* spp. isolated in Portugal: High genetic diversity and antibiotic resistance rates. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 44(4), 306–313. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.06.012>.
34. ECDC. European Centre for Disease Prevention and Control. (2022). *Campylobacteriosis. AER 2021*. December, 1–8.
35. EFSA. (2018). The European Union summary report on antimicrobial resistance in

- zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016. *EFSA Journal*, 16(2). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5182>.
36. EFSA. (2021). The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2018 / 2019. 19(February). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6490>.
 37. EFSA. (2022a). The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 20(12). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7666>.
 38. EFSA. (2022b). The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2019–2020. *EFSA Journal*, 20(3). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7209>.
 39. EFSA. (2023a). The European Union One Health 2022 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 21(12). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.8442>.
 40. EFSA. (2023b). The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2020/2021. *EFSA Journal*, 21(3). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.7867>.
 41. El-Zamkan, M. A., e Hameed, K. G. A. (2016). Prevalence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in raw milk and some dairy products. *Veterinary World*, 9(10), 1147–1151. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.1147-1151>.
 42. Elhadidy, M., Miller, W. G., Arguello, H., Álvarez-Ordóñez, A., Dierick, K., e Botteldoorn, N. (2019). Molecular epidemiology and antimicrobial resistance mechanisms of *Campylobacter coli* from diarrhoeal patients and broiler carcasses in Belgium. *In Transboundary and Emerging Diseases*, 66:1. <https://doi.org/10.1111/tbed.13046>.
 43. Ellis-Iversen, J., Ridley, A., Morris, V., Sowa, A., Harris, J., Atterbury, R., Sparks, N., e Allen, V. (2012). Persistent environmental reservoirs on farms as risk factors for *Campylobacter* in commercial poultry. *Epidemiology and Infection*, 140(5), 916–924. <https://doi.org/10.1017/S095026881100118X>.
 44. Epps, S. V. R., Harvey, R. B., Hume, M. E., Phillips, T. D., Anderson, R. C., e Nisbet, D. J. (2013). Foodborne *Campylobacter*: Infections, metabolism, pathogenesis and reservoirs. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(12),

6292–6304. <https://doi.org/10.3390/ijerph10126292>.

45. ECDC. European Centre for Disease Prevention and Control. Expert opinion on whole genome sequencing for public health surveillance. Stockholm: ECDC; 2016.
46. F. Sanger, S. Nicklen, A. A. R. C. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Obstetrics and Gynecology*, 75(4), 59S-76S. <https://doi.org/10.1097/00006250-199004001-00013>.
47. Fabre, A., Oleastro, M., Nunes, A., Santos, A., Sifré, E., Ducournau, A., Bénéjat, L., Buissonnière, A., Floch, P., Mégraud, F., Dubois, V., e Lehours, P. (2018). Whole-genome sequence analysis of multidrug-resistant campylobacter isolates: A focus on aminoglycoside resistance determinants. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(9). <https://doi.org/10.1128/JCM.00390-18>.
48. FDA. Food and Drug Administration. (2018). WGS and GenomeTrakr Q&A. 1–15.
49. Ferdinand, A. S., Kelaher, M., Lane, C. R., da Silva, A. G., Sherry, N. L., Ballard, S. A., Andersson, P., Hoang, T., Denholm, J. T., Easton, M., Howden, B. P., e Williamson, D. A. (2021). An implementation science approach to evaluating pathogen whole genome sequencing in public health. *Genome Medicine*, 13(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13073-021-00934-7>.
50. Fitzgerald, C. (2015). Campylobacter. *Clinics in Laboratory Medicine*, 35(2), 289–298. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2015.03.001>.
51. Florensa, A. F., Kaas, R. S., Clausen, P. T. L. C., Aytan-Aktug, D., e Aarestrup, F. M. (2022). ResFinder – an open online resource for identification of antimicrobial resistance genes in next-generation sequencing data and prediction of phenotypes from genotypes. *Microbial Genomics*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000748>.
52. Florez-Cuadrado, D., Ugarte-Ruiz, M., Meric, G., Quesada, A., Porrero, M. C., Pascoe, B., Sáez-Llorente, J. L., Orozco, G. L., Domínguez, L., e Sheppard, S. K. (2017). Genome comparison of erythromycin resistant campylobacter from Turkey identifies hosts and pathways for horizontal spread of erm(B) genes. *Frontiers in Microbiology*, 8(NOV), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02240>.
53. Franco, R. M. (1995). Diferentes métodos de isolamento de Campylobacter jejuni em alimentos. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, 2(3), 91–96.

<https://doi.org/10.4322/rbcv.2015.032>.

54. Ge, B., McDermott, P. F., White, D. G. e Meng, J. (2005). Role of efflux pumps and topoisomerase mutations in fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 49:3347-54. PMID:16048946. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.49.8.3347-3354.2005>.
55. G Nylen, F Dunstan, S R Palmer, Y Andersson, F Bager, J Cowden, G Feierl, Y Galloway, G Kapperud, F Megraud, K Molbak, L R Petersen, P. R. (2002). The seasonal distribution of campylobacter infection in nine European countries and New Zealand. 383–390.
56. Gharst, G., Oyarzabal, O. A., e Hussain, S. K. (2013). Review of current methodologies to isolate and identify *Campylobacter* spp. from foods. *Journal of Microbiological Methods*, 95(1), 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.07.014>.
57. Gibreel, A. D., Tracz, M., Nonaka, L., Ngo, T. M., Connell S. R. e Taylor, D. E. (2004). Incidence of antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* isolated in Alberta, Canada, from 1999 to 2002, with special reference to tet(O)-mediated tetracycline resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(9): 3442–3450. <http://doi:10.1128/AAC.48.9.3442-3450.2004>.
58. Gibreel, A., Kos, V. N., Keelan, M., Trieber, C. A., Levesque, S., Michaud, S., e Taylor, D. E. (2005). Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*: Molecular mechanism and stability of the resistance phenotype. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(7), 2753–2759. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.7.2753-2759.2005>.
59. Gibreel, A., e Taylor, D. E. (2006). Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58(2), 243–255. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl210>.
60. Gilmour, M. W., Graham, M., Van Domselaar, G., Tyler, S., Kent, H., Trout-Yakel, K. M., Larios, O., Allen, V., Lee, B., e Nadon, C. (2010). High-throughput genome sequencing of two *Listeria monocytogenes* clinical isolates during a large foodborne outbreak. *BMC Genomics*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-120>.
61. Grant, K., Jenkins, C., Arnold, C., Green, J., e Zambon, M. (2018). Implementing pathogen genomics. *Public Health England*, 31. <https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment>

_data/file/731057/implementing_pathogen_genomics_a_case_study.pdf.

62. Green, M. S., Schwartz, N., e Peer, V. (2020). Sex differences in campylobacteriosis incidence rates at different ages - A seven country, multi-year, meta-analysis. A potential mechanism for the infection. *BMC Infectious Diseases*, 20(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05351-6>.
63. Griggs, D. J., Peake, L., Johnson, M. M., Ghori, S., Mott, A., e Piddock, L. J. V. (2009). β -lactamase-mediated β -lactam resistance in Campylobacter species: Prevalence of Cj0299 (blaOXA-61) and evidence for a novel β -lactamase in *C. jejuni*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(8), 3357–3364. <https://doi.org/10.1128/AAC.01655-08>.
64. Guerrant, R. L., Van Gilder, T., Steiner, T. S., Thielman, N. M., Slutsker, L., Tauxe, R. V., et al. (2001). Infectious Diseases Society of America. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. *Clin Infect Dis*, 32:331-51. <http://dx.doi.org/10.1086/318514>.
65. Habib, I., Miller, W. G., Uyttendaele, M., Houf, K., e De Zutter, L. (2009). Clonal population structure and antimicrobial resistance of Campylobacter jejuni in chicken meat from Belgium. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(13), 4264–4272. <https://doi.org/10.1128/AEM.00168-09>.
66. Hakanen, A. J., Lehtopolku, M., Siitonen, A., Huovinen, P., e Kotilainen, P. (2003). Multidrug resistance in Campylobacter jejuni strains collected from Finnish patients during 1995-2000. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(6), 1035–1039. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg489>.
67. Hänninen, M. L., Haajanan, H., Pummi, T., Wermundsen, K., Katila, M. L., Sarkkinen, H., Miettinen, I., e Rautelin, H. (2003). Detection and typing of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli and analysis of indicator organisms in three waterborne outbreaks in Finland. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3), 1391–1396. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.3.1391-1396.2003>.
68. Hansson, I., Sandberg, M., Habib, I., Lowman, R., e Engvall, E. O. (2018). Knowledge gaps in control of Campylobacter for prevention of campylobacteriosis. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65:30–48. <https://doi.org/10.1111/tbed.12870>.
69. Health, L. P. (2019). National Campylobacter Reference Laboratory Service provided by

PHL, HSE, Dublin Summary Speciation. 1–8.

70. Hsieh, Y.-H. e Sulaiman, I. M. (2018). Campylobacteriosis: an emerging infectious foodborne disease. In: Holban, A. M. e Grumezescu, A. M. (Eds.), *Foodborne Dis*, 5:119–155.
71. Igwaran, A., e Okoh, A. I. (2019). Human campylobacteriosis: A public health concern of global importance. *Heliyon*, 5(11). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02814>.
72. Iovine, N. M. (2013). Resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni*. *Virulence*, 4(3), 230–240. <https://doi.org/10.4161/viru.23753>.
73. Jackson, B. R., Tarr, C., Strain, E., Jackson, K. A., Conrad, A., Carleton, H., Katz, L. S., Stroika, S., Gould, L. H., Mody, R. K., Silk, B. J., Beal, J., Chen, Y., Timme, R., Doyle, M., Fields, A., Wise, M., Tillman, G., Defibaugh-Chavez, S. e Gerner-Smidt, P. (2016). Implementation of Nationwide Real-time Whole-genome Sequencing to Enhance Listeriosis Outbreak Detection and Investigation. *Clinical Infectious Diseases*, 63(3), 380–386. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw242>.
74. Jehanne, Q., Bénéjat, L., Ducournau, A., Domingues-Martins, C., Cousinou, T., Bessède, E., e Lehours, P. (2021). Emergence of erythromycin resistance methyltransferases in *campylobacter coli* strains in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 65(11), 1–14. <https://doi.org/10.1128/AAC.01124-21>.
75. Joensen, K. G., Kiil, K., Gantzhorn, M. R., Nauerby, B., Engberg, J., Holt, H. M., Nielsen, H. L., Petersen, A. M., Kuhn, K. G., Sandø, G., Ethelberg, S., e Nielsen, E. M. (2020). Whole-genome sequencing to detect numerous *campylobacter jejuni* outbreaks and match patient isolates to sources, Denmark, 2015-2017. *Emerging Infectious Diseases*, 26(3), 523–532. <https://doi.org/10.3201/eid2603.190947>.
76. Jones, F. S., Orcutt, M., e Little, R. B. (1931). Vibrios (*vibrio jejuni*, N.Sp.) Associated with intestinal disorders of cows and calves. *Journal of Experimental Medicine*, 53(6), 853–863. <https://doi.org/10.1084/jem.53.6.853>.
77. Jurinke, C., Oeth, P. e Van Den Boom, D. (2004). MALDI-TOF mass spectrometry: A versatile tool for high-performance DNA analysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology*, 26(2): 147–163. <https://doi.org/10.1385/MB:26:2:147>.

78. Kaakoush, N. O., Castaño-Rodríguez, N., Mitchell, H. M., e Man, S. M. (2015). Global epidemiology of campylobacter infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 687–720. <https://doi.org/10.1128/CMR.00006-15>.
79. Keener, K. M., Bashor, M. P., Curtis, P. a, Sheldon, B. W., e Kathariou, S. (2004). Campylobacter and poultry processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3, 105–116.
80. Kovanen, S. M., Kivistö, R. I., Rossi, M., Schott, T., Kärkkäinen, U. M., Tuuminen, T., Uksila, J., Rautelin, H., e Hänninen, M. L. (2014). Multilocus sequence typing (MLST) and whole-genome MLST of campylobacter jejuni isolates from human infections in three districts during a seasonal peak in Finland. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(12), 4147–4154. <https://doi.org/10.1128/JCM.01959-14>.
81. Lachance, N., Gaudreau, C., Lamothe, F. e Turgeon, F. (1993). Susceptibilities of beta lactamase positive and negative strains of Campylobacter coli to beta-lactam agents. *Antimicrob Agents Chemother*, 37(5): 1174–1176. <http://doi:10.1128/aac.37.5.1174>.
82. Lake, I. R., Colón-González, F. J., Takkinen, J., Rossi, M., Sudre, B., Gomes Dias, J., Tavošchi, L., Joshi, A., Semenza, J. C., e Nichols, G. (2019). Exploring campylobacter seasonality across europe using the european surveillance system (TESSy), 2008 to 2016. *Eurosurveillance*, 24(13), 1–12. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.13.180028>.
83. Lastovica, A. J., Le Roux, E., Engberg, J., Gerner-Smidt, P., On, S. L. W., e Harrington, C. S. (2000). Efficient isolation of campylobacteria from Stools [4] (multiple letters). *Journal of Clinical Microbiology*, 38(7), 2798–2799.
84. Leclercq, R. (2002). Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: Nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clinical Infectious Diseases*, 34(4), 482–492. <https://doi.org/10.1086/324626>.
85. Lévesque, S., Frost, E., Arbeit, R. D., e Michaud, S. (2008). Multilocus sequence typing of Campylobacter jejuni isolates from humans, chickens, raw milk, and environmental water in Quebec, Canada. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(10), 3404–3411. <https://doi.org/10.1128/JCM.00042-08>.

86. Lin, J., Yan, M., Sahin, O., Pereira, S., Chang, Y. J. e Zhang, Q. (2007). Effect of macrolide usage on emergence of erythromycin- resistant *Campylobacter* isolates in chickens. *Antimicrob Agents Chemother*, 51:1678- 86. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01411-06>.
87. Line, J. E. (2002). *Campylobacter* and *Salmonella* populations associated with chickens raised on acidified litter. *Poultry Science*, 81(10), 1473–1477. <https://doi.org/10.1093/ps/81.10.1473>.
88. Liu, F., Lee, S. A., Xue, J., Riordan, S. M., e Zhang, L. (2022). Global epidemiology of campylobacteriosis and the impact of COVID-19. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.979055>.
89. Liu, F., Ma, R., Wang, Y., e Zhang, L. (2018). The clinical importance of campylobacter concisus and other human hosted *Campylobacter* species. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00243>.
90. Llarena, A. K., Taboada, E., e Rossi, M. (2017). Whole-genome sequencing in epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(5), 1269–1275. <https://doi.org/10.1128/JCM.00017-17>.
91. Llarena, A. K., Zhang, J., Vehkala, M., Välimäki, N., Hakkinen, M., Hänninen, M. L., Roasto, M., Mäesaar, M., Taboada, E., Barker, D., Garofolo, G., Cammà, C., Di Giannatale, E., Corander, J., e Rossi, M. (2016). Monomorphic genotypes within a generalist lineage of *Campylobacter jejuni* show signs of global dispersion. *Microbial Genomics*, 2(10), e000088. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000088>.
92. Luo, N., Sahin, O., Lin, J., Michel, L. O. e Zhang, Q. (2003). In vivo selection of *Campylobacter* isolates with high levels of fluoroquinolone resistance associated with *gyrA* mutations and the function of the CmeABC efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother*, 47:390-4. PMID:12499221. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.47.1.390-394.2003>.
93. MacCannell, D. (2013). Bacterial strain typing. *Clinics in Laboratory Medicine*, 33(3), 629–650. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2013.03.005>.

- 94.** Manavathu, E. K., Hiratsuka, K. e Taylor, D. E. (1988). Nucleotide sequence analysis and expression of a tetracycline-resistance gene from *Campylobacter jejuni*. *Gene*, 62:17–26. [http://doi:10.1016/0378-1119\(88\)90576-8](http://doi:10.1016/0378-1119(88)90576-8).
- 95.** Mattheus, W., Botteldoorn, N., Heylen, K., Pochet, B. e Dierick K. (2012). Trend analysis of antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from belgian pork and poultry meat products using surveillance data of 2004–2009. *Foodborne Pathog Dis*, 9:465–472. <https://doi:10.1089/fpd.2011.1042>.
- 96.** Mickan, L., Doyle, R., Valcanis, M., Dingle, K. E., Unicomb, L., Lanser, J., Adamson, P., Cheung, K., Combs, B., Dalton, C., Djordjevic, S., Doyle, R., Ferguson, J., Gilbert, L., Givney, R., Gordon, D., Gregory, J., Hogg, G., Inglis, T., e Valcanis, M. (2007). Multilocus sequence typing of *Campylobacter jejuni* isolates from New South Wales, Australia. *Journal of Applied Microbiology*, 102(1), 144–152. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03049.x>.
- 97.** Nachamkin, I., Ung, H. e Li. M. (2002). Increasing fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni*, Pennsylvania, USA, 1982-2001. *Emerg Infect Dis*, 8(12): 1501-3.
- 98.** Naghavi, M., Abajobir, A. A., Abbafati, C., Abbas, K. M., Abd-Allah, F., Abera, S. F. et al. (2017). Global, Regional, and National Age-Sex Specific Mortality for 264 Causes of Death, 1980-2016: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*, 390(10100): 1151–210. [http://doi:10.1016/S0140-6736\(17\)32152-9](http://doi:10.1016/S0140-6736(17)32152-9).
- 99.** Nileshkumar, V., Hati, S., Gawai, K., e Sreeja, V. (2015). Food Borne Pathogens : A Threat to Dairy Industry. Research & Reviews: *Journal of Dairy Science and Technology*, 4(1), 28–36. <http://sciencejournals.stmjournals.in/index.php/RRJoDST/article/view/410>.
- 100.** Nunes, A., Oleastro, M., Alves, F., Liassine, N., Lowe, D. M., Benejat, L., Ducounau, A., Jehanne, Q., Borges, V., Gomes, J. P., Godbole, G., e Lehours, P. (2023). Recurrent *Campylobacter jejuni* Infections with In Vivo Selection of Resistance to Macrolides and Carbapenems: Molecular Characterization of Resistance Determinants. *Microbiology Spectrum*, 11(6), 1–10. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03121-23>.
- 101.** Nguyen, T. N., Hotzel, H., Njeru, J., Mwituria, J., El-Adawy, H., Tomaso, H., et al. (2016). Antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolates from small scale and backyard chicken in Kenya. *Gut Pathog*, 8:39. <https://doi:10.1186/s13099-016-0121-5>.

- 102.** OIE. World Organisation for Animal Health (2008). *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. In OIE Terrestrial Manual. Paris: OIE.
- 103.** Pal, M. (2017). *Campylobacter jejuni*: An Emerging Foodborne Pathogen of Global Significance. *Journal of Experimental Food Chemistry*, 03(03), 2–5. <https://doi.org/10.4172/2472-0542.1000130>.
- 104.** Payot, S., Bolla, J. M., Corcoran, D., Fanning, S., Mégraud, F., e Zhang, Q. (2006). Mechanisms of fluoroquinolone and macrolide resistance in *Campylobacter* spp. *Microbes and Infection*, 8(7), 1967–1971. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.12.032>.
- 105.** Pearson, B. M., Louwen, R., Van Baarlen, P., e Van Vliet, A. H. M. (2015). Differential distribution of type II CRISPR-Cas systems in agricultural and nonagricultural *campylobacter coli* and *campylobacter jejuni* isolates correlates with lack of shared environments. *Genome Biology and Evolution*, 7(9), 2663–2679. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv174>.
- 106.** Pechère, J. C. (2001). Macrolide resistance mechanisms in Gram-positive cocci. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 18, 25–28. [https://doi.org/10.1016/s0924-8579\(01\)00407-1](https://doi.org/10.1016/s0924-8579(01)00407-1).
- 107.** Qin, D. (2019). Next-generation sequencing and its clinical application. *Cancer Biology and Medicine*, 16(1), 4–10. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2018.0055>.
- 108.** Ramonaite, S., Tamuleviciene, E., Alter, T., Kasnauskyste, N., e Malakauskas, M. (2017). MLST genotypes of *Campylobacter jejuni* isolated from broiler products, dairy cattle and human campylobacteriosis cases in Lithuania. *BMC Infectious Diseases*, 17(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2535-1>.
- 109.** Ramirez, M. S. e Tolmasky, M. E. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat*, 13:151–171. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drug.2010.08.003>.
- 110.** Reddy, S. e, Zishiri, O. T. (2017). Detection and prevalence of antimicrobial resistance genes in *Campylobacter* spp. isolated from chickens and humans. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 84(1): 1–6.
- 111.** Richardson, G., Thomas, D. R., Smith, R. M. M., Nehaul, L., Ribeiro, C. D., Brown, A. G., e Salmon, R. L. (2007). A community outbreak of *Campylobacter jejuni* infection from a chlorinated public water supply. *Epidemiology and Infection*, 135(7), 1151–1158.

<https://doi.org/10.1017/S0950268807007960>.

112. Rosner, B. M., Gassowski, M., Albrecht, S., e Stark, K. (2021). Investigating the Campylobacter enteritis winter peak in Germany, 2018/2019. *Scientific Reports*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02423-8>.
113. Rychert, J. (2019). Benefits and Limitations of MALDI-TOF Mass Spectrometry for the Identification of Microorganisms. *Journal of Infection*, 2(4), 1–5. <https://doi.org/10.29245/2689-9981/2019/4.1142>.
114. Sá, L., Pinheiro, T., Silva, J., Pedrosa, A., Soares, L., e Rocha, C. (2022). Acute Campylobacter spp . gastroenteritis in the Pediatric. *Nascer e Crescer - Birth and Growth Medical Journal*, 31(1), 9–15. <https://doi.org/10.25753/BirthGrowthMJ.v31.i1.20981>.
115. Sabat, A. J., Budimir, A., Nashev, D., Sá-Leão, R., van Dijk, J. M., Laurent, F., Grundmann, H., e Friedrich, A. W. (2013). Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Eurosurveillance*, 18(4), 1–15. <https://doi.org/10.2807/ese.18.04.20380-en>.
116. Sails, A. D., Swaminathan, B., & Fields, P. I. (2003). Clonal complexes of Campylobacter jejuni identified by multilocus sequence typing correlate with strain associations identified by multilocus enzyme electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(9), 4058–4067. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4058-4067.2003>.
117. Schreyer, M. E., Olivero, C. R., Rossler, E., Soto, L. P., Frizzo, L. S., Zimmermann, J. A., Signorini, M. L., e Virginia, Z. M. (2022). Prevalence and antimicrobial resistance of Campylobacter jejuni and C. coli identified in a slaughterhouse in Argentina. *Current Research in Food Science*, 5(March), 590–597. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.03.005>.
118. Seguíno, A., Chintoan-Uta, C., Smith, S. H. e Shaw, D. J. (2018). Public health significance of Campylobacter spp. colonisation of wild game pheasants (*Phasianus colchicus*) in Scotland. *Food Microbiol.*, 74:163–0170.
119. Sierra-arguello, Y. M., Morgan, R. B., Perdoncini, G., Leonardo, M., Gomes, M. J. P., Pinheiro, V., M, A. S. Y., Morgan, R. B., Perdoncini, G., Lima, L. M., e Gomes, M. J. P. (2015). Resistance to β -lactam and tetracycline in Campylobacter spp. isolated from broiler slaughterhouses in southern Brazil. 35(7), 637–642.

<https://doi.org/110.1590/S0100-736X2015000700006>.

- 120.** Sithole, V., Amoako, D. G., Abia, A. L. K., Perrett, K., Bester, L. A., e Essack, S. Y. (2021). Occurrence, antimicrobial resistance, and molecular characterization of *Campylobacter* spp. In intensive pig production in South Africa. *Pathogens*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/pathogens10040439>.
- 121.** Shaw, K. J., Rather, P. N., Hare, R. S. e Miller, G. H. (1993). Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol. Rev.*, 57: 138-163. <http://doi:10.1128/mr.57.1.138-163.1993>.
- 122.** Skirrow, M. B. (1977). *Campylobacter* enteritis: a 'new' disease. *BMJ*, 2: 9–11.
- 123.** Skirrow, M. B. (2006). John McFadyean and the centenary of the first isolation of *Campylobacter* species. *Clinical Infectious Diseases*, 43(9), 1213–1217. <https://doi.org/10.1086/508201>.
- 124.** Smith, T., e Taylor, M. S. (1919). Some morphological and biological characters of *Spirilla* (*Vibrio foetus* n.sp.) associated with disease of fetal membranes in cattle. *J Exp Med*, 30:99–311.
- 125.** Sproston, E. L., Wimalarathna, H. M. L. e Sheppard, S. K. (2018). Trends in fluoroquinolone resistance in *Campylobacter*. *Microb Genom*, 4(8): e000198. <https://doi:10.1099/mgen.0.000198>.
- 126.** Stone, D., Davis, M., Baker, K., Besser, T., Roopnarine, R., e Sharma, R. (2013). MLST genotypes and antibiotic resistance of *Campylobacter* spp. isolated from poultry in Grenada. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/794643>.
- 127.** Strachan, N. J. C., Watson, R. O., Novik, V., Hofreuter, D., Ogden, I. D., e Galán, J. E. (2008). Sexual dimorphism in campylobacteriosis. *Epidemiology and Infection*, 136(11), 1492–1495. <https://doi.org/10.1017/S0950268807009934>.
- 128.** Struelens, M.J. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clinical Microbiology and Infection*, v.2, p.2-11, 1996.
- 129.** Tang, Y., Fang, L., Xu, C. e Zhang, Q. (2017). Antibiotic resistance trends and mechanisms in the foodborne pathogen, *Campylobacter*. *Animal health research reviews*, 18(2): 87-98. <http://doi:10.1017/S1466252317000135>.

- 130.** Tedersoo, T., Roasto, M., Mäesaar, M., Kisand, V., Ivanova, M., e Meremäe, K. (2022). The prevalence, counts, and MLST genotypes of *Campylobacter* in poultry meat and genomic comparison with clinical isolates. *Poultry Science*, 101(4), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101703>.
- 131.** Thakur, S., White, D. G., McDermott, P. F., Zhao, S., Kroft, B., Gebreyes, W., Abbott, J., Cullen, P., English, L., Carter, P., e Harbottle, H. (2009). Genotyping of *Campylobacter coli* isolated from humans and retail meats using multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Applied Microbiology*, 106(5), 1722–1733. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04142.x>.
- 132.** The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters (2021).
- 133.** Tracz, D. M., Keelan, M., Ahmed-Bentley, J., Gibreel, A., Kowalewska-Grochowska, K., e Taylor, D. E. (2005). pVir and bloody diarrhea in *Campylobacter jejuni* enteritis. *Emerging Infectious Diseases*, 11(6), 838–843. <https://doi.org/10.3201/eid1106.041052>.
- 134.** Turcotte, M. R., Smith, J. T., Li, J., Zhang, X., Wolfe, K. L., Gao, F., Benton, C. S., e Andam, C. P. (2022). Genome characteristics of clinical *Salmonella enterica* population from a state public health laboratory, New Hampshire, USA, 2017–2020. *BMC Genomics*, 23(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08769-1>.
- 135.** Unicomb, L. E., Ferguson, J., Stafford, R. J., Ashbolt, R., Kirk, M. D., Becker, N. G., Patel, M. S., Gilbert, G. L., Valcanis, M., & Mickan, L. (2006). Low-level fluoroquinolone resistance among *Campylobacter jejuni* isolates in Australia. *Clinical Infectious Diseases*, 42(10), 1368–1374. <https://doi.org/10.1086/503426>.
- 136.** Van Vliet, A. H., e Ketley, J. M. (2001). Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. *Symposium Series (Society for Applied Microbiology)*, 30, 45–56.
- 137.** Van Belkum, A., et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection*, v.13, p.1-46. 2007.
- 138.** Vacher, S., Menard, A., Bernard, E. e Megraud, F. (2005). Detection of mutations associated with macrolide resistance in thermophilic *Campylobacter* spp. by real-time PCR. *Microb Drug Resist*, 11: 40–47.

139. Wang, G., Clark, C. G., Taylor, T. M., Pucknell, C., Barton, C., Price, L., Woodward, D. L. e Rodgers, F. G. (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: 4744-4747.
140. Wang, Y., Zhang, M., Deng, F., Shen, Z., Wu, C., Zhang, J., Zhang, Q., e Shen, J. (2014). Emergence of multidrug-resistant *Campylobacter* species isolates with a horizontally acquired rRNA methylase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(9), 5405–5412. <https://doi.org/10.1128/AAC.03039-14>.
141. Wassenaar T. M. (2000). Molecular methods for detection, speciation and subtyping of *Campylobacter* spp. *Lohmann Information*, 24: 13-19.
142. Westermarck, E. (2016). Chronic Diarrhea in Dogs: What Do We Actually Know About It? *Topics in Companion Animal Medicine*, 31(2), 78–84. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2016.03.001>.
143. Wieczorek, K., e Osek, J. (2013). Antimicrobial resistance mechanisms among campylobacter. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/340605>.
144. Wieczorek, K. e Osek, J. (2015). A five-year study on prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* from poultry carcasses in Poland. *Food Microbiol.* 49:161–5. <https://doi:10.1016/j.fm.2015.02.006>.
145. Whitehouse, C. A., Zhao, S. e Tate, H. (2018). Antimicrobial Resistance in *Campylobacter* Species: Mechanisms and Genomic Epidemiology. *Advances in Applied Microbiology*, 1-47.
146. World Health Organization. (2022). Priorities on Antimicrobial Resistance. Priorities on Antimicrobial Resistance.
147. Zeitouni, S., Collin, O., Andraud, M., Ermel, G., e Kempf, I. (2012). Fitness of macrolide resistant campylobacter coli and *Campylobacter jejuni*. *Microbial Drug Resistance*, 18(2), 101–108. <https://doi.org/10.1089/mdr.2011.0188>.
148. Zeng, X., Brown, S., Gillespie, B., e Lin, J. (2014). A single nucleotide in the promoter region modulates the expression of the β -lactamase OXA-61 in campylobacter jejuni. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(5), 1215–1223.

<https://doi.org/10.1093/jac/dkt515>.

- 149.** Zhang, X., Zhou, Q., Tang, M., Pu, J., Zhang, J., Lu, J., Zhang, Y., e Gao, Y. (2021). Aminoglycoside Resistance and Possible Mechanisms in *Campylobacter* Spp. Isolated From Chicken and Swine in Jiangsu, China. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.716185>.
- 150.** Zhangqi, S., Yang, W., Qijing, Z. e Shen, J. (2018). Antimicrobial Resistance in *Campylobacter*. *Emerging Infectious Diseases*, 11(6), 984–984. <https://doi.org/10.3201/eid1106.050266>.