

**Avaliação de águas superficiais como
reservatório de *Campylobacter* e *Arcobacter*
*sensu lato***

Versão final após defesa

Igor Miguel Antunes Venâncio

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotechnologia
(2º ciclo de estudos ou mestrado integrado)

Orientador: Prof. Doutora Susana Margarida Paraíso Ferreira
Co-orientador: Prof. Doutora Mónica Alexandra de Sousa Oleastro

fevereiro de 2021

Dedicatória

À minha avó, Maria.

Agradecimentos

Após este último ano repleto de desafios, chegou agora altura de agradecer a quem permitiu e me ajudou a terminá-lo de cabeça erguida e com um enorme sentimento de satisfação e orgulho.

Começo por agradecer à Doutora Susana Ferreira, que para além de chave fundamental no desenvolvimento deste trabalho, se mostrou muito mais que apenas minha orientadora. Pela partilha de conhecimento, grande apoio, imensa paciência e constante preocupação e incentivo, aspetos que não só possibilitaram a conclusão deste trabalho, mas também me irão certamente ajudar ao longo do meu percurso. Não existem palavras que permitam demonstrar a minha profunda gratidão, por todo o esforço e dedicação que demonstrou ao longo deste último ano. Não podia ter escolhido melhor pessoa para fazer parte desta importante etapa da minha vida, estando-lhe eternamente grato.

Agradecer também à Professora Doutora Mónica Oleastro, pela sua partilha de experiência, conselhos e disponibilidade que me foi prestada.

Aos meus companheiros de laboratório, à Carolina, à Ana, ao Rodrigo, à Alexandra e à Cristiana, por toda a ajuda, preocupação, conhecimento e mais importante companheirismo e amizade prestada durante todo este ano, revelando-se elementos muito importantes não só a nível profissional, mas pessoal, considerando-vos como a minha família do CICS.

Também aos meus verdadeiros amigos, a todos os que me permitiram e ajudaram a superar as tantas dificuldades ocorridas ao longo destes últimos anos, por sempre acreditarem em mim, mesmo quando eu próprio não acreditava, nunca me deixarem baixar os braços e sempre me fazerem seguir em frente.

Aos meus pais, avó e irmã, que mesmo sem perceber o que eu faço, sei que têm orgulho em mim. Sem vocês, nada disto seria possível e nunca conseguirei expressar a minha gratidão e o enorme orgulho na família que tenho.

Por fim, agradeço ao Centro de Investigação em Ciências da Saúde, ao Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge e à Universidade da Beira Interior por possibilitarem a realização deste trabalho de investigação.

Chega assim ao final esta minha etapa, com a esperança de poder ter contribuído da melhor forma possível.

O meu muito OBRIGADO!

Resumo

As bactérias do género *Campylobacter* e do grupo *Arcobacter sensu lato* são bacilos de Gram-negativo, pertencentes à família *Campylobacteraceae*. Até ao momento, 35 espécies foram reconhecidas no género *Campylobacter*, e 31 no grupo *Arcobacter sensu lato*, sendo que entre elas, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Aliarcobacter butzleri*, *Aliarcobacter cryaerophilus* e *Aliarcobacter skirrowii*, são as principais espécies associadas a infeções em humanos e animais. Embora exijam um hospedeiro, as bactérias do género *Campylobacter* são comumente isoladas de amostras de águas naturais, como nascentes, rios e lagos. De igual forma, mais de metade das espécies de *Arcobacter sensu lato* foram isoladas a partir de ambientes aquáticos. Esta situação revela-se como uma importante ameaça à saúde pública devido ao contacto direto do Homem com este tipo de águas. Esta preocupação é acrescida pela associação de surtos de doenças com o consumo de água contaminada com estas bactérias, sendo esta uma importante via de transmissão. Assim, o objetivo deste estudo focou-se na avaliação da distribuição de *Campylobacter* spp. e *Arcobacter sensu lato* em diferentes amostras de água, nomeadamente água de rio, água de afluentes e água de nascente não tratada, recolhidas no concelho da Covilhã, e avaliação da sua resistência a 7 antibióticos, normalmente utilizados no tratamento de infeções por estes microrganismos. Pela análise dos resultados, das 150 amostras analisadas por duas metodologias de deteção distintas, PCR e cultura, 56 (37,3 %) foram positivas para *Campylobacter* spp. quando utilizada deteção direta por PCR no meio de enriquecimento, e por isolamento 22 (14,6 %) revelaram a presença deste género; no total 60 amostras foram positivas por ambos os métodos. Em 8 de 22 amostras (36,4%) foi identificado *C. jejuni*, em 7 (31,4 %) *C. coli*, em 4 (18,2 %) *C. lari*, e 1 (4,5 %) foi positiva para *C. upsaliensis*, sendo que para duas amostras não foi possível obter uma identificação a nível de espécie. Em relação a *Arcobacter sensu lato*, também alguma variabilidade foi encontrada aquando da utilização destas duas metodologias, onde 72 de 150 amostras (48 %) foram positivas para o género quando utilizada deteção direta por PCR no meio de enriquecimento, e através de cultura foi possível o isolamento de bactérias deste grupo em 89 (59,3%) amostras; no total 99 amostras foram positivas considerando ambos os métodos. Em 74 das 89 amostras (83,1%) foram identificadas como positivas para *A. butzleri*, 20 (22,5%) para *A. cryaerophilus* e 28 amostras encontravam-se contaminadas por outras espécies de *Arcobacter*. Pela avaliação da diversidade genética, pela técnica de reação em cadeia da polimerase por consenso intergénico repetitivo enterobacteriano (ERIC-PCR - do inglês *enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR*), foi observada uma grande heterogeneidade genética entre os isolados de ambos os grupos bacterianos, registando-se 37 perfis genéticos diferentes entre os isolados provenientes das 22 amostras positivas para *Campylobacter* spp., e da mesma forma foram observados 255 perfis únicos de um total de 291 isolados de *Arcobacter sensu lato*. Quando avaliado o perfil de suscetibilidade a antibióticos, foram observadas diferenças nos perfis de resistência entre ambos os grupos bacterianos. Desta forma, para além de resistências pontuais, observou-se uma baixa multirresistência para o género *Campylobacter*, em apenas 2 dos 25

isolados avaliados, tendo-se obtido valores superiores para *Arcobacter sensu lato*, onde de um total de 238 isolados, 194 mostraram perfil de multirresistência, tendo-se verificado casos em que a resistência foi transversal a seis dos sete antibióticos testados. Assim, os resultados deste estudo demonstram uma elevada prevalência de *Campylobacter* spp e *Arcobacter sensu lato*, agravada pela alta resistência a antibióticos encontrada, em amostras de água superficial de acesso ao homem, apresentando não só alto risco para a população e animais da região, mas também para uma possível contaminação de alimentos.

Palavras-chave

Campylobacter spp.; *Arcobacter sensu lato*; Água ambiental; Água de consumo; Diversidade genética; Resistência a antimicrobianos.

Abstract

The bacteria of the genera *Campylobacter* and *Arcobacter sensu lato* group are Gram-negative bacilli, belonging to the *Campylobacteraceae* family. Until now, 35 species have been recognized for the genus *Campylobacter*, and 31 species for *Arcobacter sensu lato*. Amongst the species of both groups, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Aliarcobacter butzleri*, *Aliarcobacter cryaerophilus* and *Aliarcobacter skirrowii* are the most frequently associated with infections in humans and animals. Although requiring a host, bacteria of the genus *Campylobacter* are commonly isolated from samples of natural waters, such as spring waters, rivers and lakes. Likewise, more than half of the *Arcobacter sensu lato* species have been isolated from aquatic environments. In fact, water is considered a relevant contamination source and an important threat to public health due to their consumption and direct contact with humans. This concern is increased by the association of outbreaks with the consumption of water contaminated with these bacteria, pointing to their consumption as an important route of transmission. Thus, this study focused on assessing the distribution of *Campylobacter* spp. and *Arcobacter sensu lato* in different water samples, such as river water, water from affluents and untreated spring water, collected in the municipality of Covilhã, and evaluation of their resistance to seven antibiotics commonly used in the treatment of infections by these microorganisms. Through the analysis of the results, of the 150 samples evaluated by two distinct detection methodologies, PCR and culture, 56 (37.3 %) samples were positive for *Campylobacter* spp. when using direct detection on the enrichment broth, and 22 (14.6%) were positive by culture; in total, 60 samples were positive by both methods. The distribution by species was as follows: eight of 22 samples (36.4%) were positive for *C. jejuni*, seven (31.4 %) for *C. coli*, four (18.2 %) for *C. lari*, one sample (4.5 %) was positive for *C. upsaliensis*, and for two of the samples it was not possible to obtain an identification at the species level. Regarding *Arcobacter sensu lato*, some variability was also found when using these two methodologies, where 72 out of 150 samples (48%) were positive for the genus when using direct PCR detection in the enrichment medium. Through culture it was possible the isolation of bacteria from this group from 89 (59.3%) samples; and in total 99 samples were positive by both methods. Concerning *Arcobacter sensu lato*, the distribution of the species was as follows: 74 of the 89 samples (83.1%) were positive for *A. butzleri*, 20 (22.5%) for *A. cryaerophilus* and 28 samples were contaminated with other species of *Arcobacter*. Through the evaluation of the genetic diversity by *enterobacterial intergenic consensus-PCR polymerase chain reaction* technique (ERIC-PCR), a large genetic heterogeneity was observed among isolates of both genera. Among isolates from 22 *Campylobacter* spp. positive samples by culture, 37 different genetic profiles were found. Similarly, 255 unique profiles of a total of 291 *Arcobacter sensu lato* isolates were observed. When the antibiotic susceptibility profile was evaluated, divergences between the resistance of both groups were noted. Thus, in addition to pontual resistances, a low multidrug resistance was observed for the genus *Campylobacter*, only two among the 25 isolates studied. Higher values were obtained for *Arcobacter sensu lato*, where from a total of 238 isolates, 194 showed a multidrug resistance profile, of which some presented transversal resistance to six of

the seven antibiotics tested. In sum, the results of this study demonstrate a high prevalence of both bacterial groups in water samples accessible to humans, worsen by the high resistance found in those samples, presenting not only high risk for the population and animals of the region, but also for possible food contamination.

Keywords

Campylobacter; *Arcobacter sensu lato*; Environmental water; Drinking water; Genetic diversity; Antimicrobial resistance.

Índice

Capítulo 1: Introdução.....	1
1.1 Taxonomia do género <i>Campylobacter</i>	2
1.2 Evolução da taxonomia do género <i>Arcobacter</i>	4
1.3 Características de <i>Campylobacter</i> e <i>Arcobacter sensu lato</i>	7
1.3.1 Género <i>Campylobacter</i>	8
1.3.2 Grupo <i>Arcobacter sensu lato</i>	9
1.4 Patogenicidade associada a <i>Campylobacter</i> spp. e <i>Arcobacter sensu lato</i>	10
1.4.1 Género <i>Campylobacter</i>	10
1.4.2 Grupo <i>Arcobacter sensu lato</i>	11
1.5 Ocorrência de <i>Campylobacter</i> spp. e <i>Arcobacter sensu lato</i>	12
1.5.1 Prevalência de espécies pertencentes a <i>Campylobacter</i> spp. e <i>Arcobacter sensu lato</i> em água.....	12
1.5.2 Prevalência de espécies pertencentes a <i>Campylobacter</i> spp. e <i>Arcobacter sensu lato</i> em animais para abate	15
1.5.3 Prevalência de espécies pertencentes a <i>Campylobacter</i> spp. e <i>Arcobacter sensu lato</i> em alimentos	18
1.5.4 Prevalência de espécies pertencentes a <i>Campylobacter</i> spp. e <i>Arcobacter sensu lato</i> em animais de estimação e selvagens	20
1.6 Vias de transmissão do género <i>Campylobacter</i> spp. e <i>Arcobacter sensu lato</i>	21
1.6.1 Consumo de água contaminada.....	22
1.6.2 Consumo de alimentos contaminados	25
1.6.3 Contacto com animais domésticos e selvagens.....	26
1.7. Resistência a antibióticos por <i>Campylobacter</i> e <i>Arcobacter sensu lato</i>	27
1.8 Metodologias usadas para isolamento, identificação, genotipagem e avaliação de perfil fenotípico de resistência de <i>Campylobacter</i> e <i>Arcobacter sensu lato</i>	29
1.8.1 Isolamento de <i>Campylobacter</i> e <i>Arcobacter sensu lato</i>	29
1.8.2 Identificação de <i>Campylobacter</i> spp. e <i>Arcobacter sensu lato</i>	32
1.8.3 Genotipagem de <i>Campylobacter</i> spp. e <i>Arcobacter sensu lato</i>	34
1.8.4 Avaliação do perfil de resistência a antimicrobianos	36

Capítulo 2: Objetivos	39
Capítulo 3: Materiais e Métodos.....	41
3.1 Estirpes de referência.....	41
3.2 Armazenamento das estirpes.....	41
3.3 Recolha das amostras de água.....	41
3.4. Isolamento de <i>Campylobacter</i> spp e <i>Arcobacter sensu lato</i>	42
3.4.1. Enriquecimento das amostras	42
3.4.2 Isolamento de <i>Campylobacter</i> spp. e <i>Arcobacter sensu lato</i> a partir das amostras enriquecidas	43
3.5 Identificação presuntiva dos isolados	45
3.6 Identificação molecular dos isolados	45
3.6.1 Identificação molecular de <i>Campylobacter</i> spp.....	45
3.6.2 Identificação molecular de <i>Arcobacter sensu lato</i>	46
3.7 Genotipagem dos isolados pertencentes ao género <i>Campylobacter</i> e grupo <i>Arcobacter sensu lato</i>	47
3.8 Perfil de resistência a antibióticos.....	48
Capítulo 4: Resultados e Discussão	49
4.1 Isolamento e identificação molecular	51
4.1.1 Variação sazonal de <i>Campylobacter</i> spp. e <i>Arcobacter sensu lato</i>	54
4.1.2 <i>Campylobacter</i> spp.....	57
4.1.3 <i>Arcobacter sensu lato</i>	59
4.2 Genotipagem e diversidade genética.....	60
4.3 Resistência a antibióticos	62
4.3.1 <i>Campylobacter</i> spp.....	63
4.3.2 <i>Arcobacter sensu lato</i>	66
Capítulo 5: Conclusão	73
Capítulo 6: Perspetivas futuras.....	75
Referências Bibliográficas	77
Anexo I	105
Anexo II.....	106
Anexo III	112

Lista de Figuras

Figura 1: Principais fontes de contaminação microbiana da água.....	1
Figura 2: Árvore filogenética do género <i>Campylobacter</i> , tendo por base a similaridade da sequência do gene <i>16S rRNA</i>	4
Figura 3: Rede de decomposição dividida de 29 espécies do género <i>Arcobacter</i> , tendo por base a similaridade das sequências de 61 genes core	7
Figura 4: Rotas de transmissão associadas a agentes patogénicos emergentes..	22
Figura 5: Diagrama esquemático dos quatro métodos de teste de suscetibilidade a antimicrobianos: difusão em disco, Etest, diluição em agar e microdiluição em caldo.	38
Figura 6: Local de recolhas das amostras no concelho da Covilhã.	42
Figura 7: Protocolo de isolamento para <i>Arcobacter sensu lato</i> e <i>Campylobacter</i> spp..	44
Figura 8: Distribuição de amostras positivas com base na identificação de isolados pertencentes a <i>Campylobacter</i> spp. e <i>Arcobacter sensu lato</i> presentes em cada local de amostragem ao longo de todo o tempo de amostragem.....	54
Figura 9: Distribuição de amostras positivas com base na identificação de isolados pertencentes a <i>Campylobacter</i> spp. e <i>Arcobacter sensu lato</i> nas amostras de água durante cada mês de amostragem.	56
Figura 10: Padrões dos perfis genéticos dos isolados após genotipagem por ERIC-PCR. A) <i>Campylobacter</i> spp.. M representa o marcador de pesos moleculares. As chavetas 1, 2, 3, 4, 5 e 6 correspondem a seis amostras diferentes. B) <i>Arcobacter sensu lato</i> . M representa o marcador de pesos moleculares. As chavetas 1, 2, 3 e 4 correspondem a quatro amostras de diferentes origens.	60
Figura 11: Resistência a cada antibiótico testado por espécie de <i>Campylobacter</i> spp. GEN – Gentamicina; CIP – Ciprofloxacina; ERY – Eritromicina; TET – Tetraciclina; ERT - Ertapenemo AMC – Amoxicilina+ácido clavulânico; AMP – Ampicilina	65
Figura 12: Proporção de isolados totalmente suscetíveis, resistentes a um ou dois dos antibióticos testados.e multirresistentes por espécie de <i>Campylobacter</i>	66
Figura 13: Resistência a cada antibiótico testado por espécie de <i>Arcobacter sensu lato</i> . GEN – Gentamicina; CIP – Ciprofloxacina; ERY – Eritromicina; TET – Tetraciclina; ERT - Ertapenemo AMC – Amoxicilina+ácido clavulânico; AMP – Ampicilina	69
Figura 14: Proporção de isolados totalmente suscetíveis, resistentes a um ou dois dos antibióticos testados e multirresistentes por espécie de <i>Arcobacter sensu lato</i>	70

Lista de Tabelas

Tabela 1: Espécies de <i>Campylobacter</i> , por ano de publicação do seu reconhecimento e por local de origem de isolamento.	2
Tabela 2: Espécies de <i>Arcobacter</i> spp. por ano de publicação do primeiro isolamento e por local de origem de isolamento..	5
Tabela 3: Prevalência de espécies de <i>Campylobacter</i> spp. e <i>Arcobacter sensu lato</i> em amostras fecais de aves de capoeira.....	16
Tabela 4: Prevalência do gênero <i>Campylobacter</i> spp. e grupo <i>Arcobacter sensu lato</i> presentes no trato gastrointestinal de gado suíno, bovino, ovino e caprino.	17
Tabela 5: Lista de surtos publicados sobre de <i>Campylobacter</i> spp. transmitido pela água até ao ano de 2020.....	23
Tabela 6: Sequências dos oligonucleótidos iniciadores utilizados.....	47
Tabela 7: Prevalência de <i>Campylobacter</i> e <i>Arcobacter sensu lato</i> nas amostras de águas recolhidas recorrendo a detecção molecular aplicada aos meios de enriquecimento, e usando cultura em paralelo seguida de identificação molecular dos isolados.	52
Tabela 8: Distribuição dos isolados de <i>Campylobacter</i> spp. por espécies nas diferentes amostras e água coletadas.....	58
Tabela 9: Distribuição dos isolados de <i>Arcobacter sensu lato</i> nas diferentes amostras de água coletadas.	59
Tabela 10: Diversidade genética entre os isolados de <i>Campylobacter</i> spp. nas diferentes amostras de água.....	61
Tabela 11: Diversidade genética entre os isolados de <i>Arcobacter sensu lato</i> nas diferentes amostras de água.....	62
Tabela 12: Resistência antimicrobiana de <i>Campylobacter</i> spp. isolado a partir de diferentes amostras de água.....	63
Tabela 13: Resistência antimicrobiana de <i>Arcobacter sensu lato</i> isolado a partir de diferentes amostras de água.....	68

Lista de Acrónimos

AB	Do inglês <i>Arcobacter Broth</i>
AFLP	Do inglês <i>Amplified fragment length polymorphism</i>
BA	Do inglês <i>Blood Agar</i>
BB	Do inglês <i>Bolton Broth</i>
BHI	Do inglês <i>Brain Heart Infusion</i>
CAT	Cefoperazona, Anfotericina B e Teicoplanina
CCDA	Do inglês <i>Charcoal cefoperazone desoxycholate agar</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMI	Concentração mínima inibitória
ELISA	Do inglês <i>Enzyme-linked immunosorbent assays</i>
EMJH	<i>Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris</i>
ERIC-PCR	Do inglês <i>Enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction</i>
EUCAST	<i>European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FISH	Do inglês <i>Fluorescence in situ hybridization</i>
MALDITOF-MS	Do inglês <i>Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry</i>
mCCDA	Do inglês <i>Modified charcoal cefoperazone desoxycholate agar</i>
MHA	<i>Mueller-Hinton Agar</i>
MLST	Do inglês <i>Multilocus sequence typing</i>
mPCR	Do inglês <i>Multiplex polymerase chain reaction</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Do inglês <i>Polymerase chain reaction</i>
PFGE	Do inglês <i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>
rpm	Rotações por minuto
rRNA	Do inglês <i>Ribosomal ribonucleic acid</i>
WGS	Do inglês <i>Whole genome sequencing</i>

Capítulo 1: Introdução

A água limpa é vital não só para permitir a vida humana, mas também o próprio funcionamento do ecossistema, contudo, a negligência e a má gestão dos recursos hídricos colocam em risco a disponibilidade de água doce de maneira significativa (Kannan, Prashanth, and Maliyekkal 2020). Da mesma forma, a carga industrial de poluição, instalações precárias de tratamento de água e esgoto, leis inadequadas de controle da poluição da água e urbanização rápida contribuíram para o aumento da degradação do ambiente aquático em muitos países tanto desenvolvidos, como em desenvolvimento (Shrestha et al. 2019).

Embora tenha havido um progresso notável no que toca ao controlo e prevenção de doenças infecciosas, os riscos provenientes de agentes microbianos continuam a ser a principal causa de mortalidade humana em países em desenvolvimento, sendo que as crianças são o grupo mais afetado (WHO 2016; UNICEF 2016). De facto, a poluição da água e doenças associadas como diarreia, febre tifoide e cólera, são consideradas das principais causas de morte a nível global, sendo responsável por cerca de 2,1 milhões de vidas humanas a cada ano (WHO 2016). Desta forma, a presença de poluentes microbianos, como bactérias, vírus e protozoários, representa uma ameaça no que toca à qualidade da água, sendo a sua ocorrência devida a diversos fatores, como representado na Figura 1 (Kannan, Prashanth, and Maliyekkal 2020).

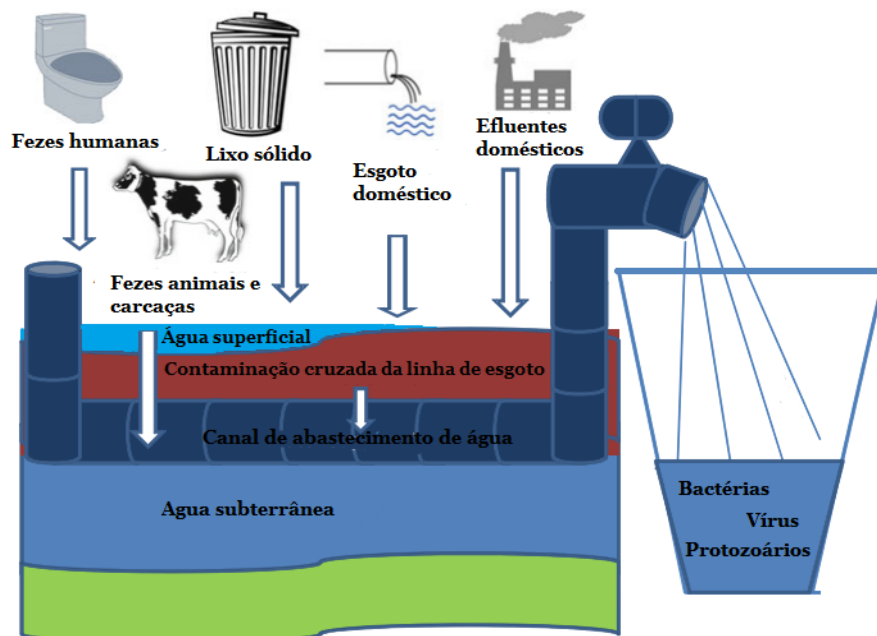


Figura 1: Principais fontes de contaminação microbiana da água. Adaptado de (Kannan, Prashanth, and Maliyekkal 2020).

Assim sendo, a análise mais abrangente desde a fonte, bem como a detecção rápida e antecipada do organismo patogénico em ambientes aquáticos, têm-se revelado parâmetros de extrema importância, uma vez que estes agentes podem colocar em risco a saúde pública (Kannan, Prashanth, and Maliyekkal 2020).

1.1 Taxonomia do género *Campylobacter*

Campylobacteraceae da ordem *Campylobacterales* é a maior e mais diversificada família pertencente à classe *Epsilonproteobacteria* e filo *Proteobacteria* (Silva et al. 2020). Desta família, faz parte o género *Campylobacter* que foi proposto pela primeira vez no ano de 1963, sendo na altura constituído por apenas duas espécies, *Campylobacter fetus* e *Campylobacter bubulus*, agora designado *Campylobacter sputorum*, sendo nesse período denominados como vibrios microaerófilos (On 2001; Natsos et al. 2019). Ao longo dos anos, este género foi aumentando, abrangendo mais espécies de *Campylobacter*, sendo que na atualidade, pela comparação de sequências parciais do gene *16S rRNA*, foram já reconhecidas 35 espécies, como apresentadas na Tabela 1, e 14 subespécies (Silva et al. 2020; On 2001).

Tabela 1: Espécies de *Campylobacter*, por ano de publicação do seu reconhecimento e por local de origem de isolamento. Adaptado de (Parte et al. 2020).

Espécies	Ano	Origem	Referência
<i>C. fetus</i>	1913	Feto de bezerro	(McFadyean and Stockman 1913)
<i>C. sputorum</i>	1914	Cavidade oral humana	(Tunncliffe 1914)
<i>C. jejuni</i>	1931	Bovinos e bezerros	(Jones et al. 1931)
<i>C. coli</i>	1948	Intestino suíno	(Doyle 1948)
<i>C. concisus</i>	1981	Humanos com doença periodontal	(Tanner et al. 1981)
<i>C. lari</i>	1983	Humanos e molúsculos	(Benjamin et al. 1983)
<i>C. hyointestinalis</i>	1983	Estômago suíno	(Gebhart et al. 1983)
<i>C. mucosalis</i>	1985	Adenomatose intestinal	(Ii et al. 1985)
<i>C. upsaliensis</i>	1991	Amostras diarreicas de humanos e animais domésticos	(Sandstedt, Karin, Jan 1991)
<i>C. curvus</i>	1991	Abscesso alveolar humano	(Vandamme et al. 1991)
<i>C. rectus</i>	1991	Canal radicular dentário humano	(Vandamme et al. 1991)
<i>C. helveticus</i>	1993	Animais domésticos	(John et al. 1992)
<i>C. showae</i>	1993	Cavidade oral humana	(Etoh et al. 1993)
<i>C. gracilis</i>	1995	Gengiva humana	(Vandamme et al. 1995)
<i>C. lanienae</i>	2000	Trabalhadores num matadouro	(Dennis Linton et al. 2000)
<i>C. hominis</i>	2001	Trato gastrointestinal humano	(Lawson et al. 2001)
<i>C. insulaenigrae</i>	2004	Mamíferos marinhos	(Foster et al. 2004)
<i>C. canadensis</i>	2007	Grus Americana	(Inglis et al. 2007)

Tabela 1 (continuação): Espécies de *Campylobacter*, por ano de publicação do seu reconhecimento e por local de origem de isolamento. Adaptado de (Parte et al. 2020).

Espécies	Ano	Origem	Referência
<i>C. cuniculorum</i>	2009	Coelhos	(Zanoni et al. 2009)
<i>C. peloridis</i>	2009	Mexilhão	(Debruyne et al. 2009)
<i>C. avium</i>	2009	Aves	(Mirko Rossi et al. 2009)
<i>C. subantarcticus</i>	2010	Aves	(Debruyne et al. 2010a)
<i>C. volucris</i>	2010	Gaiotas de cabeça negra	(Debruyne et al. 2010b)
<i>C. ureolyticus</i>	2010	Fluído amniótico	(Vandamme et al. 2016)
<i>C. troglodytis</i>	2011	Fezes de chimpanzés selvagens	(Kaur et al. 2011)
<i>C. corcagiensis</i>	2014	Macaco-cauda-de-leão	(Koziel et al. 2014)
<i>C. iguaniorum</i>	2015	Reptil	(Gilbert et al. 2015)
<i>C. geochelonis</i>	2016	Tartaruga	(Piccirillo et al. 2016)
<i>C. hepaticus</i>	2016	Galinhas com doença hepática	(Van et al. 2016)
<i>C. pinnipediorum</i>	2017	Pinípedes	(Gilbert et al. 2017)
<i>C. ornithocola</i>	2017	Aves Silvestres	(Cáceres et al. 2017)
<i>C. blaseri</i>	2018	Focas	(Gilbert et al. 2018)
<i>C. amoricus</i>	2019	Água superficial e fezes humanas com doença entérica	(Boukerb et al. 2019)
<i>C. novaezeelandiae</i>	2020	Água e aves	(Bloomfield et al. 2020)
<i>C. portucalensis</i>	2020	Mucosa prepucial de touros	(Silva et al. 2020)

A sequenciação dos genes *16S rRNA* e *23S rRNA* permite a análise filogenética e diferenciação dos membros do género *Campylobacter* (Figura 2), sendo que estas regiões são várias vezes utilizadas para a classificação taxonómica e identificação de espécies pertencentes aos géneros *Campylobacter*, *Arcobacter* e *Helicobacter*, devido à sua composição em mosaico de regiões filogeneticamente conservadas e regiões variáveis dentro do gene (Marshall et al. 1999; Kaakoush et al. 2015).

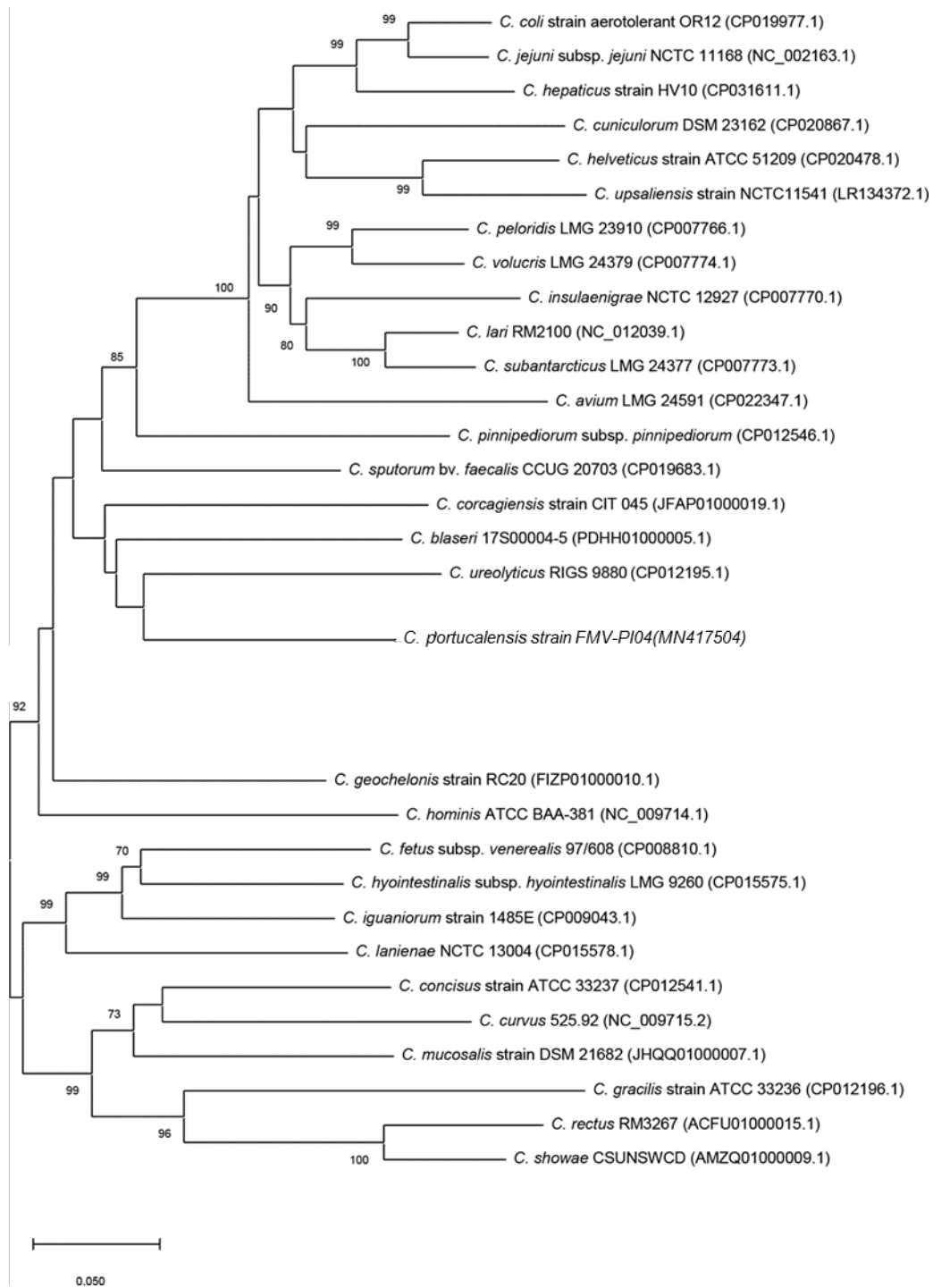


Figura 2: Árvore filogenética do género *Campylobacter*, tendo por base a similaridade da sequência do gene *16S rRNA* (Silva et al. 2020).

1.2 Evolução da taxonomia do género *Arcobacter*

Em 1991 foi proposto o género *Arcobacter*, incluído na família *Campylobacteraceae*, a qual abrange mais dois géneros, *Campylobacter* e *Sulfurospirillum* (Vandamme et al. 1991). Inicialmente, o género *Arcobacter* englobava duas espécies *Arcobacter cryaerophilus*, isolado a

partir de fetos de abortos de animais e humanos com doenças entéricas, e *Arcobacter nitrofigilis*, proveniente de raízes de uma planta, tendo sido classificados como *Campylobacter* spp. com capacidade de se multiplicar em condições aeróbicas (On 2001).

Desde a proposta para a criação de um novo gênero, *Arcobacter* spp. foi várias vezes submetido a alterações e a sua organização taxonômica permanece controversa até à atualidade (Ferreira, Oleastro, and Domingues 2019). Em 2017, Waite et al. (2017) realizaram uma análise de genômica comparativa da classe *Epsilonproteobacteria*, propondo uma reclassificação do gênero *Arcobacter* numa nova família designada *Arcobacteraceae* dentro da classe *Campylobacteria*. Atualmente foram já reconhecidas 31 espécies pertencentes a este gênero, isoladas a partir de uma variedade de ambientes e hospedeiros (Ferreira, Oleastro, and Domingues 2019), como se pode observar na Tabela 2. Mais recentemente, com base numa análise genômica e filogenética, foi proposta uma nova reavaliação deste gênero de modo a esclarecer as relações entre as suas diversas espécies. Assim, segundo os autores, o gênero *Arcobacter* passou a ser dividido em seis gêneros e um candidato, nomeadamente: *Arcobacter*, *Aliarcobacter* gen. nov., *Pseudarcobacter* gen. nov., *Malaciobacter* gen. nov., *Halarcobacter* gen. nov., *Poseidonibacter* gen. nov., e o candidato *Arcomarinus* gen. nov.. Desta forma todas as espécies passariam a ser distribuídas pelos diferentes gêneros, passando *Aliarcobacter* a compreender oito espécies, *Aliarcobacter cryaerophilus*, *A. butzleri*, *A. skirrowii*, *A. cibarius*, *A. thereius*, *A. trophiarum*, *A. lanthieri*, *A. faecis*, o gênero *Pseudarcobacter* contendo sete espécies, *Pseudarcobacter defluvii*, *P. ellisii*, *P. venerupis*, *P. cloacae*, *P. suis*, *P. aquimarinus* e *P. acticola*, *Malaciobacter* contendo cinco espécies, *Malaciobacter halophilus*, *M. mytili*, *M. marinus*, *M. molluscorum* e *M. pacificus*, com três espécies o gênero *Halarcobacter*, nomeadamente *Halarcobacter bivalviorum*, *H. anaerophilus* e *H. ebronensis*, *Poseidonibacter* com uma única espécie, *Poseidonibacter lekithochrous*, o gênero *Arcomarinus* contendo a espécie *Arcomarinus aquaticus* e o atual *Arcobacter* onde apenas se enquadra *A. nitrofigilis* (Pérez-Cataluña et al. 2018, 2019).

Tabela 2: Espécies de *Arcobacter* spp. por ano de publicação do primeiro isolamento e por local de origem de isolamento. (Hsu and Lee 2015; Pérez-Cataluña, Salas-Massó, and Figueras 2018; Pérez-Cataluña, Salas-Massó, and Figueras 2019; Callbeck et al. 2019).

Espécie	Ano	Origem do isolado	Referência
<i>A. cryaerophilus</i>	1977	Fetos Bovinos	(Ellis et al. 1977)
<i>A. nitrofigilis</i>	1983	Raízes de <i>Spartina alterniflora</i>	(McClung, Patriquin, and Davis 1983)
<i>A. butzleri</i>	1991	Amostras de fezes diarreicas	(Kiehlbauch et al. 1991)
<i>A. skirrowii</i>	1992	Fluido prepucial de touros	(Vandamme et al. 1992)
<i>A. cibarius</i>	2005	Carcaças de frango	(Houf et al. 2005)
<i>M. halophilus</i>	2005	Lagoa hipersalina	(Donachie et al. 2005)
<i>M. mytili</i>	2009	Mexilhão e água salobra	(Collado et al. 2009)

Tabela 2 (continuação): Espécies de *Arcobacter* spp. por ano de publicação do primeiro isolamento e por local de origem de isolamento. (Hsu and Lee 2015; Pérez-Cataluña, Salas-Massó, and Figueras 2018; Pérez-Cataluña, Salas-Massó, and Figueras 2019; Callbeck et al. 2019).

Espécie	Ano	Origem do isolado	Referência
<i>A. thereius</i>	2009	Porcos e Patos	(Houf et al. 2009)
<i>M. marinus</i>	2011	Água do mar	(Kim, Hwang, and Cho 2010)
<i>A. trophiarum</i>	2011	Porcos de engorda	(Smet et al. 2011)
<i>P. defluvi</i>	2011	Águas residuais	(Collado, Levican, et al. 2011)
<i>M. molluscorum</i>	2011	Mariscos	(Figueras, Collado, et al. 2011)
<i>P. ellisii</i>	2011	Mexilhões	(Figueras, Levican, et al. 2011)
<i>H. bivalviorum</i>	2012	Mexilhões e amêijoas	(Levican et al. 2012)
<i>P. venerupis</i>	2012	Mexilhões e amêijoas	(Levican et al. 2012)
<i>H. anaerophilus</i>	2013	Estuário	(Jyothsna et al. 2013)
<i>P. cloacae</i>	2013	Esgoto	(Levican, Collado, and Figueras 2013)
<i>P. suis</i>	2013	Porco	(Levican, Collado, and Figueras 2013)
<i>H. ebronensis</i>	2014	Mexilhões	(Levican et al. 2015)
<i>P. aquimarinus</i>	2014	Água do mar	(Levican et al. 2015)
<i>A. lanthieri</i>	2015	Porco e Estrume	(Whiteduck-Léveillé et al. 2015)
<i>M. pacificus</i>	2015	Água do mar	(Zhang et al. 2016)
<i>A. faecis</i>	2016	Águas residuais	(Whiteduck-Léveillé et al. 2015)
<i>P. acticola</i>	2016	Água do mar	(Park et al. 2016)
<i>P. lekithochrous</i>	2017	Moluscos	(Diéguez et al. 2017)
<i>M. haliotis</i>	2017	Abalone <i>Haliotis gigantea</i>	(Tanaka et al. 2017)
<i>M. canalis</i>	2018	Canais de água	(Pérez-Cataluña, Salas-Massó, and Figueras 2018)
<i>P. caeni</i>	2018	Água	(Pérez-Cataluña, Salas-Massó, and Figueras 2019)
<i>A. lacus</i>	2018	Água	(Pérez-Cataluña, Salas-Massó, and Figueras 2019)
<i>A. peruensis</i>	2019	Água costeiras sulfúricas	(Callbeck et al. 2019)
<i>A. vitoriensis</i>	2020	Cenoura e águas residuais	(Alonso et al. 2020)

Desta forma, algumas publicações procederam à análise e construção de redes de decomposição, através de sequências concatenadas de 61 genes centrais (41.878 pb), de maneira a não só realçar, mas também posicionar as diferentes espécies do antigo género *Arcobacter*, nos vários géneros desta nova divisão. (Figura 2) (Pérez-Cataluña et al. 2018; Alonso et al. 2020).

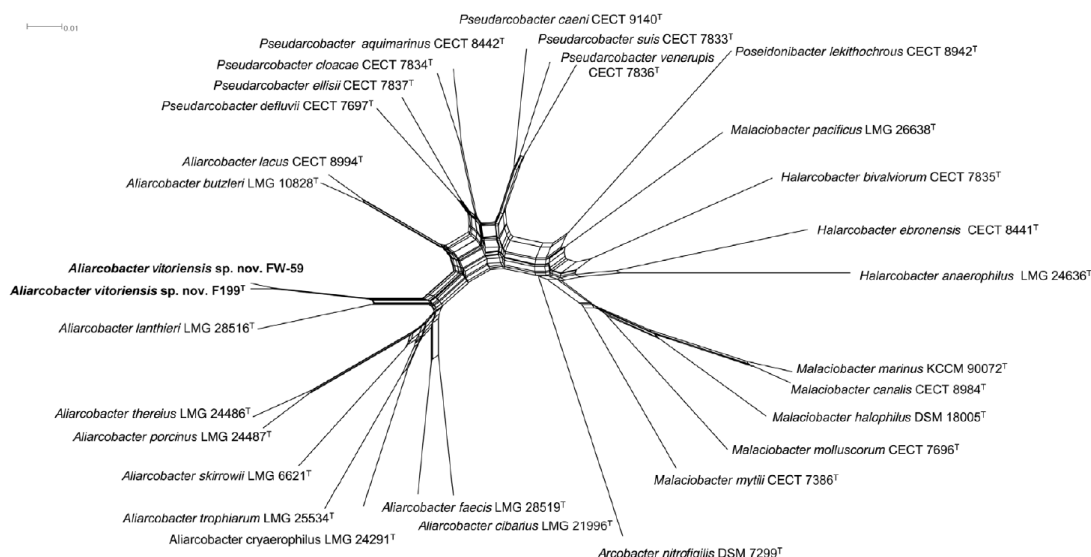


Figura 3: Rede de decomposição dividida de 29 espécies do género *Arcobacter*, tendo por base a similaridade das sequências de 61 genes core (Alonso et al. 2020).

Ainda assim, apesar das propostas apresentadas por Pérez-Cataluña et al. (2018) e Waite et al. (2017), esta nova reavaliação taxonómica, apesar de ter sido inicialmente validada, foi recentemente refutada com base num estudo levado a cabo para avaliar esta nova proposta usando critérios genómicos, filogenéticos e fenotípicos comparativos. Neste estudo apenas a distinção de um único género foi apoiada, com nenhuma das metodologias de avaliação justificando a posição dos novos géneros propostos (On et al. 2020).

Assim, e ainda que na pendência de mais pesquisas em apoio a estas novas redesignações, o nome *Arcobacter sensu lato* será usado neste trabalho de maneira a referir ao grupo de espécies do género desenvolvido historicamente (On et al. 2020).

1.3 Características de *Campylobacter* e *Arcobacter sensu lato*

Campylobacter spp. e *Arcobacter sensu lato* são caracterizados como bacilos de Gram-negativo, não formadores de esporos, móveis, podendo possuir forma em espiral. Juntamente com o género *Helicobacter*, estes inserem-se num grupo filogeneticamente distinto, denominada superfamília de *rRNA VI* ou divisão *Epsilon* pertencendo à classe *Proteobacteria* (Lehner, Tasara, and Stephan 2005).

1.3.1 Género *Campylobacter*

As espécies pertencentes ao género *Campylobacter* são maioritariamente microaerófilas, bactérias de Gram-negativo que não formam esporos (Wysok and Uradziński 2009), móveis, podendo apresentar um único flagelo polar, bipolar ou nenhum tipo de flagelo, dependendo da espécie (Guzmán-Martín, González-Bustos, and Gutiérrez-Fernández 2019).

No ambiente, estas podem apresentar-se em duas formas morfológicas, isto é, com forma cilíndrica, mais usual, e na forma de cocos. A forma cilíndrica multiplica-se em meios de cultura sob forma de colónias de tom acinzentado, planas e húmidas, apresentando-se ao microscópio, com formato em espiral, idêntico a vírgula ou em S, com 0,5 - 8 µm de comprimento e 0,2 - 0,5 µm de largura. Por outro lado, a morfologia em cocos destas bactérias apenas ocorre quando as condições ambientais são desfavoráveis, sendo uma forma viável, mas não cultivável, pelo que não se observa a sua multiplicação em meios de cultura sem um processo de ressuscitação (Wysok and Uradziński 2009).

A maioria das espécies de *Campylobacter* requer condições microaerófilas para um crescimento da população bem-sucedido, devido à sua alta sensibilidade ao oxigénio, apenas multiplicando-se em cultura com uma atmosfera microaerófila com composição ideal de 5% O₂, 10% de CO₂ e 85% de N₂ (Guzmán-Martín, González-Bustos, and Gutiérrez-Fernández 2019; Alterkruse et al. 2007). Apesar da maior parte das espécies de *Campylobacter* se desenvolverem sob condições microaeróbicas, várias espécies requerem hidrogénio que atua como doador de eletrões para o seu desenvolvimento. Ainda assim, existem também algumas espécies perfeitamente adaptadas a ambientes anaeróbios, como o caso de *C. rectus* (Kaakoush et al. 2015).

A identificação e caracterização de espécies de *Campylobacter* é muitas vezes baseada em testes bioquímicos, padrões de resistência a antibióticos e temperatura de desenvolvimento (Levin 2007). De uma maneira geral, as espécies não fermentam nem oxidam carboidratos, sendo designados como organismos quimioorganotróficos, obtendo energia a partir de aminoácidos ou intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico. A atividade da oxidase está presente em todas as espécies de *Campylobacter*, com exceção do *C. gracilis* (Silva et al. 2011). Em relação ao pH, as espécies de *Campylobacter* são capazes de se multiplicar dentro de uma ampla faixa de pH, entre 5,5 a 8,0, sendo a sua multiplicação ideal observada a valores de pH 6,5 - 7,5 (Wysok and Uradziński 2009). As populações de espécies do género *Campylobacter* conseguem crescer à temperatura de 37 °C, sendo que devido à ausência de proteínas que desempenham um papel na adaptação a baixas temperaturas, estas são incapazes de se desenvolver a temperaturas abaixo de 30 °C (Wysok and Uradziński 2009). Dentro do mesmo género, existem ainda espécies termófilas capazes de se multiplicar a temperaturas entre 37 e 42 °C, nomeadamente *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* e *C. upsaliensis*, com temperatura de multiplicação ideal de 41,5 °C. O termo "termotolerante" refere-se assim às espécies com desenvolvimento a temperaturas entre 41-

43°C, sendo o termo várias vezes utilizado para as espécies termofílicas de *Campylobacter* spp., devido a estes organismos não exibirem multiplicação a temperaturas iguais ou superiores a 55°C (Levin 2007).

1.3.2 Grupo *Arcobacter sensu lato*

A diferenciação das espécies de *Campylobacter* e *Arcobacter sensu lato* através da análise fenotípica é difícil devido à falta de procedimentos padronizados, às características fenotípicas e bioquímicas semelhantes entre estes dois grupos bacterianos, à elevada semelhança entre espécies e à ocorrência de estirpes atípicas (González et al. 2006). Antes da atual denominação dos diferentes géneros de *Arcobacter sensu lato*, estas bactérias eram designadas por “Campylobacteres aerotolerantes”, devido às semelhanças compartilhadas entre estes géneros, nomeadamente o seu perfil morfológico e bioquímico. Ainda assim, os membros de *Arcobacter sensu lato*, ao contrário de *Campylobacter* spp., possuem a capacidade de aerotolerância, sendo, portanto, a principal característica diferenciadora destes dois grupos bacterianos (Snelling et al. 2006; Talay, Molva, and Atabay 2016).

Bactérias deste grupo são caracterizadas como bastonetes Gram-negativos, curvadas em forma de S, não formam esporos, geralmente com 0,2 - 0,9 µm de largura e 0,5 - 3 µm de comprimento. Estes organismos são móveis, dotados de um único flagelo polar numa ou nas duas extremidades das células (Ho, Lipman, and Gaastra 2006), com exceção de *A. anaerophilus*, que não possui flagelos na sua constituição (Jyothsna et al. 2013).

Os membros de *Arcobacter sensu lato* são conhecidos como positivos para o teste da oxidase, mas a catalase está ausente em algumas espécies (Ferreira et al. 2016). Este grupo de géneros é também caracterizado por utilizar compostos orgânicos e aminoácidos como fontes de carbono, não fermentando nem oxidando carboidratos (Ramees et al. 2017). No que diz respeito ao pH, num estudo realizado por Sa and Harrison (2005), constatou-se que algumas das espécies apresentavam desenvolvimento numa faixa de pH de 5,5 a 8,0, sendo ideal para o crescimento da população valores entre 6,0 a 7,5, dependendo das espécies e estirpes. Ainda assim, no mesmo estudo observou-se o desenvolvimento de algumas estirpes a valores de pH 5,0, especialmente em temperaturas não ideais (25 ° C), por até 2 dias.

De um modo geral, *Arcobacter sensu lato* são capazes de se multiplicar em condições aeróbicas e em alguns casos em condições anaeróbicas, como o caso de *A. anaerophilus*, apresentando crescimento populacional numa ampla faixa de temperaturas, 15-42 °C, sendo que o desenvolvimento ideal ocorre em condições microaeróbicas, 3 a 10% de O₂, com temperatura de 37°C, podendo ainda algumas espécies requerer a necessidade de NaCl para o seu desenvolvimento (Vandamme et al. 1991; Pérez-Cataluña et al. 2018). No entanto, o aparecimento de novas espécies poderá sempre alterar algumas das características conhecidas até hoje.

1.4 Patogenicidade associada a *Campylobacter* spp. e *Arcobacter sensu lato*.

Na esfera da Saúde Pública, espécies pertencentes ao género *Campylobacter* e *Arcobacter sensu lato* estão intimamente relacionadas com o desenvolvimento de algumas doenças. Em vários países em desenvolvimento e desenvolvidos, algumas espécies pertencentes a estes grupos bacterianos são conhecidas por se apresentarem como uma das principais causas de infeções gastrointestinais, realçando um sério risco para a saúde pública (Shange, Gouws, and Hoffman 2019).

1.4.1 Género *Campylobacter*

Campylobacter spp. é uma das principais causas de doenças bacterianas zoonóticas em todo o Mundo, afetando cerca de 1% da população humana por ano na Europa (Denny et al. 2007). A doença infecciosa causada por membros do género *Campylobacter* é denominada campilobacteriose, sendo a doença zoonótica mais comumente relatada na Europa no ano de 2017 (EFSA and ECDC 2018). As espécies patogénicas *Campylobacter* spp. que se relacionam com infeções humanas incluem *C. jejuni*, *C. coli*, *C. concisus*, *C. rectus*, *C. hyointestinalis*, *C. insulaenigrae*, *C. sputorum*, *C. helveticus*, *C. lari*, *C. fetus*, *C. mucosalis*, *C. upsaliensis* e *C. ureolyticus*. Ainda assim, as espécies *C. jejuni* e *C. coli* são as principais associadas a infeções em humanos e animais (Igwaran and OKoh 2019; Sahin et al. 2017). Nomeadamente, no ano de 2015, a Agência Europeia para a Segurança Alimentar e o Centro Europeu de Prevenção e Controlo de Doenças relataram que as espécies *C. jejuni* e *C. coli* foram a causa mais comum de campilobacteriose, sendo esta a doença de origem bacteriana a mais frequente nesse ano (EFSA and ECDC 2016). Com a dose infecciosa estimada em 500 microrganismos pertencentes a este género, as manifestações clínicas de campilobacteriose são amplamente indistinguíveis de outras infeções intestinais bacterianas, onde os sintomas de infeção são febre, cólicas abdominais e diarreia, com ou sem sangue nas fezes, podendo durar entre três dias a uma semana (Nachamkin, Szymanski, and Blaser 2008; Coker et al. 2002). As infeções causadas por *C. jejuni* podem evoluir para diversos níveis de gravidade, como diarreia leve e autolimitada, para colite hemorrágica e, por vezes, meningite e bacteremia, sendo que em casos mais severos pode provocar um distúrbio autoimune do sistema nervoso periférico desenvolvendo-se para doenças associadas a Síndrome de Guillain-Barré ou Síndrome de Miller Fischer (Igwaran and OKoh 2019; Coker et al. 2002; Butzler 2004). A síndrome de Guillain-Barré é uma doença autoimune rara caracterizada pelo ataque do sistema nervoso periférico, levando à fraqueza muscular, paralisia e consequentemente morte (Epps et al. 2013). Ainda assim, infeções por *C. coli* diferem das obtidas de *C. jejuni*, sendo os principais sintomas diarreia aquosa, dor abdominal, vômito, febre, enterocolite inflamatória, mal-estar e náuseas (Igwaran and OKoh 2019).

A motilidade mediada por flagelos, adesão bacteriana à mucosa intestinal, capacidade invasiva e capacidade de produzir toxinas, como o caso da toxina distensora citoletal são fatores de virulência associados ao género *Campylobacter* (Dasti et al. 2010; Asakura et al. 2007). Ainda assim, os mecanismos específicos de virulência associados a *Campylobacter* spp. ainda não foram claramente elucidados, provavelmente devido à falta de similaridade da patogénese associada a este género e outros organismos patogénicos (Dasti et al. 2010).

1.4.2 Grupo *Arcobacter sensu lato*

Embora espécies pertencentes ao grupo *Arcobacter sensu lato* não façam parte da flora saprófita normal do intestino humano, o ser humano pode ser potencialmente infetado pela ingestão de alimentos e água contaminada com estes organismos (Shah et al. 2011). Referente a esta temática, foram já associadas várias espécies destes géneros quer a doenças entéricas como outras doenças extraintestinais, nomeadamente bacteremia e peritonite, em humanos. De entre as diversas espécies deste grupo, são *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii* as mais frequentemente associadas a doença no Homem (Ferreira, Oleastro, and Domingues 2019; Shah et al. 2011). A espécie *A. butzleri* recebeu foco devido aos muitos estudos que demonstraram que esta bactéria se encontra presente numa grande variedade de hospedeiros e ambientes, sendo o quarto organismo mais comum do tipo *Campylobacter* detetado em amostras de fezes diarreicas humanas, representando a importância epidemiológica desta bactéria (Collado et al. 2013; Ferreira et al. 2014). Da mesma forma, a Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos considerou já as espécies *A. butzleri* e *A. cryaerophilus*, como organismos que representam um perigo severo para a saúde humana (Tompkin et al. 2002).

A presença destas bactérias em alimentos para consumo humano e a sua capacidade de sobrevivência a temperaturas de armazenamento, apontam que a ingestão destas bactérias através de alimentos contaminados possa ser responsável pela doença arcobacteriose. Vários fatores como a ocorrência, concentração de células, padrões de consumo de produtos, exposição, dose infecciosa e suscetibilidade da população, poderão influenciar o risco de desenvolvimento da doença causada por estas bactérias, no entanto o conhecimento acerca deste assunto é limitado (Ferreira, Oleastro, and Domingues 2019). Os principais sintomas clínicos causados por arcobacteriose incluem diarreia aquosa prolongada, câibras abdominais, náusea e vômito (Vandenberg et al. 2004; Vandamme et al. 1992). Além do Homem, espécies deste grupo foram já isolados a partir de animais com várias doenças, incluindo aborto, septicemia, mastite, gastrite e enterite (On et al. 2002; Julia et al. 1993).

Apesar de muitos relatos relativos à prevalência destas bactérias em alimentos e água, e à sua associação com doenças que afetam tanto humanos como animais, ainda existe um conhecimento limitado sobre a patogenicidade e virulência destas bactérias (Ho, Lipman, and Gaastra 2006; Hänel, Tomaso, and Neubauer 2016). Até ao momento, foram já descritos vários genes putativos de virulência, como *cadF*, *cj1349*, *ciaB*, *mviN*, *pldA*, *tlyA*, *hecA*, *hecB*, *irgA*, *iroE*

presentes no genoma de *A. butzleri*, sendo considerados como potencialmente importantes para a virulência deste patogénico, devido à homologia com genes de virulência presentes em outras bactérias (Miller et al. 2007; Kim et al. 2018). Da mesma forma, existem informações de estudos relacionados com estes genes e/ou fatores de virulência presentes em espécies de *Arcobacter sensu lato*, sendo que, com base nestes sabe-se que a capacidade de adesão, invasão celular, secreção de toxinas e indução de secreção da citocina pró-inflamatória (IL-8) desempenham um papel no estabelecimento de infeção no hospedeiro (Carrillo et al. 2016; Houf et al. 2001). Ainda assim, para se poder confirmar a magnitude do potencial risco associado a este género, vários fatores necessitam de ser compreendidos, nomeadamente o número de espécies de *Arcobacter sensu lato* que abrigam estes genes, bem como os papéis associados à patogenicidade desempenhados por cada um deles (Kim et al. 2018).

1.5 Ocorrência de *Campylobacter* spp. e *Arcobacter sensu lato*

Os membros da família *Campylobacteraceae* foram já encontrados numa vasta gama de ambientes, desde respiradouros presentes no fundo do mar, a raízes de plantas e trato gastrointestinal de animais. Desta forma, dentro do grupo *Arcobacter sensu lato*, várias espécies foram já isoladas a partir das mais diversas fontes, como água de esgoto, sedimentos estuarinos, ambientes marinhos e hipersalinos, raízes de plantas e animais, incluindo moluscos e bivalves (Gilbert et al. 2019).

Por outro lado, ao contrário de *Arcobacter sensu lato*, do qual vários membros vivem livremente no meio ambiente, *Campylobacter* spp. está predominantemente associado a hospedeiros vertebrados (Fitzgerald and Nachamkin 2015). Membros pertencentes a este género foram principalmente isolados a partir do trato digestivo de animais vertebrados e órgãos reprodutivos. As espécies intestinais de *Campylobacter* mostram ainda uma forte afinidade com a mucosa intestinal dos hospedeiros (Gilbert et al. 2019).

1.5.1 Prevalência de espécies pertencentes a *Campylobacter* spp. e *Arcobacter sensu lato* em água

Ainda que as bactérias pertencentes ao género *Campylobacter* e grupo *Arcobacter sensu lato* não façam parte da flora normal do intestino humano, o consumo de água contaminada como consequência de poluição fecal, pode muitas vezes resultar em infeções e doenças que afetam humanos e animais (Shah et al. 2011). A segurança da água destinada a consumo por parte do Homem, é baseada na prevenção da contaminação fecal da água bruta, no tratamento por filtração e desinfecção nas estações de tratamento de águas. Ainda assim, diferentes matrizes de água podem desempenhar vias importantes na transmissão de infeções por parte destas

bactérias devido principalmente à contaminação fecal de águas residuais e ambientais através de aves aquáticas e escoamento de dejetos de animais, bem como descargas de efluentes de esgoto não desinfetados ou com infiltração séptica (Pitkänen 2013).

Embora exijam um hospedeiro para o crescimento populacional, as bactérias do género *Campylobacter* são comumente isoladas de amostras de águas naturais, como nascentes, rios e lagos, devido a descargas de estações de tratamento de águas residuais, escoamento de terrenos agrícolas e contaminação direta por fezes de aves e animais selvagens (Vereen et al. 2007). Chuvas fortes e falhas no tratamento e monitorização adequada de fontes de água potável e de águas subterrâneas podem levar a distribuição de *Campylobacter* spp. através do sistema de abastecimento de água (Bartholomew et al. 2014; O'Reilly et al. 2007). Da mesma forma, águas ambientais podem atuar como fonte de colonização de espécies de *Campylobacter* em animais produtores da cadeia alimentar, por meio de águas subterrâneas e superficiais, frequentemente utilizados como água potável para animais de quinta (Mughini-gras et al. 2016; Pérez-Boto, García-Peña, and Echeita 2010). Embora a maioria dos estudos publicados sobre a deteção de *Campylobacter* tenham sido feitos em aves, *Campylobacter* spp. são frequentemente isolados de ambientes aquáticos ao longo do globo (Pitkänen 2013). Vereen et al. 2007 relatou a prevalência destas bactérias em água corrente proveniente de bacia hidrográfica rural na planície costeira do sul da Geórgia, Estados Unidos da América (EUA), onde obteve uma prevalência de 88% (74/84) para *Campylobacter* spp.. Da mesma forma, Hellein et al. (2011) efetuou um estudo em amostras de águas superficiais marinhas e pluviais da Flórida, EUA, verificando a deteção de *Campylobacter* resultando em prevalências de 18,2% (2/11) e 38,0% (8/21), respetivamente. Também na Europa, Moore, Caldwell, and Millar (2001) realizaram um estudo para avaliar a prevalência de bactérias deste género em várias amostras de água potável, recreativa e ambiental recolhidas na Irlanda do Norte, no qual observou uma prevalência de *Campylobacter* spp. em 2,2% (2/91) das amostras de água potável de torneiras domésticas, 8,8% (5/57) de água da piscina, 4,3% (1/23) de água do lago e 100% (1/1) de água recreativa. Da mesma forma, um estudo efetuado em rios e lagos na região de Brittany, em França, revelou que 50% (30/60) das amostras de água foram positivas para espécies termotolerantes de *Campylobacter*, com *C. jejuni* representando 74,1% dos isolados, *C. coli* 17,8% e *C. lari* 8,1% (Denis et al. 2011). Também através da análise de diferentes amostras de água na África do Sul, observou-se uma prevalência de espécies de *Campylobacter*, nomeadamente em 6/11 amostras de águas superficiais e 1/4 proveniente de esgoto bruto (Diergaardt et al. 2004).

Entre as diferentes espécies de *Campylobacter*, *C. jejuni* é a principal identificada presente em águas por todo o mundo, estando maioritariamente associado com contaminação proveniente de descargas de esgoto. No entanto outras espécies termotolerantes podem ser isoladas, como *C. coli* e *C. lari*, embora estejam mais associadas com escoamentos agrícolas e bandos de aves aquáticas (Thomas et al. 1999; Hokajärvi et al. 2013; Obiri-Danso and Jones 1999). Assim sendo, a presença destas espécies em ambientes aquáticos reflete a água como uma importante fonte de contaminação (Frost 2001).

Em comparação ao género *Campylobacter*, foi sugerido que as bactérias do grupo *Arcobacter sensu lato* podem adaptar-se mais facilmente a sobreviver em ambientes aquáticos devido à sua resistência a altas concentrações de NaCl, a baixas temperaturas e capacidade de sobreviver e multiplicar em condições aeróbicas (Sa and Harrison 2005). Desta forma, várias espécies pertencentes a estes géneros demonstraram estar presentes numa vasta gama de corpos de água, como águas residuais, água do mar, lago e água do rio, água potável, água subterrânea, água de lazer, em efluentes e lodo de esgoto, podendo levar à transmissão destes agentes patogénicos emergentes pela água (Hsu and Lee 2015).

No que toca a águas residuais, González et al. (2007) relataram o isolamento de espécies pertencentes a *Arcobacter sensu lato* através do processamento de águas residuais coletadas em Espanha, tendo identificado como espécies maioritárias *A. butzleri* e *A. cryaerophilus*. Da mesma forma, através da análise de amostras de esgoto doméstico não tratado, proveniente de nove estações de tratamento de águas residuais em Cheshire, Reino Unido, observou-se uma alta prevalência 50% (28/56) destas bactérias, nomeadamente 75% dos isolados identificados como *A. butzleri*, tendo-se identificado também *A. cryaerophilus* isolado de um dos locais de amostragem (Merga et al. 2014). Mais recentemente, Levican, Collado, and Figueras (2016) avaliaram a prevalência destes géneros em amostras de água residual, onde 96,7% (29/30) das amostras foram positivas para as bactérias deste grupo. A água do mar é outra potencial fonte destas bactérias, tendo-se já isolado espécies como *A. sulfidicus* e *A. marinus* (Wirsen et al. 2002; Kim, Hwang, and Cho 2010), sendo também fonte de novas espécies pertencentes a este grupo bacteriano como *A. pacificus*, *A. acticola* e mais recentemente *A. peruensis* e *A. vitoriensis* (Zhang et al. 2016; Park et al. 2016; Callbeck et al. 2019; Alonso et al. 2020).

Ainda que nem todas as espécies sejam patogénicas, a compreensão da prevalência de *Arcobacter sensu lato* em ambientes aquáticos é importante devido à crescente associação a doenças que afetam animais e humanos, como o caso de *A. butzleri* (Collado, Figueras, et al. 2011). Num estudo desenvolvido por Rathlavath, Kumar, and Nayak (2017) relativo ao isolamento de espécies de *Arcobacter sensu lato* em ambientes costeiros, observou-se a identificação de 34 amostras positivas para este grupo de entre 57 amostras totais, sendo *A. butzleri* a espécie mais frequentemente isolada. Podendo ser encontrado em vários corpos de água, Rice et al. (1999) estudaram a sua prevalência em amostras de água subterrânea, utilizada como fonte de água potável ao Homem, tendo-se observado a presença de *A. butzleri*. Também quanto à sua prevalência em águas superficiais e de consumo, foram já descritas algumas publicações, como o caso de Talay, Molva, and Atabay (2016) que de um total de 115 amostras provenientes de locais diferentes, isolou com sucesso *Arcobacter sensu lato* de 41 amostras (35,6%), com a identificação da espécie *A. butzleri* em 24 amostras de esgotos, 13 rios e 2 de águas de nascente. De uma maneira geral, a prevalência de *Arcobacter sensu lato* nos diversos ambientes aquáticos foi revista recentemente apresentando prevalência média ponderada de 91,0% para águas residuais, 87,1% para lagos e rios, 75,2% para praias de lazer, 43,8% para águas subterrâneas, 17,6% para água do mar e por fim 3,2% para água potável, sendo que

variações quanto à presença destas bactérias nos vários corpos de água podem ser devidas ao uso de diferentes tipos de amostra, níveis de contaminação fecal, variações sazonais, temperatura da água e método de isolamento usado (Hsu and Lee 2015). Ainda assim, a presença de espécies destes dois grupos bacterianos em ambientes aquáticos é de grande importância devido não só a estas poderem colocar em risco a qualidade da água, mas também a própria saúde pública.

1.5.2 Prevalência de espécies pertencentes a *Campylobacter* spp. e *Arcobacter sensu lato* em animais para abate

É sabido que as espécies de *Campylobacter* e *Arcobacter* podem encontrar-se no trato gastrointestinal de muitos animais da cadeia alimentar, como aves (Tabela 3), gado bovino, ovelhas e porcos (Tabela 4), o que torna estes hospedeiros como potenciais fontes de contaminação de alimentos e águas superficiais podendo representar riscos à saúde humana (Shange, Gouws, and Hoffman 2019; Nygård et al. 2004).

Aves de capoeira foram relatadas como a principal fonte de infeções por *Campylobacter* spp. sendo também relatadas como reservatórios para algumas espécies do grupo *Arcobacter sensu lato*. Os níveis de prevalência destes grupos bacterianos podem diferir entre os estudos devido a diversos fatores, no entanto, em geral estima-se níveis de prevalência de 6 a 44% para espécies de *Arcobacter* e 2 a 100% para *Campylobacter* spp. (Shange, Gouws, and Hoffman 2019). No que diz respeito ao género *Campylobacter*, as aves domésticas são o principal hospedeiro, possivelmente devido a fatores como a sua alta temperatura corporal variando de 39 a 41 ° C, onde a faixa de temperatura se assemelha à temperatura ideal de multiplicação de 42 ° C das espécies termófilas (Fitzgerald and Nachamkin 2015). Da mesma forma, a carne de aves de capoeira é comumente relatada como a fonte mais frequente de *Arcobacter sensu lato* em comparação à carne vermelha e de porco, a qual surge com uma prevalência variando de 3,3% a 73% a nível global para a carne destes animais (Shange, Gouws, and Hoffman 2019).

Tabela 3: Prevalência de espécies de *Campylobacter* spp. e *Arcobacter sensu lato* em amostras fecais de aves de capoeira. Adaptado de Shange, Gouws, and Hoffman (2019).

Animal	Região	Tipo de amostra	Prevalência (%)	Espécies de <i>Campylobacteraceae</i>	Referência
Galinhas	Tailândia	Amostras fecais	11	<i>C. jejuni</i>	(Chokboonmongkol et al. 2009)
	Vietnã	Amostras fecais	32	<i>C. jejuni</i>	(Carrique-Mas et al. 2020)
	Países Baixos	Amostras fecais	93-97	<i>C. jejuni, C. coli</i>	(Schets et al. 2017)
	Índia	Amostras fecais	8	<i>Arcobacter</i> spp.	(H. V. Mohan et al. 2014)
	Sul do Chile	Amostras fecais	10	<i>A. cryaerophilus</i> <i>A. butzleri</i>	(Fernandez et al. 2015)
	Alto Egito	Amostras fecais	44	<i>Arcobacter</i> spp.	(Hassan 2017)
	Costa Rica	amostras fecais	6	<i>A. butzleri</i> <i>A. cryaerophilus</i>	(Bogantes et al. 2015)
	Perus	Alto Egito	Amostras fecais	15	<i>Arcobacter</i> spp.
Patos	Vietnã	Amostras fecais	24	<i>C. jejuni</i>	(Carrique-Mas et al. 2014)
	Alto Egito	Amostras fecais	22	<i>Arcobacter</i> spp.	(Hassan 2017)
	Costa Rica	Amostras fecais	20	<i>A. butzleri,</i> <i>A. cryaerophilus</i>	(Bogantes et al. 2015)
Gansos	Peru	Amostras fecais	12,93	<i>Arcobacter</i> spp.	(Çelîk et al. 2018)
	Costa Rica	Amostras fecais	10	<i>A. butzleri,</i> <i>A. cryaerophilus</i>	(Bogantes et al. 2015)

No caso do gado bovino e suíno, sabe-se que geralmente, os porcos são portadores assintomáticos das espécies *Campylobacter* e *Arcobacter sensu lato*, apresentando-se como transportadores de várias espécies pertencentes a estes grupos bacterianos (Shange, Gouws, and Hoffman 2019). As espécies *C. jejuni* e *A. butzleri* apresentam-se como as espécies maioritárias isoladas de suínos, no entanto existem já estudos que demonstraram a presença de outras espécies de *Arcobacter sensu lato* em amostras de fezes de porcos e efluentes de pocilga, como por exemplo *A. trophiarum* e *A. cibarius* (Smet et al. 2011). Os animais bovinos são também

relatados como portadores de espécies pertencentes a estes dois grupos bacterianos (Driessche et al. 2005).

Tabela 4: Prevalência do género *Campylobacter* spp. e grupo *Arcobacter sensu lato* presentes no trato gastrointestinal de gado suíno, bovino, ovino e caprino. Adaptado de Shange, Gouws, and Hoffman (2019).

Animal	Região	Tipo de amostra	Prevalência (%)	Espécies de <i>Campylobacteraceae</i>	Referência
Gado bovino	Japão	Amostras fecais	40	<i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i>	(Haruna et al. 2013)
	Irão	Amostras fecais	8-12	<i>A. butzleri</i> <i>A. cryaerophilus</i> <i>A. skirrowii</i>	(Shirzad, Tabatabaei, and Khoshbakht 2016)
	Índia	Amostras fecais	10	<i>Arcobacter</i> spp.	(Mohan et al. 2014)
	Inglaterra	Amostras fecais	43	<i>A. butzleri</i>	(Yvette Merga et al. 2013)
	Itália	Amostras fecais	40	<i>A. butzleri</i> <i>A. cryaerophilus</i> <i>A. skirrowii</i>	(Giacometti, Ucchi, et al. 2015)
	Sul do Chile	Amostras fecais	37	<i>A. butzleri</i> <i>A. cryaerophilus</i>	(Fernandez et al. 2015)
Gado suíno	Japão	Amostras fecais	42,4	<i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i>	(Haruna et al. 2013)
	Índia	Amostras fecais	12	<i>Arcobacter</i> spp.	(Mohan et al. 2014)
	Gana	Amostras fecais	29	<i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> , <i>C. lari</i>	(Karikari et al. 2017)
	Sul do Chile	Amostras fecais	59	<i>A. butzleri</i> <i>A. cryaerophilus</i>	(Fernandez et al. 2015)
Gado caprino	Gana	Amostras fecais	19	<i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> , <i>C. lari</i>	(Karikari et al. 2017)
	Escócia	Amostras fecais	25	<i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i>	(Rotariu et al. 2009)
Gado ovino	Escócia	Amostras fecais	14-21	<i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i>	(Sproston et al. 2011)
	Gana	Amostras fecais	13	<i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> <i>C. lari</i>	(Karikari et al. 2017)
	Irão	Amostras fecais	10,1-18,5	<i>A. butzleri</i> <i>A. cryaerophilus</i> <i>A. skirrowii</i>	(Aski et al. 2015)

A água poderá ter um papel importante tanto na contaminação de animais produtores de alimentos, através da ingestão de água contaminada, como na sua utilização durante o processo de abate para posterior consumo, sendo que de igual forma através das fezes de animais portadores destas bactérias, poderá resultar a contaminação fecal de amostras de água (Giacometti et al. 2015; Fisher et al. 2014). Assim, manter um alto padrão de higiene é um dos objetivos mais importantes da produção animal. Existe a necessidade de fornecer carne e produtos à base de carne que sejam seguros para o consumo humano, no entanto a segurança destes alimentos pode ser ameaçada pela presença de bactérias patogênicas, como *Campylobacter* spp. e *Arcobacter sensu lato* podendo atuar como reservatórios de transmissão de doenças ao Homem (Shah et al. 2012; Shange, Gouws, and Hoffman 2019).

Desta forma, os resultados refletem a necessidade de pesquisas que explorem a prevenção e redução da contaminação bacteriana desde a produção primária até ao abate dos animais para posterior consumo (Shange, Gouws, and Hoffman 2019).

1.5.3 Prevalência de espécies pertencentes a *Campylobacter* spp. e *Arcobacter sensu lato* em alimentos

Ainda que seja de conhecimento adquirido para espécies do género *Campylobacter* e algumas vezes relatado para espécies de *Arcobacter sensu lato* que a transmissão ao Homem ocorre maioritariamente através de alimentos de origem animal, especialmente aves, leite cru, e ainda água contaminada, a transmissão advinda de espécies pertencentes a estes grupos bacterianos presentes em produtos frescos contaminados de origem não animal, como frutas e vegetais, revelou já ser uma importância significativa para a saúde pública (Verhoeff-Bakkenes et al. 2011; Hsu and Lee 2015).

Mesmo antes da preparação dos alimentos para o consumidor, matrizes alimentares como vegetais e frutas podem ser contaminados com microrganismos patogênicos durante a produção, colheita, processamento, embalagem ou mesmo no varejo. Fezes, presença e sobrevivência de patógenos no solo, água de irrigação, estrume natural ou compostado inadequadamente, ar, animais selvagens ou domésticos e ainda manipulação por parte do Homem, são apontadas como potenciais fontes de contaminação de produtos alimentares (Beuchat 1995).

Desta forma, numerosos estudos realçaram já a presença de *Campylobacter* spp. em vários géneros alimentícios, alface, espinafre, rabanete e ervilha, sendo as espécies *C. jejuni* e *C. coli* as que representam prevalência maioritária, sugerindo os alimentos como fator de risco para doenças causadas ao homem, como caso de campilobacteriose (Abadias et al. 2008; Brandl et al. 2004; Gardner et al. 2011). Num estudo elaborado por Park and Sanders (1992) procurando a prevalência de *Campylobacter* spp. em alimentos demonstrou a deteção de *C. jejuni* em 3,3%

amostras de espinafre, 3,1% de alface, 2,7% de rabanete, 2,5% presente em cebola verde, 2,4% em salsa e 1,6% proveniente de amostras de batata, sendo a água contaminada uma das possíveis fontes de contaminação.

Quanto à presença de espécies do grupo *Arcobacter sensu lato*, num estudo realizado por González and Ferrús (2011) foi relatada a presença de *A. butzleri* em alfaces frescas baseados em testes moleculares, com percentagens de 14-20%. Da mesma forma, foram já observados resultados relativos à presença destas bactérias em espinafres e cenouras prontos a comer, com percentagens de 35% e 9% respetivamente, sendo *A. butzleri* a espécie maioritariamente encontrada nestes produtos alimentares, seguida de *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii* (Hausdorf et al. 2013). Segundo os autores a contaminação de vegetais poderá ocorrer durante a etapa de produção, onde a utilização de fertilizantes contaminados e de água de irrigação contaminada, têm o potencial de contaminar a produção (Hausdorf et al. 2011).

Tal como acontece com vegetais e legumes, o marisco, como amêijoas e ostras, estão descritos como contendo espécies de *Campylobacter* spp. e *Arcobacter sensu lato*, podendo assim representar uma fonte potencial de infeções humanas, especialmente devido ao seu consumo crus ou levemente cozidos (Wilson and Moore 1996; Collado et al. 2011). Num estudo realizado por Hoek et al. (2007) demonstrou-se a presença de espécies do género *Campylobacter* em moluscos e frutos do mar com uma prevalência de 20%, sendo *C. lari* identificado em todas as amostras positivas.

Referente a *Arcobacter sensu lato*, é sabido que vários frutos do mar se apresentam como reservatórios naturais destas bactérias, sendo também fonte de várias novas espécies com potencial patogénico desconhecido (Levican et al. 2012; Levican, Collado, and Figueras 2013). Apesar do risco, estão ainda relatados muito poucos estudos onde se avalia a prevalência destas espécies em moluscos e frutos do mar provenientes de ambientes aquáticos, sendo que alguns relataram prevalências na ordem dos 100% em amêijoas e 41,1% em mexilhões (Collado, Guarro, and Figueras 2009; Maugeri et al. 2000; Romero et al. 2002). Nestes estudos, *A. butzleri* foi relatada como a espécie mais prevalente nas amostras estudadas, seguida de *A. cryaerophilus*, refletindo assim a alta distribuição destes géneros pelas mais variadas matrizes alimentares.

Por outro lado, e à semelhança com produtos alimentares como frutas e vegetais, a água poderá desempenhar um importante papel na contaminação destes alimentos, sendo as descargas de água poluída com fezes em ambientes marinhos consideradas como um dos principais motivos da presença destas bactérias em moluscos e vários frutos do mar, representando desta forma um sério risco para a saúde pública (Salas-Massó et al. 2018).

1.5.4 Prevalência de espécies pertencentes a *Campylobacter* spp. e *Arcobacter sensu lato* em animais de estimação e selvagens

Desde a descoberta de bactérias da família *Campylobacteraceae*, várias espécies pertencentes ao género *Campylobacter* e grupo *Arcobacter sensu lato* foram isoladas e identificadas em vários animais, incluindo domésticos, animais de estimação, selvagens e aves (Facciola et al. 2017; Merga et al. 2011).

No que diz respeito a animais de estimação e outros animais de companhia, foram já realizados vários estudos por todo o Mundo indicando diferentes taxas de prevalência destas bactérias (Goni et al. 2017). Vários animais domésticos foram apresentados como possíveis hospedeiros para *Campylobacter* spp., onde diversos autores relataram o isolamento de *C. jejuni*, *C. coli*, *C. upsaliensis*, *C. helveticus* e *C. lari* a partir de amostras fecais caninas provenientes do continente Europeu e Asiático (Tsai et al. 2007; Rossi et al. 2008; Hald et al. 2012). Num estudo levado a cabo por Chaban, Ngeleka, and Hill (2010) destacou-se uma prevalência de *C. jejuni* até 7% em fezes de 70 cães saudáveis. Mais recentemente, Aslantaş (2019) estudou a prevalência de *Campylobacter* spp. em cães e gatos, apresentando níveis de 33,8% e 28,6% para cada um dos animais, respetivamente. Dos isolados pertencentes ao género *Campylobacter* de um total de 50 amostras, 28 foram identificadas como *C. jejuni* e 19 positivas para *C. coli*. Em relação a animais selvagens, foi já detetada a prevalência de *Campylobacter* spp. isolado a partir de animais terrestres, aves selvagens e répteis, tendo também sido fonte da descoberta de novas espécies pertencentes a este género como *C. testudinum* e *C. iguaniorum* (Petersen et al. 2001; Martín-Maldonado et al. 2019; Gilbert et al. 2019). Da mesma forma, num estudo para deteção de espécies de *Campylobacter* em animais do zoológico, Rossi et al. (2008) relatou a presença de *C. insulaenigrae* isolado de amostras fecais de focas e leões marinhos, enquanto *C. jejuni* foi isolado de elefantes, ursos e lêmures, e da mesma forma, observou-se também a prevalência de *C. coli* em amostras chimpanzés e dromedários.

Arcobacter sensu lato foi também isolado a partir de fontes de animais, incluindo animais de estimação, aves domésticas, animais selvagens e animais do zoológico. Tal como relatado para *Campylobacter* spp., estas bactérias foram já isoladas de cães e gatos domésticos tendo sido designados como importantes hospedeiros destes grupos bacterianos (Petersen et al. 2007). Estudos efetuados em países da Europa, isolaram *A. butzleri* e *A. cryaerophilus* obtidos de amostras de esfregaços fecais e orais de cães e gatos, com prevalências de 4% e 78%, respetivamente (Houf, Smet, and Bare 2008; Fera et al. 2009). Também animais selvagens foram já relatados como potenciais hospedeiros de *Arcobacter sensu lato*, sendo já isolado de animais selvagens terrestres como alpaca, rinoceronte preto e branco, gorila, gazela, ema e vários equídeos, bem como a partir de amostras fecais de répteis, tendo-se identificado várias espécies, incluindo *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii* (Gilbert et al. 2014; Wesley and Schroeder-Tucker 2011).

Dada a prevalência destas bactérias nestes animais, vários fatores de transmissão poderão estar por de trás da sua contaminação, sendo a água um dos principais apontados, quer através da ingestão ou contacto com fontes de água contaminada (Daczowska-Kozon and Brzostek-Nowakowska 2001; Miller et al. 2007).

1.6 Vias de transmissão do género *Campylobacter* spp. e *Arcobacter sensu lato*

As doenças transmitidas pela água e alimentos apresentam-se como uma importante preocupação de saúde pública em todo o mundo. Apesar do constante melhoramento das medidas de segurança alimentar efetuadas ao longo dos últimos anos, as doenças transmitidas por produtos contaminados têm-se revelado um grave problema de saúde pública (Dewey-Mattia et al. 2018).

Nesta perspetiva, segundo o relatório da Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças, constatou-se que *Campylobacter* é a causa mais comum de gastroenterite bacteriana, particularmente nos casos mais graves relatados (EFSA and ECDC 2018). Ainda assim, apesar do número de casos de doenças de origem em alimentos causadas pelos principais agentes patogénicos conhecidos ser considerável, em muitos casos estas são classificadas como tendo causa desconhecida. Esta incapacidade na identificação etiológica do agente da doença pode ser associada a diversos fatores, nomeadamente à falta de pesquisa de outros potenciais agentes causadores de doenças de origem bacteriana, ou à utilização de procedimentos de isolamento e identificação que não permitem a identificação correta do agente causador (Dewey-Mattia et al. 2018; EFSA and ECDC 2018; Barrett and Fhogartaigh 2017; Scallan et al. 2011).

Assim sendo, parece relevante a necessidade de uma maior vigilância dos surtos transmitidos através de alimentos e do próprio ambiente de maneira a melhorar o conhecimento sobre a epidemiologia da transmissão de doenças bem como o verdadeiro significado dos agentes patogénicos emergentes na sua incidência (Ferreira, Oleastro, and Domingues 2019).

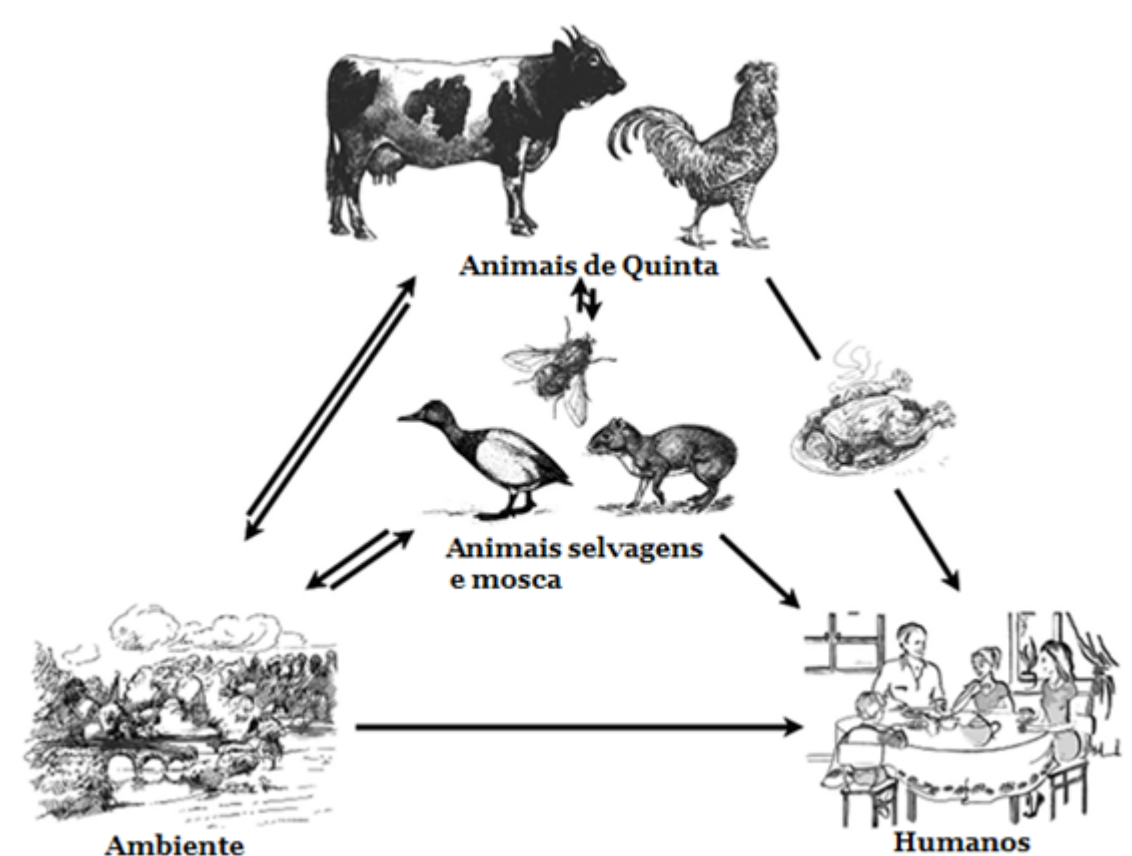


Figura 4: Rotas de transmissão associadas a agentes patogênicos emergentes. Adaptado de Bronowski, James, and Winstanley (2014).

1.6.1 Consumo de água contaminada

No que diz respeito ao meio ambiente, vários autores têm vindo a sugerir o envolvimento de diferentes corpos d'água como fontes de surtos associados a *Campylobacter* spp. e *Arcobacter sensu lato* (Pitkänen 2013; Lehner, Tasara, and Stephan 2005).

A água é um veículo comum nos surtos relatados de campilobacteriose, sendo a sua contaminação devida maioritariamente a fezes de pássaros selvagens e ao escoamento de fezes de animais contaminados, podendo a sua transmissão pôr em risco milhares de indivíduos (Frost 2001; Miller and Mandrell 2005; Liao et al. 2019). O primeiro surto reportado causado por *Campylobacter* associado ao consumo de água ocorreu em 1978 em Bennington, Vermont (Haley et al. 1980), posteriormente, numerosos relatórios acerca de surtos transmitidos através de ambientes aquáticos foram já publicados, como representado na Tabela 5.

Tabela 5: Lista de surtos publicados sobre de *Campylobacter* spp. transmitido pela água até ao ano de 2020. Adaptado de (Pitkänen 2013; Pedati et al. 2019; Gilpin et al. 2020; Paruch, Paruch, and Sørheim 2019).

País	Ano	Abastecimento de água	Número de infetados	Mecanismo de contaminação	Referência
Austrália	1997	Água da Chuva	23	Fezes de animais	(Merritt, Miles, and Bates 1999)
Canadá	1985	Abastecimento comunitário de águas subterrâneas	241	Neve derretida	(Millson et al. 1991)
	2000	Águas subterrâneas comunitárias	2300	Escoamento de água pela chuva	(Clark et al. 2003)
Dinamarca	1995	Águas subterrâneas comunitárias	2400	Contaminação de esgoto	(Peter et al. 1998)
	2007	Águas subterrâneas não tratadas	5800	Contaminação cruzada	(Vestergaard et al. 2007)
	2010	Abastecimento de água comunitário	20.000	Escoamento de água pela chuva	(Gubbels et al. 2012)
Finlândia	1985	Águas subterrâneas não comunitárias	35	Contaminação de esgoto	(Rautelin et al. 1986)
	1986	Águas subterrâneas não comunitárias	96	Contaminação de esgoto	(Rautelin et al. 1990)
	1998	Abastecimento municipal de água subterrânea	15.000	Contaminação cruzada	(Kuusi et al. 2005)
	2000	Águas subterrâneas comunitárias	5500	Escoamento de água pela chuva	(Ha et al. 2003)
	2001	Águas subterrâneas comunitárias	800	Infiltração no lago	(Ha et al. 2003)
	2001	Águas subterrâneas comunitárias	18.000	Escoamento de águas superficiais	(Ha et al. 2003)
	2004	Águas subterrâneas comunitárias	5100	Escoamento de água pela chuva	(Pitkänen et al. 2008)
	2007	Águas subterrâneas comunitárias	9500	Contaminação cruzada	(Laine et al. 2019)
França	2000	Águas subterrâneas comunitárias	2600	Falha na cloração das águas	(Sanitaire, Maurice, and Inter-re 2006)
Grécia	2009	Sistema de distribuição rural	-	Falha na cloração das águas	(Karagiannis et al. 2010)
Nova Zelândia	1986	Águas superficiais e subterrâneas comunitárias	19	Escoamento de água pela chuva	(Brieseman 1987)
	2016	Abastecimento municipal de água subterrânea	8320	Escoamento de água pela chuva	(Gilpin et al. 2020)
Noruega	1984	Abastecimento comunitário de água de superfície	680	Escoamento de água pela chuva	(Gondrosen et al. 1991)
	1988	Abastecimento comunitário de água de superfície	330	Falha na cloração das águas	(Melby et al. 2000)
	2007	Águas subterrâneas comunitárias	3600	Contaminação por esgoto	(Jakopanec et al. 2008)
	2019	Abastecimento de água comunitário	2000	Fezes de animais	(Paruch, Paruch, and Sørheim 2019)
Suécia	1980	Águas subterrâneas comunitárias	2000	Contaminação por esgoto	(Mentzing 1981)
Suíça	1998	Águas subterrâneas comunitárias	3400	Contaminação por esgoto	(Maurer and Stürchler 2000)
Suíça Reino Unido	2008	Abastecimento de água comunitário	1500	Contaminação cruzada	(Breitenmoser et al. 2011)
	1981	Águas subterrâneas não comunitárias	257	Fezes de animais	(Palmer, Gully, and White 1981)

Tabela 5 (continuação): Lista de surtos publicados sobre de *Campylobacter* spp. transmitido pela água até ao ano de 2020. Adaptado de (Pitkänen 2013; Pedati et al. 2019; Gilpin et al. 2020; Paruch, Paruch, and Sørheim 2019).

País	Ano	Abastecimento de água	Número de infetados	Mecanismo de contaminação	Referência
Reino Unido EUA	1993	Água de nascente não comunitária	43	Escoamento de água pela chuva	(Duke et al. 1996)
	2000	Abastecimento comunitário	442	Escoamento de água pela chuva	(Richardson et al. 2007)
	1978	Águas superficiais comunitárias	3000	Escoamento de água pela chuva	(Haley et al. 1980)
EUA	1983	Abastecimento comunitário de águas subterrâneas	865	Falha na cloração das águas	(Sacks et al. 1986)
	2017	Abastecimento comunitário	6	Contaminação cruzada	(Pedati et al. 2019)

Mais recentemente, Paruch, Paruch, and Sørheim (2019) relataram um surto de campilobacteriose em Bergen, na Noruega, descrito como o maior surto de *Campylobacter* spp. registado transmitido pela água na história desse país. Segundo os autores, ao investigar o foco da epidemia, identificou-se uma antiga piscina de contenção de água potável que havia sido contaminada com fezes provenientes de animais, tendo-se detetado bactérias do género *Campylobacter* em vários pontos do sistema de distribuição de água. No total, mais de 2000 moradores adoeceram dos quais 76 foram hospitalizados, sendo duas mortes suspeitas de estarem relacionadas com a infeção.

À semelhança do género *Campylobacter*, a presença de *Arcobacter sensu lato* em águas ambientais e a sua capacidade de sobreviver no meio aquático, tem revelado o seu potencial como agente patogénico emergente transmitido pela água, apontando para a água como fonte de transmissão (Ferreira, Oleastro, and Domingues 2016). Desta forma, vários autores têm vindo a considerar a água como uma importante fonte de disseminação de bactérias deste grupo em animais e humanos (Hsu and Lee 2015). De facto, alguns surtos de doenças causadas por espécies pertencentes a *Arcobacter sensu lato* foram associados a contaminação pela água. No ano de 1996, foi relatada a primeira ocorrência de gastroenterite por contaminação de ambientes aquáticos num acampamento de escoteiras em Idaho, tendo afetado 81% das pessoas presentes no acampamento, nomeadamente 79% funcionários e 80% campistas (Rice et al. 1999). Pela análise da água do poço utilizada como água potável, *A. butzleri* foi o único microrganismo isolado sendo assumido como a fonte do surto, devido a falhas no sistema de cloração automatizado da água do acampamento. Um segundo surto foi relatado em South Bass Island (Ohio), causando 1.450 casos de pessoas infetadas apresentando sintomas de câibras e diarreia, onde bactérias deste grupo foram isoladas de amostras de água de poço mais poluídas pelas fezes (Fong et al. 2007). *A. cryaerophilus* e outros patogénicos diferentes foram também isolados a partir amostras fecais de pacientes na Eslovênia durante um surto causado pela contaminação do sistema de água potável da região (Kopilovic et al. 2008).

A qualidade microbiológica da água é baseada nos níveis de indicadores de poluição fecal como preditores da presença de microrganismos patogénicos intestinais, ainda assim, nada se sabe sobre o potencial relacionamento entre esses indicadores e a presença de *Arcobacter sensu lato* em ambientes aquáticos (Collado et al. 2008). Assim sendo, determinar a sua real incidência pode ser uma tarefa dificultada, uma vez que a maioria dos testes laboratoriais não inclui a deteção de espécies deste género, e sendo que através do uso de métodos fenotípicos pode resultar numa identificação incorreta (Merga et al. 2014), o que pode refletir o número limitado de relatos de surtos através da ingestão de água contaminada por estas bactérias.

1.6.2 Consumo de alimentos contaminados

É sabido que os géneros alimentícios se apresentam como uma das principais vias de transmissão de potenciais agentes zoonóticos representando uma importante preocupação de saúde pública, que pode estar associada a várias doenças, resultantes da ingestão de produtos contaminados biológica ou quimicamente (Ferreira, Oleastro, and Domingues 2019). Também no caso de *Campylobacter spp.* e *Arcobacter sensu lato* os alimentos são considerados como a principal potencial via de transmissão destas bactérias ao Homem (Facciola et al. 2017; Lehner, Tasara, and Stephan 2005).

De facto, comer ou manusear carne crua ou mal-cozida de frango é apresentado como o principal fator de risco para contrair campilobacteriose, no entanto, mesmo o consumo de leite cru, carne vermelha crua, frutas e legumes foi já identificado como uma possível via de transmissão destas bactérias (Gras et al. 2012; Maina et al. 2004; Rapp et al. 2012). Em relação a surtos por *Campylobacter*, a preparação e consumo de carne de aves é responsável por cerca de 20 a 30% dos casos de campilobacteriose em humanos, por outro lado, 50 a 80% são atribuídos ao reservatório de frango como um todo, 20 a 30% dos casos causados por patógenos de bovinos e cerca de 0,4 % ao consumo de carne de porco (EFSA 2010; Birthe Hald et al. 2016; Newell et al. 2017). Da mesma forma, o leite de vaca e os produtos lácteos não pasteurizados bem como frutas e vegetais, são veículos comuns para a transmissão de *Campylobacter spp.* sendo que Facciola et al. (2017) e Evans et al. (1996) relataram um surto de campilobacteriose decorrente de uma visita de estudo a uma fazenda. Segundo este estudo, o surto ocorreu devido ao consumo de leite cru contaminado com *C. jejuni*, onde 20 das 38 crianças e 3 auxiliares adultos desenvolveram infeção gastrointestinal. No que se refere a frutas e vegetais, Kirk et al. (1997) publicaram um relatório acerca de um surto prolongado de infeção por *Campylobacter* através do consumo de pepino, onde 78 casos foram detetados, 16 dos quais foram confirmados como infeções por *Campylobacter spp.*.

Até hoje, veículos alimentares associados a possíveis infeções por espécies pertencentes ao grupo *Arcobacter sensu lato* ainda não foram estabelecidos, isto podendo ser devido à ocorrência de casos não diagnosticados e não relatados (Ferreira, Oleastro, and Domingues 2019; Ferreira et al. 2016). Desta forma, o único surto de origem alimentar causado por estas

bactérias, foi relatado em 2008 associado a *A. butzleri*, o qual ocorreu numa festa de casamento em Wisconsin (EUA), onde o consumo de frango assado foi o único fator significativamente associado à doença. Segundo os autores, 51 dos infetados com caso clínico comprovado apresentaram diarreia como principal sintoma e 12 apresentaram doenças não diarreicas com cólicas abdominais, fadiga, náusea, calafrios e dores no corpo (Lappi et al. 2013).

1.6.3 Contacto com animais domésticos e selvagens

Não só o consumo de água e alimentos contaminados, constitui uma via potencial de transmissão de agentes patogénicos emergentes como o caso de *Campylobacter spp.* e *Arcobacter sensu lato*. A alta prevalência destas bactérias em ambiente doméstico e selvagem, e o contacto com estes animais pode outra potencial via de transmissão destas bactérias ao Homem (Facciola et al. 2017; Houf, Smet, and Bare 2008). Assim, alguns autores identificaram o contacto com animais domésticos, especialmente cachorros e gatinhos, como um dos fatores de risco para casos esporádicos de infeção de doenças causadas por *Campylobacter spp.* (Adak et al. 1995; Neal and Slack 1997). Esta hipótese, foi também verificada por Tenkate and Stafford (2001) os quais demonstraram que cerca de 6% da campilobacteriose entérica humana é transmitida através de animais domésticos. Da mesma forma e tal como acontece com *Campylobacter*, no que se refere a *Arcobacter sensu lato*, alguns autores têm vindo a referir que o contato próximo com animais de estimação, como cães e gatos, pode fornecer uma via potencial de transmissão destas espécies ao ser humano (Stehr-Green and Schantz 1987; Hald and Madsen 1997). Ainda assim, o modo de transmissão destas bactérias dos animais para o homem ainda não foi completamente elucidado (Collado et al. 2011).

Várias outras fontes de contaminação, incluindo insetos, foram também investigadas como reservatório e possível foco de transmissão de espécies de *Campylobacter*, sendo sugerido que as moscas desempenham um papel na transmissão desta bactéria a partir de outras fontes contaminadas (Kaakoush et al. 2015). Desta forma, Nichols et al. (2012) relataram que se observava um aumento no número de casos de diarreia em Inglaterra e País de Gales, especialmente durante os meses de verão, observando-se uma similaridade no crescimento e amadurecimento de larvas que dão origem às moscas, aumentando o número de insetos adultos. Segundo os autores, a transmissão da doença ocorre através do contato direto das patas do inseto, probóscide e pelos corporais após serem contaminados com material fecal ou regurgitado contaminado com alimentos (Nichols 2005).

1.7. Resistência a antibióticos por *Campylobacter* e *Arcobacter sensu lato*

O aumento da resistência a agentes antimicrobianos por parte de organismos patogênicos tem sido geograficamente heterogêneo, refletindo tendências de boa e má administração de antibióticos nos diversos setores, com particularidade para o setor agropecuário (Yang et al. 2019). Sugerindo também que a utilização intensiva de antibióticos, tem levado a um aumento do número de estirpes resistentes e conseqüentemente uma eficácia reduzida na sua eliminação (Wegener 2003). Desta forma, a Organização Mundial da Saúde (OMS) aponta o aumento da resistência a antibióticos por agentes patogênicos como uma ameaça mundial considerável à saúde pública (WHO 2014). Nesta medida, tem existido um foco na limitação da utilização de antibióticos usados em humanos em ambiente clínico e em animais para alimentação, sendo relatado como o primeiro passo para a resolução de um problema significativo (FDA 2017).

A resistência a antimicrobianos na cadeia alimentar, incluindo a resistência a múltiplos antibióticos, tem-se revelado uma questão complexa, podendo o desenvolvimento e propagação da resistência de bactérias zoonóticas através dos seus reservatórios em animais, como aves, suínos e bovinos, ser posteriormente transmitida ao Homem (EFSA 2008). De facto, o aparecimento de estirpes do género *Campylobacter* e *Arcobacter sensu lato* multirresistentes, revela-se como um importante risco para a saúde pública, uma vez que esta característica pode não só dificultar o tratamento da doença por elas advinda, mas também levar a uma dispersão dos determinantes de resistência a elas associados (Looveren et al. 2001). No que diz respeito a isolados de corpos d'água superficiais e subterrâneos alguns estudos sugerem que os ambientes aquáticos podem fornecer um cenário ideal para a aquisição e disseminação de resistência a antibióticos, uma vez afetados frequentemente por atividades antrópicas (Martí, Variatza, and Balcazar 2014; Pitkänen 2013).

Nos últimos anos, um aumento na resistência de *Campylobacter* spp. a antibióticos tem sido relatado por todo o Mundo (Gharst, Oyarzabal, and Hussain 2013). Ainda que as infeções advindas desta bactéria não requeiram geralmente tratamento com antibióticos, sendo muitas vezes consideradas de curta duração, clinicamente leves e autolimitadas, em casos mais severos e em populações de risco, como por exemplo, crianças e idosos ou aqueles com condições subjacentes como os imunocomprometidos, poderá ser necessário recorrer à utilização destes fármacos no tratamento (Pacanowski et al. 2008). Os macrólidos, como azitromicina e eritromicina, apresentam-se como os principais compostos de escolha para o tratamento de campilobacteriose, também tetraciclina e fluoroquinolonas, como ciprofloxacina, foram já sugeridas como linhas terapêuticas alternativas, e em casos sistêmicos mais graves, poderá recorrer-se à injeção intravenosa de aminoglicosídeos, como gentamicina (Wieczorek and Osek 2013; Alfredson and Korolik 2007; Moore et al. 2006). No entanto, desde a década de 90, a resistência a agentes antimicrobianos como tetraciclina, fluoroquinolonas e, em menor extensão

macrólidos, tem aumentado tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, tendo-se reconhecido como um problema emergente de saúde pública (Engberg et al. 2001). Num estudo de comparação de resistências de isolados provenientes de várias fontes, incluindo ambientes aquáticos, na tentativa de compreender a fonte de transmissão de bactérias do gênero *Campylobacter* resistentes a antimicrobianos, observou-se que resistência a ciprofloxacina era mais comum em isolados humanos, e que isolados resistentes a eritromicina e tetraciclina foram maioritariamente provenientes de amostras de frango e isolados humanos. No caso de *Campylobacter* proveniente de amostras aquáticas estes mostraram resistência para antimicrobianos como a tetraciclina, nomeadamente em 3 de um total de 41 isolados, indicando assim menores taxas de resistência em estirpes de origem aquática (Lévesque, Frost, and Michaud 2007).

Outros estudos, considerando o consumo de água contaminada como uma via de transmissão, têm demonstrado elevadas taxas de suscetibilidade de *Campylobacter* proveniente de fontes aquáticas, a antimicrobianos como a eritromicina, estreptomicina, ciprofloxacina e gentamicina. Quanto à resistência das estirpes, estas apresentaram taxas superiores de resistência para as tetraciclina, onde, segundo os autores, tais resultados surgiram aparentemente devido ao seu uso na criação veterinária e produção de alimentos (Lindmark et al. 2004; Denis et al. 2012). Ainda assim, mais recentemente, Kanwal et al. (2019) procurou descrever os perfis de suscetibilidade de estirpes de *C. jejuni* provenientes de águas residuais, tendo-se observado um alto padrão de resistência para tetraciclina, eritromicina, cloranfenicol, ciprofloxacina, cefotaxima, gentamicina, ácido nalídixico e estreptomicina, e baixa resistência à tigeciclina. Segundo os autores, em comparação com os valores já apresentados, estas variações de resistência aos medicamentos podem dever-se principalmente a efeitos climáticos bem como a diferenças nas práticas e regulamentações de criação de aves dos diferentes países, muitas vezes resultando na contaminação de ambientes aquáticos com estas bactérias multirresistentes.

De forma semelhante ao que acontece quando é diagnosticada campilobacteriose, devido à autolimitação de enterites causadas por algumas espécies de *Arcobacter sensu lato*, a prescrição de antimicrobianos nem sempre acontece, sendo que apenas ocorre em caso de persistência e gravidade dos sintomas (Collado et al. 2011). Com base em alguns estudos, algumas espécies deste gênero revelaram-se suscetíveis para algumas classes de antibióticos como fluoroquinolonas, tetraciclina e aminoglicosídeos, sendo por isso aconselhados para o tratamento de infeções por bactérias deste grupo (Collado et al. 2011; Ferreira et al. 2016; Rathlavath et al. 2017). Quanto aos perfis de resistência de bactérias provenientes de ambientes aquáticos, também alguns trabalhos focados nesta análise foram já apresentados, sendo que, segundo uma recente meta-análise levada a cabo por Ferreira et al. (2019), observou-se um nível percentual elevado de isolados de *Arcobacter sensu lato* de fontes de água resistentes aos antibióticos cefalotina, cefotaxima e ampicilina. Em contraste, baixas frequências de resistência foram descritas para antibióticos como eritromicina, tetraciclina, estreptomicina e gentamicina. No entanto, quando comparados com isolados humanos e alimentares, estes revelaram-se

menos resistentes a antimicrobianos como eritromicina, ciprofloxacina, tetraciclina, gentamicina e estreptomicina. Ainda assim, este tipo de análise é dificultada dado que nenhum protocolo de referência nem critérios interpretativos padrão estão disponíveis para o teste de suscetibilidade antimicrobiana deste grupo bacteriano, o que resulta numa limitação da avaliação da suscetibilidade antimicrobiana para estas bactéria (Lehours et al. 2007; Ferreira et al. 2016).

Vários estudos têm ainda reportado um perfil de multirresistência em espécies de *Campylobacter* e *Arcobacter sensu lato*. Desta forma, num estudo de avaliação do perfil de resistência a antimicrobianos em isolados de fontes de água ambiental verificou-se uma elevada presença de bactérias multirresistentes, sendo que 100 % dos isolados de *Campylobacter* spp. analisados apresentavam resistência a pelo menos três antimicrobianos, dos quais 8 foram identificados como *C. jejuni*, 8 como *C. coli* e 6 *C. lari* (Karikari et al. 2016). De igual forma, num outro estudo de Rathlavath, Kohli, Sanjit, et al. (2017) destacou-se a frequência de bactérias resistentes a múltiplos antibióticos a níveis consideráveis, observando-se que num total de 27 isolados de *Arcobacter sensu lato* provenientes de águas costeiras, 33,3 % (9/27) eram resistentes a mais de três classes de antibióticos. Este aumento de resistências deve-se principalmente à exposição excessiva dos animais de consumo a diferentes antimicrobianos durante a sua produção, assim como ao uso desmedido destas substâncias pela população humana, podendo desta forma levar à disseminação destas bactérias resistentes por toda a cadeia alimentar bem como uma ampla variedade de ambientes aquáticos, quer por contacto com esgoto urbano com níveis mais elevados de indicadores fecais ou mesmo através de fezes de animais contaminados por estas bactérias (Ferreira et al. 2016; Collado et al. 2010).

1.8 Metodologias usadas para isolamento, identificação, genotipagem e avaliação de perfil fenotípico de resistência de *Campylobacter* e *Arcobacter sensu lato*

1.8.1 Isolamento de *Campylobacter* e *Arcobacter sensu lato*

Em contexto laboratorial, várias espécies pertencentes ao género *Campylobacter* spp. e *Arcobacter sensu lato* foram já isoladas a partir dos mais diversos ambientes e hospedeiros.

As fezes geralmente apresentam um número elevado de células viáveis de *Campylobacter*, tornando sua deteção facilmente possível através de plaqueamento direto em meios seletivos (Fitzgerald et al. 2017). Por outro lado, durante o isolamento a partir de amostras alimentares e ambientais, como é o caso da água, a presença de outras bactérias com tempo de desenvolvimento mais rápido e o menor número de células presentes podem limitar o seu isolamento, sendo necessária uma etapa de pré-enriquecimento que desempenha um papel essencial no aumento do número de células de *Campylobacter* para posterior deteção (Gharst,

Oyarzabal, and Hussain 2013). Desta forma, com vista a melhorar o processo de recuperação de *Campylobacter* spp. durante o passo de enriquecimento, várias modificações nos procedimentos e nos meios de enriquecimento existentes foram propostas, como alterações na concentração e combinação de antibióticos e outros agentes seletivos utilizados, a introdução tardia de agentes seletivos ou temperaturas elevadas de incubação e a adição de compostos de maneira a reduzir os efeitos tóxicos dos derivados de oxigénio durante o processo (Bolton, Coates, and Hutchinson 1984; Corry et al. 1995). Para tal, vários caldos de enriquecimento como caldo *Bolton*, caldo de enriquecimento *Campylobacter* e caldo *Preston*, estão disponíveis para serem utilizados antes da etapa de isolamento. Quando comparados quanto à sua eficácia, o caldo *Bolton* foi o que ofereceu o melhor equilíbrio entre a inibição de organismos concorrentes e a multiplicação de *Campylobacter* spp. (Baylis et al. 2000). Em relação aos meios de cultura, no ano de 1977, foi desenvolvido o primeiro meio de cultura seletivo para *C. jejuni* e *C. coli*, desde então, vários meios de cultura seletivos sólidos e líquidos para cultivar *Campylobacter* spp. foram descritos e avaliados, como o caso do meio *Preston*, CCDA (do inglês - *charcoal cefoperazone desoxycholate agar*) e ágar *Butzler*. Ainda assim, a utilização de CCDA e incubação a 42 °C em vez de 37 °C é geralmente a metodologia predominante, pois permite o isolamento de mais espécies de *Campylobacter* (Habib et al. 2008; Kiess, Parker, and McDaniel 2010). De forma geral, todos os meios seletivos contêm um meio basal, sangue ou outros agentes, como carvão que atua na eliminação da toxicidade do oxigénio (Fitzgerald, Whichard, and Fields 2008). Para além disso podem ser suplementados com uma variedade de combinações de antibióticos aos quais as espécies termófilas deste género são intrinsecamente resistentes, nomeadamente, polimixina, vancomicina, trimetoprim, rifampicina, cefoperazona, cefalotina, colistina, cicloheximida e/ou nistatina, suprimindo o desenvolvimento de muitas bactérias pertencentes à flora microbiana presente nas amostras, o que permite o isolamento de espécies de *Campylobacter* (Vandenberg, Skirrow, and Butzler 2015; Zhang and Sahin 2020).

Assim, no que toca a amostras de água, o método padrão para a deteção de espécies de *Campylobacter* termotolerantes é baseado em filtração por membrana (ISO17995 2005). Neste procedimento, as amostras de água são filtradas passando através de filtros com tamanho de poro de 0,45 µm posteriormente colocados no meio de enriquecimento. Segundo a norma, é utilizada uma etapa de enriquecimento, podendo ser utilizados tanto caldo *Preston* como caldo *Bolton*. Após incubação do caldo a 37 °C durante 48 h, alíquotas de meio são semeadas em placas de mCCDA (do inglês - *modified charcoal cefoperazone desoxycholate agar*) e incubadas a 41,5 °C por 48 h. Um total de 4 dias, é necessário de maneira a confirmar a presença de colónias de *Campylobacter* spp., sendo que no caso de um resultado positivo presuntivo, é necessária confirmação, tornando o processo vários dias mais longo.

Tal como acontece com o género *Campylobacter*, diversos estudos foram desenvolvidos abordando o isolamento de espécies de *Arcobacter sensu lato*. No ano de 1977, foi relatado o primeiro isolado destas bactérias proveniente de fetos bovinos abortados, tendo sido recuperado

utilizando o meio Leptospira Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) (Ellis et al. 1977). Vinte anos depois, Atabay and Corry (1997) propuseram a utilização de um meio de enriquecimento suplementado com três antibióticos distintos, cefoperazona, anfotericina B e teicoplanina (CAT), para isolamento de *Arcobacter sensu lato* em frango, sendo as amostras, após uma etapa de enriquecimento, transferidas para meio com agar suplementado também com CAT. Neste estudo, os autores avaliaram também o isolamento das amostras em placas de agar suplementado com sangue recorrendo ao método da filtração passiva, observando resultados positivos no isolamento destas bactérias para ambos os protocolos (Atabay and Corry 1997). Mais tarde, um novo método de isolamento seletivo foi proposto, pela adição de cinco antibióticos distintos ao meio de enriquecimento com concentrações ajustadas, e ao meio com agar onde as estirpes seriam cultivadas, tendo demonstrado igualmente altos níveis de inibição do crescimento de microflora acompanhante (Houf et al. 2001). Nesse mesmo estudo foram comparadas duas metodologias de maneira a que se avaliassem as diferenças nas taxas de isolamento destes microrganismos, uma com a utilização de um passo de enriquecimento, e outro pelo método de isolamento direto, obtendo-se percentagens de isolados positivos de 73% e 50%, respetivamente. Apoiando a hipótese da utilização de um passo de enriquecimento, o qual leva a taxas de recuperação de espécies de *Arcobacter sensu lato* superiores (Houf et al. 2001). Ainda assim, o meio de enriquecimento projetado por Atabay and Corry (1997), tem-se revelado um dos métodos mais usados e apoiado por vários estudos no isolamento deste tipo de bactérias (Collado et al. 2011).

Outros parâmetros importantes como as diferenças nas condições de cultura, poderão ter influência no isolamento de bactérias pertencentes a *Arcobacter sensu lato*, nomeadamente o tempo de incubação e as condições atmosféricas a que estas estão sujeitas. Neste contexto, Houf et al. (2001) observou que colónias de *A. butzleri* podem ser visíveis após 24 h de incubação após uma etapa de enriquecimento prévio, ainda assim, espécies como *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii* podem necessitar de tempos de 48 h ou até 72 h de incubação de maneira a que estas se tornarem detetáveis.

Também no que diz respeito às condições atmosféricas, Levican et al. (2014) realizou um estudo de comparação entre duas condições, nomeadamente incubação sob condições de aerobiose ou microaerobiose. Durante o processo, foi observado um aumento relativamente ao número de isolados de *Arcobacter sensu lato* quando submetidos a atmosferas de aerobiose comparativamente com a incubação em ambiente de microaerofilia, influenciando de igual forma a diversidade de espécies isoladas (Levican et al. 2014). Assim sendo, os autores sugerem a incubação aeróbia como principal metodologia prática rotineira para a cultura e isolamento destas bactérias.

Desta forma, referente à deteção destas bactérias em amostras ambientais, um dos métodos utilizados requer um passo de filtração da água através da utilização de filtros com poros de 0,22 µm ou 0,45 µm (Shrestha et al. 2019; Levican, Collado, and Figueras 2016). Segundo os autores

Levican, Collado, and Figueras (2016), após filtração, os filtros são introduzidos em meio *Arcobacter* suplementado com CAT e incubados aerobicamente (30°C, 48 a 72 h). Após o enriquecimento, é utilizada a técnica de filtração por membrana, usando filtros de membrana de nitrocelulose de tamanho de poro de 0,45 µm colocados na superfície de placas, posteriormente incubadas aerobicamente (30°C, 48 a 72 h).

Contudo, apesar de vários meios e procedimentos terem já sido utilizados para isolar e detectar bactérias destes grupos bacterianos, um método de referência padronizado ainda não foi proposto (Levican et al. 2014; Collado et al. 2011).

1.8.2 Identificação de *Campylobacter* spp. e *Arcobacter sensu lato*

Dentro das espécies de *Campylobacter* com capacidade de se desenvolver a 42 °C, as espécies mais frequentemente encontradas são *C. jejuni* e *C. coli*, sendo relatadas como principais agentes causadores de enterite humana. No entanto, baixas frequências de outras espécies também foram descritas em casos de doenças alimentares em humanos, causadas por exemplo, por *C. lari*, *C. hyointestinalis*, *C. fetus* e *C. upsaliensis* (Natsos et al. 2019; Steinhäuserova et al. 2001). Desta forma, torna-se cada vez mais necessária a identificação correta destes agentes zoonóticos, de maneira a que se consigam traçar rotas de transmissão de bactérias deste gênero, bem como avaliar a sua incidência e comportamento no ambiente e animais. Ainda assim, a sua identificação é difícil devido não só à taxonomia complexa e em rápida evolução, mas também a inércia bioquímica de *Campylobacter* spp., uma vez que estes são bioquimicamente inativos quando comparados com outras bactérias, portanto, poucos testes fenotípicos estão disponíveis de maneira a identificá-los (Steinhäuserova et al. 2001).

Vários métodos alternativos e rápidos têm sido desenvolvidos para a detecção de *Campylobacter* spp., incluindo métodos de hibridação fluorescente *in situ* (FISH – do inglês *fluorescence in situ hybridization*) (Lehtola et al. 2006) e testes imunológicos como ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA – do inglês *enzyme-linked immunosorbent assays*) (Oyarzabal and Battie 2012). Ainda assim, os métodos de confirmação mais eficazes e comumente utilizados são os baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR – do inglês *polymerase chain reaction*), uma vez que as reações fenotípicas são frequentemente atípicas e difíceis de interpretar, como o caso do teste de hidrólise do hipurato para diferenciar as espécies *C. coli* e *C. jejuni* (Lehtola et al. 2006).

Desde o primeiro ensaio de PCR desenvolvido por Oyofu et al. (1992) para a identificação de *Campylobacter* spp., esta técnica tornou-se uma das plataformas usadas para a identificação destes patogênicos emergentes. Passados 4 anos, Linton, Owen, and Stanley (1996), desenvolveram um outro ensaio PCR específico para o gênero *Campylobacter* utilizando regiões conservadas na sequência de *16S rRNA* ocorridas entre os nucleótidos 412-1128. Mais tarde, uma série de ensaios de PCR *multiplex* (mPCR) foram projetados para detectar a presença de

duas ou mais espécies na mesma amostra, nomeadamente para discriminar as diferentes espécies de *Campylobacter*. Desta forma, Wang et al. (2018) desenvolveram um ensaio para a identificação de *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* e *C. fetus* provenientes de amostras clínicas. Este ensaio foi desenhado para identificar simultaneamente o gene *23S rRNA* de *Campylobacter* spp., bem como genes característicos das principais espécies causadoras de doenças em humanos, observando-se a deteção de todas as cinco espécies com alto grau de especificidade.

Recentemente surgiu uma técnica emergente para rápida identificação e classificação de microrganismos por espetrometria de massa (MALDI-TOF MS - do inglês *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*). Este sistema deteta e identifica proteínas através da determinação da razão massa/carga de fragmentos específicos individuais da célula bacteriana. O padrão proteico é utilizado para criar um espectro de massa de cada organismo individual, sendo posteriormente comparado com uma base de dados (Patel 2015). Os organismos relacionados são indicados com um valor indicando o nível de confiança na identificação, assim, de acordo com esse valor, a identificação pode ser feita ao nível de família, género ou mesmo espécie (Patel 2015). Alguns autores efetuaram já estudos de identificação de espécies pertencentes ao género *Campylobacter*, observando níveis de precisão próximos de 100% (Bessède et al. 2011; Martiny et al. 2010).

Tal como acontece, com o género *Campylobacter*, a deteção e identificação de espécies pertencentes ao grupo *Arcobacter sensu lato* é problemática, devido não só às dificuldades de multiplicação destas bactérias, mas também à inércia metabólica que estas apresentam. Outro fator a ter em conta são as semelhanças morfológicas e bioquímicas entre espécies dos dois grupos bacterianos, onde a identificação incorreta pode ocorrer quando se usam apenas de métodos convencionais e testes fenotípicos (González, García, and Fernández 2012).

Desta forma, a utilização de métodos moleculares, como a técnica de PCR, tem sido a metodologia comumente utilizada e considerada como melhor opção para a identificação e diferenciação das suas espécies, uma vez que o DNA bacteriano não depende das condições de crescimento da população, e abriga regiões com diferentes graus de variabilidade que permitem direcionar sequências específicas de maneira a identificar um determinado género ou espécie, ou mesmo diferenciar estirpes pertencentes à mesma espécie (González, García, and Fernández 2012). Segundo esta metodologia, Harmon and Wesley (1996) foram os primeiros a propor um par de oligonucleótidos iniciadores tendo como alvo o gene *16S rRNA*, específicos para *Arcobacter sensu lato*, resultando na amplificação de um fragmento com 1223 pb.

Posteriormente, foi proposto um mPCR (Houf et al. 2000) para a identificação das espécies mais prevalentes e comumente relacionadas com doenças em humanos e animais, nomeadamente *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii*, sendo relatado como o mais utilizado a nível mundial para a deteção e diferenciação de espécies pertencentes a *Arcobacter*

sensu lato (González, García, and Fernández 2012). Este método baseia-se na utilização de diferentes pares de oligonucleótidos iniciadores com alvos para os genes *16S* e *23S rRNA* permitindo assim a amplificação de fragmentos específicos de cada espécie (Houf et al. 2001). Um mPCR mais recente foi desenvolvido por Doudah et al. (2010) permitindo a diferenciação de cinco espécies de *Arcobacter sensu lato* associadas a animais e humanos, nomeadamente *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii*, *A. cibarius* e *A. thereius*. Neste ensaio os autores utilizaram pares de oligonucleótidos iniciadores tendo como alvo dois marcadores, o gene *gyrA* para *A. cryaerophilus* e o gene *23S rRNA* para as restantes espécies. Um estudo de comparação do desempenho das metodologias de identificação deste grupo, foi levado a cabo por Levican e Figueras (2013), tendo-se destacado que nenhum dos métodos foi totalmente confiável e tendo demonstrado diferentes taxas de erros de identificação para espécies-alvo e não-alvo. Ainda assim, observou-se que a técnica de mPCR descrita por Houf et al. (2000) foi 100% confiável para a identificação de *A. butzleri*, não se apresentou o mesmo para a técnica descrita por Doudah et al. (2010), uma vez que não é considerada confiável para essa espécie bem como *A. cryaerophilus*, sendo, no entanto, fidedigno na identificação de todas as restantes espécies. No entanto os autores sugerem o uso destas metodologias em paralelo para identificação dos isolados, ainda que com a diversidade de espécies atualmente conhecidas de *Arcobacter sensu lato* em diferentes ambientes, estas poderão ser alteradas no futuro.

1.8.3 Genotipagem de *Campylobacter* spp. e *Arcobacter sensu lato*

As limitações associadas a métodos de subtipagem fenotípica, juntamente com o crescimento intensificado de técnicas moleculares, levaram ao desenvolvimento de uma ampla gama de métodos de subtipagem molecular (Fitzgerald, Whichard, and Fields 2008). Enquanto traços fenotípicos são considerados como base de métodos de fenotipagem, os genes responsáveis pela produção destas características fenotípicas concebem a base para a genotipagem (Mohan 2011).

A utilização de metodologias de genotipagem permite não só a diferenciação entre estirpes da mesma espécie, conseguindo-se avaliar a diversidade genética entre isolados, mas também a deteção de possíveis contaminações cruzadas no ambiente e diferentes amostras, padrões de infeção e rotas de transmissão, construção de árvores filogenéticas, e ainda oferecer informação epidemiológica das estirpes na expectativa de se poder identificar o foco de contaminação ou infeção (Doudah et al. 2014; Magana et al. 2017).

Devido à importância clínica de *Campylobacter* spp. e *Arcobacter sensu lato*, várias ferramentas de genotipagem molecular foram desenvolvidas, nomeadamente, métodos moleculares como eletroforese de campo pulsado (PFGE – do inglês *pulsed-field gel electrophoresis*), tipagem por sequenciação de múltiplos loci (MLST – do inglês *multilocus sequence typing*), análise do polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP – do inglês *amplified fragment length polymorphism*), reação em cadeia da polimerase por consenso intergénico repetitivo enterobacteriano (ERIC-PCR - do inglês *enterobacterial*

repetitive intergenic consensus-PCR) e sequenciação do genoma total (WGS – do inglês *whole genome sequence*).

Em contraste com a eletroforese de DNA convencional, o mecanismo da técnica de PFGE é baseado na migração e separação de fragmentos de DNA bacteriano através de mudanças alternadas na corrente elétrica (Guzmán-Martín, González-Bustos, and Gutiérrez-Fernández 2019). Desde a sua aplicação em bactérias pertencentes à família *Campylobacteraceae*, como *Arcobacter sensu lato* e *Campylobacter* spp., este método tem sido amplamente utilizado para identificar potenciais fontes de contaminação humana, ainda assim por outro lado é considerado por alguns autores um processo muito complexo e dispendioso (Guzmán-Martín, González-Bustos, and Gutiérrez-Fernández 2019; Carrillo et al. 2016; Doudiah et al. 2014).

Outra metodologia aplicada à genotipagem destas bactérias da família *Campylobacteraceae*, é o MLST, aplicado na análise de sequências de fragmentos provenientes de diferentes genes do genoma bacteriano, sendo posteriormente comparada com bancos de dados (Maiden et al. 1998; Guzmán-Martín, González-Bustos, and Gutiérrez-Fernández 2019). Ainda que atualmente a técnica de MLST seja um dos principais sistemas de genotipagem utilizado para caracterização epidemiológica e rastreio de fontes de vários agentes patogénicos, como o caso de *Campylobacter like organisms*, este nem sempre é adequado para estudos epidemiológicos de curta duração e vigilância de rotina na identificação de surtos, verificando-se o mesmo tipo de sequências com casos não relacionados (Carrillo-Ávila, Sorlózano-Puerto, and Pérez-Ruiz 2016; Clark et al. 2005), ou mesmo não sendo encontrada uma associação entre os tipos de sequência e o hospedeiro ou fontes de contaminação (Collado et al. 2011).

Uma metodologia de genotipagem introduzida para caracterizar diversas estirpes de bactérias responsáveis por vários surtos de gastroenterites no homem e animais, é a designada ERIC-PCR. Sendo uma das técnicas de diferenciação de estirpes mais utilizadas, esta consiste na utilização de oligonucleótidos iniciadores direcionados para sequências repetitivas que ocorrem em várias cópias de alguns genomas bacterianos, produzindo “impressões digitais” de fragmentos DNA com tamanhos diferentes (Adzitey et al. 2013; González, García, and Fernández 2012). Nesta medida, vários estudos relataram já o poder desta técnica aplicada a bactérias dos géneros *Campylobacter* e diferentes espécies do grupo *Arcobacter sensu lato*, tendo demonstrado não só a extensa diversidade genómica presente em isolados dos dois grupos bacterianos, mas também a rapidez, facilidade e papel económico da técnica (Collado et al. 2010; Staji, Birgani, and Raeisian 2018).

Da mesma forma, a técnica de WGS (*Whole Genome Sequencing*), tem-se revelado um potencial método alternativo não só para rastrear surtos de doenças de origem bacteriana, mas também possuindo um importante papel na caracterização molecular destes mesmos agentes zoonóticos (Carrillo et al. 2012). Tal como o nome indica, esta tecnologia consiste na sequenciação do genoma completo, sendo esta técnica utilizada com o intuito de elucidar os genomas individuais

de agentes patogénicos transmitidos por alimentos durante os surtos, sendo por isso, a abordagem mais utilizada no diagnóstico e vigilância nos Estados Unidos e agências reguladoras globais de segurança alimentar (Ricke et al. 2019; Taboada et al. 2017). Desta forma, vários estudos relataram já a utilização desta técnica em espécies do género *Campylobacter spp.* e grupo *Arcobacter sensu lato* de forma a obter-se caracterizações epidemiológicas, incluindo vigilância e deteção de surtos, bem como análise de variabilidade genética (Llarena, Taboada, and Rossi 2017; Joensen et al. 2017; Cha et al. 2016; Isidro et al. 2020).

1.8.4 Avaliação do perfil de resistência a antimicrobianos

A suscetibilidade das bactérias aos antibióticos é um pré-requisito para que os agentes antimicrobianos sejam eficazes na sua eliminação ou inibição. No entanto, a contaminação do ambiente por antibióticos advindos de atividades antropogénicas, aumenta a prevalência de bactérias resistentes a compostos antimicrobianos (Xie, Shen, and Zhao 2018). Uma vez que podem ser excretados sem a sua metabolização, os próprios antimicrobianos podem ser detetados em ambientes agropecuário, devido à sua elevada administração em animais destinados à produção alimentar. Por sua vez, o estrume contaminado por estes pode também ser aplicado como fertilizante em terras agrícolas, e contaminar conseqüentemente o solo e água, criando assim uma maior variedade de rotas de transmissão destas bactérias resistentes (Hudson et al. 2017).

Desta forma, testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos desempenham um papel importante na orientação da terapia e monitorização epidemiológica da resistência de agentes patogénicos emergentes (Ge et al. 2013). Estes testes envolvem a medição da atividade do antibiótico contra o microrganismo de teste, determinando a concentração mínima inibitória (CMI) ou o diâmetro da zona de inibição, onde critérios interpretativos são utilizados de maneira a classificar o organismo como suscetível, intermédio ou resistente (Ge et al. 2013). Estas metodologias de teste fenotípico incluem vários métodos de difusão (disco, comprimido e Etest®) e diluição (diluição em caldo e agar) (Ge et al. 2013). Em relação à validação e padronização dos métodos, estes são conduzidos principalmente através de organizações que desenvolvem padrões de consenso, nomeadamente o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) nos Estados Unidos e o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) na Europa (Ge et al. 2013).

Embora *Campylobacter ssp.* tenha sido reconhecido pela primeira vez como um importante agente patogénico humano em 1972, apenas em 2004 foram desenvolvidos métodos de teste de suscetibilidade padronizados, sendo a primeira metodologia de avaliação antimicrobiana baseada no método de diluição em agar (McDermott et al. 2004). No ano seguinte, após a padronização deste teste, uma nova metodologia foi desenvolvida, através da microdiluição em caldo para bactérias do género *Campylobacter* (McDermott et al. 2005). Para a realização de ambos os testes de diluição, uma série de placas, tubos ou poços em placas de microtitulação,

contendo diluições de duas vezes do agente antimicrobiano, são preparadas e posteriormente inoculadas com uma suspensão padronizada do microrganismo. Após a sua incubação, os resultados são examinados e os CMIs são determinados como a menor concentração antimicrobiana que inibe o crescimento bacteriano (CLSI 2012a).

Outro método desenvolvido para a avaliação da suscetibilidade antimicrobiana é designado por Etest® (PDM Epsilometer, AB Biodisk, Solna, Suécia; adquirido pela bioMérieux em 2008). Ao contrário do teste de diluição, em que é necessária a preparação da diluição do antibiótico, esta metodologia consiste na aplicação de tiras, as quais contêm um gradiente pré-definido e estável de concentrações antimicrobianas ao longo de todo o seu comprimento, tornando a técnica uma maneira conveniente e econômica de observar valores de CMI numa ampla faixa de diluição de concentrações de drogas (Ge et al. 2013). A simplicidade, precisão e confiabilidade da metodologia tornou-a apropriada e conveniente para comercialização aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) (Joyce et al. 1992).

Da mesma forma, devido à sua conveniência, flexibilidade e baixo custo, o método de difusão em disco foi já relatado como metodologia padrão amplamente utilizada para avaliação da suscetibilidade bacteriana, sendo aplicada no teste de suscetibilidade de vários agentes patogênicos de crescimento rápido, e também modificada de maneira a testar alguns organismos fastidiosos (CLSI 2012b; EUCAST 2012). Inicialmente, uma suspensão padronizada é preparada e inoculada em placa, sendo de seguida colocado o disco com o antibiótico sobre a placa inoculada. Desta forma, ao antibiótico é permitido difundir através do agar solidificado, resultando na formação de uma zona de inibição de crescimento bacteriano. Uma vez relatada como uma metodologia com potencial na avaliação da suscetibilidade de rotina em laboratório, esta é amplamente aceite, oferecendo um protocolo simples e de baixo custo (Jorgensen and Ferraro 2009).

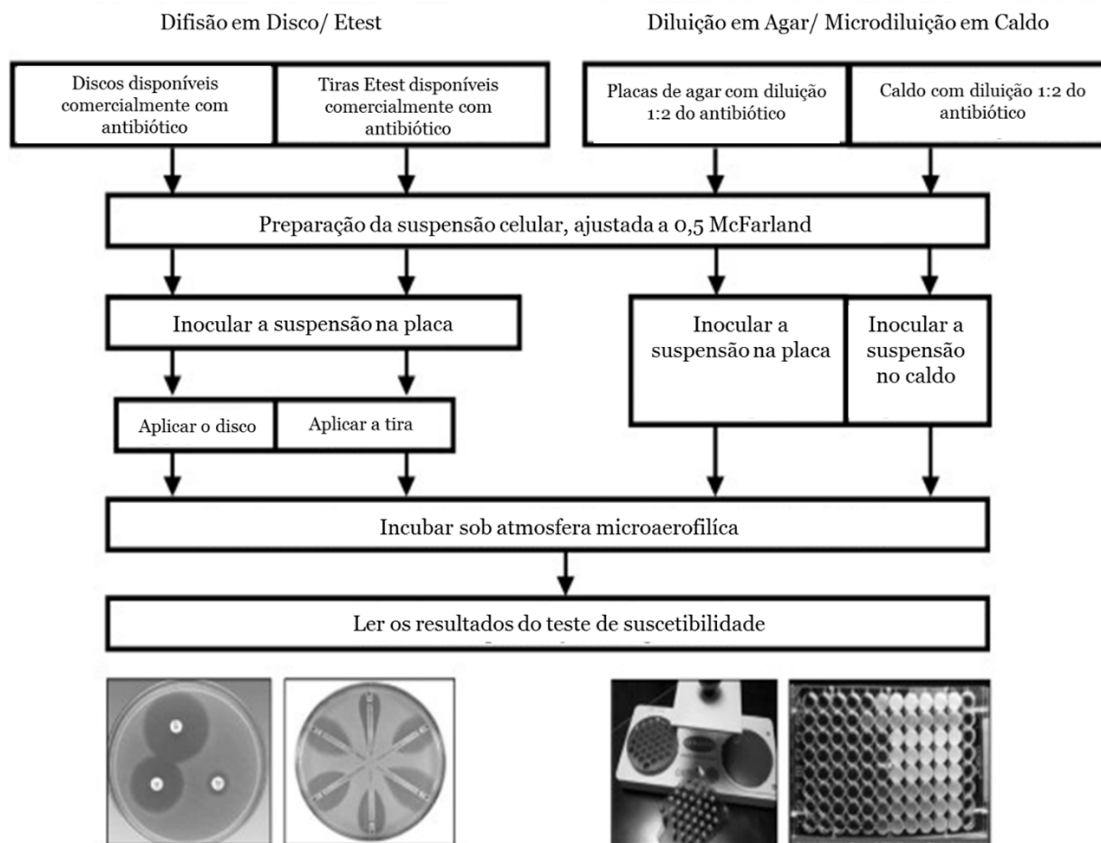


Figura 5: Diagrama esquemático dos quatro métodos de teste de suscetibilidade a antimicrobianos: difusão em disco, *Etest*, diluição em agar e microdiluição em caldo. Adaptado de (Ge et al. 2013).

Desta forma, face ao aparecimento de bactérias resistentes a diferentes classes de antibióticos, a escolha do método de teste de avaliação antimicrobiana deve ser baseada quer no propósito da sua utilização, quer na capacidade do laboratório, bem como na disponibilidade de métodos de teste padronizados e pontos de interrupção, reprodutibilidade, precisão, facilidade de desempenho, flexibilidade e custo, uma vez que um grande aumento na resistência de bactérias está a ocorrer por todo o mundo, colocando em risco a eficácia dos antibióticos que salvaram já milhões de vidas (Ge et al. 2013; Ventola 2015).

Assim, torna-se relevante o aprofundamento dos estudos relativos à prevalência, diversidade e resistência a antibióticos destas bactérias, tendo em conta não só os dados descritos acerca de *Campylobacter* spp. e *Arcobacter sensu lato* como agentes patogénicos emergentes, mas também devido ao seu importante papel de virulência e patogenicidade associada, revelando o seu potencial risco para a saúde pública.

Capítulo 2: Objetivos

Microrganismos do género *Campylobacter* spp. e grupo *Arcobacter sensu lato* têm recebido foco e emergido como importantes agentes patogénicos zoonóticos de origem alimentar, causando doenças e infeções bacterianas muitas vezes graves quer em humanos, quer em animais. De facto, bactérias destes grupos bacterianos foram já consideradas por diversas entidades, como organismos que representam um perigo grave para a saúde pública. Nesta perspetiva, tem-se vindo a aumentar o interesse na investigação destes agentes patogénicos de maneira a compreender melhor o seu perfil de distribuição e resistência a agentes antimicrobianos, na esperança de se poder identificar o foco de contaminação, prevenir a contaminação do homem e melhorar o seu tratamento. Desta forma, ainda que a maioria das infeções humanas seja atribuída principalmente a reservatórios de aves, a contribuição da água tem sido reconhecida como uma das vias de transmissão mais prováveis. Isto tem direcionado vários estudos para a avaliação da incidência destes microrganismos em ambientes aquáticos, no entanto, são escassos os estudos elaborados em Portugal. Assim, o objetivo global deste trabalho prende-se com a avaliação de águas superficiais como reservatório de *Campylobacter* spp. e *Arcobacter sensu lato*, com foco em águas de rio e seus afluentes e águas de nascentes. Assim, os objetivos específicos propostos para a realização deste trabalho foram os seguintes:

- Analisar a prevalência de *Campylobacter* spp. e *Arcobacter sensu lato* em amostras de diferentes corpos de água recolhidos em diversos pontos do concelho da Covilhã;
- Avaliar a diversidade em relação a espécies e características genéticas entre os isolados obtidos das amostras contaminadas por *Campylobacter* spp. e *Arcobacter sensu lato*;
- Avaliar o perfil de resistência a diferentes antibióticos das estirpes identificadas.

Capítulo 3: Materiais e Métodos

3.1 Estirpes de referência

Ao longo da realização do trabalho de investigação foram usadas estirpes como referência, *A. butzleri* LMG 10828, *A. cryaerophilus* LMG 10829, *A. skirrowii* LMG 6621 e *C. jejuni* NCTC 11168, como controlos positivos de forma a validar os resultados obtidos.

3.2 Armazenamento das estirpes

Todas as estirpes, tanto as de referência, como estirpes isoladas durante este trabalho passíveis de pertencer ao género *Campylobacter* spp. e grupo *Arcobacter sensu lato* foram criopreservadas em meio Brain Heart Infusion (BHI, Liofilchem, Italy)) com 20 % (v/v) de glicerol em tubos criogénicos, e armazenadas à temperatura de -80 °C. Antes do começo de cada ensaio, as estirpes foram previamente inoculadas em placas de Blood Agar (BA, Oxoid, England) suplementadas com 5 % (v/v) de sangue de cavalo desfibrinado, permitindo um crescimento ótimo da população e verificação da pureza de cada cultura.

3.3 Recolha das amostras de água

Neste trabalho foram estudadas amostras de águas superficiais de rio, afluentes de rio e fontes de águas de nascente. A amostragem foi efetuada no período de outubro de 2019 a julho de 2020, com a seguinte distribuição de amostragem: 5 amostras provenientes de água do rio, 10 a partir de afluentes do mesmo rio e 10 de fontes de água de nascente, recolhidas nos meses de outubro, novembro, dezembro, fevereiro, março e julho. Em cada mês de amostragem, a colheita foi efetuada em 25 pontos distribuídos na região do concelho da Covilhã, durante o período de estudo de seis meses, sendo a recolha dividida por dois dias (Figura 6). Em cada local foram recolhidas amostras para dois frascos estéreis de volumes de 1 L e 200 mL, permitindo o isolamento de bactérias de cada grupo bacteriano em estudo. Após a recolha das amostras de água, estas foram transportadas em condições de refrigeração até ao laboratório e posteriormente processadas. Num total de cento e cinquenta amostras de água, incluindo 30 amostras de água do rio Zêzere, 60 amostras de afluentes e 60 provenientes de fontes de água de nascente, foram recolhidas e examinadas quanto à presença de *Campylobacter* spp. e *Arcobacter sensu lato*.

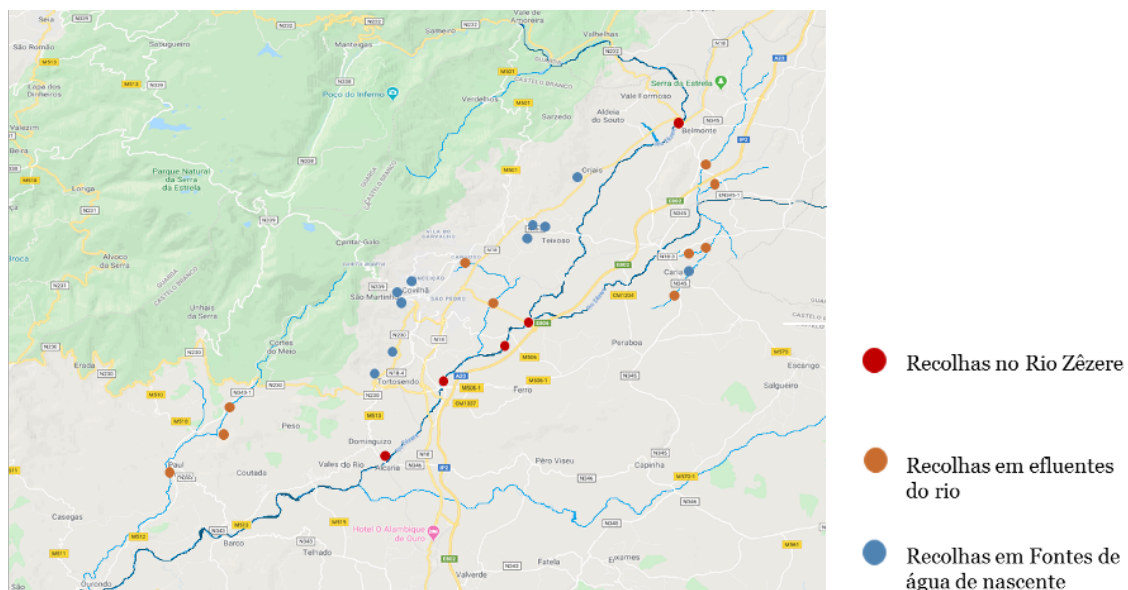


Figura 6: Local de recolhas das amostras no concelho da Covilhã. Adaptado de <https://www.google.pt/maps>

3.4. Isolamento de *Campylobacter* spp e *Arcobacter sensu lato*

3.4.1. Enriquecimento das amostras

Todas as amostras foram processadas em condições de assepsia. Para a análise de *Campylobacter* spp. adotou-se a metodologia descrita por Jokinen et al. (2012) com alterações. Assim, filtrou-se 1 L água, proveniente de cada ponto, usando uma rampa de filtração ligada a um sistema de vácuo com membranas estéreis de nitrocelulose com poros de tamanho 0,45 µm (Ahlstrom, Germany). Em caso de colmatção da membrana, esta foi sendo substituída. As membranas usadas para filtração de cada amostra foram incubadas em 25 mL de Bolton Broth (BB, Oxoid, United Kingdom) suplementado com 5% (v/v) sangue lisado de cavalo e com Cefoperazona (20 mg/L), Trimetoprim (20 mg/L), Vancomicina (20 mg/L) e anfotericina (10 mg/L) (Bolton Selective Supplement, Oxoid, England). Todas as membranas em meio de enriquecimento foram incubadas a 37 °C em jarras com ambiente de microaerofilia (5% O₂, 10% CO₂ e 85% N₂) gerado através de um gerador de microaerofilia (Anoxomat, The Netherlands), e incubadas durante 48 h (Figura 6).

De igual forma, para o isolamento de *Arcobacter sensu lato*, e de acordo com Isidro et al. (2020) com algumas modificações, após a filtração de 200 mL água, proveniente de cada ponto, com membranas estéreis de nitrocelulose com poros de tamanho 0,22 µm (Advantec, Japan), estas foram incubadas com 9 mL *Arcobacter* Broth (AB, Oxoid, England) suplementado com Cefoperazona (8,0 mg/L), Anfotericina B (10,0 mg/L) e Teicoplanina (4,0 mg/L) (CAT Selective

Supplement, Oxoid, England). Após a homogeneização de todas as amostras, estas foram incubadas a 30 °C durante 48 h.

Posterior ao período de incubação, 400 µL de todos os meios de enriquecimento foram recolhidos e congelados para posterior análise (Figura 7).

3.4.2 Isolamento de *Campylobacter* spp. e *Arcobacter sensu lato* a partir das amostras enriquecidas

Após o período de enriquecimento, duas metodologias distintas foram utilizadas para isolamento de cada género, como representado na Figura 7. No que diz respeito ao isolamento de *Campylobacter* spp. (Jokinen et al. 2012), após enriquecimento, 20 µL de meio foram plaqueados em placas de mCCDA (CCDA selective Supplement, Oxoid, England) e disperso com ajuda de uma ansa através de estrias permitindo assim o isolamento das colónias, sendo posteriormente incubadas à temperatura de 42 °C em microaerofilia por 48 h. Após esse período, observaram-se as placas quanto à presença ou ausência de colónias típicas de *Campylobacter* spp.. Para cada amostra que apresentou morfologia típica, selecionaram-se pelo menos 3 colónias, as quais foram subcultivadas em placas de BA durante 24 h a 42 °C em microaerofilia. Após a incubação, todas as colónias foram repicadas para duas novas placas de BA e colocadas em ambientes distintos, uma placa incubada em microaerofilia e outra em aerobiose a 37 °C, ambas durante 24 h. Todas as colónias que não apresentaram crescimento bacteriano em aerobiose, foram então subcultivadas para posterior análise.

Quanto às amostras respeitantes ao isolamento de *Arcobacter sensu lato*, o plaqueamento das amostras após enriquecimento foi efetuado através do método de filtração passiva descrito anteriormente (Isidro et al. 2020). Desta forma, 200 µL de cada meio de enriquecimento foram aplicados sobre um filtro de nitrocelulose estéril de poro com tamanho 0,45 µm, previamente colocado na superfície da placa com auxílio de uma pinça esterilizada. De seguida à aplicação dos meios de enriquecimento, as placas foram incubadas a temperatura ambiente durante 30 minutos, após este período, o filtro foi retirado e o meio disperso com uma ansa através de estrias de maneira a se obter colónias isoladas. As placas foram então incubadas a 30 °C durante 24 a 72 h e posteriormente inspecionadas para observação da presença ou ausência de colónias típicas. Tal como realizado anteriormente, em cada amostra que apresentou colónias típicas, repicaram-se pelo menos 3 colónias, as quais foram subcultivadas em BA. Após a seleção e passagem das colónias de cada amostra, as placas foram incubadas durante 24 h a 30 °C em condições de aerobiose, permitindo verificar a pureza das mesmas para posterior análise.

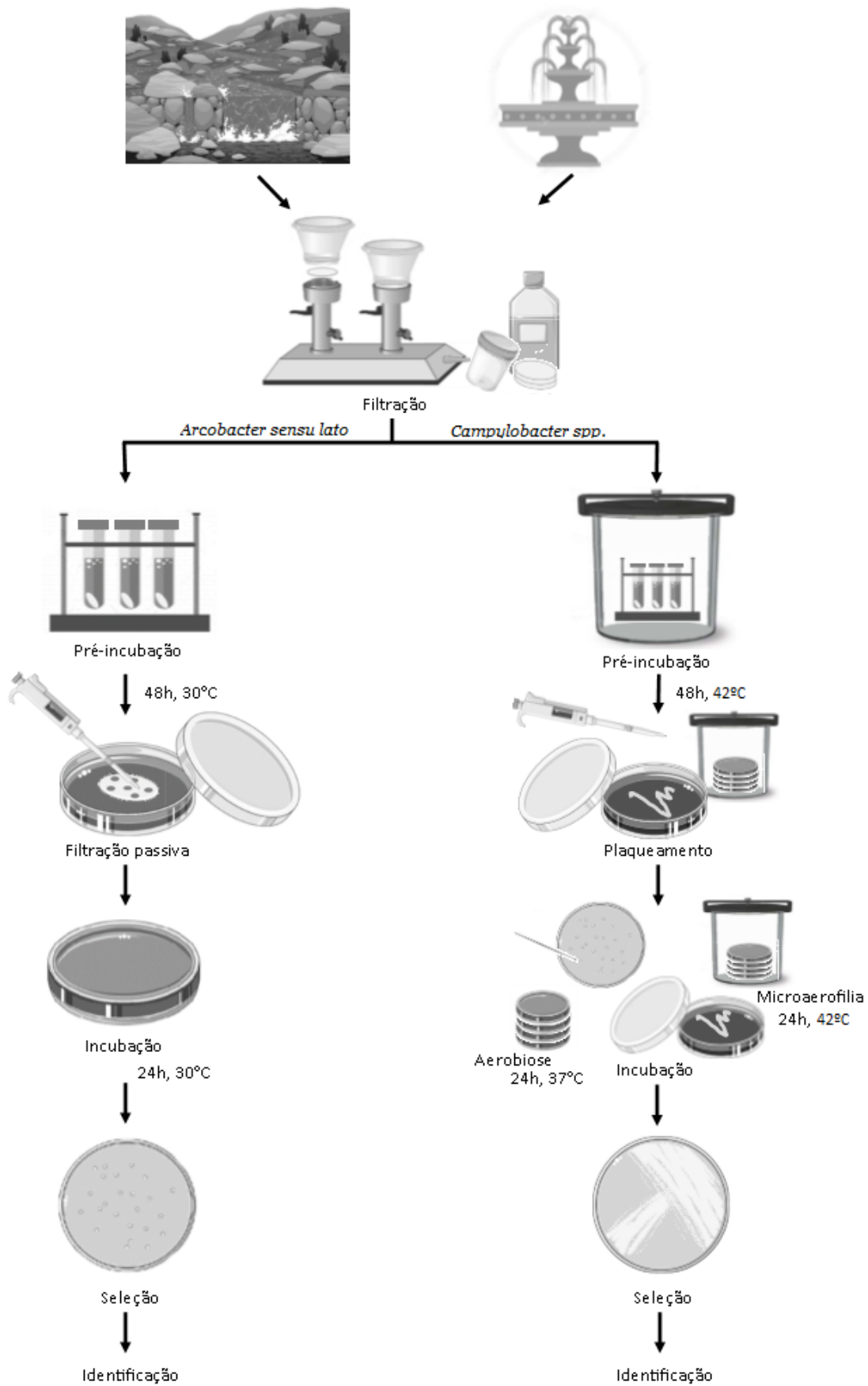


Figura 7: Protocolo de isolamento para *Arcobacter sensu lato* e *Campylobacter spp.*.

3.5 Identificação presuntiva dos isolados

Todos os isolados com características típicas, tanto de *Campylobacter* como *Arcobacter sensu lato*, foram caracterizados fenotipicamente pelo teste da oxidase (Oxidase Test, Liofilchem, Itália) e através do método de coloração de Gram. Os isolados positivos para oxidase e que apresentaram morfologia celular característica (bacilos Gram negativos, curvados) foram posteriormente subcultivados e armazenados como descrito na subseção 3.2..

3.6 Identificação molecular dos isolados

De maneira a identificar os diferentes isolados, todos os que se assemelhavam como bactérias pertencentes aos grupos bacterianos *Campylobacter* e *Arcobacter sensu lato* foram identificados ao nível de género. Desta forma, para todas as amostras, a extração de DNA foi efetuada pelo método de lise por fervura, onde parte da biomassa das colónias foi suspensa em 200 µL de água ultrapura esterilizada, sendo posteriormente aquecida a 100°C durante 10 min de maneira a ocorrer a lise celular. No caso dos meios de enriquecimento, os 400 µL recolhidos previamente foram sujeitos às mesmas condições que as suspensões celulares. Após a fervura, os tubos foram centrifugados durante 3 min a uma rotação de 8000 rotações por minuto (rpm) para remoção dos detritos celulares, onde o sobrenadante foi usado como DNA *template* nas reações de PCR. Em todos os ensaios utilizou-se pelo menos uma estirpe de referência como controlo positivo.

3.6.1 Identificação molecular de *Campylobacter* spp.

A identificação molecular de *Campylobacter* a nível de género foi efetuada usando o PCR específico para género descrito por Linton, Owen, and Stanley (1996). A mistura reacional foi preparada para um volume final de 10 µL sendo constituída por 0,25U de enzima DreamTaq polimerase (Thermo Fisher Scientific, Thermo Scientific™, Dreieich, Germany), 0,2 mM desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs) e 1 µL 10x DreamTaq buffer (10x), 0,5 µM de cada oligonucleótido iniciador (C412F e C1288R), 6,75 µL de água ultrapura estéril e 1 µL de DNA previamente extraído. As condições do PCR foram: desnaturação inicial durante 5 min a 95 °C, seguida de 30 ciclos, cada um composto por 30 segundos (s) de desnaturação a 95 °C, 30 s de hibridação dos oligonucleótidos iniciadores a 54 °C e 30 s de extensão a 72 °C, no final ocorreu um período de extensão final a 72 °C durante 10 minutos. No final do processo de PCR, todos produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1 % em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1x e corado com Green safe (Green safe Premium, Nzytech, Lisboa, Portugal), sendo sempre aplicado um marcador de pesos moleculares (NZYDNA ladder III, Nzytech, Lisboa, Portugal), sendo os géis posteriormente revelados com luz ultravioleta (UV) num transiluminador (UVITEC).

Posteriormente, todos os isolados positivos para *Campylobacter* spp. foram enviados para o Laboratório de Referência das Infecções Gastrointestinais do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), para identificação a nível de espécie, pela metodologia de MALDI-TOF MS.

3.6.2 Identificação molecular de *Arcobacter sensu lato*

Para os isolados possíveis de pertencer a *Arcobacter sensu lato*, e à semelhança de *Campylobacter*, em primeiro lugar estes foram identificados usando o PCR específico para género descrito por Harmon and Wesley (1996). A mistura reacional foi preparada para um volume final de 12,5 µL do qual 0,31 U pertencentes a enzima DreamTaq DNA polimerase, 0,2 mM de dNTPs e 1,25 µL 10x DreamTaq buffer, 0,5 µM de cada oligonucleótido iniciador (219F e 1427R) e 8,18 µL de água ultrapura, por fim adicionou-se 1,5 µL de DNA previamente extraído de cada amostra para um volume final da reação de 12,5 µL. As condições do PCR foram: desnaturação inicial durante 5 min a 95 °C, seguida de 30 ciclos, cada um composto por 30 s de desnaturação a 95 °C, 30 s de hibridação dos oligonucleótidos iniciadores a 56 °C e 30 s de extensão a 72 °C, finalizando com um período de extensão final a 72 °C com duração de 10 minutos. Após um resultado positivo como pertencentes ao género de interesse, foi feita a distinção entre as diferentes espécies, para tal foram utilizados dois mPCR's distintos. No mPCR descrito por Houf et al. (2000), as reações foram preparadas com as seguintes condições: para um volume final de 7 µL foram adicionados 3,5 µL de Supreme NZYTaq 2xGreen Master Mix, 1 µM dos oligonucleótidos iniciadores Arco, Butz, Skir, CryI e CryII, 1 µL de DNA e sendo o volume aferido com água ultra pura. As condições do PCR foram as seguintes: 5 min a 95 °C, seguido por 30 ciclos, cada um constituído por 30 s a 95 °C, 30 s a 61 °C e 30 s a 72 °C, sendo feita uma extensão final a 72 °C durante 7 minutos. O segundo mPCR usado foi o descrito por Doudah et al. (2010), cuja mistura reacional foi preparada num volume final de reação de 10 µL contendo água, 3,5 µL de Supreme NZYTaq 2xGreen Master Mix, e 1 µM de cada oligonucleótido iniciador (ButR, SkiR, TherR, CibR, ArcoF, GyraF e GyraR). As condições do PCR foram as seguintes: 3 min a 95 °C, seguido por 30 ciclos, cada um composto por 30 s a 95 °C, 30 s a 58 °C e 90 s a 72 °C, sendo feita uma extensão final a 72 °C durante 15 minutos.

Por fim, todos os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1 % em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1x e corado com Green safe, sendo sempre aplicado um marcador de pesos moleculares, sendo os géis posteriormente revelados com luz ultravioleta (UV) num transiluminador (UVITEC).

Tabela 6: Sequências dos oligonucleótidos iniciadores utilizados.

Gene alvo	Oligonucleótidos iniciadores	Sequência (5'-3')	Temperatura de hibridização	Tamanho fragmento	Referências
<i>rRNA 16S</i>	C412F	GGATGACACTTTTCGGAGC	58 °C	<i>Campylobacter</i> spp. - 810 pb	(Owen and Stanley 1996)
<i>rRNA 16S</i>	C1288R	CATTGTAGCACGTGTGTC			
<i>rRNA 16S</i>	219F	GAGATTAGCCTGTATTGTATC	56 °C	<i>Arcobacter sensu lato</i> - 1123 pb	(Harmon and Wesley 1996)
<i>rRNA 16S</i>	1427R	TAGCATCCCCGCTTCGAATGA			
<i>rRNA 16S</i>	Arco	CGTATTACCGTAGCATAGC	61 °C	<i>A. cryaerophilus</i> - 257 pb	(Houf et al. 2000)
<i>rRNA 16S</i>	Butz	CCTGGACTTGACATAGTAAGAATGA			
<i>rRNA 16S</i>	Skir	GGCGATTTACTGGAACACA			
<i>rRNA 16S</i>	Cry I	TGCTGGAGCGGATAGAAAGTA			
<i>rRNA 16S</i>	Cry II	AACAACCTACGTCCTTCGAC			
<i>rRNA 23S</i>	ButR	TCCTGATACAAGATAATTGTACG	58 °C	<i>A. skirrowii</i> - 198 pb	(Doudah et al. 2010)
<i>rRNA 23S</i>	TherR	GCAACCTCTTTGGCTTACGAA			
<i>rRNA 23S</i>	CibR	CGAACAGGATTCTCACCTGT			
<i>rRNA 23S</i>	SkiR	TCAGGATACCATTAAAGTTATTGATG			
<i>rRNA 23S</i>	ArcoF	GCYAGAGGAAGAGAAATCAA			
<i>Gyrase A</i>	GyrasF	AGAACATCACTAAATGAGTTCTCT			
<i>Gyrase A</i>	GyrasR	CCAACAATATTTCCAGTYTTTGGT			
-	ERIC-1R	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC	56,7 °C	-	(Houf et al. 2002)
-	ERIC-2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	59 °C	-	

3.7 Genotipagem dos isolados pertencentes ao gênero *Campylobacter* e grupo *Arcobacter sensu lato*

Uma vez terminada a identificação molecular dos diferentes isolados, passou-se à determinação da diversidade genética dos mesmos por ERIC-PCR. Para tal, os isolados foram cultivados em placas de BA, as quais foram incubadas a 30 °C em aerobiose para *Arcobacter sensu lato*, e 37 °C em atmosfera microaerofilia para os isolados pertencentes a *Campylobacter* spp., durante 48 h. Após a incubação, procedeu-se a uma nova extração do DNA pelo método de lise por fervura, tal como descrito na subseção 3.7. O DNA de dupla cadeia foi de seguida quantificado recorrendo-se a um nanoespectrofotómetro (Nanophotometer, Implen GmbH, Munich, Germany) e posteriormente ajustada a concentração para 25 ng/μL.

A reação de ERIC-PCR foi realizada num volume final de reação de 15 µL, usando 1,5 µL de 10x DreamTaq buffer, 0,16 U de DreamTaq DNA Polimerase, 2 mM de cloreto de magnésio (concentração final de MgCl₂ de 4 mM), 0,2 mM de dNTPs, 0,5 mM de cada oligonucleótido iniciador (ERIC1 e ERIC2) e 1 µL do DNA extraído com concentração de 25 ng/µL (Houf et al. 2002). As misturas reacionais foram amplificadas num termociclador considerando os seguintes parâmetros: um ciclo de desnaturação durante 5 minutos a 94 °C, seguido de 40 ciclos em que cada um foi composto por 1 min de desnaturação a 94 °C, 1 min de hibridação dos oligonucleótidos iniciadores a 25 °C e 2 min de extensão a 72 °C. Terminados os ciclos, a reação de PCR concluiu-se com um período de extensão final a 72 °C durante 5 minutos. Concluída a reação, 10 µL dos produtos amplificados foram de seguida analisados através do método de eletroforese em gel de agarose a 2 %, utilizando Greensafe como corante, procedendo-se à corrida dos géis por 2h 15 min a 120 Volts (V). Finalmente, estes foram visualizados sob luz ultravioleta e posteriormente analisados para identificação dos perfis genéticos distintos.

3.8 Perfil de resistência a antibióticos

A avaliação dos perfis de resistência a antibióticos foi realizada para todos os isolados positivos para *Campylobacter* spp. e *Arcobacter sensu lato*, sendo testados um total de sete antibióticos (Susceptibility Disks, Bio-Rad, France) para cada isolado através da metodologia de difusão em disco segundo as diretrizes do CA-SFM/EUCAST (2020). Os antibióticos testados foram: gentamicina (GEN, 10µg), eritromicina (ERY, 15 µg), tetraciclina (TET, 30 µg) e ciprofloxacina, (CIP, 5 µg), que fazem parte do painel de antibióticos recomendados pelo EUCAST para *Campylobacter* spp.. Foram também testados alguns antibióticos da classe dos β-lactâmicos, utilizados em terapêuticas alternativas no caso de sintomas crónicos que necessitam de tratamento e em que a estirpe infetante é resistente aos antibióticos mais comuns, como é o caso do ertapenemo (ETP, 10 µg), amoxicilina-ácido clavulânico (AMC, 20/10 µg) e ampicilina (AMP, 10 µg). A seleção das estirpes foi realizada após a análise dos perfis genéticos obtidos por ERIC-PCR de todos os isolados positivos, tendo sido avaliada a resistência a antibióticos de todas as estirpes que apresentavam um perfil genético distinto.

As suspensões bacterianas foram preparadas por suspensão direta dos isolados previamente cultivados em BA (VWR, Belgium) durante 24 h a 37 °C e 30 °C em microaerofilia, para *Campylobacter* e *Arcobacter sensu lato*, respetivamente. Assim suspenderam-se as colónias em solução salina de cloreto de sódio a 0,85 % (p/V) e ajustou-se a turbidez da suspensão a 0,5 McFarland. Posteriormente, os isolados foram inoculados com a ajuda de uma zaragatoa em placas Mueller-Hinton Agar (MHA, Oxoid, United Kingdom) suplementado com 5% de sangue de cavalo desfibrinado e 20 mg/L de β-Nicotinamida adenina dinucleotido (β-NAD). Em seguida os discos de antibióticos foram dispensados nas placas inoculadas e incubados a 37 °C e 30 °C, para *Campylobacter* e *Arcobacter sensu lato*, respetivamente, sob atmosfera microaerofílica.

Todos os resultados relativos às zonas de inibição foram registados e interpretados de acordo com os pontos de corte estabelecidos pelo CA-SFM/EUCAST (2020) para *Campylobacter* spp.. No caso de *Arcobacter sensu lato*, uma vez que ainda não existem critérios interpretativos fornecidos, os critérios usados para *Campylobacter* spp. foram de igual forma aplicados para este grupo neste estudo.

Capítulo 4: Resultados e Discussão

Ao longo do tempo, as doenças relacionadas com a água têm vindo a aumentar, permanecendo como uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo (Clasen et al. 2007; WHO 2010). Em muitos países, os reservatórios hídricos de superfície servem como a principal fonte de água potável, no entanto esses corpos de água são frequentemente vulneráveis à contaminação por diversos agentes patogénicos (Pandey et al. 2014). De facto, segundo um relatório da Organização Mundial de Saúde, 35% do total do número de mortes associadas a doenças diarreicas resultam da ingestão de água a partir de fontes inadequadas para consumo em países subdesenvolvidos (WHO 2019). Ainda assim, nos países desenvolvidos, embora haja uma maior conscientização quanto à contaminação por patogénicos da água e da sua qualidade, surtos de doenças transmitidas de origem hídrica por meio de abastecimento público de água continuam a ser relatados (Brookes et al. 2004).

Entre estes agentes, bactérias pertencentes a *Campylobacter* spp. e *Arcobacter sensu lato* incluem diversas espécies consideradas como agentes patogénicos emergentes, para os quais uma das fontes de contaminação mais provável tem sido apontada como sendo a água (Pitkänen 2013; Ho, Lipman, and Gaastra 2006). Ainda assim, apesar da relevância destes microrganismos, até ao momento, nenhum trabalho relatou a presença destes microrganismos em ambientes aquáticos em Portugal. Desta forma, face ao papel patogénico associado a estas bactérias, bem como à crescente associação da água como uma das suas vias de transmissão ao Homem, pretendeu-se com este trabalho analisar amostras de água provenientes de diferentes fontes aquáticas quanto à presença destas bactérias.

4.1 Isolamento e identificação molecular

A recolha das amostras de águas superficiais foi efetuada em diferentes locais de amostragem de modo a analisar vários tipos de água onde o contacto com o Homem é possível, nomeadamente água de rio, água de afluente e água de nascente.

A prevalência de *Campylobacter* spp. e *Arcobacter sensu lato* no total de 150 amostras analisadas encontra-se sumarizada na Tabela 7. No geral, verificou-se em todas as amostras de água uma elevada percentagem de identificação de bactérias do género *Campylobacter* e do grupo *Arcobacter sensu lato*, tanto pela deteção por PCR efetuada diretamente no meio de enriquecimento, como pela técnica de cultura e isolamento da bactéria após enriquecimento. Assim, revelando uma alta prevalência e distribuição destas bactérias patogénicas em vários ambientes aquáticos no concelho da Covilhã.

Tabela 7: Prevalência de *Campylobacter* e *Arcobacter sensu lato* nas amostras de águas recolhidas recorrendo a deteção molecular aplicada aos meios de enriquecimento, e usando cultura em paralelo seguida de identificação molecular dos isolados.

Amostras de água	Número de amostras positivas / número de amostras totais (%)			
	Deteção molecular no meio de enriquecimento		Isolamento por cultura	
	<i>Campylobacter</i> spp.	<i>Arcobacter sensu lato</i>	<i>Campylobacter</i> spp.	<i>Arcobacter sensu lato</i>
Água de Rio	20/30 (66,7%)	22/30 (73,3%)	8/30 (26,7%)	29/30 (96,7%)
Água de afluente do Rio	29/60 (48,3%)	39/60 (65%)	11/60 (18,3%)	46/60 (76,7%)
Água de nascente	7/60 (11,7%)	11/60 (18,3%)	4/60 (6,7%)	14/60 (23,3%)
Total	56/150 (37,3%)	72/150 (48%)	22/150 (14,6%)	89/150 (59,3%)

No que toca à comparação dos resultados obtidos pelos dois métodos de deteção, os dados apresentados para cada grupo bacteriano indicam algumas diferenças entre eles, nomeadamente, para *Campylobacter* spp. observa-se um maior número de amostras positivas após efetuado o PCR direto nos meios de enriquecimento, quando comparado com isolamento das colónias deste género, obtendo-se uma prevalência de amostras positivas totais com 37,3 % e 14,6 %, respetivamente. Com base nos resultados apresentados, tais valores podem ser devidos ao processo de deteção molecular utilizando a técnica de PCR, uma vez que esta vai permitir a deteção de células viáveis e não viáveis (Abulreesh, Paget, and Goulder 2006), onde o resultado da deteção em meio de enriquecimento poderá ser positivo sem um isolamento posterior da bactéria de interesse. Assim, tais valores podem resultar da metodologia usada uma vez que a cultura convencional nem sempre permite o crescimento de colónias, devido principalmente ao à presença de células viáveis mas não cultiváveis de *Campylobacter* já descritas para amostras ambientais (Abulreesh, Paget, and Goulder 2006). Também a quantidade de água filtrada pode ter influência, dado que alguns estudos relataram a presença de um baixo número de células em amostras de água (Abulreesh, Paget, and Goulder 2006). Desta forma, para aumentar a sensibilidade do isolamento por cultura é apropriado a filtração de grandes quantidades de amostra, de forma a aumentar a concentração de células no filtro, sendo que, segundo o descrito por Abulreesh, Paget, and Goulder (2006), o volume de dez litros aumentou o número de isolados de *Campylobacter* recuperados. Os mesmos autores sugeriram que volumes de amostra de 1L são muito pequenos para a deteção de *Campylobacter* em água (Abulreesh, Paget, and Goulder 2006). Ainda assim, esta discrepância de resultados apresentados para cada método era expectável, principalmente devido à utilização de um PCR específico para género, englobando todas as espécies de *Campylobacter* spp., face ao método de isolamento utilizado, favorecendo apenas o desenvolvimento de espécies termotolerantes.

No que se refere à prevalência em cada local de amostragem, a água de rio foi a que se revelou com maiores taxas de recuperação de *Campylobacter* spp. obtendo-se 26,7 e 18,3 % de amostras positivas por cultura provenientes de rio e afluentes, respetivamente, e 6,7 % a partir de amostras de água de nascente positivas após o isolamento e identificação das diferentes colónias isoladas. A incidência de *Campylobacter* spp. em ambientes aquáticos por aplicação de métodos de isolamento tem sido reportada em países como França, Canadá, Noruega, Irlanda do Norte e Nova Zelândia. Face a comparação entre estudos, uma alta variabilidade de valores foi encontrada, com taxas de isolamento relatadas de 6 a 60 % para amostras provenientes de rios e riachos (Denis et al. 2011; Van Dyke et al. 2010; Savill et al. 2001; Brennhovd, Kapperud, and Langeland 1992), ou inferiores, entre 0 e 29,5 %, para águas de nascente (Savill et al. 2001; J. Moore, Caldwell, and Millar 2001). Desta forma, com base na observação dos resultados, a mesma tendência quanto à prevalência foi observada neste trabalho. Assim, uma vez relatado que bactérias deste género são caracterizadas por sobreviver com dificuldade fora do hospedeiro, normalmente elevadas taxas de recuperação em águas fluviais refletem índices de contaminação através de fezes de animais, efluentes de esgoto ou mesmo a partir de escoamentos agrícolas (Vereen et al. 2007).

Quanto aos resultados relativos a *Arcobacter sensu lato*, estes, ao contrário do que foi observado para *Campylobacter* spp., indicam uma maior taxa de prevalência para métodos de isolamento por cultura em comparação com a deteção direta nos meios de enriquecimento, ou seja 59,3 % e 48 %, respetivamente. Vários foram os casos em que o resultado da deteção molecular foi negativo, sendo, no entanto, possível proceder ao isolamento de bactérias pertencentes a *Arcobacter sensu lato* a partir destas amostras. Nestes casos específicos, uma das causas apontadas prende-se com o facto de a deteção por PCR poder ser limitada pela presença de inibidores da reação e também influenciada pela origem da amostra (Ferreira, Oleastro, and Domingues 2016). Ainda assim, esta elevada prevalência relativa à metodologia de isolamento por cultura, confirma o já relatado acerca da utilização de um passo de pré-enriquecimento, seguido de inoculação em placa, descrita como a metodologia que tem maior sucesso no isolamento de bactérias do grupo *Arcobacter sensu lato* (Levican et al. 2014).

À semelhança de *Campylobacter*, a alta incidência de *Arcobacter sensu lato* em ambientes aquáticos por aplicação de métodos de isolamento por cultura tem sido reportada em amostras provenientes de água de rio e de nascente em países como Espanha, Turquia e Japão, onde se observaram valores de 23,5 a 85 % e 4 a 25% de prevalência para amostras de rio e água de nascente, respetivamente (Morita et al. 2005; Collado et al. 2008a; Çelik and Ünver 2015; Talay, Molva, and Atabay 2016). Ainda assim, tal variabilidade relativa às taxas de isolamento pode depender da diversidade de métodos aplicados para amostragem e isolamento, ecologia das fontes de água e diferenças nas características geográficas e climáticas das regiões onde os estudos foram realizados (Collado et al. 2010). Desta forma, no geral, a mesma tendência quanto à prevalência foi observada neste estudo, sendo a água de rio a que se revelou com maior prevalência deste grupo bacteriano com 96,7 % de amostras de rio e 76,7% de amostras de

afuentes positivas para este grupo e 23,3 % de amostras de água de nascente positivas após o isolamento e identificação das diferentes colónias isoladas.

Em relação às prevalências relativas a cada grupo, observou-se um maior número de amostras positivas para *Arcobacter sensu lato* (66%), apresentando valores mais elevados com a utilização de ambas as metodologias de identificação quando comparado com *Campylobacter* spp. (40%). Diferenças nos resultados confirmam o já relatado para bactérias pertencentes a *Arcobacter sensu lato*, sendo descritas como um agente patogénico emergente de origem hídrica, ao contrário de *Campylobacter*, mais comumente relatado como presente em aves (Banting and Salvat 2017; Abulreesh, Paget, and Goulder 2006). Ainda assim, elevadas taxas de recuperação representam um sério risco para a população, revelando a fraca qualidade da água superficial, podendo resultar em surtos quer em humanos, quer em animais.

4.1.1 Variação sazonal de *Campylobacter* spp. e *Arcobacter sensu lato*

Uma vez que os resultados relativos à prevalência de bactérias do género *Campylobacter* e grupo *Arcobacter sensu lato* em diferentes corpos de água, revelaram altos níveis de recuperação destes microrganismos, procurou perceber-se as possíveis alterações na taxa de recuperação de cada grupo bacteriano relativas a cada local de amostragem ao longo do tempo. Desta forma, o estudo da sua prevalência foi efetuado considerando cada um dos vinte e cinco pontos de recolha, durante os seis meses de estudo (outubro 2019 a julho 2020).

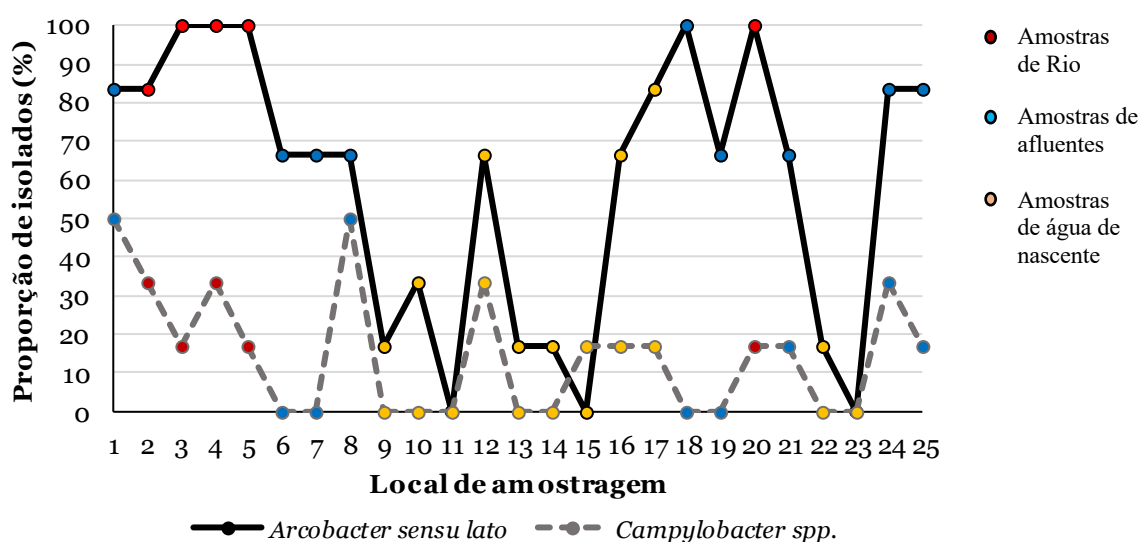


Figura 8: Distribuição de amostras positivas com base na identificação de isolados pertencentes a *Campylobacter* spp. e *Arcobacter sensu lato* presentes em cada local de amostragem ao longo de todo o tempo de amostragem.

Com base nos resultados apresentados na Figura 8, no geral e tal como observado na Tabela 7, maiores prevalências foram observadas em amostras provenientes de água do rio, seguido de afluentes, e por fim amostras de água de nascente, para ambos os grupos bacterianos. Relativamente a *Campylobacter* spp., considerando as várias recolhas feitas em cada um dos pontos, a taxa de recuperação variou entre 16,7 e 33,3 % para amostras de água do rio, entre 0 e 50% para amostras provenientes de afluentes, e prevalências de 0 a 33,3 % para amostras de fontes de água de nascente. Em 7 de um total de 10 pontos de recolha de águas de nascente, não foi possível o isolamento de bactérias deste género, bem como em algumas amostras de afluentes do rio, onde água de 4 dos 10 locais se revelaram igualmente negativos. Quanto a amostras recolhidas do rio Zêzere, foi possível a recuperação *Campylobacter* em todos os pontos de recolha.

Foi já descrito que a água de superfície se poderá apresentar como um reservatório de várias espécies deste género, provenientes de diferentes hospedeiros (Smid et al. 2013). De igual forma, embora a contribuição das diversas origens de contaminação não seja ainda totalmente elucidada, a vida selvagem, com especial atenção para aves selvagens, é frequentemente considerada como fonte importante de contaminação ambiental (Smid et al. 2013). Por outro lado, fontes de água subterrânea ou nascentes, raramente são consideradas um reservatório para microrganismos patogénicos, uma vez que os solos pelos quais as bactérias devem passar geralmente funcionam de maneira a diminuir a concentração dos microrganismos por meio de filtração (Whiley et al. 2013). Ainda assim, a água de nascente contaminada foi já identificada como uma fonte de campilobacteriose, desta forma permitindo o isolamento de bactérias deste género, ainda que em menor quantidade face a fontes de água ambientais como rios e riachos (Savill et al. 2001).

Quanto ao grupo *Arcobacter sensu lato*, este revelou valores mais elevados de prevalência quando comparado a *Campylobacter* spp.. Assim, considerando os diferentes períodos de amostragem foi possível o isolamento de bactérias deste grupo em todas as colheitas efetuadas ao longo do ano em cinco dos pontos em estudo, 4 relativos a amostras de rio e uma de afluente, de um total de vinte e cinco locais de amostragem. Para as restantes amostras, elevadas taxas de recuperação, acima de 60%, foram observadas relativas às restantes amostras de rio e seus afluentes e ainda em três das 10 fontes amostradas. Tal como aconteceu com *Campylobacter*, amostras com prevalências inferiores ou mesmo nulas foram obtidas principalmente para águas de nascente, realçando a melhor qualidade da água utilizada muitas vezes para consumo. Desta forma, tais resultados vão ao encontro com o já relatado por outros autores, onde a prevalência de bactérias deste grupo isoladas a partir de ambientes aquáticos se revela superior para lagos e rios, por comparação com amostras de águas de consumo comumente observadas com níveis de prevalência mais baixos (Collado et al. 2010; Talay, Molva, and Atabay 2016; Hsu and Lee 2015).

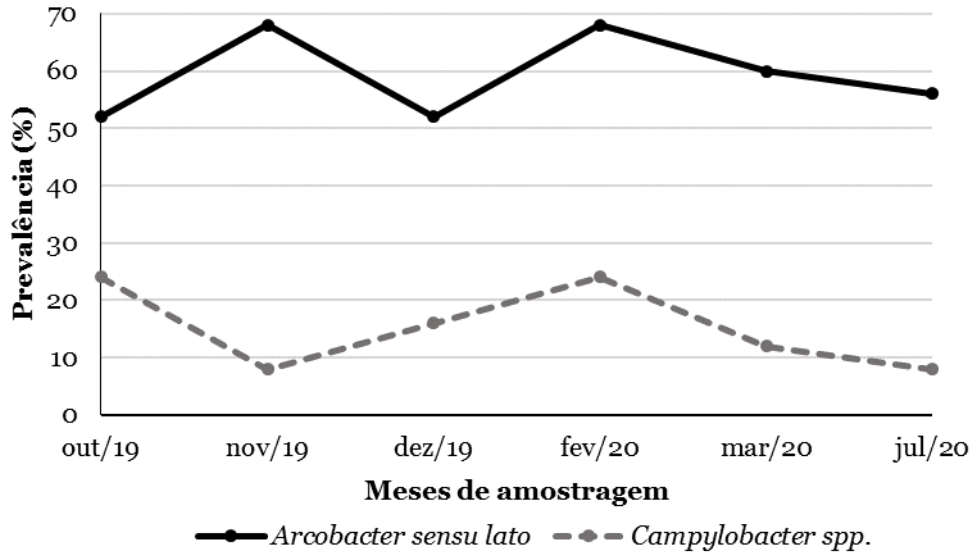


Figura 9: Distribuição de amostras positivas com base na identificação de isolados pertencentes a *Campylobacter spp.* e *Arcobacter sensu lato* nas amostras de água durante cada mês de amostragem.

Em termos da distribuição sazonal, foi já relatado que a sobrevivência de espécies do género *Campylobacter* é favorecida pela baixa temperatura, ausência de luz solar e pelo baixo número de microbiota indígena (Pitkänen 2013). Desta forma, em relação à sua prevalência ao longo de todos os meses de estudo, taxas de recuperação nos vários locais de amostragem revelaram níveis máximos de isolamento de espécies de *Campylobacter* nos meses outubro e fevereiro com prevalências de 24%, correspondendo a períodos de estações outono e inverno, respetivamente. Estes resultados vão ao encontro de estudos anteriores, revelando que a prevalência de *Campylobacter* em águas superficiais é menor quando há mais horas de sol, onde, segundo o relatado, temperaturas e níveis de radiação ultravioleta mais elevados, poderão levar à redução da sobrevivência de *Campylobacter spp.* em ambientes aquáticos (Jones 2001). Brennhovd, Kapperud, e Langeland (1992), tinham já observado prevalências superiores de *Campylobacter* durante o período de outono e inverno, com 26/45 (57,8 %) de amostras positivas para este género, em comparação com a primavera e especialmente o verão, onde os níveis de frequência foram de 12/33 (36,4 %) e 4/18 (22,2 %). De igual forma, num estudo recente de Mulder et al. (2020), a prevalência de *Campylobacter* durante o período outono e inverno revelou maior taxa de recuperação de bactérias deste género em comparação com as estações primavera e verão. Ainda assim, apesar de na generalidade, tais resultados estarem em concordância com o já reportado para este género, diferenças significativas foram observadas relativamente ao mês de novembro, não sendo possível verificar a causa da baixa prevalência.

Em relação a espécies de *Arcobacter sensu lato* nas diferentes fontes de água, as taxas de recuperação de todos os locais de estudo revelaram resultados mais elevados nos meses de novembro e fevereiro com prevalências de 68%, sendo que foi observada uma prevalência inferior no verão. Isto contrasta como o relatado por Collado et al. (2010), onde se observou

uma maior taxa de isolamento no período de verão em Espanha, a partir de amostras recolhidas ao longo da bacia do rio Llobregat. Ainda assim, à semelhança destes resultados, Çelik and Ünver (2015), demonstraram um maior número de isolados recuperados de águas fluviais nos períodos entre o inverno e primavera, tendo isolado *A. butzleri* de 4 de 10 (40%), 4 de 18 (22,2%), 4 de 29 (13,8%) e 2 de 21 (9,5%) em amostras coletadas em meses de inverno, primavera, outono e verão, respetivamente. Indo ao encontro com a literatura relacionada, tais prevalências superiores relativas aos meses de inverno poderão comprovar o descrito por Fera et al. (2010), relatando que células do grupo *Arcobacter sensu lato* podem sobreviver melhor em ambientes aquáticos a temperaturas mais baixas. Da mesma forma, foi já sugerido que chuvas extremas podem favorecer o transporte de espécies de *Arcobacter* através de escoamento destas águas para ambientes aquáticos, como o caso de águas superficiais (Fong et al. 2007). Assim, uma possível explicação para a maior taxa de recuperação de bactérias deste género, poderá estar relacionada com temperaturas mais baixas e elevados níveis de precipitação, sendo o mês de novembro apresentado com tais características (IPMA 2020). Quanto ao mês de fevereiro, apesar do aumento da temperatura, face aos meses anteriores, este aumento da prevalência poderá resultar do elevado índice de pluviosidade observado no mês antecessor, sendo ainda potenciado através da passagem da tempestade Glória, verificando-se não só o aumento dos caudais dos rios, mas também a afluência de enxurradas, possibilitando o transporte destas bactérias através de terrenos agrícolas (IPMA 2020). No entanto, apesar de, no geral, tais resultados estarem em concordância com o já reportado, diferenças significativas foram observadas relativamente ao mês de dezembro, não sendo possível verificar a causa da baixa prevalência.

Assim, a água pode ser uma fonte de contaminação devendo ser considerada não apenas como portadora do agente infeccioso, mas também como a fonte de infeção primária (Çelik and Ünver 2015). A presença de espécies de *Campylobacter* e *Arcobacter sensu lato* em amostras de água de rios e nascentes, revela que provavelmente terrenos agrícolas e terras em redor do rio Zêzere desta região estão contaminados com estes agentes patogénicos, podendo desta forma apresentar um sério risco em termos de transmissão destas bactérias a humanos e animais, bem como a contaminação de alimentos.

4.1.2 *Campylobacter* spp.

Uma vez classificados os isolados como pertencendo ao género *Campylobacter*, estes foram posteriormente identificadas ao nível de espécie através da metodologia de MALDI-TOF MS por comparação com uma base de dados. Os resultados referentes à sua identificação encontram-se resumidos na Tabela 8.

Tabela 8: Distribuição dos isolados de *Campylobacter* spp. por espécies nas diferentes amostras e água coletadas.

Amostras de água	Número de amostras positivas por espécie/ número de amostras positivas totais (%)				
	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>Campylobacter</i> spp.
Água de Rio	0/7 (0%)	4/7 (50%)	2/7 (25%)	0/7 (12,5%)	1/7 (12,5%)
Água de afluente do Rio	6/11 (54,4%)	2/11 (18,2%)	1/11 (9,1%)	1/11 (0%)	1/11 (27,2%)
Água de nascente	2/4 (50%)	1/4 (25%)	1/4 (25%)	0/4 (0%)	0/4 (0%)
Total	8/22 (36,4%)	7/22 (31,2%)	4/22 (18,2%)	1/22 (4,5%)	2/22 (9,1%)

Pela análise dos resultados, observou-se que do total de amostras positivas para *Campylobacter* spp., 36,4 % foram identificadas como contaminadas por *C. jejuni*, seguido de *C. coli*, com uma prevalência de 31,2%. Duas outras espécies foram igualmente identificadas, ainda que em menor percentagem, nomeadamente *C. lari* em 4 do total de 22 amostras positivas (18,2%) e *C. upsaliensis* presente em apenas uma das 22 amostras analisadas (4,5%). Anteriormente, *C. jejuni* foi já relatada como principal espécie presente em ambientes aquáticos analisados por Denis et al. (2011), onde uma percentagem superior desta espécie (66,6 %) foi observada quando comparada com *C. coli* (33,3 %), seguido de *C. lari* (10%). Em contraste, num outro estudo, foram observadas maiores taxas de recuperação de *C. coli* (44%), seguido por *C. jejuni* (34,6%) e posteriormente *C. lari* (14,7 %) (Rosef, Rettedal, and Lågeide 2001). Desta forma, indo ao encontro do já relatado por Abulreesh, Paget, and Goulder (2006), diferentes espécies de *Campylobacter* spp. em ambientes aquáticos parecem refletir diferenças quanto à(s) fonte(s) de contaminação. Assim, mais recentemente, Mulder et al. (2020) efetuaram um estudo de rastreio de fontes de contaminação animal de águas superficiais com diferentes espécies deste género, chegando à conclusão de que isolados de água identificados como *C. coli*, foram atribuídos principalmente a presença de aves selvagens, face a *C. jejuni* onde a sua recuperação foi identificada como advinda a partir de ruminantes e aves de campo. Desta forma, quando analisados os resultados em relação a cada ponto de recolha, observa-se uma maior taxa de isolamento de *C. coli* (50 %) de origem no rio Zêzere, local onde a presença de aves aquáticas foi mais notada, e por outro lado, em amostras provenientes de afluentes, onde diversos pontos foram caracterizados pela proximidade com animais de gado, a espécie *C. jejuni* (54,4 %) foi a maioritariamente isolada, podendo desta forma confirmar o anteriormente relatado, ainda que mais testes serão necessários de forma a identificar a possível fonte de contaminação.

4.1.3 *Arcobacter sensu lato*

De forma idêntica ao observado para *Campylobacter* spp., após a confirmação inicial da presença de *Arcobacter sensu lato* em todas as amostras, foram realizados dois mPCR's de forma a permitir a identificação da(s) espécie(s) nelas existentes. Tais resultados referentes à identificação de espécies deste grupo encontram-se resumidos na Tabela 9.

Tabela 9: Distribuição dos isolados de *Arcobacter sensu lato* nas diferentes amostras de água coletadas.

Amostras de água	Número de amostras positivas por espécie/ número de amostras positivas totais (%)		
	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>Arcobacter sensu lato</i>
Água de Rio	27/29 (93,1%)	4/29 (13,8%)	13/29 (44,8%)
Água de afluente do Rio	37/46 (80,4%)	12/46 (26,1%)	11/46 (23,9%)
Água de nascente	10/14 (71,4%)	4/14 (28,6%)	4/14 (28,6%)
Total	74/89 (83,1%)	20/89 (22,5%)	28/89 (31,5%)

No que diz respeito à incidência das diferentes espécies, observou-se que a mais recuperada foi *A. butzleri* (83,1 %), seguindo-se de *A. cryaerophilus* (22,5 %). No total das 89 amostras positivas para este grupo, *A. butzleri* e *A. cryaerophilus* foram co-isolados em 7 amostras, nomeadamente 3 obtidas a partir de água de rio, 3 de afluentes e uma proveniente de água de nascente. É de notar que em 31,5 % das amostras positivas para *Arcobacter sensu lato* não foi possível determinar a espécie isolada pelos métodos usados, uma vez que o resultado após a identificação molecular não foi conclusivo. Desta forma, poderão ter sido isoladas espécies ainda não reconhecidas com a utilização dos mPCR's referidos anteriormente, uma vez permitindo identificar apenas 5 espécies das 31 atualmente reconhecidas.

A determinação de *A. butzleri* como espécie mais frequente assemelha-se a relatórios anteriores onde elevadas prevalências desta espécie foram encontradas a partir de diferentes ambientes aquáticos (Morita et al. 2005; Collado et al. 2008; Çelik and Ünver 2015; Talay, Molva, and Atabay 2016). Quanto à presença de outras espécies, apenas se verificou a deteção de *A. cryaerophilus* em menos amostras, apoiando o anteriormente descrito por Çelik and Ünver (2015), que sugeriu que *A. butzleri* poderá ser mais resistente em relação a outras espécies existentes no meio de enriquecimento, podendo desta forma representar o efeito inibitório competitivo desta espécie sobre outras presentes na dinâmica populacional. Da mesma forma, também a própria metodologia de cultura foi descrita como influenciando as espécies

encontradas nas amostras, com parâmetros como composição do meio, etapa de pré-enriquecimento, condições atmosféricas ou tempo de incubação de enriquecimento e plaqueamento, influenciando a seletividade de recuperação e especificidade do processo, favorecendo a recuperação de *A. butzleri* em detrimento de outras espécies (Levicán, Collado, and Figueras 2016; Houf et al. 2002), o que pode contribuir para a maior taxa de amostras positivas observadas para esta espécie.

4.2 Genotipagem e diversidade genética

Após o isolamento e identificação molecular das diferentes amostras, todos os isolados positivos foram genotipados através da metodologia de ERIC-PCR de maneira a inferir sobre a diversidade genética de todas as amostras, e selecionar os isolados que seriam posteriormente analisados quanto à sua suscetibilidade a diferentes antibióticos. A Figura 10 mostra-nos o resultado de um exemplo de uma corrida de eletroforese após a reação de ERIC-PCR, que serve de exemplo da avaliação da diversidade genética de cada grupo bacteriano estudado.

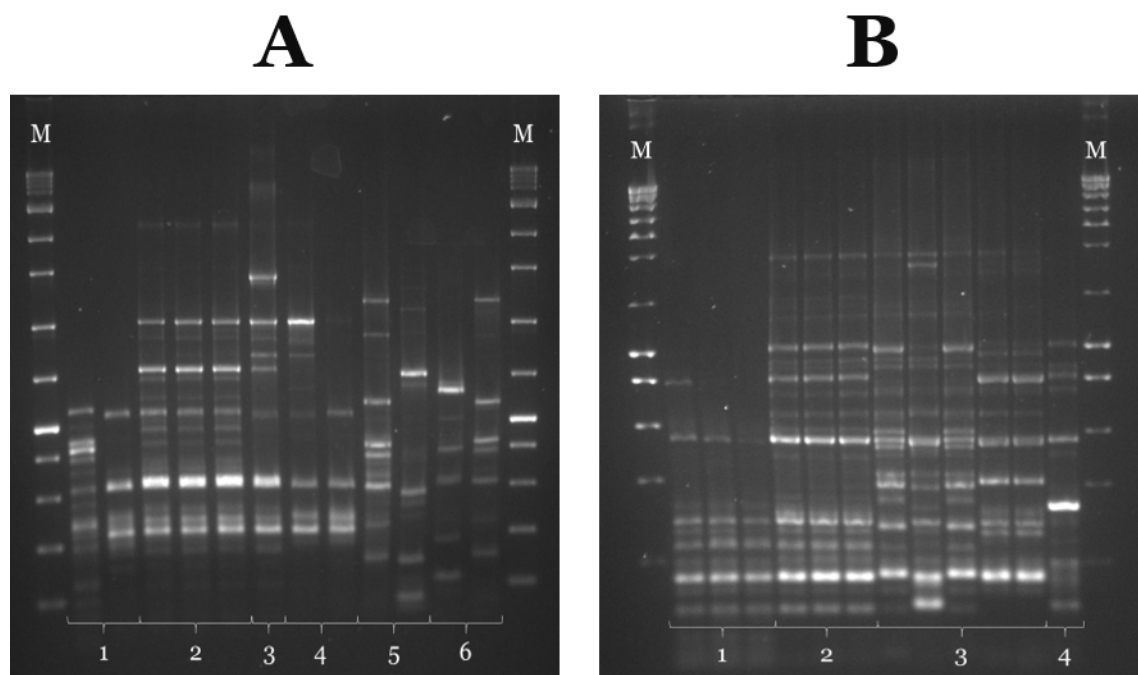


Figura 10: Padrões dos perfis genéticos de isolados por ERIC-PCR. A) *Campylobacter* spp.. M representa o marcador de pesos moleculares. As chavetas 1, 2, 3, 4, 5 e 6 correspondem a isolados de seis amostras diferentes. B) *Arcobacter sensu lato*. M representa o marcador de pesos moleculares. As chavetas 1, 2, 3 e 4 correspondem a isolados de quatro amostras de diferentes origens.

No que diz respeito a amostras de *Campylobacter* spp., verificou-se uma elevada diversidade genética entre os isolados, revelando um total de 37 perfis genéticos diferentes entre os 50 isolados identificados como pertencendo a este género provenientes de 22 amostras (Tabela 10).

Quanto às espécies isoladas, observou-se que *C. coli* foi a que apresentou maior diversidade genética contendo 9 perfis genéticos distintos em 11 isolados, seguindo-se a espécie *C. jejuni* e *C. lari*, ambas com 8 perfis genéticos de um total de 13 isolados identificados, e por último *C. upsaliensis* com apenas um isolado.

Tabela 10: Diversidade genética entre os isolados de *Campylobacter* spp. nas diferentes amostras de água.

Amostras de água	Número de amostras positivas	Número de isolados	Número de perfis genéticos distintos
Água de Rio	7	16	11
Água de afluente do Rio	11	25	18
Água de nascente	4	9	8

Assim, pela análise global dos resultados, técnicas de tipagem molecular revelaram alta diversidade genética de espécies de *Campylobacter* spp.. Esta foi já reportada em isolados do género *Campylobacter* provenientes de ambientes fluviais e água de consumo, onde, por exemplo, 42 de um total de 46 perfis se revelaram únicos (Denis et al. 2011). Segundo os autores, tal variabilidade no genótipo de *Campylobacter* está provavelmente ligada à presença, em determinados momentos, de animais e atividades agrícolas ao redor dos rios (Denis et al. 2011). Também recentemente, num estudo de avaliação da diversidade genética utilizando a metodologia de ERIC-PCR, elevada heterogeneidade foi igualmente observada em isolados derivados de fontes alimentares e ambientes aquáticos, onde das 71 estirpes de *C. jejuni* e *C. coli*, 58 se apresentaram com perfil genético distinto (Igwaran and Okoh 2020). A diversidade genética é um dos diferentes mecanismos que ajudam estes agentes patogénicos a prosperar em circunstâncias hostis no ambiente ou no hospedeiro, dando-lhes a capacidade de colonizar múltiplos hospedeiros (Chuma et al. 2016), sendo esta afirmação apoiada através dos resultados obtidos neste estudo.

Da mesma forma, uma alta diversidade genética foi verificada entre os isolados de *Arcobacter sensu lato*, observando-se um total de 255 perfis genéticos de um total de 291 isolados identificados como pertencendo a este grupo obtidos a partir de 150 amostras (Tabela 11). Quanto às espécies de *Arcobacter sensu lato*, verificou-se que a diversidade genética é elevada com *A. butzleri* apresentando um total de 175 perfis genéticos distintos em 208 isolados, e a espécie *A. cryaerophilus* com 34 perfis genéticos entre 35 isolados totais.

Tabela 11: Diversidade genética entre os isolados de *Arcobacter sensu lato* nas diferentes amostras de água

Amostras de água	Número amostras positivas	Número isolados positivos	Número perfis genéticos distintos
Água de Rio	29	110	100
Água de afluente do Rio	46	141	124
Água de nascente	14	40	31

A alta diversidade genética observada para este grupo vai ao encontro com o anteriormente relatado por Collado et al. (2010), onde foi observada uma alta prevalência de espécies pertencentes a *Arcobacter sensu lato* em águas superficiais, sendo que através da análise da sua diversidade genética, 91,2 % (309/339) das colônias apresentaram genótipos diferentes, nomeadamente, 248 entre os 275 isolados de *A. butzleri* e 60 de um total de 63 isolados de *A. cryaerophilus*. Assim, segundo as conclusões dos autores, face à alta diversidade genética observada poderá inferir-se que isolados específicos de *Arcobacter sensu lato* não são capazes de persistir ou colonizar predominantemente no mesmo local do rio ao longo do tempo (Collado et al. 2010). Da mesma forma, segundo Aydin et al. (2007), a deteção de elevada variabilidade genética em isolados deste grupo bacteriano pode indicar várias fontes de contaminação deste tipo de águas, o que aumenta o nível de risco para animais e população em redor destes locais.

4.3 Resistência a antibióticos

No século anterior, várias infeções bacterianas intratáveis passaram a ser passíveis de tratamento devido à descoberta de antibióticos capazes de eliminar estes agentes patogénicos. Contudo, a sua utilização inadequada e excessiva acabou por levar ao aparecimento e disseminação progressiva de uma população microbiana resistente (Rajagunalan et al. 2013).

Para além da utilização de antibióticos no Homem, estes podem ser aplicados em larga escala na produção animal como medicamentos terapêuticos e aditivos para rações para prevenção e tratamento de doenças e taxas de crescimento melhoradas (Kümmerer 2009; Wei et al. 2011).. Assim, a utilização de águas residuais de origem animal em ambientes agropecuários poderá contaminar os solos e os sistemas de água circundantes, representando assim uma séria ameaça para o homem e meio ambiente (Kümmerer 2009; Wei et al. 2011). Da mesma forma, estes podem ser transportados para valas, rios e riachos por meio de escoamento e drenagem, águas subterrâneas através de lixiviação, contaminando águas e chegando mesmo a permitir a sua entrada na própria cadeia alimentar. Estes compostos antimicrobianos podem exercer uma pressão seletiva sobre os microrganismos resultando no desenvolvimento de resistência por bactérias patogénicas, e conseqüentemente levar a um tratamento ineficaz das infeções causadas por estes microrganismos (Wei et al. 2011; S. Kim, Park, and Chandran 2010).

Assim, sendo *Campylobacter* e *Arcobacter sensu lato* considerados como agentes patogênicos emergentes de origem alimentar e hídrica, e dada a sua elevada prevalência em ambientes aquáticos, torna-se importante avaliar a resistência das estirpes isoladas a partir dos diversos corpos de água, submetendo-as a testes de suscetibilidade a antibióticos utilizados na área clínica e veterinária.

4.3.1 *Campylobacter* spp.

O perfil de resistência a antibióticos de 25 estirpes de *Campylobacter* spp. foi avaliado usando a metodologia de difusão em disco. A seleção de estirpes a avaliar foi feita considerando, os isolados onde foi possível a identificação quanto à espécie por MALDI-TOF MS, e que apresentaram perfis de ERIC-PCR únicos. A suscetibilidade foi avaliada relativamente a 7 antibióticos pertencentes a 7 classes distintas: aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, macrólidos, tetraciclina, carbapenemos, penicilinas e combinação β -lactâmicos/inibidor de β -lactamases, sendo estes utilizados em casos clínicos associados a infecções por espécies de *Campylobacter* spp. (Bolton 2015; Dai et al. 2020). A tabela 12 apresenta o número de isolados resistentes a cada antibiótico, tendo em conta cada tipo de água analisada.

Tabela 12 : Resistência antimicrobiana de *Campylobacter* spp. isolado a partir de diferentes amostras de água.

Antibióticos	Amostra de água			
	Número de estirpes resistentes/Número de estirpes totais (% Resistência)			
	Água de rio	Água de afluente	Fonte de nascente	Total
Gentamicina	0/8 (0 %)	0/11 (0 %)	0/5 (0%)	0/25 (0 %)
Ciprofloxacina	0/8 (0 %)	1/11 (9,1 %)	1/5 (20 %)	2/25 (8 %)
Eritromicina	1/8 (12,5 %)	0/11 (0 %)	0/5 (0 %)	1/25 (4%)
Tetraciclina	0/8 (0 %)	1/11 (9,1 %)	2/5 (40 %)	3/25 (12%)
Ertapenemo	0/8 (0 %)	0/11 (0 %)	0/5 (0 %)	0/25 (0 %)
Ampicilina	3/8 (37,5 %)	6/11 (54,5 %)	1/5 (20 %)	10/25 (40 %)
Amoxicilina+ácido clavulânico	0/8 (0 %)	0/11 (0 %)	1/5 (20 %)	1/25 (4 %)

Pela análise da tabela, intervalos de frequência de resistência para a ampicilina entre 20 e 54,5% foram observados, encontrando-se de acordo com o reportado acerca da alta resistência por parte destas bactérias para esta classe de antibióticos. Esta resistência está normalmente correlacionada com a presença de β -lactamases em estirpes resistentes de *Campylobacter* spp. (Taylor and Courvalin 1988). Isto pode ser correlacionado com os resultados obtidos dado que

quando foi avaliada a suscetibilidade das estirpes a uma penicilina combinada com um inibidor de β -lactamases (amoxicilina+ácido clavulânico), os valores de frequência de resistência reduziram. Em relação à classe das tetraciclina, esta revelou-se como o segundo antibiótico com nível global de resistência superior (12 %). A resistência à tetraciclina foi demonstrada como podendo ser mediada por plasmídeo, existindo assim a possibilidade de transferência de genes de resistência entre bactérias do género *Campylobacter* e outras bactérias do meio ambiente (Pratt and Korolik 2005), sendo por isso uma possível justificação dos resultados apresentados. No entanto, os valores de frequência de resistência revelaram-se inferiores aos obtidos no estudo de Kanwal et al. (2019) sobre a resistência antimicrobiana de isolados de águas residuais, no qual se observou que grande parte das bactérias se revelaram resistentes para este agente antimicrobiano.

No que se refere à classe das fluoroquinolonas, dada a sua crescente utilização na produção avícola, o aparecimento de estirpes de *Campylobacter* termofílicas resistentes à ciprofloxacina tem vindo a aumentar (Moore and Matsuda 2004). Da mesma forma, tendência de resistência à eritromicina em isolados clínicos tem sido frequentemente relatada (Moore et al. 2006). Szczepanska, Spica, and Klawe (2017), reportaram resistências significativas para a classe das fluoroquinolonas (66,7 %) num estudo de prevalência e resistência antimicrobiana de *C. jejuni* e *C. coli* isolados de fontes ambientais em áreas urbanas e suburbanas. Também em relação a macrólidos, foram reportadas altas frequências de resistência, onde 98 % das estirpes de *Campylobacter* spp. originárias de ambientes aquáticos, se revelaram resistentes a esta classe de antibióticos (Karikari et al. 2016). Contudo, pela observação dos resultados, foram encontrados níveis mais baixos de resistência para ciprofloxacina e eritromicina, apresentando-se com uma taxa de resistência de 8 e 4 % para ambas as classes de antibióticos, respetivamente. Ainda assim, uma vez comparados com resultados de diferentes origens, diferenças no clima, bem como a diversidade na origem das amostras de água, poderão ser uma possível justificação para as divergências encontradas, uma vez que, tais características poderão ter influência na resistência destas bactérias (Kanwal et al. 2019).

Em relação à suscetibilidade das estirpes, observou-se que para gentamicina, ertapenemo e amoxicilina com ácido clavulânico, também a taxa de resistência se revelou nula ou baixa. Do mesmo modo, vários são os trabalhos onde a elevada percentagem de suscetibilidade a estes agentes antimicrobianos foi observada (Post et al. 2017; Gaudreau et al. 2016; Szczepanska, Spica, and Klawe 2017). Por este motivo, a utilização de aminoglicosídeos intravenosos foi já considerada na escolha do tratamento de bacteriemias graves e outras infeções sistémicas causadas por *Campylobacter* spp. (Aarestrup and Engberg 2001), sendo tal afirmação apoiada neste trabalho, face aos valores apresentados.

Apesar das principais fontes de campilobacteriose humana estarem intimamente relacionadas com origem animal, fontes como água ambiental poderão ser consideradas como potenciais modos de transmissão da doença (Szczepanska, Spica, and Klawe 2017). Segundo o último

relatório europeu acerca da resistência antimicrobiana em bactérias zoonóticas isoladas a partir de humanos, animais e alimentos, Portugal encontra-se entre os países com as mais altas taxas de resistência por *Campylobacter* da Europa (EFSA and ECDC 2020). Ainda assim, por comparação com os resultados apresentados neste estudo, os níveis de resistência observados neste trabalho encontram-se muito abaixo do reportado, principalmente para antibióticos como ciprofloxacina e eritromicina, onde valores superiores a 50 % de resistência combinada a estes agentes antimicrobianos foram observados em isolados das diversas origens (EFSA and ECDC 2020). Desta forma, e tal como já relatado por alguns autores (Lévesque, Frost, and Michaud 2007; Lindmark et al. 2004; Denis et al. 2012), bactérias deste género isoladas a partir de origem hídrica tendem a apresentar maior suscetibilidade antimicrobiana face a isolados humanos e animais, onde o contato mais próximo e a crescente utilização de antibióticos observada em ambientes clínicos e agropecuários poderá surgir como uma possível justificação para as discrepâncias encontradas, resultando em bactérias com maior índice de resistência.

Após a avaliação do perfil de resistência de todos os isolados, analisámos as resistências por espécie do género *Campylobacter*, quer resistências individuais (Figura 11), quer perfis de multirresistência (Figura 12), dado que o aparecimento de bactérias multirresistentes constitui um sério risco para a saúde da população (Looveren et al. 2001).

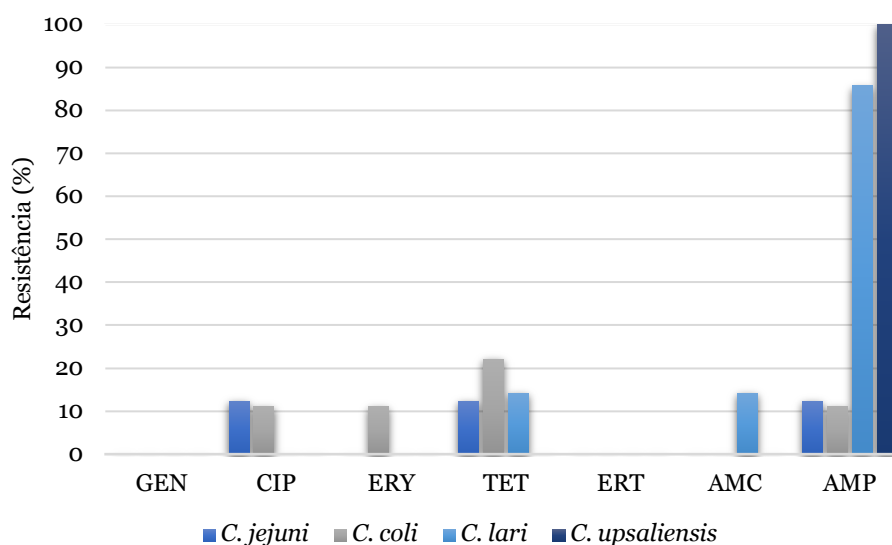


Figura 11: Resistência a cada antibiótico testado por espécie de *Campylobacter* spp. GEN – Gentamicina; CIP – Ciprofloxacina; ERY – Eritromicina; TET – Tetraciclina; ERT – Ertapenemo AMC – Amoxicilina+ácido clavulânico; AMP – Ampicilina

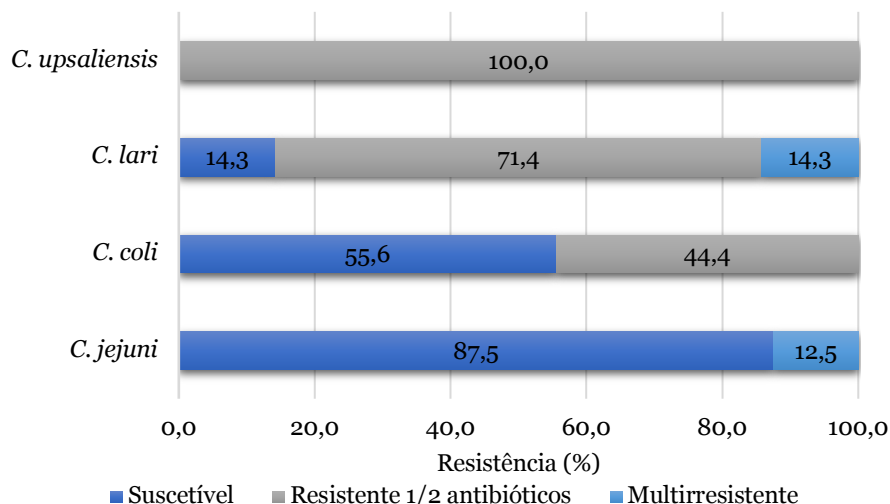


Figura 12: Proporção de isolados totalmente suscetíveis, resistentes a um ou dois dos antibióticos testados e multirresistentes por espécie de *Campylobacter*.

Estudos anteriores sugeriram que ambientes aquáticos como águas superficiais e subterrâneas permitem trocas horizontais de genes para a aquisição e disseminação de resistência a antibióticos (Marti, Variatza, and Balcazar 2014). Por conseguinte, alguns estudos reportaram elevadas taxas de multirresistência de *Campylobacter* recuperados de diversas fontes alimentares, humanas e ambientais (Mourkas et al. 2019; Otigbu et al. 2018). No entanto, em espécies de *Campylobacter* spp. foi também reportada uma elevada suscetibilidade antimicrobiana em isolados provenientes de águas superficiais, onde valores máximos de multirresistência rondaram os 2,8% (Denis et al. 2012; Lindmark, Harbom, Thebo, Andersson, Hedin, Osterman, Lindberg, Andersson, and Westo 2004). Com base no perfil fenotípico de resistência observado neste trabalho é possível verificar que a maioria das estirpes em estudo não apresentaram resistência a mais de duas classes de antibióticos testados, verificando-se que do total das 25 estirpes analisadas (Figura 12 e Anexo I), apenas duas foram classificadas como multirresistentes, apresentando resistência a três das sete classes de antibióticos testadas. Ainda assim, diferentes padrões de resistência e multirresistência parecem depender do país onde é efetuado o estudo, do tipo de água de onde é efetuado o isolamento, da metodologia utilizada para avaliação (Denis et al. 2012), bem como de diferenças até ao nível regional.

4.3.2 *Arcobacter sensu lato*

De igual forma ao efetuado com o género *Campylobacter*, procedeu-se à avaliação do perfil de resistência a antibióticos das estirpes identificadas como *Arcobacter sensu lato* que apresentaram perfis de ERIC-PCR únicos. Neste passo foram eliminados dezassete isolados do estudo, uma vez que se perderam. Desta forma, um total de 238 estirpes foram testadas através da metodologia de difusão em disco, para as mesmas 7 classes de antibióticos já referidas.

Analisando os resultados obtidos (Tabela 13) observou-se uma frequência de resistência elevada à tetraciclina, sendo este o antibiótico onde se obteve as mais elevadas percentagens de resistência, superiores a 90 %. Os estudos de suscetibilidade antimicrobiana relevaram também uma taxa de resistência elevada à eritromicina, ertapenemo e ampicilina, obtendo-se resistências de 73,9 %, 66,0 % e 72,7 %, respetivamente. Tais percentagens de resistência são muito superiores às descritas por outros estudos anteriores, onde isolados de origem ambiental apresentaram baixas taxas de resistência às tetraciclinas (0 a 3,7 %) e nulas para eritromicina (Isidro et al. 2020; Šilha, Pejchalová, and Šilhová 2017). Sendo estas duas das classes de antibióticos sugeridas para o tratamento de infeções associadas a bactérias pertencentes a este grupo bacteriano (Ferreira et al. 2016), o presente estudo indica que pode haver um aumento na resistência a estes antimicrobianos face os valores apresentados, representando um sério risco para a população. Quanto ao antibiótico ampicilina, percentagens de resistência de 66,6 a 73,8 % foram já reportadas para isolados com proveniência em ambientes aquáticos (Šilha, Pejchalová, and Šilhová 2017; Rathlavath et al. 2017; Ferreira et al. 2019), encontram-se de acordo com o observado neste trabalho.

Relativamente à ciprofloxacina, as percentagens de resistência das estirpes foram mais baixas com valores de 24,8 %. Ainda assim, tais valores de resistência são superiores aos descritos por Vandenberg et al. (2006), no qual as resistências para as fluoroquinolonas de isolados humanos apresentaram uma percentagem de 3,3 %, tendo neste caso sido a classe de antibióticos sugerida para o tratamento de doenças associadas à infeção por espécies deste género. Intervalos de frequência de resistência para o antibiótico amoxicilina+ácido clavulânico entre 11,5 e 19 % foram observados, encontrando-se abaixo do reportado acerca da resistência por parte destas bactérias, isoladas a partir de ambientes marinhos, para esta classe de antibióticos (Rathlavath et al. 2017). Semelhante a *Campylobacter* spp., a resistência à classe das penicilinas foi já correlacionada com a presença de β -lactamases em estirpes resistentes de *Arcobacter sensu lato* (Isidro et al. 2020). Desta forma, a baixa resistência observada vai ao encontro de resultados obtidos por Miller et al. (2007), uma vez que quando avaliada a suscetibilidade de bactérias deste grupo a uma penicilina combinada com um inibidor de β -lactamases (amoxicilina+ácido clavulânico), os valores de resistência reduziram. Por fim, e segundo o já reportado (Šilha, Pejchalová, and Šilhová 2017; Isidro et al. 2020), maiores taxas de resistência das estirpes analisadas foram observadas para a classe dos aminoglicosídeos (18,1 %). Contudo, tais resultados poderão apoiar o sugerido por Rathlavath et al. (2017), na utilização deste composto para o tratamento de doenças por *Arcobacter sensu lato*, uma vez que menores taxas de resistência foram observadas em comparação com os outros antibióticos.

Tabela 13: Resistência antimicrobiana de *Arcobacter sensu lato* isolado a partir de diferentes amostras de água.

Antibióticos	Amostra de água			
	Número de estirpes resistentes/Número de estirpes totais (% Resistência)			
	Água de rio	Água de afluente	Fonte de nascente	Total
Gentamicina	20/96 (20,8 %)	18/116 (15,5 %)	5/26 (19,2 %)	43/238 (18,1 %)
Ciprofloxacina	26/96 (27,1 %)	28/116 (24,1 %)	5/26 (19,2 %)	59/238 (24,8 %)
Eritromicina	75/96 (78,1 %)	79/116 (68,1 %)	22/26 (84,6 %)	176/238 (73,9 %)
Tetraciclina	90/96 (93,7 %)	102/116 (87,9 %)	23/26 (88,5 %)	215/238 (90,3%)
Ertapenemo	65/96 (67,7 %)	77/116 (66,4 %)	15/26 (57,7 %)	157/238 (66 %)
Amoxicilina+ácido clavulânico	16/96 (16,7 %)	22/116 (19 %)	3/26 (11,5 %)	41/238 (17,2 %)
Ampicilina	68/96 (70,8 %)	86/116 (74,1 %)	19/26 (73,1 %)	173/238 (72,7%)

Uma vez relatada a possível contaminação da água de superfície por fezes de animais, torna-se relevante a comparação destes valores com os de isolados de origem animal e a partir de ambientes agropecuários. Desta forma, percentagens reduzidas de resistência foram já reportadas em estirpes provenientes de carne de frango para os antimicrobianos tetraciclina, eritromicina e ciprofloxacina (Šilha, Pejchalová, and Šilňová 2017). Por outro lado, num estudo levado a cabo por Vicente-Martins et al. (2018) em Portugal, verificaram-se taxas de resistência, para isolados de diferentes categorias alimentares, semelhantes aos obtidos neste estudo com valores de resistência de 90,5 % e 21 %, para os antibióticos tetraciclina e ciprofloxacina, respetivamente. Ainda assim, referente à classe dos aminoglicosídeos, macrólidos e β -lactâmicos, as estirpes revelaram-se mais suscetíveis quando comparados com os valores observados neste trabalho (Vicente-Martins et al. 2018). Assim, e uma vez sendo o país de origem e área regional, comum a ambos os estudos, tais comparações possibilitam a hipótese de isolados de origem hídrica, apresentarem níveis resistência a antibióticos idênticos ou superiores a estirpes de origem alimentar. A possível abundância de agentes antimicrobianos transportados para o ambiente poderá exercer pressão seletiva, resultando em bactérias resistentes, tal como descrito por Kim, Park, and Chandran (2010).

As Figuras 13 e 14 apresentam a distribuição das estirpes obtidas por perfil fenotípico de resistência, fazendo a distinção entre as diferentes espécies isoladas. Através da sua observação, pode verificar-se que a espécie cujas estirpes apresentam menor suscetibilidade para o total de classes de antimicrobianos testados é *A. butzleri*, apresentando um total de 171 (98,8%) isolados resistentes a pelo menos um antibiótico, seguindo-se de *A. cryaerophilus* contendo 27 (96,4 %) isolados resistentes a uma ou mais classes de antibióticos. Quanto à resistência a cada uma das classes de antibióticos, também *A. butzleri* foi a espécie que se revelou menos suscetível, com as

seguintes taxas de resistência: 16,7 % para gentamicina, 25,4 % para ciprofloxacina, 72,2 % para eritromicina, 90,2 % para tetraciclina, 72,8 % para ertapenemo, 17,9 % para amoxicilina com ácido clavulânico e 74,6 % para ampicilina. Em comparação com *A. cryaerophilus*, esta apenas se revelou mais resistente para duas das sete classes de antimicrobianos, nomeadamente eritromicina, com uma frequência de resistência de 79,3 %, e amoxicilina com ácido clavulânico, com 27,6 % de estirpes resistentes. Desta forma, tais resultados confirmam o anteriormente descrito por Ferreira et al. (2016), onde elevadas taxas de resistência observadas para *A. butzleri* sugerem esta espécie como um reservatório de genes que pode contribuir para a disseminação da resistência a agentes antimicrobianos através da interface animal-humano-ambiente, podendo indiretamente resultar no fracasso do tratamento de infeções mais graves.

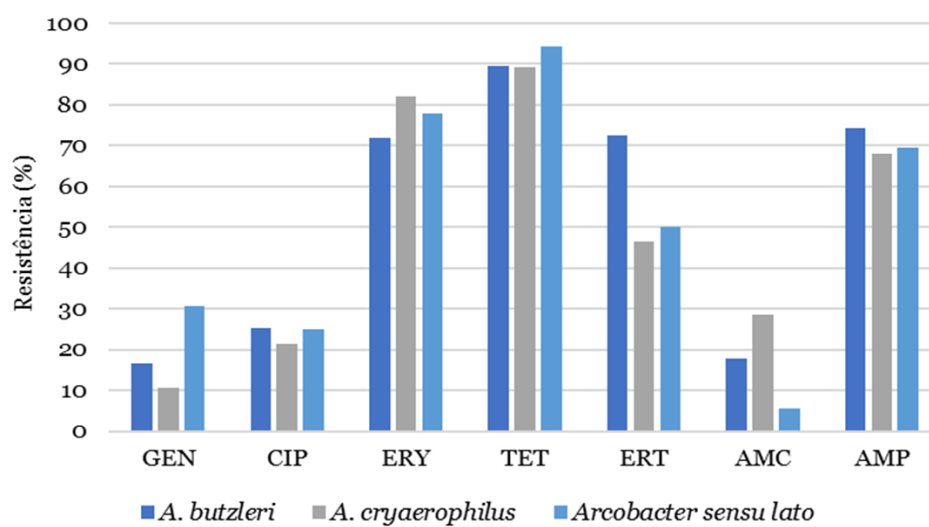


Figura 13: Resistência a cada antibiótico testado por espécie de *Arcobacter sensu lato*. GEN – Gentamicina; CIP – Ciprofloxacina; ERY – Eritromicina; TET – Tetraciclina; ERT - Ertapenemo AMC – Amoxicilina+ácido clavulânico; AMP – Ampicilina

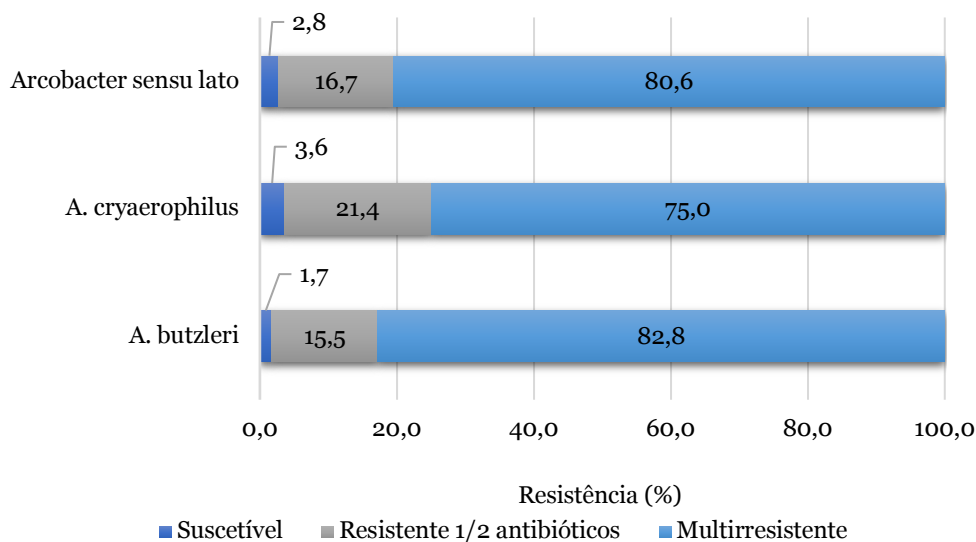


Figura 14: Proporção de isolados totalmente suscetíveis, resistentes a um ou dois dos antibióticos testados e multirresistentes por espécie de *Arcobacter sensu lato*.

No que toca à avaliação da multirresistência, também através da Figura 14 é possível verificar que, de um modo geral, a maioria das estirpes em estudo apresentam um perfil de multirresistência. Uma estirpe é considerada multirresistente quando apresenta resistência a três ou mais classes de antibióticos distintos, sendo que esta multirresistência foi já reportada em espécies pertencentes a *Arcobacter sensu lato*, tanto em ambientes aquáticos (Rathlavath et al. 2017), como proveniente de amostras alimentares (Vicente-Martins et al. 2018). Da mesma forma, num estudo de suscetibilidade de isolados de *Arcobacter* de diferentes fontes, elevadas percentagens de multirresistência foram igualmente identificadas, em que 89 % dos isolados de *A. butzleri* e *A. cryaerophilus*, provenientes de carne de aves, amostras de águas residuais e fezes humanas, se revelaram multirresistentes (Šilha, Pejchalová, and Šilhová 2017).

Assim, através da análise da Figura 14 e Anexo II relativamente aos resultados obtidos neste estudo consegue-se observar uma multirresistência em 194 estirpes das 238 (81,5 %) estudadas, valor este muito elevado, verificando-se casos em que a resistência é transversal a seis antibióticos/classes em estudo.

Elevados valores de resistência das diferentes estirpes podem estar associados à pressão seletiva que é criada, por exemplo, através da utilização excessiva de antibióticos nos processos de produção de animais para consumo humano, descargas de efluentes domésticos e industriais onde uma vez excretados para o solo e cursos de água, podem levar à disseminação destas bactérias resistentes no meio ambiente, resultando num sério risco para a população. Além disso, a introdução ou acúmulo progressivo no meio ambiente de agentes antimicrobianos, detergentes, desinfetantes e resíduos da poluição industrial, doméstica e até hospitalar, poderá contribuir para a evolução e disseminação desses organismos resistentes no meio aquático

(Baquero, Martínez and Cantón 2008). Isto é evidenciado dado que o consumo destes alimentos ou água contaminados com *Arcobacter sensu lato* é considerado como a principal via de transmissão para humanos e animais (Collado et al. 2011). Desta forma, torna-se necessário rever autorizações e limites de utilização de antibióticos de maneira a evitar transferência de resistências que possam dificultar ou impossibilitar o tratamento de patologias causadas pela infecção por estas bactérias. Por outro lado, o fato de não existirem critérios internacionais estabelecidos referentes aos pontos de corte específicos para *Arcobacter sensu lato*, bem como um método padronizado para a avaliação da suscetibilidade antimicrobiana, poderá resultar numa avaliação incorreta e incompleta da resistência deste grupo, e dificulta uma adequada comparação com outros trabalhos (Ferreira et al. 2016, 2019). Desta forma, é também importante a criação de um método de avaliação da suscetibilidade antimicrobiana adequado e desenhado para este microrganismo, pois a falta de um protocolo sensível, e pontos de corte específicos podem resultar numa interpretação inadequada dos resultados obtidos, dificultando a comparação de dados entre os diferentes estudos (Ferreira et al. 2016).

Assim, uma vez incluídos na lista de microrganismos considerados um perigo grave para a saúde humana pela Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos (ICMSF 2002), a elevada prevalência de *A. butzleri* e *A. cryaerophilus* em ambientes aquáticos pode ser preocupante, principalmente acrescido quando associada a uma elevada taxa de resistência a diversos antibióticos, o que poderá ter um papel relevante tanto na ineficácia do tratamento de infecções por elas causadas, como na transferência de resistência a outras bactérias patogênicas presentes no mesmo ambiente.

Capítulo 5: Conclusão

Dada a inexistência de dados relativos à prevalência de *Campylobacter* e *Arcobacter sensu lato* em ambientes aquáticos em território Nacional, este trabalho procurou inferir acerca da prevalência destas bactérias em diferentes corpos de água contribuindo assim para um melhor conhecimento acerca da prevalência e resistência destes microrganismos.

Um total de 150 amostras de diferentes ambientes aquáticos foram analisadas, obtendo-se uma taxa de prevalência mais baixa do género *Campylobacter* (40 %), quando comparada com *Arcobacter sensu lato* (66 %). Relativamente a presença de ambos os grupos bacterianos nas diferentes amostras em estudo, maiores taxas de recuperação foram observadas em águas do Rio, seguido de águas de afluentes e por fim fontes de água de nascente não tratada. Após deteção molecular de *Campylobacter* spp. diretamente ao meio de enriquecimento foram registadas 37,3 % de amostras positivas, e 14,6 % amostras positivas quando se efetuou o processo de isolamento seguido pela identificação molecular de todos os isolados. Valores superiores foram obtidos relativamente à deteção de *Arcobacter sensu lato*, nomeadamente observou-se uma prevalência de 48 % por deteção molecular direta e 59,3 % quando utilizados métodos de cultura. Após efetuada a identificação das diferentes espécies presentes, verificou-se uma maior prevalência de *C. jejuni* (36,4%), e *A. butzleri* apresentou-se como espécie maioritária do grupo *Arcobacter sensu lato*, com uma prevalência de 83,1 %. Outras espécies foram também isoladas a partir das diversas amostras, nomeadamente *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* e ainda *A. cryaerophilus*. Também 9,1 % e 31,5 % das amostras revelaram-se contaminadas com outras espécies de *Campylobacter* spp. e *Arcobacter sensu lato*, respetivamente, embora não fosse possível identificar a espécie pertencente.

Uma vez observada a prevalência de ambos os grupos bacterianos, o estudo da sua variação sazonal foi efetuado, observando-se uma maior recuperação de *Campylobacter* spp. nos meses de outubro e fevereiro, e uma maior taxa de isolamento de *Arcobacter sensu lato* em novembro e fevereiro. Desta forma, níveis mais baixos de temperatura e maiores índices de pluviosidade pareceram favorecer a acumulação e recuperação de estirpes de ambos os grupos bacterianos. De igual forma, a diversidade genética entre os isolados positivos foi avaliada, verificando-se uma elevada heterogeneidade genética, conseguindo-se identificar 37 perfis genéticos distintos entre os 50 isolados positivos para o género *Campylobacter* spp., e 255 de um total de 291 isolados de *Arcobacter sensu lato*.

Posteriormente, o perfil de resistência das estirpes de *Campylobacter* e *Arcobacter sensu lato* foi também avaliado, onde foram observadas diferenças na resistência por comparação entre ambos os grupos. Em geral, espécies do género *Campylobacter* revelaram percentagens de resistência de 40 % para a ampicilina, 12 % para tetraciclina, 8 % para o antibiótico ciprofloxacina e 4 % para eritromicina e amoxicilina com ácido clavulânico. Não foi observada

resistência à gentamicina e ertapenemo, podendo a utilização destes antibióticos ser uma opção na terapêutica de infecções graves causadas por *Campylobacter* spp. com origem hídrica. Por outro lado, um maior índice de resistência foi observado na generalidade dos isolados de *Arcobacter sensu lato*, onde a maioria das estirpes revelou-se resistente à tetraciclina (72,7 %), eritromicina (73,9 %) e ampicilina (72,7 %), 66% dos isolados foram resistentes ao ertapenemo, 24,8 % à ciprofloxacina, 18,1 % à gentamicina e por fim 17,2 % foram resistentes à combinação amoxicilina com ácido clavulânico. Da mesma forma, constaram-se diferenças significativas na multirresistência por comparação dos dois grupos bacterianos, onde 8% dos isolados de *Campylobacter* apresentaram um perfil de multirresistência, face ao observado para *Arcobacter sensu lato*, onde 81,5 % dos isolados apresentou resistência a três ou mais antibióticos. Altas taxas de multirresistência podem dificultar e até impossibilitar um tratamento eficaz de possíveis infecções graves causadas por estes microrganismos. Assim, poderá ser necessário alertar a população para os riscos que estas resistências podem transportar, bem como definir uma estratégia de tratamento eficaz de infecções por estes microrganismos, uma vez considerados como patogénicos emergentes.

Em conclusão, através deste trabalho foi possível estudar a prevalência de *Campylobacter* spp. e *Arcobacter sensu lato* em amostras de diversos ambientes aquáticos, avaliar a sua presença através de duas metodologias de isolamento distintos, observar a diversidade genética entre os isolados obtidos e ainda inferir sobre o perfil de resistência das estirpes isoladas a vários antibióticos. Tais resultados reforçam a ideia de que a água poderá desempenhar um papel importante na transmissão de bactérias patogénicas, como o caso de *Campylobacter* e *Arcobacter sensu lato*, onde a presença e infecções por elas associadas poderão estar a ser subestimadas.

Capítulo 6: Perspetivas futuras

Considerando o género *Campylobacter* spp. e grupo *Arcobacter sensu lato* como agentes patogénicos emergentes, verifica-se a necessidade de se estabelecer e padronizar metodologias que permitam uma real avaliação da sua distribuição, identificação inequívoca das espécies pertencentes a cada um grupo bacteriano, bem como da adequada avaliação dos seus padrões de resistência a antibióticos. Desta forma, torna-se importante o foco de algumas abordagens em trabalhos futuros:

- Identificar todos os isolados que se revelaram inconclusivos referente à espécie em ambos os grupos bacterianos através de métodos moleculares;
- Avaliar diversos métodos de isolamento a partir de amostras de água na tentativa de estabelecer as melhores condições de cultura, para o crescimento tanto do género *Campylobacter*, como de *Arcobacter sensu lato*;
- Efetuar uma análise quantitativa do número de células viáveis, de maneira a avaliar o grau de risco de aquisição da infeção;
- Melhorar ou desenhar novos PCR para a deteção destes grupos bacterianos e distinção das diferentes espécies a eles pertencentes, de maneira a evitar o aparecimento de resultados inconclusivos;
- Analisar possíveis rotas de transmissão e origem de contaminação dos ambientes aquáticos;
- Estabelecer pontos de corte específicos para o grupo *Arcobacter sensu lato*, assim como o desenvolvimento do método padrão para a avaliação correta da resistência antimicrobiana de bactérias de ambos os grupos, de forma a possibilitar uma comparação coerente com os dados já publicados.

Referências Bibliográficas

- Aarestrup, Frank M., Engberg, J.. 2001. "Antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter*." *Veterinary Research* 32 (3-4): 311-21.
- Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C., Viñas, I.. 2008. "Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments." *International Journal of Food Microbiology* 123 (1-2): 121-29.
- Abulreesh, H. H., Paget, T. A., Goulder, R.. 2006. "*Campylobacter* in waterfowl and aquatic environments: incidence and methods of detection." *Environmental Science and Technology* 40 (23): 7122-31.
- Adak, G. K., Cowden, J. M., Nicholas, S., Evans, H. S.. 1995. "The public health laboratory service national case-control study of primary indigenous sporadic cases of *Campylobacter* infection." *Epidemiology and Infection* 115 (1): 15-22.
- Alterkruse, S. F., Boor, K. J., Cook, M., Cole, E., Freier, T., Jaykus, L., King, R., Mazzotta, A., Kowalczyk, B., Perencevich, E., Rupple, A., Scott, J., Thompson, S., Zink, D., Wesley, I. V. 2007. National Advisory Committee on Microbiological Criteria For Foods. "Analytical utility of *Campylobacter* methodologies." *Journal of Food Protection* 70 (1): 241-50.
- Adzitey, F., Huda, N., Ali, G. R. R. . 2013. "Molecular techniques for detecting and typing of bacteria, advantages and application to foodborne pathogens isolated from ducks." *3 Biotech* 3 (2): 97-107.
- European Food Safety Authority (EFSA). 2008. "Foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard: scientific opinion of the panel on biological hazards." *The EFSA Journal* 765: 1-87.
- Alfredson, D. A., Korolik, V.. 2007. "Antibiotic resistance and resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*." *FEMS Microbiology Letters* 227 (2): 123-32.
- Alonso, R., Girbau, C., Martinez-Malaxetxebarria, I., Fernandez-Astorga, A., Pérez-Cataluña, A., Salas-Massó, N., Romalde, J. L., Figueras, MJ. 2020. "*Aliarcobacter vitoriensis* sp. nov., isolated from carrot and urban wastewater." *Systematic and Applied Microbiology* 43: 126091.
- Asakura, M., Samosornsuk, W., Taguchi, M., Kobayashi, K., Misawa, N., Kusumoto, M., Nishimura, K., Matsuhisa, A., Yamasaki, S. 2007. "Comparative analysis of cytolethal distending toxin (cdt) genes among *Campylobacter jejuni*, *C. coli* and *C. fetus* strains." *Microbial Pathogenesis* 43 (4): 174-83.
- Aski, H. S., Tabatabaei, M., Raeisi, M., Khoshbakht, R. 2015. "Occurrence and antimicrobial resistance of emergent *Arcobacter* spp. Isolated from cattle and sheep in Iran." *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 44: 37-40.
- Aslantaş, Ö. 2019. "Isolation and molecular characterization of thermophilic *Campylobacter* spp. in dogs and cats." *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 25 (3): 341-48.
- Atabay, H I, Corry, J. E. L. 1997. "The prevalence of campylobacters and arcobacters in broiler

- chickens.” *Journal of Applied Microbiology* 83 (5): 619–26.
- Aydin, F., Gümüşsoy, K. S., Atabay, H. I., Iça, T., Abay, S.. 2007. “Prevalence and distribution of *Arcobacter* species in various sources in turkey and molecular analysis of isolated strains by ERIC-PCR.” *Journal of Applied Microbiology* 103 (1): 27–35.
- Banting, G., Figueras, M. J.. 2017. “*Arcobacter*.” In *Global Water Pathogens Project*. Edited by Rose, J.B., Jiménez-Cisneros, B., Part 3, Michigan State University, E. Lansing, MI, UNESCO, 3–25.
- Baquero, F., Marínez, J. L., Cantón, R.. 2008. “Antibiotics and antibiotic resistance in water environments.” *Current opinion in biotechnology* 19 (3): 260–265.
- Barrett, J., Fhogartaigh, C. N. 2017. “Bacterial gastroenteritis.” *Medicine* 45 (11): 683–89.
- Bartholomew, N., Brunton, C., Mitchell, P., Wiliamson, J.. 2014. “A waterborne outbreak of campylobacteriosis in the South Island of New Zealand due to a failure to implement a multi-barrier approach.” *Journal of Water and Health* 12 (3): 555–64.
- Baylis, C. L., MacPhee, S., Martin, K. W., Humphrey, T. J., Betts, R. P. 2000. “Comparison of three enrichment media for the isolation of *Campylobacter* spp. from foods.” *Journal of Applied Microbiology* 89: 884–91.
- Benjamin, J., Leaper, S., Owen, R. J., Skirrow, M. B.. 1983. “Description of *Campylobacter laridis*, a new species comprising the nalidixic acid resistant thermophilic *Campylobacter* (NARTC) Group.” *Current Microbiology* 8 (4): 231–38.
- Bessède, E., Solecki, O., Siffrè, E., Labadi, L., Mégraud, F.. 2011. “Identification of *Campylobacter* species and related organisms by matrix assisted laser desorption ionization–time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry.” *Clinical Microbiology and Infectious* 17 (11): 1735–39.
- Beuchat, L. R. 1995. “Pathogenic microorganisms associated with fresh produce.” *Journal of Food Protection* 59 (2): 204–16.
- Bloomfield, S., Wilkinson, D., Rogers, L., Biggs, P., French, N., Mohan, V., Savoian, M., Venter, P., Midwinter, A.. 2020. “*Campylobacter novaezeelandiae* sp. nov., isolated from birds and water in New Zealand.” *International Journal of Sistematic and Evolutionary Microbiology* 70 (6): 3775–3784
- Bogantes, E. V., Fallas-padilla, K. L, Rodriguez-rodriguez, C. E, Jaramillo, H. F., Echandi, M. L. A. 2015. “Zoonotic species of the genus *Arcobacter* in poultry from different regions of Costa Rica.” *Journal of Food Protection* 78 (4): 808–11.
- Bolton, D. J. 2015. “*Campylobacter* virulence and survival factors.” *Food Microbiology* 48: 99–108.
- Boukerb, A. M, Penny, C., Serghine, J., Walczak, C., Cauchie, H. M., Miller, W. G, Losch, S., Ragimbeau, C., Mossong, J., Mégraud, F., Lehours, P., Bénéjat, L., Gourmelon, M.. 2019. “*Campylobacter armoricus* sp. nov., a novel member of the *Campylobacter lari* group isolated from surface water and stools from humans with enteric infection.” *International Journal of Sistematic and Evolutionary Microbiology* 69 (12): 3969–79.
- Brandl, M. T., Haxo, A. F., Bates, A. H, Mandrell, R. E. 2004. “Comparison of survival of *Campylobacter jejuni* in the phyllosphere with that in the rhizosphere of spinach and

- radish plants." *Applied and Environmental Microbiology* 70 (2): 1182–89.
- Breitenmoser, A., Fretz, R., Schmid, J., Besl, A., Etter, R. 2011. "Outbreak of acute gastroenteritis due to a washwater- contaminated water supply, Switzerland, 2008." *Journal of Water and Health* 9 (3): 569–76.
- Brennhovd, O., Kapperud, G., Langelan,d G. 1992. "Survey of thermotolerant *Campylobacter* spp. and *Yersinia* spp. in three surface water sources in Norway." *International Journal of Food Microbiology* 15 (3–4): 327–38.
- Brieseman, M. A. 1987. "Town water supply as the cause of an outbreak of *Campylobacter* infection." *The New Zealand Medical Journal* 100 (821): 212–213.
- Bronowski, C., James, C. E., Winstanley, C. 2014. "Role of environmental survival in transmission of *Campylobacter jejuni*." *FEMS Microbiology Letters* 356 (1): 8–19.
- Brookes, J. D., Antenucci, J., Hipsey, M., Burch, M. D., Ashbolt, N. J., Ferguson, C. 2004. "Fate and transport of pathogens in lakes and reservoirs." *Environment International* 30 (5): 741–59.
- Butzler, J. P. 2004. "*Campylobacter*, from obscurity to celebrity." *Clinical Microbiology and Infection* 10 (10): 868–76.
- Cáceres, A., Muñoz, I., Iraola, G., Díaz-Viraqué, F., Collado, L. 2017. "*Campylobacter ornithocola* sp. nov., a novel member of the *Campylobacter lari* group isolated from wild bird faecal samples." *International Journal of Sistematic and Evolutionary Microbiology* 67 (6): 1643–49.
- Callbeck, C. M., Pelzer, C., Lavik, G., Ferdelman, T. G., Graf, J. S., Schunck, H., Littmann, S., Fuchs, B. M., Hach, P. F., Kalvelage, T., Schmitz, R. A., Kuypers, M. M. M. 2019. "*Arcobacter peruensis* sp. nov., a chemolithoheterotroph isolated from sulfide and organic rich coastal waters off Peru." *Applied and Environmental Microbiology* 85 (24).
- Carrillo-Ávila, J. A., Sorlózano-Puerto, A., Pérez-Ruiz, M. 2016. "Brief report multilocus sequence typing analysis of human *Campylobacter coli* in Granada (Spain)." *Revista Española de Quimioterapia* 29 (6): 332–35.
- Carrillo, C. D., Kruczkiewicz, P., Mutschall, S., Tudor, C. C. A., 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: 1–12.
- Carrillo, C. D., Kenwell, R., Iugovaz, I., Oyarzabal, O. A. 2016. "Recovery of *Campylobacter* spp. from food and environmental sources" In *Campylobacter jejuni*. Edited by Butcher, J., Stintzi, A., Humana Press, New York, 9–18.
- Carrique-Mas, J. J., Bryant, J. E., Cuong, N. V., Hoang, N. V. M. 2014. "An epidemiological investigation of *Campylobacter* in pig and poultry farms in the mekong delta of Vietnam." *Epidemiology and Infection* 142 (7): 1425–36.
- Çelîk, E., Sağlam, A. G., Çelebî, Ö., Otlu, S. 2018. "Isolation of *Arcobacter* spp. from domestic ducks and geese and identification of the recovered isolates by using molecular method." *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 42 (5): 467–72.
- Çelik, E., Ünver, A. 2015. "Isolation and identification of *Arcobacter* spp. by multiplex per from

- water sources in Kars region." *Current Microbiology* 71 (5): 546–50.
- Cha, W., Mosci, R., Wengert, S. L., Singh, P., Newton, D. W., Salimnia, H., Lephart, P., Khalife, W., Mansfield, L. S., Rudrik, J. T., Manning, S, D.. 2016. "Antimicrobial susceptibility profiles of human *Campylobacter jejuni* isolates and association with phylogenetic lineages." *Frontiers in Microbiology* 7: 589.
- Chaban, B., Ngeleka, M., Hill, J. E. 2010. "Detection and quantification of 14 *Campylobacter* species in pet dogs reveals an increase in species richness in feces of diarrheic animals." *BioMed Central Microbiology* 10 (1): 73.
- Chokboonmongkol, C., Patchanee, P., Gözl, G., Zessin, K., Alter, T. 2009. "Prevalence, quantitative load, and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. from broiler ceca and broiler skin samples in Thailand." *Poultry Science* 92 (2): 462–67.
- Chuma, I. S., Nonga, H. E., Mdegela, R. H., Kazwala, R. R.. 2016. "Epidemiology and RAPD-PCR typing of thermophilic campylobacters from children under five years and chickens in morogoro municipality, Tanzania." *BMC Infectious Diseases* 16 (1): 1–11.
- Clark, C. G., Bryden, L., Cuff, W. R., Johnson, P. L., Jamieson, F., Ciebin, B., Wang, G. 2005. "Use of the oxford multilocus sequence typing protocol and sequencing of the flagellin short variable region to characterize isolates from a large outbreak of waterborne *Campylobacter* sp. strains in Walkerton, Ontario, Canada." *Journal of Clinical Microbiology* 43 (5): 2080–91.
- Clark, C. G., Price, L., Ahmed, R., Woodward, D. L., Melito, P. L., Rodgers, F. G., Jamieson, F., Ciebin, B., Li, A., Ellis, A. 2003. "Characterization of waterborne outbreak – associated *Campylobacter jejuni*, Walkerton, Ontario." *Emerging Infectious Diseases* 9 (10): 1232–1241.
- Clasen, T., Schmidt, W. P., Rabie, T., Roberts, I., Cairncross, S.. 2007. "Interventions to improve water quality for preventing diarrhea: systematic review and meta-analysis." *British Medical Journal* 33 (7597): 782
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2012a. "Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard—ninth edition (M07-A9)." CLSI Document M07-A9, Wayne, PA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2012b. "Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard—eleventh edition (M02-A11)." CLSI Document M02-A11, Wayne, PA.
- Coker, A. O., Isokpehi, R. D., Thomas, B. N., Amisu, K. O., Obi, C. L. 2002. "Human campylobacteriosis in developing countries." *Emerging Infectious Diseases* 8 (3): 237–43.
- Collado, L., Cleenwerck, I., Trappen S. V., Vos, P. D., Figueras, M. J. 2009. "*Arcobacter mytili* sp. nov., an indoxyl acetate-hydrolysis-negative bacterium isolated from mussels." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59 (6): 1391–96.
- Collado, L., Figueras, M. J.. 2011. "Taxonomy, epidemiology, and clinical relevance of the genus *Arcobacter* taxonomy, epidemiology, and clinical relevance of the genus *Arcobacter*." *Clinical Microbiology Reviews* 24 (1): 174–92.
- Collado, L., Guarro, J., Figueras, M. J.. 2009. "Prevalence of *Arcobacter* in meat and shellfish."

- Journal of Food Protection* 72 (5): 1102–6.
- Collado, L., Gutiérrez, M., González, M., Fernández, H. 2013. “Assessment of the prevalence and diversity of emergent *Campylobacter* in human stool samples using a combination of traditional and molecular methods.” *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 75 (4): 434–36.
- Collado, L., Inza, I., Guarro, J., Figueras, M. J.. 2008. “Presence of *Arcobacter* spp. in environmental waters correlates with high levels of fecal pollution.” *Environmental Microbiology* 10 (6): 1635–40.
- Collado, L., Kasimir, G., Perez, U., Bosch, A., Pinto, R., Saucedo, G., Huguet, J. M., Figueras, M. J.. 2010. “Occurrence and diversity of *Arcobacter* spp. along the llobregat river catchment, at sewage effluents and in a drinking water treatment plant.” *Water Research* 44 (12): 3696–3702.
- Collado, L., Levican, A., Perez, J., Figueras, M. J.. 2011. “*Arcobacter defluvi* sp. nov., isolated from sewage samples.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61 (9): 2155–61.
- Comité de l’antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, (CASFM), European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). 2020. “Comité de l’antibiogramme de la société française de microbiologie.” *Société Française de Microbiologie* 2 (2): 133–42.
- Corry, J. E. L., Post, D. E., Colin, P., Laisney, M. J.. 1995. “Culture media for the isolation of campylobacters.” *International Journal of Food Microbiology* 26: 43–76.
- Daczowska-Kozon, E., Brzostek-Nowakowska, J.. 2001. “*Campylobacter* spp. in waters of three main Western Pomerania water bodies.” *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 203 (5–6): 435–43.
- Dai, L., Sahin, O., Grover, M., Zhang, Q.. 2020. “New and alternative strategies for the prevention, control, and treatment of antibiotic-resistant *Campylobacter*.” *Translational Research* 223: 76–88.
- Dasti, J. I., Tareen, A. M., Lugert, R., Zautner, A. E., Uwe, G.. 2010. “*Campylobacter jejuni*: a brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms.” *International Journal of Medical Microbiology* 300 (4): 205–11.
- Debruyne, L., Broman, T., Bergstro, S., On, S. L. W., Vandamme, P.. 2010a. “*Campylobacter subantarcticus* sp. nov., isolated from birds in the sub-antarctic region.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60 (4): 815–19.
- Debruyne, L., Broman, T., Bergstro, S., On, S. L. W., Vandamme, P.. 2010b. “*Campylobacter volucris* sp. nov., isolated from black-headed gulls (*Larus ridibundus*).” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60 (8): 1870–75.
- Debruyne, L., On, S. L. W., Brandt, E. D., Vandamme, P.. 2009. “Novel *Campylobacter lari*-like bacteria from humans and molluscs: description of *Campylobacter peloridis* sp. nov., *Campylobacter lari* subsp. *concheus* sub. sp. nov. and *Campylobacter lari* sub. sp. *lari* sub. sp. nov.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59 (5): 1126–32.

- Denis, M., Mourand, G., Chidaine, B., Kempf, I.. 2012. "Susceptibility of *Campylobacter* isolates from river water in Brittany, France." *International Journal of Antimicrobial Agents* 40 (1): 84–85.
- Denis, M., Tanguy, M., Chidaine, B., Laisney, M. J., Mégraud, F., Fravalo, P.. 2011. "Description and sources of contamination by *Campylobacter* spp. of river water destined for human consumption in Brittany, France." *Pathologie Biologie* 59 (5): 256–63.
- Denny, J., Boelaert, F., Borck, B., Heur, O. E., Ammon, A., Makela, P.. 2007. "Zoonotic Infection in Europe: trends and figures—a summary of the EFSA-ECDC annual report." Disponível Online: <Http://Www.Eurosurveillance.Org/ViewArticle.aspx?ArticleId=3336>. Acedido a 11 Abril 2020.
- Dewey-Mattia, D., Manikonda, K., Wise, M. E., Crowe, S. J.. 2018. "Surveillance for foodborne disease outbreaks — United States, 2009 – 2015." *Centers for Disease Control and Prevention* 67 (10): 1–16.
- Diéguez, A. L., Balboa, S., Magnesen, T., Romalde J. L.. 2017. "*Arcobacter lekithochrous* sp. nov., isolated from a molluscan hatchery" *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 67 (5): 1327–32.
- Diergaardt, S. M., Venter, S. N., Spreeth, A., Theron, J., Brözel, V.S.. 2004. "The occurrence of campylobacters in water sources in South Africa." *Water Research* 38 (10): 2589–95.
- Donachie, S. P., Bowman, J. P., On, S. L. W., Alam, M.. 2005. "*Arcobacter halophilus* sp. nov., the first obligate halophile in the genus *Arcobacter*." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55 (3): 1271–77.
- Doudiah, L., Zutter, L. D., Bare, J., Houf, K.. 2014. "Towards a typing strategy for *Arcobacter* species isolated from humans and animals and assessment." *Foodborne Pathogens and Disease* 11 (4): 272–80.
- Doudiah, L., Zutter, L.D., Vandamme, P., Houf K.. 2010. "Identification of five human and mammal associated *Arcobacter* species by a novel multiplex-PCR assay." *Journal of Microbiological Methods* 80 (3): 281–86.
- Driessche, E. V., Houf, K., Vangroenweghe, F., Zutter, L.D., Hoof, J. V.. 2005. "Prevalence, enumeration and strain variation of *Arcobacter* species in the faeces of healthy cattle in Belgium." *Veterinary Microbiology* 105: 149–54.
- Duke, L. A., Breathnach, A. S., Jenkins, D. R., Harkis, B. A.. 1996. "A mixed outbreak of *Cryptosporidium* and *Campylobacter* infection associated with a private water supply." *Epidemiology and Infection* 116: 303–8.
- Dyke, M. I. V., Morton, V. K., McLellan, N. L., Huck, P. M.. 2010. "The occurrence of *Campylobacter* in river water and waterfowl within a watershed in southern Ontario, Canada." *Journal of Applied Microbiology* 109 (3): 1053–66.
- Ellis, W., Neill, S., O'Brien, J., Hanna, J. 1977. "Isolation of *Spirillum*-like organisms from pig fetuses." *Veterinary Record* 102 (5): 106.
- Engberg, J., Aarestrup, F. M., Taylor, D. E., Gerner-smidt, P., Nachamkin, I.. 2001. "Resistance mechanisms *Campylobacter*." *Emerging Infectious Diseases* 7 (1): 24–34.
- Epps, S. V. R., Harvey, R. B., Hume, M. E., Phillips T. D., Anderson, R. C., Nisbet, D. J.. 2013.

- “Foodborne *Campylobacter*: infections, metabolism, pathogenesis and reservoirs.” *International Journal of Environmental Research and Public Health* 10: 6292–6304.
- Etoh, Y., Dewhirst, F. E., Paster, B. J., Yamamoto, A., Goto, N.. 1993. “*Campylobacter showae* sp. nov., isolated from the human oral cavity.” *International Journal of Systematic Bacteriology* 43 (9): 631–39.
- European Committee for Antimicrobial Susceptibility (EUCAST). 2012. “Clinical breakpoints, epidemiological cut-off (ECOFF) values and EUCAST disk diffusion methodology for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*.” Disponível online: [Http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Consultation/Campylobacter_wide_consultation_August_2012.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Consultation/Campylobacter_wide_consultation_August_2012.pdf). Acedido a 23 de setembro 2020.
- Evans, M. R., Roberts, R. J., Ribeiro, C. D., Gardner, D., Kembrey, D.. 1996. “A milk-borne *Campylobacter* outbreak following an educational farm visit.” *Epidemiology and Infection* 117 (3): 457–62.
- Facciola, A., Riso, R., Avventuroso, E., Visalli, G., Delia, S. A., Laganà, P.. 2017. “*Campylobacter*: from microbiology to prevention.” *Journal of Preventive Medicine and Hygiene* 58 (2): 79–92.
- Fera, M. T., Gugliandolo, C., Lentini, V., Favalaro, A., Bonanno, D., Camera, E. L., Maugeri, T. L.. 2010. “Specific detection of *Arcobacter* spp. in estuarine waters of southern Italy by PCR and fluorescent in situ hybridization.” *Letters in Applied Microbiology* 50 (1): 65–70.
- Fera, M. T., Camera, E. L., Carbone, M., Malara, D., Pennisi, M. G.. 2009. “Pet cats as carriers of *Arcobacter* spp. in southern Italy.” *Journal of Applied Microbiology* 106 (5): 1661–66.
- Fernandez, H., Villanueva, M. P., Mansilla, I., Gonzalez, M., Latif, F.. 2015. “*Arcobacter butzleri* and *A. cryaerophilus* in human, animals and food sources, in southern Chile.” *Brazilian Journal of Microbiology* 147 (1): 145–47.
- Ferreira, S., Júlio, C., Queiroz, J. A., Domingues, F. C., Oleastro, M.. 2014. “Molecular diagnosis of *Arcobacter* and *Campylobacter* in diarrhoeal samples among portuguese patients.” *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 78 (3): 220–25.
- Ferreira, S., Luís, A., Oleastro, M., Pereira, L., Domingues, F. C.. 2019. “A meta-analytic perspective on *Arcobacter* spp. antibiotic resistance.” *Journal of global antimicrobial resistance* 16: 130–39.
- Ferreira, S., Oleastro, M., Domingues, F. C.. 2016. “*Arcobacter* spp. in food chain — From Culture to omics.” In *Foodborne Pathogens and Antibiotic Resistance*, Edited by Om V. Singh, First Edition, New York 73–177.
- Ferreira, S., Oleastro, M., Domingues, F. C.. 2019. “Current insights on *Arcobacter butzleri* in food chain.” *Current Opinion in Food Science* 26: 9–17.
- Ferreira, S., Queiroz, J. A., Oleastro, M., Domingues, F. C.. 2016. “Insights in the pathogenesis and resistance of *Arcobacter*: a review.” *Critical Reviews in Microbiology* 42 (3): 364–83.
- Figueras, J. M., Collado, L., Levican, A., Perez, J., Josep, M., Yustes, C.. 2011. “*Arcobacter molluscorum* sp. nov., a new species isolated from shellfish.” *Systematic and Applied Microbiology* 34 (2): 105–9.
- Figueras, J. M., Levican, A., Collado, L., Isabel, M., Yustes, C.. 2011. “*Arcobacter ellisii* sp. nov.,

- isolated from mussels.” *Systematic and Applied Microbiology* 34 (6): 414–18.
- Fisher, J. C., Levican, A., Figueras, M. J., McLellan, S. L.. 2014. “Population Dynamics and Ecology of *Arcobacter* in Sewage.” *Frontiers in Microbiology* 5 : 1–9.
- Fitzgerald, C., Nachamkin, I.. 2015. “*Campylobacter and Arcobacter*”. In *Manual of Clinical Microbiology*, Edited by Warnock, D., Jorgensen, J., Pfaller, M., Carroll, K., Funke, G., Landry, M., Richter, S., Eleventh E., Eleventh Edition, American Society for Microbiology Press, Washington, DC, 998-1012.
- Fitzgerald, C., Whichard, J., Nachamkin, I.. 2017. “Diagnosis and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* species”. In *Campylobacter*, Edited by Nachamkin, I., Szymanski, C. M., Blaser, M. J., Third Edition, American Society for Microbiology Press, Washington, 227-243.
- Fitzgerald, C., Whichard, J., Fields, P. I.. 2008. “*The Genus Campylobacter*”. In *Practical Handbook of Microbiology*, Edited by Goldman, E., Green, L. H., Second Edition, CRC Press, New York, 583-598.
- Food and Drug Administration (FDA). 2017. “Veterinary Feed Directive (VFD).” Disponível online: <https://www.fda.gov/animal-veterinary/development-approval-process/veterinary-feed-directive-vfd>. Acedido a 27 de Março de 2020.
- Fong, T., Mansfield, L. S., Wilson, D. L., Schwab, D. J., Molloy S. L., Rose, J. B.. 2007. “Massive microbiological groundwater contamination associated with a waterborne outbreak in lake erie, south bass island, Ohio.” *Environmental Health Perspectives* 115 (6): 856–64.
- Foster, G., Holmes, B., Steigerwalt, A. G., Lawson, P. A., Thorne, P., Byrer, D. E., Ross, H. M., Xerry, J., Thompson, P. M., Collins, M. D.. 2004. “*Campylobacter insulaenigrae* sp. nov., isolated from marine mammals.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54 (6): 2369–73.
- Frost, J. A. 2001. “Current epidemiological issues in human campylobacteriosis.” *Journal of Applied Microbiology* 90 (S6): 85–95.
- European Food Safety Authority (EFSA), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). 2016. “The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015.” *EFSA Journal* 14 (12): 4634.
- European Food Safety Authority (EFSA). 2010. “Scientific opinion on quantification of the risk posed by broiler meat to human campylobacteriosis in the EU.” *EFSA Journal* 8: 1437–1526.
- European Food Safety Authority (EFSA), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). 2018. “The European union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017.” *EFSA Journal* 16 (12): 5500.
- European Food Safety Authority (EFSA). 2018. “The European union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017.” *EFSA Journal* 16 (12): e05500.
- European Food Safety Authority (EFSA), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). 2020. “The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017/2018.” *EFSA*

- Journal* 18 (3): 6007.
- Gardner, T. J., Fitzgerald, C., Xavier, C., Klein, R., Pruckler, J., Stroika, S., McLaughlin, J. B.. 2011. "Outbreak of campylobacteriosis associated with consumption of raw peas." *Clinical Infectious Diseases* 53 (1): 26–32.
- Gaudreau, C., Pilon, P. A., Sylvestre, J. L., Boucher, F., Bekal, S.. 2016. "Multidrug-resistant *Campylobacter coli* in men who have sex with men, Quebec, Canada, 2015." *Emerging Infectious Diseases* 22 (9): 1661–63.
- Ge, B., Wang, F., Sjölund-Karlsson, M., McDermott, P. F.. 2013. "Antimicrobial resistance in *Campylobacter*: susceptibility testing methods and resistance trends." *Journal of Microbiological Methods* 95 (1): 57–67.
- Gebhart, C. J., Ward, G. E., Chang, K., Kurtz, H. J.. 1983. "*Campylobacter hyointestinalis* (new species) isolated from swine with lesions of proliferative ileitis." *American Journal of Veterinary Research* 44 (3): 361–67.
- Gharst, G., Oyarzabal, O. A., Hussain, S. K.. 2013. "Review of current methodologies to isolate and identify *Campylobacter* spp. from foods." *Journal of Microbiological Methods* 95 (1): 84–92.
- Giacometti, F., Lucchi, A., Francesco, D., Delogu, M., Grilli, E., Guarniero, I., Stancampiano, L., Manfreda, G., Merialdi, G., Serraino, A.. 2015. "Circulation in a dairy farm and sources of milk contamination." *Applied and Environmental Microbiology* 81 (15): 5055–63.
- Giacometti, F., Ucchi, A., Francesco, A. D., Delogu, M., Grilli, E., Guarniero, I., Stancampiano, L., Manfreda, G., Merialdi, G., Serraino, A.. 2015. "*Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus* and *Arcobacter skirrowii* circulation in a dairy farm and sources of milk contamination." *Applied and environmental microbiology* 81 (15): 5055–5063.
- Gilbert, M. J., Duim, B., Zomer, A. L., Wagenaar, J. A.. 2019. "Living in cold blood : *Arcobacter*, *Campylobacter*, and *Helicobacter* in reptiles." *Frontiers in Microbiology* 10 : 1–16.
- Gilbert, M. J., Kik, M., Miller, W. G., Duim, B., Wagenaar, J. A.. 2015. "*Campylobacter iguaniorum* sp. nov., isolated from reptiles." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65 (3): 975–82.
- Gilbert, M. J., Kik, M., Timmerman, A. J., Severs, T., Kusters, J. G., Duim, B., Wagenaar, J. A.. 2014. "Occurrence, diversity, and host association of intestinal *Campylobacter*, *Arcobacter*, and *Helicobacter* in reptiles." *PLoS ONE* 9 (7): e101599.
- Gilbert, M. J., Miller, W. G., Leger, J. S., Chapman, M. H., Timmerman, A. J., Duim, B., Foster, G., Wagenaar, J. A.. 2017. "*Campylobacter pinnipediorum* sp. nov., isolated from pinnipeds, comprising *Campylobacter pinnipediorum* subsp. *pinnipediorum* subsp. nov. and *Campylobacter pinnipediorum* subsp. *caledonicus* subsp. nov." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 67 (6): 1961–68.
- Gilbert, M. J., Zomer, A. L., Timmerman, A. J., Spaninks, M. P., Rubio-garcía, A., Rossen, J. W., Duim, B., Wagenaar, J. A.. 2018. "*Campylobacter blaseri* sp. nov., isolated from common seals (*Phoca vitulina*)." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 68 (5): 1787–94.
- Gilpin, B. J., Walker, T., Paine, S., Sherwood, J., Mackereth, G., Wood, T., Hambling, T.,

- Hewison, C., Brounts, A., Wilson, M., Scholes, P., Robson, B., Lin, S., Cornelius, A., Rivas, L., Hayman, D. T. S., French, N. P., Zhang, J., Wilkinson, D. A., Midwinter, A. C., Biggs, P. J., Jagroop, A., Eyre, R., Baker, M. G., Jones, N.. 2020. "A large scale waterborne campylobacteriosis outbreak, havelock north, New Zealand." *Journal of Infection* 81 (3): 390–95.
- Gondrosen, B., Gregusson, S., Ribe, H., Dahl, O. P.. 1991. "Waterborne campylobacteriosis in northern Norway." *International Journal of Food Microbiology* 12: 151–56.
- Goni, M. D., Muhammad, I. J., Goje, M., Bitrus, A. A., Jajere, S. M., Adam, B. M., Abbas, M. A.. 2017. "Occurrence of emerging *Arcobacter* in dogs and cats and its public health implications: A review." *Advances in Animal and Veterinary Sciences Occurrence* 5 (9): 362.
- González, A., Botella, S., Montes, R. M., Moreno, Y., Ferrús, M. A.. 2007. "Direct detection and identification of *Arcobacter* species by multiplex PCR in chicken and wastewater samples from Spain." *Journal of Food Protection* 70 (2): 341–47.
- González, A., Moreno, Y., González, R., Hernández, J., Ferrús, M. A. 2006. "Development of a simple and rapid method based on polymerase chain reaction – based restriction fragment length polymorphism analysis to differentiate *Helicobacter*, *Campylobacter*, and *Arcobacter* species." *Current Microbiology* 53 (5): 416–21.
- González, A., Ferrús, M. A.. 2011. "Study of *Arcobacter* spp. contamination in fresh lettuces detected by different cultural and molecular methods." *International Journal of Food Microbiology* 145 (1): 311–14.
- González, I., García, T., Fernández, S.. 2012. "Current status on *Arcobacter* research : an update on DNA-based identification and typing methodologies." *Food Analytical Methods* 5 (5): 956–68.
- Gras, L. M., Smid, J. H., Wagenaar, J. A., Boer, A. G. D., Havelaar A. H., Friesema, I. H. M., French, N. P., Busani, L., Pelt, W. V.. 2012. "Risk factors for *campylobacteriosis* of chicken, ruminant, and environmental origin : a combined case- control and source attribution analysis." *PLoS ONE* 7 (8): e42599.
- Gubbels, S. M., Kuhn, K. G., Larsson J. T., Adelhardt, M., Engberg, J. Ø. R., Ingildsen, P., Hollesen, L. W., Muchitsch, S., Mølbak, K. Å., Ethelberg, S.. 2012. "A waterborne outbreak with a single clone of *Campylobacter jejuni* in the Danish town of Køge in May 2010." *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 44 (8): 586–94.
- Guzmán-Martín, J. L., González-Bustos, P., Gutiérrez-Fernández, J.. 2019. "*Campylobacter* spp. and typing tools." *Applied Biochemistry and Microbiology* 55 (5): 470–73.
- Ha, M., Haajanen, H., Pummi, T., Wermundsen, K., Katila, M., Sarkkinen, H., Miettinen, I., 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): 1391–96.
- Habib, I., Sampers, I., Uyttendaele, M., Zutter, L. D., Berkvens, D.. 2008. "A bayesian modelling framework to estimate *Campylobacter* prevalence and culture methods sensitivity: application to a chicken meat survey in Belgium." *Journal of Applied Microbiology* 105

- (6): 2002–8.
- Hald, B., Madsen, M.. 1997. “Healthy puppies and kittens as carriers of *Campylobacter* spp., with special reference to *Campylobacter upsaliensis*.” *Journal of Clinical Microbiology* 35 (12): 3351–52.
- Hald, B., Pedersen, K., Wainø, M., Jørgensen, J. C., Madsen, M.. 2012. “Longitudinal study of the excretion patterns of thermophilic *Campylobacter* spp. in young pet dogs in Denmark.” *Journal of Clinical Microbiology* 42 (5): 2003–12.
- Hald, B., Skov, M. N., Nielsen, E. M., Rahbek, C., Madsen, J. J., Wainø, M., Chriél, M., Nordentoft, S., Baggesen, D. L., Madsen, M.. 2016. “*Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in wild birds on danish livestock farms.” *Acta Veterinaria Scandinavica* 58 (11): 1–10.
- Haley, C. E., Gunn, R. A., Hughes, J. M., Lippy, E. C., Craun, G. F.. 1980. “Outbreaks of waterborne disease in the United States, 1978.” *The Journal of Infectious Diseases* 141 (6): 794–97.
- Hänel, I., Tomaso, H., Neubauer, H.. 2016. “*Arcobacter* – an underestimated zoonotic pathogen?” *Bundesgesundheitsbl* 59 (6): 789–94.
- Harmon, K. M., Wesley, I. V.. 1996. “Identification of *Arcobacter* isolates by PCR.” *Letters in Applied Microbiology* 232 (4): 241–44.
- Haruna, M., Sasaki, Y., Murakami, M., Mori, T., Asai, T., Ito, K., Yamada, Y.. 2013. “Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolates from beef cattle and pigs in Japan.” *Journal of Veterinary Medical Science* 75 (5): 625–628.
- Hassan, A. K.. 2017. “Detection and identification of *Arcobacter* species in poultry in Assiut Governorate, Upper Egypt.” *Journal of Advanced Veterinary Research* 7 (2): 53–58.
- Hausdorf, L., Fröhling, A., Schlüter, O., Klocke, M.. 2011. “Analysis of the bacterial community within carrot wash water.” *Canadian Journal of Microbiology* 57 (5): 447–52.
- Hausdorf, L., Neumann, M., Bergmann, I., Sobiella, K., Mundt, K., Fröhling, A., Schlüter, O., Klocke, M.. 2013. “Occurrence and genetic diversity of *Arcobacter* spp. in a spinach-processing plant and evaluation of two *Arcobacter*-specific quantitative PCR assays.” *Systematic and Applied Microbiology* 36 (4): 235–43.
- Hellein, K. N., Battie, C., Tauchman, E., Lund, D., Oyarzabal, O. A., Lepo, J. E.. 2011. “Culture-based indicators of fecal contamination and molecular microbial indicators rarely correlate with *Campylobacter* spp. in recreational waters.” *Journal of Water and Health* 9 (4): 695–707.
- Ho, H. T. K., Lipman, L. J. A., Gaastra, W.. 2006. “*Arcobacter*, what is known and unknown about a potential foodborne zoonotic agent!” *Veterinary Microbiology* 115 (1-3): 1–13.
- Hoek, M. V., Overbeek, V. W. M., Bouw, E. M., Graag, P., Jacobs-Reitsma, W. F., Aarts, H. J. M.. 2007. “Detection of *Campylobacter* species in bivalve mollusks.” *14th International Workshop on Campylobacter, Helicobacter and Related Organisms*. 49 (4): 204.
- Hokajärvi, A., Pitkänen, T., Siljanen, H. M. P., Nakari, U., Torvinen, E., Siitonen, A., Miettinen, T.. 2013. “Occurrence of thermotolerant *Campylobacter* spp. and *Adenoviruses* in finnish bathing waters and purified sewage effluents.” *Journal of Water and Health* 11 (1): 120–

- Houf, K., Devriese, L. A., Zutter, L., Hoof, J. V., Vandamme, P.. 2001. "Development of a new protocol for the isolation and quantification of *Arcobacter* species from poultry products." *Journal of Food Microbiology* 71 (1): 189–96.
- Houf, K., On, S. L. W., Coenye, T., Debruyne, L., Smet, S., Vandamme, P.. 2009. "*Arcobacter thereius* sp. nov., isolated from pigs and ducks." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59 (10): 2599–2604.
- Houf, K., On, S. L. W., Coenye, T., Mast, J., Hoof, J. V., Vandamme, P.. 2005. "*Arcobacter cibarius* sp. nov., isolated from broiler carcasses." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55 (2): 713–17.
- Houf, K., Smet, S., Bare, J.. 2008. "Dogs as carriers of the emerging pathogen *Arcobacter*." *Veterinary Microbiology* 130 (1–2): 208–13.
- Houf, K., Tutenel, A., Zutter, L., Hoof, J. V., Vandamme, P.. 2000. "Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection and identification of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus* and *Arcobacter skirrowii*." *FEMS Microbiology Letters* 193 (1): 89–94.
- Houf, K., Zutter, L., Hoof, J. V., Vandamme, P.. 2002. "Assessment of the genetic diversity among arcobacters isolated from poultry products by using two PCR-based typing methods." *Applied and Environmental Microbiology* 68 (5): 2172–78.
- Hsu, T. D., Lee, J.. 2015. "Global distribution and prevalence of *Arcobacter* in food and water." *Zoonoses and Public Health* 62 (8): 579–89.
- Hudson, J. A., Frewer, L. J., Jones, G., Brereton, P. A., Whittingham, M. J., Stewart, G.. 2017. "The agri-food chain and antimicrobial resistance: A review." *Trends in Food Science and Technology* 69: 131–47.
- Igwaran, A., Okoh, A. I.. 2020. "Molecular determination of genetic diversity among *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from milk, water, and meat samples using enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR)." *Infection Ecology and Epidemiology* 10 (1): 1830701.
- Igwaran, A., Okoh, A. I.. 2019. "Heliyon human *campylobacteriosis* : A public health concern of global importance." *Heliyon* 5 : e02814.
- Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA). 2020. "Índice PDSI (Palmer Drought Severity Index)." Disponível online: <https://www.ipma.pt/pt/oclima/observatorio.secas/>. Acedido a 6 Agosto 2020.
- Ii, R. M. R., Smibert, R. M., Johnson, J. L., Krieg, N. R.. 1985. "*Campylobacter mucosalis* comb. nov.: emended description." *International Journal of Sistematic Bacteriology* 35 (2): 189–92.
- Bolton, F. J., Coates, D., Hutchinson, D. N.. 1984. "The ability of *Campylobacter* media supplements to neutralize photochemically induced toxicity and hydrogen peroxide." *Journal of Applied Bacteriology* 56 (1): 151–57.
- Inglis, G. D., Hoar, B. M., Whiteside, D. P., Morck, D. W.. 2007. "*Campylobacter canadensis* sp. nov., from captive whooping cranes in Canada." *International Journal of Sistematic and*

- Evolutionary Microbiology* 57 (11), 2636-2644.
- Isidro, J., Ferreira, S., Pinto, M., Domingues, F. C., Oleastro, M., Gomes, J. P., Borges, V.. 2020. "Virulence and antibiotic resistance plasticity of *Arcobacter butzleri*: insights on the genomic diversity of an emerging human pathogen." *Infection, Genetics and Evolution* 80: 104213.
- ISO 17995. 2005. "Water quality. Detection and enumeration of thermotolerant *Campylobacter* species." International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Jakopanec, I., Borgen, K., Vold, L., Lund, H., Forseth, T., Hannula, R., Nygård, K.. 2008. "A large waterborne outbreak of campylobacteriosis in Norway: The Need to Focus on Distribution System Safety." *BioMed Central Infectious Diseases* 8 (1): 128.
- Joensen, K. G., Kuhn, K. G., Müller, L., Björkman, J. T., Torpdahl, M., Engberg, J., Holt, H. M., Nielsen, H. L., Petersen, A. M., Ethelberg, S., Nielsen, E. M.. 2017. "Whole-genome sequencing of *Campylobacter jejuni* isolated from danish routine human stool samples reveals surprising degree of clustering." *Clinical Microbiology and Infection* 24 (2): 201.
- John, S., Burnens, A. P., Linton, D., On, S. L. W., Costas, M., Owen, R. J. 1992. "*Campylobacter heheticus* sp. nov., a new thermophilic species from domestic animals: Characterization, and cloning of a species-specific DNA probe." *Journal of General Microbiology* 138: 2293-2303.
- Jokinen, C., Koot, J., Carrillo, C. D., Gannon, V. P. J., Jardine, C. M., Mutschall, S. K., Topp, E., Taboada, E. N.. 2012. "An enhanced technique combining pre-enrichment and passive filtration increases the isolation efficiency of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from water and animal fecal samples." *Journal of Microbiological Methods* 91 (3): 506-13.
- Jones, F. S., Orcutt, M., Little, R. B., V.M.D. 1931. "Vibrios (*Vibrio jejuni*, N.SP:) associated with intestinal disorders of cows and calves." *The Journal of Experimental Medicine* 56 (6): 853-64.
- Jones, K. 2001. "Campylobacters in water, sewage and the environment." *Symposium Series (Society for Applied Microbiology)* 90 (6): 68-79.
- Jorgensen, J. H., Ferraro, M. J.. 2009. "Antimicrobial susceptibility testing: A review of general principles and contemporary practices." *Clinical Infectious Diseases* 49 (11): 1749-55.
- Joyce, L. F., Downes, J., Stockman, K., Andrew, J. H.. 1992. "Comparison of five methods, including the PDM epsilometer test (ETest), for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa*." *Journal of Clinical Microbiology* 30 (10): 2709-13.
- Julia, A, McClure, H. M., Wachsmuth, I. K., Anderson, D. C., McClure, H. M., Wachsmuth, I. K.. 1993. "*Arcobacter* (*Campylobacter*) *butzleri*-associated diarrheal illness in a nonhuman primate population." *Infection and Immunity* 61 (5): 2220-23.
- Jyothsna, T. S. S., Rahul, K., Ramaprasad, E. V. V., Sasikala, C., Ramana, C. V.. 2013. "*Arcobacter anaerophilus* sp. nov., isolated from an estuarine sediment and emended description of the genus *Arcobacter*." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63 (12): 4619-25.
- Kaakoush, N. O., Castaño-Rodríguez, N., Mitchell, H. M., Man, S. M.. 2015. "Global

- epidemiology of *Campylobacter* infection.” *Clinical Microbiology Reviews* 28 (3): 687–720.
- Kannan, U., Prashanth, S. K., Maliyekkal, S. M.. 2020. “Measurement, analysis, and remediation of biological pollutants in water.” In *Measurement, Analysis and Remediation of Environmental Pollutants*. Edited by Gupta, T., Singh, S. P., Rajput, P., Agarwal, A. K.. First Edition, Springer Press, Singapore, 211-243.
- Kanwal, S., Noreen, Z., Aalam, V., Akhtar, J., Masood, F., Javed, S., Bokhari, H.. 2019. “Comparative immunology, microbiology and infectious diseases variation in antibiotic susceptibility and presence of type VI secretion system (T6SS) in *Campylobacter jejuni* isolates from various sources.” *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 66 : 101345.
- Karagiannis, I., Sideroglou, T., Gkolfinopoulou, K., Tsouri, A., Lampousaki, D., Velonakis, E. N., Scoulica, E. V., Mellou, K., Panagiotopoulos, T., Bonovas, S.. 2010. “A waterborne *Campylobacter jejuni* outbreak on a Greek island.” *Epidemiol Infect* 138 (12): 1726–34.
- Karikari, A. B., Obiri-danso, K., Frimpong, E. H., Krogfelt, K. A.. 2016. “Occurrence and susceptibility patterns of *Campylobacter* isolated from environmental water sources.” *African Journal of Microbiology Research* 10 (37): 1576–80.
- Karikari, A. B., Obiri-Danso, K., Frimpong, E. H., Krogfelt, K. A.. . 2017. “Antibiotic resistance of *Campylobacter* recovered from faeces and carcasses of healthy livestock.” *BioMed Research International*, 1–9.
- Kaur, T., Singh, J., Huffman, M. A., Petrz, J., Taylor, N. S., Xu, S., Dewhirst, F. E., Paster, B. J., Debruyne, L., Vandamme, P., Fox, J. G.. 2011. “*Campylobacter troglodytis* sp. nov., isolated from feces of human-habituated wild chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*) in Tanzania.” *American Society for Microbiology* 77 (7): 2366–73.
- Kiehlbauch, J. A., Brenner, D. O., Nicholson, M. A., Baker, C. N., Patton, C. M., Steigerwalt, A. G., Wachsmuth, I. K.. 1991. “*Campylobacter butzleri* sp. nov. isolated from humans and animals with diarrheal illness.” *Journal of Clinical Microbiology* 29 (2): 376–85.
- Kiess, A. S., Parker, H. M., Mcdaniel, C. D.. 2010. “Evaluation of different selective media and culturing techniques for the quantification of *Campylobacter* ssp. from broiler litter.” *Poultry Science* 89 (8): 1755–62.
- Kim, H. M., Hwang, C. Y., Cho, B. C.. 2010. “*Arcobacter marinus* sp. nov.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60 (3): 531–36.
- Kim, N. H., Park, S. M., Kim, H. W., Cho, T. J., Kim, S. H., Rhee, M. S.. 2018. “Prevalence of pathogenic *Arcobacter* species in south korea: Comparison of two protocols for isolating the bacteria from foods and examination of nine putative virulence genes.” *Food Microbiology* 78: 18–24.
- Kim, S., Park, H., Chandran, K.. 2010. “Propensity of activated sludge to amplify or attenuate tetracycline resistance genes and tetracycline resistant bacteria: A mathematical modeling approach.” *Chemosphere* 78 (9): 1071–77.
- Kirk, M. D., Waddell, R., Dalton, C., Creaser, A., Rose, N.. 1997. “A prolonged outbreak of *Campylobacter* infection at a training facility.” *Communicable Diseases Intelligence* 21

- (5): 57–60.
- Kopilovic, B., Ucakar, V., Koren, N., Krek, M., Kraigner, A. 2008. “Waterborne outbreak of acute gastroenteritis in a coastal area in Slovenia in June and July 2008.” *EuroSurveillance* 13 (34): 1–3.
- Koziel, M., O’Doherty, P., Vandamme, P., Corcoran, G. D., Sleator, R. D., Brigid, L. 2014. “*Campylobacter corcagiensis* sp. nov., isolated from faeces of captive lion-tailed macaques (*macaca silenus*) in Ireland.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64 (8): 2878–83.
- Kümmerer, Klaus. 2009. “Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part II.” *Chemosphere* 75 (4): 435–41.
- Kuusi, M., Nourti, J. P., Hänninen, M. L., Koskela, M., Jussila, V., Kela, E., Miettinen, I., Ruutu, P. 2005. “A large outbreak of campylobacteriosis associated with a municipal water supply in Finland.” *Epidemiology and Infection* 133 (4): 593–601.
- Doyle, L.P. 1948. “The etiology of swine dysentery.” *Journal of the American Veterinary Medical Association* 9 (30): 50–15.
- Laine, J., Houvinen, E., Virtanen, M. J., Snellman, M., Lumio, J., Ruutu, P., Kujansuu, E., Vuento, R., Pitkänen, T., Miettinen, I., Herrala, J., Lepistö, O., Anttonen, J., Helenius, J., Hänninen, M. L., Maunula, L., Mustonen, J., Kuusi, M., Pirkanmaa Waterborne Outbreak Study Group. 2019. “An extensive gastroenteritis outbreak after drinking-water contamination by sewage effluent, Finland.” *Epidemiology and Infection* 139 (7): 1105–13.
- Lappi, V., Archer, J. R., Cebelinski, E., Leano, F., Besser, J. M., Klos, R. F., Medus, C., Smith, K. E., Fitzgerald, C., Davis, J. P. 2013. “An outbreak of foodborne illness among attendees of a wedding reception in wisconsin likely caused by *Arcobacter butzleri*.” *Foodborne Pathogens and Disease* 10 (3): 250–55.
- Lawson, A. J., On, S. L. W., Logan, J. M. J., Stanley, J. 2001. “*Campylobacter hominis* sp. nov., from the human gastrointestinal tract.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 251584 (51): 651–60.
- Lehner, A., Tasara, T., Stephan, R. 2005. “Relevant aspects of *Arcobacter* spp. as potential foodborne pathogen.” *International Journal of Food Microbiology* 102: 127–35.
- Lehours, P., Ménard, A., Prouzet-Mauleon, V., Bringaud, F., Lehours, P., Francis, M. 2007. “Nucleotide sequence of the *Gyr A* gene of *Arcobacter* species and characterization of human ciprofloxacin-resistant clinical isolates.” *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 49 (3): 337–45.
- Lehtola, M. J., Pitkänen, T., Miebach, L., Miettinen, I. T. 2006. “Survival of *Campylobacter jejuni* in potable water biofilms: A comparative study with different detection methods.” *Water Science and Technology* 54 (3): 57–61.
- Lévesque, S., Frost, E., Michaud, S. 2007. “Comparison of antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* isolated from humans, chickens, raw milk, and environmental water in Québec.” *Journal of Food Protection* 70 (3): 729–35.
- Levican, A., Collado, L., Aguilar, C., Yustes, C., Diéguez, A. L., Romalde, J. L., Figueras, J. M. 2012. “*Arcobacter bivalviorum* sp. nov. and *Arcobacter venerupis* sp. nov., new species

- isolated from shellfish.” *Systematic and Applied Microbiology* 35 (3): 133–38.
- Levican, A., Collado, L., Figueras, J. M.. 2016. “The use of two culturing methods in parallel reveals a high prevalence and diversity of *Arcobacter* spp. in a wastewater treatment plant.” *BioMed Research International*, 1–9.
- Levican, A., Collado, L., Figueras, J. M.. 2013. “*Arcobacter cloacae* sp. nov. and *Arcobacter suis* sp. nov., two new species isolated from food and sewage.” *Systematic and Applied Microbiology* 36 (1): 22–27.
- Levican, A., Collado, L., C., Yustes, Aguilar, C., Figueras, J. M.. 2014. “Higher water temperature and incubation under aerobic and microaerobic conditions increase the recovery and diversity of *Arcobacter* spp. from shellfish.” *Applied and Environmental Microbiology* 80 (1): 385.
- Levican, A., Figueras, J. M.. 2013. “Performance of five molecular methods for monitoring *Arcobacter* spp.” *BioMed Central Microbiology* 13 (1): 220.
- Levican, A., Rubio-Arcos, S., Martinez-Murcia, A., Collado, L., Figueras, J. M.. 2015. “*Arcobacter ebronensis* sp. nov. and *Arcobacter aquimarinus* sp. nov., two new species isolated from marine environment.” *Systematic and Applied Microbiology* 38 (1): 30–35.
- Levin, R. E. 2007. “*Campylobacter jejuni*: a review of its characteristics, pathogenicity, ecology, distribution, subspecies characterization and molecular methods of detection.” *Food Biotechnology* 21 (4): 271–347.
- Liao, S., Marshall, J., Hazelton, M. L., French, N. P.. 2019. “Extending statistical models for source attribution of zoonotic diseases: a study of campylobacteriosis.” *The Royal Society* 16 (150): 20180534.
- Lindmark, H., Harbom, B., Thebo, L., Andersson, L., Hedin, G., Osterman, B., Lindberg, T., Andersson, Y., Westo, A.. 2004. “Genetic characterization and antibiotic resistance of *Campylobacter jejuni* isolated from meats, water, and humans in Sweden.” *Journal of Clinical Microbiology* 42 (2): 700–706.
- Linton, D., Owen, R. J., Stanley, J.. 1996. “Rapid identification by PCR of the genus *Campylobacter* and of five *Campylobacter* species enteropathogenic for man and animals.” *Research in Microbiology* 147 (9): 707–18.
- Linton, D., Lawson, A. J., Logan, J. M. J., Stanley, J.. 2000. “*Campylobacter lanienae* sp. nov., a new species isolated from workers in an abattoir” 50 (2): 865–72.
- Llarena, A., Taboada, E., Rossi, M.. 2017. “Whole-genome sequencing in the epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections.” *Journal of Clinical Microbiology* 55 (5): 1269–75.
- Looveren, M. V., Daube, G., Zutter, L., Dumont, J., Lammens, C., Wijdooghe, M., Vandamme, P., Jouret, M., Cornelis, M., Goossens, H.. 2001. “Antimicrobial Susceptibilities of *Campylobacter* strains isolated from food animals in Belgium.” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48 (2): 235–40.
- Magana, M., Chatzipanagiotou, S., Burriel A., R., Ioannidis, A.. 2017. “Veterinary sciences inquiring into the gaps of *Campylobacter* surveillance methods.” *Veterinary Sciences* 4 (3): 36.
- Maiden, M. C. J., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou,

- J., Zurth, K., Caugant, D. A., Feavers, I. M., Achtman, M., Spratt, B. G.. 1998. "Multilocus sequence typing : a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (6): 3140–45.
- Maina, J., Schillinger, U., Museve, P., Mbugua, S. K., Holzappel, W. H.. 2004. "Isolation, identification and characterisation of the dominant microorganisms of kule naoto: The Maasai traditional fermented milk in Kenya." *International Journal of Food Microbiology* 94 (3): 269–78.
- Marshall, S. M., Melito, P. L., Woodward, D. L., Johnson, W. M., Rodgers, F. G., Mulvey, M. R.. 1999. "Isolates by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the 16S rRNA gene" 37 (12): 4158–60.
- Marti, E., Variatza, E., Balcazar, J. L.. 2014. "The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance." *Trends in Microbiology* 22 (1): 36–41.
- Martín-Maldonado, B., Montoro-Dasi, L., Pérez-Gracia, M. T., Jordá, J., Vega, S., Marco-Jiménez, F., Marin, C.. 2019. "Wild bonelli' s eagles (*Aquila fasciata*) as carrier of antimicrobial resistant *Salmonella* and *Campylobacter* in eastern Spain." *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 67: 101372.
- Martiny, D., Dediste, A., Debruyne, L., Vlaes, L., Haddou, N. B., Vandamme, P., Vandenberg, O.. 2010. "Accuracy of the API Campy System, the Vitek 2 Neisseria – Haemophilus card and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for the identification of *Campylobacter* and related organisms." *Clinical Microbiology and Infection* 17 (7): 5–7.
- Maugeri, T. L., Gugliandolo, C., Carbone, M., Caccamo, D., Fera, M. T.. 2000. "Isolation of *Arcobacter* spp. from a brackish environment." *The New Microbiologica* 23 (2): 143–149.
- Maurer, A. M., Stürchler, D.. 2000. "A waterborne outbreak of small round structured virus, *Campylobacter* and *Shigella* co-infections in la Neuveville, Switzerland, 1998." *Epidemiology and Infection* 125 (2): 325–32.
- McClung, C. R., Patriquin, D. G., Davis, R. E.. 1983. "*Campylobacter nitroijigilis* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with roots of spavtina alternijlora loisel." *International Journal of Sistematic Bacteriology* 33 (3): 605–12.
- McDermott, P. F., Bodeis, S. M., Aarestrup, F. M., Brown, S., Traczewski, M., Fedorka-Cray, P., Wallace, M., Critchley, I. A., Thornsberry, C., Graff, S., Flamm, R., Beyer, J., Shortridge, D., Piddock, L. J., Ricci, V., Johnson, M. M., Jones, R. N., Reller, B., Mirrett, S., Aldrobi, J., Rennie, R., Brosnikoff, C., Turnbull, L., Stein, G., Schooley, S., Hanson, R. A, Walker, R. D.. 2004. "Development of a standardized susceptibility test for *Campylobacter* with quality-control ranges for ciprofloxacin, doxycycline, erythromycin, gentamicin, and meropenem" *Microbial drug resistance* 10 (2): 124–31.
- McDermott, P. F., Bodeis-Jones, S. M., Fritsche, T. R., Jones, R. N., Walker, R. D., *Campylobacter* Susceptibility Testing Group. 2005. "Broth microdilution susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and the determination of quality control ranges for fourteen antimicrobial agents." *Journal of Clinical Microbiology* 44 (2): 677.

- McFadyean, J., Stockman, S.. 1913. "Report of the departmental committee appointed by the board of agriculture and fisheries to inquire into epizootic abortion. Part III." *Abortion in Sheep*. HMSO London.
- Melby, K. K., Svendby, J. G., Eggebø, T., Holmen, L. A., Andersen, B. M., Lind, L., Sjøgren, E., Kaijser, B.. 2000. "Outbreak of *Campylobacter* infection in a subarctic community." *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 19 (7): 542–44.
- Mentzing, L. O.. 1981. "Waterborne outbreaks of *Campylobacter* enteritis in central sweden." *The Lancet* 318 (8242), 352-354..
- Merga, J. Y., Leatherbarrow, A. J. H., Winstanley, C., Bennett, M., Hart, C. A., Miller, W. G., Williams, N. J.. 2011. "Comparison of *Arcobacter* isolation methods, and diversity of *Arcobacter* spp. in Cheshire, United Kingdom." *Applied and Environmental Microbiology* 77 (5): 1646.
- Merga, J. Y., Royden, A., Pandey, A. K., Williams, N. J.. 2014. "*Arcobacter* spp. isolated from untreated domestic effluent." *Letters in Applied Microbiology* 59 (1): 122–26.
- Merga, J. Y., Williams, N. J., Miller, W. G., Leatherbarrow, A. J. H., Bennett, M., Hall, N., Ashelford, K. E., Winstanley, C.. 2013. "Exploring the diversity of *Arcobacter butzleri* from cattle in the UK using MLST and whole genome sequencing." *PLoS ONE* 8 (2): e55240.
- Merritt, A., Miles, R., Bates, J.. 1999. "An outbreak of *Campylobacter* enteritis on an island resort, north queensland." *Communicable Diseases Intelligence* 23 (8): 215–19.
- Miller, W. G., Mandrell, R. E.. 2005. "Prevalence of *Campylobacter* in the food and water supply: incidence, outbreaks, isolation and detection." *Campylobacter: Molecular and Cellular Biology*, 101–63.
- Miller, W. G., Parker, C. T., Rubenfield, M., Mendz, G. L., Wosten, M. M., Ussery, D. W., Stolz, J. F., Binnewies, T. T., Hallin, P. F., Wang, G., Malek, J. A., Rogosin, A., Stanker, L. H., Mandrell, R. E.. 2007. "The complete genome sequence and analysis of the *Epsilonproteobacterium Arcobacter butzleri*." *PLoS ONE* 2 (12): e1358.
- Millson, M., Bokhout, M., Carlson, J., Spielberg, L., Aldis, R., Borczyk, A., Lior, H.. 1991. "An outbreak of *Campylobacter jejuni* gastroenteritis linked to meltwater contamination of a municipal well." *Canadian Journal of Public Health= Revue Canadienne de Sante Publique* 82 (1): 27–31.
- Mohan, H. V., Rathore, K., Dhama, R. S., Ramees, A., Patya, T. P., Bagalko, M. Y., Wani, P. S., Bhilegaonkar, A., Kumar, K. N.. 2014. "Prevalence of *Arcobacter* spp. in humans, animals and foods of animal origin in India based on cultural isolation, antibiogram, PCR and multiplex PCR detection." *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* 9 (8): 542–466.
- Mohan, V.. 2011. "Molecular Epidemiology of campylobacteriosis and Evolution of *Campylobacter Jejuni* ST-474 in New Zealand." Tese apresentada em cumprimento parcial dos requisitos para o grau de Doutor em Filosofia na Universidade de Massey , Institute of Veterinary, Animal and Biomedical Sciences, Massey University, Palmerston North, New Zealand.
- Moore, J., Caldwell, P., Millar, B.. 2001. "Molecular detection of *Campylobacter* spp. in

- drinking, recreational and environmental water supplies.” *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 204 (2–3): 185–89.
- Moore, J. E., Matsuda, M.. 2004. “Fluoroquinolone resistance in environmental urease-positive *Campylobacters*: why we don’t see it?” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53 (5): 891–92.
- Moore, J. E., Barton, M. D., Blair, I. S., Corcoran, D., Kempf, I., Lastovica, A. J., Dooley, J. S. G., Fanning, S., Kempf, I., Lastovica, A. J., Lowery, C. J., Matsuda, M., McDowell, D. A., McMahon, A., Millar, B. C., Rao, J. R., Rooney, P. J., Seal, B. S., Snelling, W. J., Tolba, O.. 2006. “The epidemiology of antibiotic resistance in *Campylobacter*.” *Microbes and Infection* 8 (7): 1995–1966.
- Morita, Y., Maruyama, S., Kabeya, H., Boonmar, S., Nimsuphan, B., Nagai, A., Murayama, S.. 2005. “Prevalence of *Arcobacter* spp. and numbers of coliform bacteria in river-water samples.” *Journal of the Japan Veterinary Medical Association* 58 (6): 415–17.
- Mourkas, E., Florez-Cuadrado, D., Pascoe, B., Calland, J. K., Bayliss, S. C., Mageiros, L., Méric, G., Hitchings, M. D., Quesada, A., Porrero, C., Ugarte-Ruiz, M., Gutiérrez-Fernández, J., Domínguez, L., Sheppard, S. K.. 2019. “Gene pool transmission of multidrug resistance among *Campylobacter* from livestock, sewage and human disease.” *Environmental Microbiology* 21 (12): 4597–4613.
- Mughini-Gras, L., Penny, C., Ragimbeau, C., Schets, F. M., Blaak, H., Duim, B., Wagenaar, J. A., Boer, A., Cauchie, H. M., Mossong, J., Pelt, W. V.. 2016. “Quantifying potential sources of surface water contamination with *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*.” *Water Research* 101: 36–45.
- Mulder, A. C., Franz, E., Rijk, S., Versluis, M. A. J., Coipan, C., Buij, R., Müskens, G., Koene, M., Pijnacker, R., Duim, B., Bloois, L. V., Veldman, K., Wagenaar, J. A., Zomer, A. L., Schets, F. M., Blaak, H., Mughini-Gras, L.. 2020. “Tracing the animal sources of surface water contamination with *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*.” *Water Research* 187: 116421.
- Nachamkin, I., Szymanski, C. M., Blaser, M. J.. 2008. “*Campylobacter*.” In *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 14. Edited by Altekruze, S. F., Third Edition, Washington, DC, USA, 732.
- Natsos, G., Mouttotou, N., Ahmad, S., Kamran, Z., Ioannidis, A., Koutoulis, K.. 2019. “The genus *Campylobacter*: detection and isolation methods, species identification and typing techniques.” *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society* 70 (1): 1327–1338.
- Neal, K. R., Slack, R. C. B.. 1997. “Diabetes mellitus, anti-secretory drugs and other risk factors for *Campylobacter* gastro-enteritis in adults: a case-control.” *Epidemiology and Infection* 119 (3): 307–11.
- Newell, D. G., Mughini-Gras, L., Kalupahana, R. S., Wagenaar, J. A.. 2017. “*Campylobacter* epidemiology—sources and routes of transmission for human infection.” *Campylobacter - Features, Detection, and Prevention of Foodborne Disease*. Edited by Klein, Günter. First Edition, Academic Press, 85-110.
- Nichols, G. L. 2005. “Fly transmission of *Campylobacter*.” *Emerging Infectious Diseases* 11 (3): 361–64.

- Nichols, G. L., Richardson, J. F., Sheppard, S. K., Lane, C., Sarran, C.. 2012. “*Campylobacter* epidemiology: a descriptive study reviewing 1 million cases in England and Wales between 1989 and 2011” *British Medical Journal Open* 2 (4): e001179.
- Nygård, K., Andersson, Y., Røttingen, J. A., Svensson, Å., Lindbäck, J., Kistemann, T., Giesecke, J.. 2004. “Association between environmental risk factors and *Campylobacter* infections in Sweden.” *Epidemiology and Infection* 132 (2): 317–25.
- O’Reilly, C. E., Bowen, A. B., Perez, N. E., Sarisky, J. P., Shepherd, C. A., Miller, M. D., Hubbard, B. C., Herring, M., Buchanan, S. D., Fitzgerald, C., Hill, V., Arrowood, M. J., Xiao, L. X., Hoekstra, R. M., Mintz, E. D., Lynch, M. F., Outbreak Working Group. 2007. “A waterborne outbreak of gastroenteritis with multiple etiologies among resort island visitors and residents: Ohio, 2004.” *Clinical Infectious Diseases* 44 (4): 506–512.
- Obiri-Danso, K., Jones, K.. 1999. “Distribution and seasonality of microbial indicators and thermophilic *Campylobacters* in two freshwater bathing sites on the river lune in northwest England.” *Journal of Applied Microbiology* 87 (6): 822–32.
- On, S. L. W., Miller, W. G., Biggs, P. J., Cornelius, A. J., Vandamme, P.. 2020. “A critical rebuttal of the proposed division of the genus *Arcobacter* into six genera using comparative genomic, phylogenetic, and phenotypic criteria.” *Systematic and Applied Microbiology* 43 (5): 126108.
- On, S. L. W.. 2001. “Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns.” *Journal of Applied Microbiology* 90 (S6): 1–15.
- On, S. L. W., Jensen, T. K., Bille-Hansen, V., Jorsal, S. E., Vandamme, P.. 2002. “Prevalence and diversity of *Arcobacter* spp. isolated from the internal organs of spontaneous porcine abortions in Denmark.” *Veterinary Microbiology* 85 (2): 159–67.
- Otigbu, A. C., Clarke, A. M., Fri, J., Akanbi, E. O., Njom and, H. A.. 2018. “Antibiotic sensitivity profiling and virulence potential of *Campylobacter jejuni* isolates from estuarine water in the eastern cape province, South Africa.” *International Journal of Environmental Research and Public Health* 15 (5): 925.
- Oyarzabal, O. A., Battie, C.. 2012. “Immunological methods for the detection of *Campylobacter* spp. – current applications and potential use in biosensors” In *Trends in Immunolabelled and Related Techniques*. Edited by Abuelzein, E., First Edition, Croatia, 203-226.
- Oyofe, B. A., Thornton, S. A., Burr, D. H., Trust, T. J., Pavlovskis, O. R., Guerry, P.. 1992. “Specific detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using polymerase chain reaction.” *Journal of Clinical Microbiology* 30 (10): 2613–19.
- Pacanowski, J., Lalande, V., Lacombe, K., Boudraa, C., Lesprit, P., Legrand, P., Trystram, D., Kassis, N., Arlet, G., Mainardi, J. L., Doucet-Populaire, F., Girard, P. M., Meynard, J. L., Campyl Study Group. 2008. “*Campylobacter* bacteremia: clinical features and factors associated with fatal outcome.” *Clinical Infectious Diseases* 47 (6): 790–96.
- Palmer, S. R., Gully, P. R., White, J. M.. 1981. “Water-borne outbreak of *Campylobacter* gastroenteritis.” *The Lancet* 321 (8319): 287–90.
- Pandey, P. K., Kass, P. H., Soupir, M. L., Biswas, S., Singh, V. P.. 2014. “Contamination of water

- resources by pathogenic bacteria.” *AMB Express* 4 (1): 1–16.
- Park, C. E., Sanders, G. W.. 1992. “Occurrence of thermotolerant campylobacters in fresh vegetables sold at farmers’ Outdoor Markets and Supermarkets.” *Canadian Journal of Microbiology* 38 (4): 313–16.
- Park, S., Jung, Y. T., Kim, S., Yoon, J. H.. 2016. “*Arcobacter acticola* sp. nov., isolated from seawater on the east sea in South Korea.” 54 (10): 655–59.
- Paruch, L., Paruch, A. M., Sørheim, R.. 2019. “DNA-based faecal source tracking of contaminated drinking water causing a large *Campylobacter* outbreak in Norway 2019.” *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 224: 113420.
- Patel, R.. 2015. “MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases.” *Clinical Chemistry* 61 (1): 1–12.
- Pedati, C., Koirala, S., Safranek, T., Buss, B. F., Carlson, A. V.. 2019. “Campylobacteriosis outbreak associated with contaminated municipal water supply — Nebraska, 2017.” *Morbidity and Mortality Weekly Report* 68 (7): 169–73.
- Pérez-Boto, D., García-Peña, F. J., Echeita, M. A.. 2010. “Drinking water as the source of *Campylobacter coli* infection in grandparent heavy breeders.” *Avian Pathology* 39 (6): 483–87.
- Pérez-Cataluña, A., Massó, S., Figueras, M. J.. 2018. “*Arcobacter canalis* sp. nov., isolated from a water canal contaminated with urban sewage.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 68: 1258–64.
- Pérez-Cataluña, A., Salas-Massó, N., Diéguez, A. L., Balboa, S., Lema, A., Romalde, J. L., Figueras, J. M.. 2018. “Revisiting the taxonomy of the genus *Arcobacter*: Getting order from the chaos.” *Revisiting the Taxonomy of the Genus Arcobacter* 9: 2077.
- Pérez-Cataluña, A., Salas-Massó, Figueras, J. M.. 2019. “*Arcobacter lacus* sp. nov. and *Arcobacter caeni* sp. nov., two novel species isolated from reclaimed water.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 69 (11): 3326–31.
- Peter, E., Scheutx, G. S., Louis, S., On, S. L. W.. 1998. “Water-borne *Campylobacter jejuni* infection in a danish town—a 6-week continuous source outbreak.” *Clinical Microbiology and Infectious* 4 (11): 648–56.
- Petersen, L., Nielsen, E. M., Engberg, J., On, S. L. W., Dietz, H. H.. 2001. “Comparison of genotypes and serotypes of *Campylobacter jejuni* isolated from danish wild mammals and birds and from broiler flocks and humans.” *Applied and Environmental Microbiology* 67 (7): 3115–21.
- Petersen, R. F., Harrington, C. S., Kortegaard, H. E., On, S. L. W.. 2007. “A PCR-DGGE method for detection and identification of *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Arcobacter* and related *Epsilonbacteria* and its application to saliva samples from humans and domestic pets.” *Journal of Applied Microbiology* 103 (6): 2601–15.
- Piccirillo, A., Niero, G., Calleros, L., Ruben, P., Naya, H., Iraola, G.. 2016. “*Campylobacter geochelonis* sp. nov. isolated from the western Hermann’s tortoise (*Testudo hermanni hermanni*).” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66 (9): 3468–76.

- Pitkänen, T.. 2013. "Review of *Campylobacter* spp. in drinking and environmental waters." *Journal of Microbiological Methods* 95 (1): 39–47.
- Pitkänen, T., Miettinen, I. T., Nakari, U., Takkinen, J., Nieminen, K., Siitonen, A., Kuusi, M., Holopainen, A., Hänninen, M. L.. 2008. "Faecal contamination of a municipal drinking water distribution system in association with *Campylobacter jejuni* infections." *Journal of Water and Health* 06 (3): 365–76.
- Post, A., Martiny, D., Waterschoot, N., Hallin, M., Maniewski, U., Bottieau, E., Esbroeck, M. V., Vlieghe, E., Ombelet, S., Vandenberg, O., Jacobs, J.. 2017. "Antibiotic susceptibility profiles among *Campylobacter* isolates obtained from international travelers between 2007 and 2014." *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 36 (11): 2101–7.
- Pratt, A., Korolik, V.. 2005. "Tetracycline resistance of australian *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 55 (4): 452–60.
- Rajagunalan, S., Chakraborty, S., Dhama, K., Singh, S. V.. 2013. "Antibiotic resistance - an emerging health problem: causes, worries, challenges and solutions – A review." *International Journal of Current Research* 5 (7): 1880–92.
- Ramees, T, P., Dhama, K., Karthik, K., Rathore, R. S., Kumar, A., Saminathan, M., Tiwari, R., Malik, Y. S., Singh, R. K.. 2017. "*Arcobacter*: An emerging food-borne zoonotic pathogen, its public health concerns and advances in diagnosis and control – A comprehensive review." *Veterinary Quarterly* 37 (1): 136–61.
- Rapp, D., Ross, C. M., Pleydell, E. J., Muirhead, R. W.. 2012. "Differences in the fecal concentrations and genetic diversities of *Campylobacter jejuni* populations among individual cows in two dairy herds." *Applied and Environmental Microbiology* 78 (21): 7564–71.
- Rathlavath, S., Kohli, V., Sanjit, A., Lekshmi, M., Tripathi, G., Kumar, S., Nayak, B. B.. 2017. "Virulence genotypes and antimicrobial susceptibility patterns of *Arcobacter butzleri* isolated from seafood and its environment." *International Journal of Food Microbiology* 263: 32–37.
- Rathlavath, S., Kumar, S., Nayak, B. B.. 2017. "Comparative isolation and genetic diversity of *Arcobacter* spp. from fish and the coastal environment." *Letters in Applied Microbiology* 65 (1): 42–49.
- Rautelin, H., Sappinen, O., Jahkola, M., Saloranta, K., Rantanen B., Kosunen, T.. 1986. "*Campylobacter* epidemic in virrat in the summer of 1985." *Duodecim; Laaketieteellinen Aikakauskirja* 102 (10): 629–635.
- Rautelin, H., Koota, K., Essen, R. V., Jahkola, M., Siitonen, A., Kosunen, U. T.. 1990. "Waterborne *Campylobacter jejuni* epidemic in a finnish hospital for rheumatic diseases." *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 22: 321–26.
- Rice, E. W., Rodgers, M. R., Wesley, I. V., Johnson, C. H., Tanner, S. A.. 1999. "Isolation of *Arcobacter butzleri* from ground water." *Letters in Applied Microbiology* 28: 31–35.
- Richardson, G., Thomas, D. R., Smith, R. M. M., Neahaul, L., Ribeiro, C. D., Brown, A. G., Salmon, R. L.. 2007. "A community outbreak of *Campylobacter jejuni* infection from a

- chlorinated public water supply.” *Epidemiology and Infection* 135: 1151–58.
- Ricke, S. C., Feye, K. M., Chaney, W. E., Shi, Z., Pavlidis, H.. 2019. “Developments in rapid detection methods for the detection of foodborne *Campylobacter* in the United States.” *Frontiers in Microbiology* 9: 3280.
- Romero, J., García-Varela, M., Lacleste, J. P., Espejo, R. T.. 2002. “Bacterial 16S rRNA gene analysis revealed that bacteria related to *Arcobacter* spp. constitute an abundant and common component of the oyster microbiota (*Tiostrea chilensis*).” *Microbial Ecology* 44 (4): 365–71.
- Rosef, O., Rettedal, G., Lågeide, L.. 2001. “Thermophilic campylobacters in surface water: a potential risk of campylobacteriosis.” *International Journal of Environmental Health Research* 11 (4): 321–27.
- Rossi, M., Hänninen, M. L., Revez, J., Hannula, M., Zanoni, R. G.. 2008. “Occurrence and species level diagnostics of *Campylobacter* spp., enteric *Helicobacter* spp. and *Anaerobiospirillum* spp. in healthy and diarrheic dogs and cats.” *Veterinary Microbiology* 129 (3-4): 304–14.
- Rossi, M., Debruyne, L., Zanoni, R. G., Manfreda, G., Revez, J., Vandamme, P.. 2009. “*Campylobacter avium* sp. nov., a hippurate-positive species isolated from poultry.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59 (9): 2364–69.
- Rotariu, O., Dallas, J. F., Ogden, I. D., Macrae, M., Sheppard, S. K., Maiden, M. C. J., Gormley, F. J., Forbes, K. J., Strachan, N. J. C.. 2009. “Spatiotemporal homogeneity of *Campylobacter* subtypes from cattle and sheep across northeastern and southwestern scotland.” *Applied and Environmental Microbiology* 75 (19): 6275–81.
- Sa, E. M. D., Harrison, M. A.. 2005. “Effect of pH, NaCl content , and temperature on growth and survival of *Arcobacter* spp.” *Journal of Food Protection* 68 (1): 18–25.
- Sacks, J. J., Lieb, S., Baldy, L. M., Berta, S., Patton, C. M., White, M. C., Bigler, W. J., Witte, J. J.. 1986. “Epidemic campylobacteriosis associated with a community water supply.” *American Journal of Public Health* 76 (4): 424–28.
- Sahin, O., Yaeger, M., Wu, Z., Zhang ,Q.. 2017. “*Campylobacter* - Associated diseases in animals.” *The Annual Review of Animal Biosciences* 5: 21–42.
- Salas-Massó, N., Figueras, M. J., Andree, K. B., Furones, M. D.. 2018. “Do the *Escherichia coli* european union shellfish safety standards predict the presence of *Arcobacter* spp., a potential zoonotic pathogen?” *Science of the Total Environment* 624: 1171–79.
- Sandstedt, K., Jan, U.. 1991. “Description of *Campylobacter upsaliensis* sp. nov. previously known as the CNW group.” *Systematic and Applied Microbiology* 14 (1): 39–45.
- Gallay, A., De Valk, H., Cournot, M., Ladeuil, B., Hemery, C., Castor, C., Bon, F., Mégraud, F., Le Cann, P., Desenclos, J. C., half of the Outbreak Investigation Team. 2006. “A large multi-pathogen waterborne community outbreak linked to faecal contamination of a groundwater system, France, 2000.” *Clinical Microbiology and Infection* 12 (6): 561–70.
- Savill, M. G., Hudson, J. A., Ball, A., Klena, J. D., Scholes, P., Whyte, R. J., McCormick, R. E., Jankovic, D.. 2001. “Enumeration of *Campylobacter* in New Zealand recreational and drinking waters.” *Journal of Applied Microbiology* 91 (1): 38–46.

- Scallan, E., Grif, P. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Hoekstra, R. M.. 2011. "Foodborne illness acquired in the United States – Unspecified agents." *Emerging Infectious Diseases* 17 (1): 16–22.
- Schets, F. M., Jacobs-Reitsma, W. F., der Plaats, R. Q., Heer, L. K., Hoek, A. H., Hamidjaja, R. A., Maria, A., Husman, D. R., Blaak, H.. 2017. "Prevalence and types of *Campylobacter* on poultry farms and in their direct environment." *Journal of Water and Health* 15 (6): 849–62.
- Shah, A. H., Saleha, A. A., Zunita, Z., Murugaiyah, M.. 2011. "Arcobacter – An emerging threat to animals and animal origin food products?" *Trends in Food Science and Technology* 22 (5): 225–36.
- Shah, A. H., Saleha, A. A., Zunita, Z., Cheah, Y. K., Murugaiyah, M., Korejo, N. A.. 2012. "Genetic characterization of *Arcobacter* isolates from various sources." *Veterinary Microbiology* 160 (3–4): 355–61.
- Shange, N., Gouws, P., Hoffman, L. C.. 2019. "Campylobacter and Arcobacter species in food - producing animals: Prevalence at primary production and during slaughter." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 35 (9): 1–16.
- Shirzad, H., Tabatabaei, M., Khoshbakht, R.. 2016. "Occurrence and antimicrobial resistance of emergent *Arcobacter* spp. isolated from cattle and sheep in Iran." *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 44: 37–40.
- Shrestha, R. G., Tandukar, S., Bhandari, D., Sherchan, S. P., Tanaka, Y., Sherchand, J. B., Haramoto, E.. 2019. "Prevalence of *Arcobacter* and other pathogenic bacteria in river water in Nepal." *Water* 11 (1416): 9.
- Šilha, D., Pejchalová, M., Šilhová, L.. 2017. "Susceptibility to 18 drugs and multidrug resistance of *Arcobacter* isolates from different sources within the Czech Republic." *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 9: 74–77.
- Silva, J., Leite, D., Fernandes, M., Mena, C., Gibbs, P. A., Teixeira, P.. 2011. "Campylobacter spp. as a foodborne pathogen: A review." *Frontiers in Microbiology* 2 (200): 1–12.
- Silva, M. F., Pereira, I., Carneiro, C., Hemphill, A., Mateus, L., Lopes-da-Costa, L., Silva, E.. 2020. "Campylobacter portucalensis sp. nov., a new species of *Campylobacter* isolated from the preputial mucosa of bulls." *PLoS ONE* 15 (1): e0227500.
- Smet, S. D., Vandamme, P., Zutter, L. D., On, S. L. W., Doudah, L., Houf, K.. 2011. "Arcobacter trophiarum sp. nov., isolated from fattening pigs." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61 (2): 356–61.
- Smid, J. H., Gras, L. M., Boer, A. G., French, N. P., Havelaar, A. H., Wagenaar, J. A., Pelt, W. V.. 2013. "Practicalities of using non-local or non-recent multilocus sequence typing data for source attribution in space and time of human campylobacteriosis." *PLoS ONE* 8 (2): e55029.
- Snelling, W. J., Matsuda, M., Moore, J. E., Dooley, J. S. G.. 2006. "Under the microscope: Arcobacter." *Letters in Applied Microbiology* 42 (1): 7–14.
- Sproston, E L., Ogden, I. D., Macrae, M., Dallas, J. F., Sheppard, S. K., Cody, A. J., Colles, F. M., Wilson, M. J., Forbes, K. J., Strachan, N. J. C.. 2011. "Temporal variation and host

- association in the *Campylobacter* population in a longitudinal ruminant farm study.” *Applied and Environmental Microbiology* 77 (18): 6579–86.
- Staji, H., Birgani, S. F., Raeisian, B.. 2018. “Comparative clustering and genotyping of *Campylobacter jejuni* strains isolated from broiler and turkey feces by using RAPD-PCR and ERIC-PCR analysis.” *Annals of Microbiology* 68 (11): 755–62.
- Stehr-Green, J. K., Schantz, P. M.. 1987. “The impact of zoonotic diseases transmitted by pets on human health and the economy.” *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 17 (1): 1–15.
- Steinhauserova, I., Ceskova J., Fojtikova, K., Obrovskaa, I.. 2001. “Identification of thermophilic *Campylobacter* spp. by phenotypic and molecular methods.” *Journal of Applied Microbiology* 90 (3): 470–75.
- Szczepanska, B., Spica, D., Klawe, J. J.. 2017. “Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from children and environmental sources in urban and suburban areas.” *BioMed Central Microbiology* 17 (1): 1–9.
- Taboada, E. N., Graham, M. R., Carriço, J. A., Domselaar, G. V.. 2017. “Food safety in the age of next generation sequencing, bioinformatics, and open data access.” *Frontiers in Microbiology* 8: 909.
- Talay, F., Molva, C., Atabay, H. I.. 2016. “Isolation and identification of *Arcobacter* species from environmental and drinking water samples.” *Folia Microbiologica* 61 (6): 479–84.
- Tanaka, R., Cleenwerck, I., Mizutani, Y., Iehata, S., Bossier, P., Vandamme, P.. 2017. “*Arcobacter haliotis* sp. nov., isolated from abalone species *haliotis gigantea*.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 67 (8), 3050-3056.
- Tanner, A. C. R., Badger, S., Lai, C., Listgarten, M. A., Visconti, R. A., Socransky, S. S.. 1981. “*Wolinella* gen. nov., *Wolinella succinogenes* (*Vibrio succinogenes* Wolin et al.) comb. nov., and description of *Bacteroides gracilis* sp. nov., *Wolinella recta* sp. nov., *Campylobacter concisus* sp. nov., and *Eikenella corrodens* from humans with periodontal disease.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 31 (4), 432-445.
- Taylor, D. E., Courvalin, P.. 1988. “Mechanisms of antibiotic resistance in *Campylobacter* species.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 32 (8): 1107–12.
- Tenkate, T. D., Stafford, R. J.. 2001. “Risk factors for *Campylobacter* infection in infants and young children: A matched case-control study.” *Epidemiol Infect* 127 (3): 399–404.
- Thomas, C., Gibson, H., Hill, D. J., Mabey, M.. 1999. “*Campylobacter* epidemiology: An aquatic perspective.” *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement* 85 (S1): 168–77.
- Tompkin, R. B., Roberts, T. A., van Schothorst, M., Cole, L. M. B., Gram, R. L., Dahms, S.. 2002. “Microbiological testing in food safety management.” *Microorganisms in Food: 7*. Springer Science and Business Media. Kluwer/ Plenum, New York.
- Tsai, H., Huang, H., Lin, C., Lien, Y., Chou, C.. 2007. “*Salmonellae* and *Campylobacters* in household and stray dogs in northern Taiwan.” *Veterinary Research Communications* 31 (8): 931–39.
- Tunncliff, R.. 1914. “An anaerobic *Vibrio* isolated from a case of acute bronchitis.” *Journal of*

- Infectious Diseases* 15 (2): 350–351.
- United Nations International Children's Emergency Fund (UNICEF). 2016. "One is too many: ending child deaths from pneumonia and diarrhoea." New York, NY, 1-74.
- Van, T. T. H., Elshagmani, E., Gor, M. C., Scott, P. C., Moore, R. J.. 2016. "*Campylobacter hepaticus* sp. nov., isolated from chickens with spotty liver disease." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66 (11): 4518–24.
- Vandamme, P., Daneshvar, M. I., Dewhirst, F. E., Paster, B. J., Kersters, K., Goossens, H., Moss, C. W.. 1995. "Chemotaxonomic analyses of *Bacteroides gracilis* and *Bacteroides ureolyticus* and reclassification of *B. gracilis* as *Campylobacter gracilis* comb. nov." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 45 (1), 145-152.
- Vandamme, P., Falsen, E., Rossau, R., Hoste, B., Segers, P., Tygat, R., De Ley, J.. 1991. "Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: Emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 41 (1), 88-103.
- Vandamme, P., Debruyne, L., De Brandt, E., Falsen, E.. 2016. "Reclassification of *Bacteroides ureolyticus* as *Campylobacter ureolyticus* comb. nov., and emended description of the genus *Campylobacter*" *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 60 (9): 2016-2022..
- Vandamme, P., Pugina, P., Benzi, G., Van Etterijck, R., Vlaes, L., Kersters, K., Butzler, J. P., Lior, H., Lauwers, S.. 1992. "Outbreak of recurrent abdominal cramps associated with *Arcobacter butzleri* in an italian school." *Journal of Applied Microbiology* 30 (9): 2335–37.
- Vandenberg, O., Skirrow, M. B., Butzler, J. P.. 2015. "*Campylobacter* and *Acrobacter*" In *Manual of Clinical Microbiology*, Edited by Jorgensen, J., Pfaller, M., Carroll, K., Funke, G., Landry, M., Richter, S., Warnock, D., Eleventh Edition, Washington, USA, 1541-1562.
- Vandenberg, O., Dediste, A., Houf, K., Ibekwem, S., Souayah, H., Cadranel, S., Douat, N., Zissis, G., Butzler, J. P., Vandamme, P.. 2004. "Species in humans." *Emerging Infectious Diseases* 10 (10): 1863–67.
- Vandenberg, O., Houf, K., Douat, N., Vlaes, L., Retore, P., Butzler, J. P., Dediste, A.. 2006. "Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of non-*jejuni/coli* campylobacters and arcobacters from Belgium." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 57 (5): 908–13.
- Ventola, C. L.. 2015. "The antibiotic resistance crisis part 1: Causes and threats." *Pharmacy and Therapeutics* 40 (4): 277–83.
- Vereen, E., Lowrance, R. R., Cole, D. L., Lipp, E. K.. 2007. "Distribution and ecology of campylobacters in coastal plain streams (Georgia, United States of America)." *Applied and Environmental Microbiology* 73 (5): 1395–1403.
- Verhoeff-bakkenes, L., Jansen, H. A., Velt, P. H., Beumer, R. R., Zwietering, M. H., Leusden, F. M.. 2011. "Consumption of raw vegetables and fruits: A risk factor for *Campylobacter* infections." *International Journal of Food Microbiology* 144 (3): 406–12.
- Vestergaard, L. S., Olsen, K. E., Stensvold, C. R., Böttiger, B. E., Adelhardt, M., Lisby, M., Mørk, L., Mølbak, K.. 2007. "Outbreak of severe gastroenteritis with multiple aetiologies caused

- by contaminated drinking water in Denmark, January 2007.” *Weekly releases (1997–2007)* 12 (13): 3164.
- Vicente-Martins, S., Oleastro, M., Domingues, F. C., Ferreira, S.. 2018. “*Arcobacter* spp. at retail food from Portugal: Prevalence, genotyping and antibiotics resistance” *Food Control* 85: 107–12.
- Waite, D. W., Vanwonterghem, I., Rinke, C., Parks, D. H., Zhang, Y., Takai, K., Sievert, S. M., Simon, J., Campbell, B. J., Hanson, T. E., Woyke, T., Klotz, M. G., Hugenholtz, P.. 2017. “Comparative genomic analysis of the class *Epsilonproteobacteria* and proposed reclassification to *Epsilonbacteraeota* (phyl. nov.)” *Frontiers in Microbiology* 8: 682.
- Wang, G., Clark, C. G., Taylor, T. M., Pucknell, C., Barton, C., Price, L., Woodward, D. L., Rodgers, F. G.. 2018. “Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*” *Journal of Clinical Microbiology* 40 (12): 4744–47.
- Wegener, H. C.. 2003. “Antibiotics in animal feed and their role in resistance development.” *Current Opinion in Microbiology* 6 (5): 439–45.
- Wei, R., Ge, F., Huang, S., Chen, M., Wang, R.. 2011. “Occurrence of veterinary antibiotics in animal wastewater and surface water around farms in Jiangsu province, China.” *Chemosphere* 82 (10): 1408–14.
- Wesley, I. V., Schroeder-Tucker, L.. 2011. “Recovery of *Arcobacter* spp. from nonlivestock species.” *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 42 (3): 508–12.
- Whiley, H., Akker, B. V. D., Giglio, S., Bentham, R.. 2013. “The role of environmental reservoirs in human campylobacteriosis.” *International Journal of Environmental Health Research and Public Health* 10 (11): 5886–5907.
- Whiteduck-Léveillé, K., Whiteduck-Léveillé, J., Cloutier, M., Tambong, J. T., Xu, R., Topp, E., Arts, M. T., Chao, J., Adam, Z., Lévesque, C. A., Lapen, D. R., Villemur, R., Khan, I. U. H.. 2015. “Identification, characterization and description of *Arcobacter faecis* sp. nov., isolated from a human waste septic tank.” *Systematic and Applied Microbiology* 39 (2): 1–7.
- Whiteduck-Léveillé, K., Whiteduck-Léveillé, J., Cloutier, M., Tambong, J. T., Xu, R., Topp, E., Arts, M. T., Chao, J., Adam, Z., Lévesque, C. A., Lapen, D. R., Villemur, R., Talbot, G., Khan, I. U. H.. 2015. “*Arcobacter lanthieri* sp. nov., isolated from pig and dairy cattle manure.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65 (8): 2709–16.
- World Health Organization (WHO). 2014. “Antimicrobial resistance: Global report on surveillance.” Geneva, Switzerland, *World Health Organization*.
- World Health Organization (WHO). 2016. “Number of reported cholera cases.” Geneva, Switzerland, *World Health Organization*.
- World Health Organization (WHO). 2010. “UN-water global annual assessment of sanitation and drinking-water (GLAAS): Targeting resources for better results.” Geneva, Switzerland, *World Health Organization*.
- World Health Organization (WHO). 2019. “Safe water, better health.” Geneva, Switzerland,

World Health Organization.

- Wieczorek, K., Osek, J.. 2013. "Antimicrobial resistance mechanisms among *Campylobacter*." *BioMed Research International* 2013: 1–12.
- Wilson, I. G., Moore, J. E.. 1996. "Presence of *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. in shellfish." *Epidemiology and Infection* 116 (2): 147–53.
- Wirsen, C. O., Sievert, S. M., Cavanaugh, C. M., Molyneaux, S. J., Ahmad, A., Taylor, L. T., Delong, E. F., Taylor, C. D.. 2002. "Characterization of an autotrophic sulfide-oxidizing marine *Arcobacter* sp. that produces filamentous sulfur." *Applied and Environmental Microbiology* 68 (1): 316–25.
- Parte, A.C., Sardà Carbasse, J., Meier-Kolthoff, J.P., Reimer, L.C. and Göker, M. (2020). "List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 70: 5607-5612. Disponível online: <http://www.bacterio.net/>. Acedido a 2 de Junho, 2020.
- Wysok, B., Uradziński, J.. 2009. "*Campylobacter* spp. - a significant microbiological hazard in food. i. Characteristics of *Campylobacter* species, infection source, epidemiology." *Polish Journal of Veterinary Sciences* 12 (1): 141–148.
- Xie, W. Y., Shen, Q., Zhao, F. J.. 2018. "Antibiotics and antibiotic resistance from animal manures to soil: A review." *European Journal of Soil Science* 69 (1): 181–95.
- Yang, Y., Feye, K. M., Shi, Z., Pavlidis, H. O., Kogut, M., Ashworth, A. J., Ricke, S. C.. 2019. "A historical review on antibiotic resistance of foodborne *Campylobacter*." *Frontiers in Microbiology* 10: 1509.
- Zanoni, R. G., Debruyne, L., Rossi, M., Revez, J., Vandamme, P.. 2009. "*Campylobacter cuniculorum* sp. nov., from rabbits." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59 (7): 1666–71.
- Zhang, Q., Sahin, O.. 2020. "Campylobacteriosis." *Diseases of poultry* 754-769.
- Zhang, Z., Yu, C., Wang, X., Yu, S., Zhang, X. H.. 2016. "*Arcobacter pacificus* sp. nov., isolated from seawater of the south pacific Gyre." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66 (2): 542–47.

Anexo I

Identificação, origem, espécies e perfis de resistência a antibióticos das diferentes estirpes de *Campylobacter* spp..

Estirpe	Categoria de água	Espécie	Resistência
W1-1	Riacho	<i>C.coli</i>	-
W2-2	Rio Zêzere	<i>C.lari</i>	AMP
W5-2	Rio Zêzere	<i>C.coli</i>	-
W8-6	Riacho	<i>C.jejuni</i>	-
W24	Riacho	<i>C.jejuni</i>	-
W30-3	Riacho	<i>C.jejuni</i>	-
W36-2	Riacho	<i>C.upsaliensis</i>	AMP
W40-5	Riacho	<i>C.lari</i>	AMP
W54-1	Rio Zêzere	<i>C.lari</i>	AMP
W54-2	Rio Zêzere	<i>C.lari</i>	AMP
W54-3	Rio Zêzere	<i>C.lari</i>	AMP
W70-1	Riacho	<i>C.jejuni</i>	-
W72-1	Fonte de nascente	<i>C.lari</i>	TET, AMC, AMP
W72-2	Fonte de nascente	<i>C.lari</i>	-
W74-1	Riacho	<i>C.jejuni</i>	CIP, TET, AMP
W76-2	Riacho	<i>C.coli</i>	-
W76-3	Riacho	<i>C. coli</i>	-
W77-6	Rio Zêzere	<i>C.coli</i>	-
W78-5	Rio Zêzere	<i>C.coli</i>	AMP
W79-1	Rio Zêzere	<i>C.coli</i>	ERY, TET
W79-2	Rio Zêzere	<i>C.coli</i>	TET
W87-1	Fonte de nascente	<i>C.coli</i>	CIP, TET
W112-2	Fonte de nascente	<i>C.jejuni</i>	-
W115-2	Fonte de nascente	<i>C.jejuni</i>	-
W125-1	Riacho	<i>C.jejuni</i>	-

CIP – Ciprofloxacina; ERY – Eritromicina; TET – Tetraciclina; AMC – Amoxicilina+ácido clavulânico; AMP – Ampicilina

Anexo II

Identificação, origem, espécies e perfis de resistência a antibióticos das diferentes estirpes de *Arcobacter sensu lato*.

Estirpe	Categoria de água	Espécie	Resistência
W2-1P	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMC, AMP
W2-2P	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	TET, ERT, AMC, AMP
W2-3P	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	GEN, TET, AMP
W2-2 G	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	GEN, TET, AMP
W3-1	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET
W3-3	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMP
W4-3	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMP
W5-1P	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	GEN, ERY, TET, ERT, AMC, AMP
W5-2P	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMP
W5-3P	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMC, AMP
W5-1G	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMP
W5-2G	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	GEN, TET, AMP
W5-3G	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMP
W8-1	Riacho	<i>A. butzleri</i>	GEN, TET, AMP
W8-2	Riacho	<i>A. butzleri</i>	-
W8-3	Riacho	<i>A. butzleri</i>	CIP, TET
W9-1	Fonte de nascente	<i>A. butzleri</i>	GEN, ERY, TET, AMP
W10-1	Fonte de nascente	<i>Arcobacter sensu lato</i>	GEN, ERY, TET, AMP
W12-1	Fonte de nascente	<i>A. butzleri</i>	GEN, ERY, TET, ERT, AMP
W12-3	Fonte de nascente	<i>Arcobacter sensu lato</i>	ERY, TET, ERT, AMP
W17-1	Riacho	<i>A. butzleri</i>	GEN, CIP, ERY, AMP
W18-2	Riacho	<i>A. butzleri</i>	GEN, ERY, AMP
W19-1	Riacho	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMP
W19-4	Riacho	<i>Arcobacter sensu lato</i>	TET, AMP
W20-1	Rio Zêzere	<i>Arcobacter sensu lato</i>	ERY, TET, ERT, AMP
W24-1	Riacho	<i>A. butzleri</i>	GEN, CIP, ERY, AMP
W24-3	Riacho	<i>A. butzleri</i>	GEN, ERY
W26-1	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	GEN, ERY, TET, AMP
w26-2	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	GEN, CIP, ERY, TET, AMP
w26-3	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	GEN, CIP, ERY, AMP
w26-4	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	GEN, ERY, TET, AMP
w26-5	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMP
w26-6	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	GEN, CIP, ERY, TET, ERT, AMP
W27-2	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMP
W27-3	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	CIP, ERY, TET, ERT, AMP
W28-1	Riacho	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMP
W28-2	Riacho	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT
W28-3	Riacho	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMC, AMP
W29-1	Riacho	<i>A. butzleri</i>	CIP, ERY, TET, ERT, AMP
W32-1	Fonte de nascente	<i>Arcobacter sensu lato</i>	ERY, TET, ERT, AMC, AMP

Anexo 2: Identificação, origem, espécies e perfis de resistência a antibióticos das diferentes estirpes de *Arcobacter sensu lato* (Continuação).

Estirpe	Categoria de água	Espécie	Resistência
W32-2	Fonte de nascente	<i>Arcobacter sensu lato</i>	GEN, ERY, TET, AMP
W32-6	Fonte de nascente	<i>Arcobacter sensu lato</i>	ERY, TET, AMP
W35-1	Fonte de nascente	<i>A. butzleri</i>	AMP
W36-2	Riacho	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMP
W36-3	Riacho	<i>A. butzleri</i>	GEN, ERY, TET, AMP
W40-1	Fonte de nascente	<i>A. butzleri</i>	CIP, ERY, TET, ERT, AMC, AMP
W40-2	Fonte de nascente	<i>A. butzleri</i>	CIP, ERY, TET, ERT, AMP
W40-3	Fonte de nascente	<i>A. butzleri</i>	GEN, CIP, ERY, TET, AMP
W41-1	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMC, AMP
W41-2	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	CIP, ERY, TET, ERT, AMC, AMP
W41-3	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET
W42-1	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	GEN, CIP, ERY, TET, ERT, AMP
W42-2	Rio Zêzere	<i>A. cryaerophilus</i>	CIP, ERY, TET, ERT, AMC, AMP
W42-3	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT
W44-1	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	CIP, ERY, TET, ERT, AMP
W44-2	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMC, AMP
W45-1	Riacho	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMP
W45-2	Riacho	<i>A. butzleri</i>	CIP, ERY, TET, ERT, AMP
W46-1	Riacho	<i>A. butzleri</i>	TET, ERT, AMC, AMP
W46-2	Riacho	<i>A. butzleri</i>	TET, ERT, AMC, AMP
W46-3	Riacho	<i>A. butzleri</i>	CIP, ERY, TET, ERT, AMP
W47-3	Fonte de nascente	<i>A. cryaerophilus</i>	CIP, ERY, TET
W48-1	Riacho	<i>A. butzleri</i>	TET, ERT, AMP
w48-2	Riacho	<i>A. butzleri</i>	TET, ERT
W48-3	Riacho	<i>A. butzleri</i>	TET, ERT, AMP
W49-1	Riacho	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMP
W49-2	Riacho	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMP
W49-3	Riacho	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMP
W50-1	Riacho	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMP
W50-2	Riacho	<i>Arcobacter sensu lato</i>	ERY, TET, ERT, AMP
W50-4	Riacho	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMP
w51-1	Riacho	<i>A. butzleri</i>	GEN, ERY, ERT, AMP
W51-4	Riacho	<i>A. butzleri</i>	CIP, TET, ERT, AMP
W51-1A	Riacho	<i>A. cryaerophilus</i>	TET, ERT
W53-2A	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	CIP, TET, ERT, AMP
W53-3A	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	CIP, ERY, TET, ERT, AMP
W54-3	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMP
W54-2A	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMP
W54-3A	Rio Zêzere	<i>Arcobacter sensu lato</i>	ERY, TET, ERT
W55-3	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, AMC
W55-1A	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	CIP
W62-1	Fonte de nascente	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMP

Anexo 2: Identificação, origem, espécies e perfis de resistência a antibióticos das diferentes estirpes de *Arcobacter sensu lato* (Continuação).

Estirpe	Categoria de água	Espécie	Resistência
W62-2	Fonte de nascente	<i>A. butzleri</i>	ERT, AMP
W63-2	Fonte de nascente	<i>A. cryaerophilus</i>	CIP, ERY, TET, AMP
W63-3	Fonte de nascente	<i>A. cryaerophilus</i>	ERY, TET, ERT, AMC, AMP
W64-1	Fonte de nascente	<i>A. cryaerophilus</i>	ERY, TET, ERT, AMP
W64-3	Fonte de nascente	<i>A. cryaerophilus</i>	ERY, TET, ERT, AMP
W67-1	Riacho	<i>A. cryaerophilus</i>	ERY, TET, ERT, AMC, AMP
W67-1A	Riacho	<i>A. cryaerophilus</i>	ERY, TET, ERT, AMC, AMP
W69-1	Rio Zêzere	<i>Arcobacter sensu lato</i>	GEN, CIP, ERY, TET, AMP
W69-2	Rio Zêzere	<i>A. cryaerophilus</i>	GEN, CIP, ERY, TET
W69-1A	Rio Zêzere	<i>A. cryaerophilus</i>	GEN, ERY
W69-2A	Rio Zêzere	<i>Arcobacter sensu lato</i>	GEN, CIP, ERY, TET, ERT
W73-1	Riacho	<i>Arcobacter sensu lato</i>	GEN, CIP, ERY, TET, AMP
W73-2	Riacho	<i>A. cryaerophilus</i>	TET, ERT, AMP
W73-3	Riacho	<i>A. cryaerophilus</i>	ERY, TET, AMC, AMP
W73-4	Riacho	<i>A. cryaerophilus</i>	ERY, TET, ERT, AMC, AMP
W74-2	Riacho	<i>A. cryaerophilus</i>	ERY, TET, AMP
W75-2A	Riacho	<i>A. cryaerophilus</i>	ERY, TET, AMP
W76-1	Riacho	<i>Arcobacter sensu lato</i>	ERY, TET
W76-2	Riacho	<i>A. cryaerophilus</i>	ERY, TET, ERT, AMC, AMP
W76-6	Riacho	<i>A. cryaerophilus</i>	ERY, TET, AMP
W77-1	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	CIP, ERY, TET, ERT
W77-2	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	CIP, ERY, TET, ERT
W77-3	Rio Zêzere	<i>Arcobacter sensu lato</i>	-
W77-4	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMP
W78-1	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	CIP, TET, ERT
W78-2	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMP
W78-3	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	CIP, ERY, TET, ERT
W78-4	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET
W79-1	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	TET, ERT, AMP
W79-2	Rio Zêzere	<i>Arcobacter sensu lato</i>	TET
W79-3	Rio Zêzere	<i>Arcobacter sensu lato</i>	ERY, TET
W79-4	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	CIP, ERY, TET
W79-5	Rio Zêzere	<i>A. cryaerophilus</i>	ERY, TET
W80-1	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMP
W80-2	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMP
W80-3	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMP
W81-1	Riacho	<i>A. cryaerophilus</i>	CIP, TET
W81-2	Riacho	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET
W81-3	Riacho	<i>A. butzleri</i>	CIP, ERY, TET, ERT, AMP
W81-5	Riacho	<i>A. cryaerophilus</i>	CIP, ERY, TET, ERT, AMP
W82-1	Riacho	<i>A. butzleri</i>	CIP, ERY, TET, ERT, AMP
W82-2	Riacho	<i>Arcobacter sensu lato</i>	CIP, ERY, TET, ERT, AMP

Anexo 2: Identificação, origem, espécies e perfis de resistência a antibióticos das diferentes estirpes de *Arcobacter sensu lato* (Continuação).

Estirpe	Categoria de água	Espécie	Resistência
W82-3	Riacho	<i>A. butzleri</i>	CIP, ERY, TET, ERT, AMP
W83-1	Riacho	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMC, AMP
W83-2	Riacho	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMC, AMP
W83-3	Riacho	<i>A. cryaerophilus</i>	ERY, TET, ERT, AMC, AMP
W83-4	Riacho	<i>A. butzleri</i>	CIP, ERY, TET, ERT, AMP
W87-1	Fonte de nascente	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT
W87-3	Fonte de nascente	<i>A. butzleri</i>	TET
W92-1	Riacho	<i>A. cryaerophilus</i>	TET, AMP
W92-2	Riacho	<i>A. cryaerophilus</i>	ERY
W92-4	Riacho	<i>A. cryaerophilus</i>	ERY, TET, ERT
W92-6	Riacho	<i>Arcobacter sensu lato</i>	TET, ERT, AMP
W94-4	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	TET
W94-5	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMP
W94-6	Rio Zêzere	<i>Arcobacter sensu lato</i>	TET, ERT, AMP
W95-3	Riacho	<i>Arcobacter sensu lato</i>	ERY, TET, AMP
W95-4	Riacho	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT
W96-1	Riacho	<i>A. butzleri</i>	GEN, ERY
W96-4	Riacho	<i>A. butzleri</i>	TET, ERT, AMP
W96-5	Riacho	<i>A. butzleri</i>	CIP, TET
W97-3	Fonte de nascente	<i>Arcobacter sensu lato</i>	ERY, AMP
W97-4	Fonte de nascente	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMP
W97-5	Fonte de nascente	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMP
W98-6	Riacho	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMP
W99-4	Riacho	<i>A. butzleri</i>	-
W99-6	Riacho	<i>A. butzleri</i>	TET
W100-1	Riacho	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET
W100-2	Riacho	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMP
W100-4	Riacho	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET
W100-5	Riacho	<i>A. butzleri</i>	CIP, ERY, TET, ERT
W100-6	Riacho	<i>A. butzleri</i>	-
W101-2	Riacho	<i>Arcobacter sensu lato</i>	CIP, ERY, TET, ERT, AMP
W101-3	Riacho	<i>Arcobacter sensu lato</i>	CIP, TET, ERT, AMP
W101-4	Riacho	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMP
W102-1	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMP
W102-2	Rio Zêzere	<i>Arcobacter sensu lato</i>	ERY, TET, ERT
W102-3	Rio Zêzere	<i>Arcobacter sensu lato</i>	ERY, TET
W102-6	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	GEN, CIP, ERY, AMC, AMP
W103-1	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	CIP, ERY, TET, ERT, AMP
W103-3	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMC, AMP
W103-4	Rio Zêzere	<i>Arcobacter sensu lato</i>	GEN, TET
W103-5	Rio Zêzere	<i>Arcobacter sensu lato</i>	GEN, ERY, TET, AMP
W104-1	Rio Zêzere	<i>A. cryaerophilus</i>	GEN, ERY, TET, AMP

Anexo 2: Identificação, origem, espécies e perfis de resistência a antibióticos das diferentes estirpes de *Arcobacter sensu lato* (Continuação).

Estirpe	Categoria de água	Espécie	Resistência
W104-2	Rio Zêzere	<i>Arcobacter sensu lato</i>	GEN, CIP, ERY, TET, AMP
W104-3	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMP
W104-5	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	TET, ERT
W104-6	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMP
W105-1	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET
W105-2	Rio Zêzere	<i>Arcobacter sensu lato</i>	GEN, ERY, AMP
W105-3	Rio Zêzere	<i>Arcobacter sensu lato</i>	ERY, TET, ERT
W105-4	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMP
W106-2	Riacho	<i>Arcobacter sensu lato</i>	TET, ERT, AMP
W106-6	Riacho	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMC, AMP
W106-7	Riacho	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT
W106-8	Riacho	<i>Arcobacter sensu lato</i>	ERY, TET, ERT, AMC, AMP
W107-1	Riacho	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMP
W107-3	Riacho	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMC, AMP
W107-6	Riacho	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT
W108-1	Riacho	<i>Arcobacter sensu lato</i>	ERY, TET, ERT
W108-2	Riacho	<i>Arcobacter sensu lato</i>	GEN, CIP, ERY, TET, AMP
W108-3	Riacho	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT
W108-4	Riacho	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMC, AMP
W108-5	Riacho	<i>A. butzleri</i>	GEN, ERY, TET, AMP
W112-1	Fonte de nascente	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT
W117-1	Riacho	<i>A. butzleri</i>	CIP, ERY, TET, ERT, AMC, AMP
W119-1	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	TET, ERT
W119-2	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMP
W119-4	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	TET, ERT
W120-1	Riacho	<i>Arcobacter sensu lato</i>	GEN, CIP, ERY, TET
W120-2	Riacho	<i>A. butzleri</i>	GEN, TET, ERT
W120-3	Riacho	<i>Arcobacter sensu lato</i>	TET, ERT, AMP
W120-5	Riacho	<i>A. butzleri</i>	CIP, ERY, TET
W122-1	Fonte de nascente	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT
W123-2	Riacho	<i>A. cryaerophilus</i>	ERY, TET, AMP
W125-3	Riacho	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMP
W127-1	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	TET, ERT, AMC, AMP
W127-2	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMP
W127-3	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMP
W127-4	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	TET, ERT, AMP
W128-1	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMC, AMP
W128-2	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMC, AMP
W128-3	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	CIP, ERY, TET, ERT, AMP
W128-4	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	TET, AMP
W128-5	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, AMP
W129-1	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	CIP, ERY, TET, ERT, AMP

Anexo 2: Identificação, origem, espécies e perfis de resistência a antibióticos das diferentes estirpes de *Arcobacter sensu lato* (Continuação).

Estirpe	Categoria de água	Espécie	Resistência
W129-2	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	TET, ERT, AMP
W129-4	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	CIP, TET, ERT, AMP
W130-1	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMP
W130-3	Rio Zêzere	<i>Arcobacter sensu lato</i>	ERY, TET, ERT, AMP
W131-1	Riacho	<i>A. butzleri</i>	AMP
W131-3	Riacho	<i>A. butzleri</i>	GEN, AMP
W131-4	Riacho	<i>A. butzleri</i>	GEN, TET, AMP
W132-1	Riacho	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, AMP
W133-1	Riacho	<i>A. butzleri</i>	TET, ERT, AMP
W142-2	Riacho	<i>A. cryaerophilus</i>	-
W142-3	Riacho	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMP
W144-1	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMC, AMP
W144-3	Rio Zêzere	<i>A. butzleri</i>	CIP, ERY, TET, ERT, AMC, AMP
W146-2	Riacho	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMP
W146-4	Riacho	<i>A. butzleri</i>	AMP
W147-1	Fonte de nascente	<i>A. butzleri</i>	TET
W148-1	Riacho	<i>A. butzleri</i>	TET, ERT, AMP
W148-2	Riacho	<i>A. butzleri</i>	TET, ERT, AMC, AMP
W148-3	Riacho	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMP
W148-5	Riacho	<i>A. butzleri</i>	GEN, ERY, TET, AMP
W148-6	Riacho	<i>A. butzleri</i>	CIP, ERY, TET, ERT, AMP
W149-1	Riacho	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMP
W149-2	Riacho	<i>A. butzleri</i>	ERY, TET, ERT, AMP
W149-4	Riacho	<i>A. butzleri</i>	GEN, ERY, TET, ERT, AMC, AMP
W149-5	Riacho	<i>A. butzleri</i>	CIP, TET, ERT, AMC, AMP
W149-6	Riacho	<i>A. butzleri</i>	TET, ERT, AMC, AMP
W150-1	Riacho	<i>A. butzleri</i>	TET, ERT, AMC, AMP
W150-4	Riacho	<i>A. butzleri</i>	CIP, ERY, TET, ERT, AMP
W150-5	Riacho	<i>A. butzleri</i>	GEN, ERY, TET, ERT
W150-6	Riacho	<i>A. butzleri</i>	CIP, TET, ERT, AMC, AMP

GEN – Gentamicina; CIP – Ciprofloxacina; ERY – Eritromicina; TET – Tetraciclina; ERT - Ertapenemo
 AMC – Amoxicilina+ácido clavulânico; AMP - Ampicilina

Anexo III

Comunicação em painel de parte deste trabalho de Mestrado

Igor Venâncio, Mónica Oleastro, Susana Ferreira, “Distribuição de *Arcobacter* spp. em amostras de água no concelho da Covilhã”, IV Jornadas de Educação e Investigação em Saúde, Guarda, Portugal, 12 de dezembro de 2019



CERTIFICADO

Certifica-se que Igor Venâncio, Mónica Oleastro e Susana Ferreira apresentaram um poster com o título «Distribuição de *Arcobacter* spp. em amostras de água no concelho da Covilhã» nas IV Jornadas de Educação e Investigação em Saúde realizadas no dia 12 de dezembro de 2019, na Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico da Guarda.

Guarda, 12 de dezembro de 2019

A Diretora da Escola Superior de Saúde



(Prof. Paula Pissarra)

A Presidente do Conselho Pedagógico



(Prof. Doutora Ermelinda Marques)



Comunicação oral de parte deste trabalho de Mestrado

Igor Venâncio, Mónica Oleastro, Susana Ferreira, Distribution of *Campylobacter* spp. and *Arcobacter sensu lato* in water samples. XV Annual CICS-UBI Symposium, Covilhã, Portugal, 1 e 2 de outubro 2020.

