

AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA FENOTÍPICA E GENOTÍPICA ÀS TETRACICLINAS EM *Campylobacter jejuni* ISOLADOS DA CADEIA PRODUTIVA DE FRANGOS NA REGIÃO SUL DO RIO GRANDE DO SUL

LAÍS ABREU ANASTÁCIO¹; NATALIE RAUBER KLEINUBING²; TASSIANA
RAMIRES²; LETICIA KLEIN SHEIK²; KAUANA DOS SANTOS SOARES²;
WLADIMIR PADILHA DA SILVA³

¹Universidade Federal de Pelotas – laisabr@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas– nataliek10@hotmail.com; tassianaramires@gmail.com;
leticiascheik@hotmail.com; kauana_soares@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – wladimir.padilha2011@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A campilobacteriose é uma doença gastrointestinal de distribuição mundial, causada por micro-organismos pertencentes ao grupo denominado *Campylobacter* termofílicos, sendo a espécie *C. jejuni* a responsável por cerca de 80 a 90% dos casos de infecção em humanos (SZCZEPANSKA et al., 2015). *Campylobacter* termofílicos estão amplamente distribuídos entre os animais de sangue quente, porém as aves são consideradas os hospedeiros primários dessa bactéria, pois a temperatura corporal desses animais coincide com a temperatura ótima de multiplicação do patógeno (EPPS et al., 2013; AGUNOS, et al., 2014; HALD et al., 2015; WHO, 2018).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, a campilobacteriose se caracteriza por sintomas como diarreia, dor abdominal, febre, dor de cabeça, náuseas e vômitos, que geralmente duram de 3 a 6 dias. Além disso, podem ocorrer algumas complicações pós-infecção, como a artrite reativa e a síndrome de Guillain-Barré, que resulta em paralisia muscular, podendo ocasionar disfunção respiratória e morte. Apesar da campilobacteriose ser geralmente auto limitante (EFSA/ECDC, 2017), em casos de infecção sistêmica ou em infecções em pacientes imunocomprometidos, a terapia com o uso de antimicrobianos é necessária (WHO, 2018). Entre os fármacos utilizados na terapia da doença destacam-se os do grupo das tetraciclinas (como a doxiciclina e tetraciclina), frequentemente escolhidos por serem antibióticos de amplo espectro (CHOPRA & ROBERTS M, 2001).

A utilização indiscriminada de antimicrobianos para o tratamento de infecções, bem como o seu uso como promotor de crescimento em animais de produção, fez com que a bactéria *C. jejuni* adquirisse mecanismos de resistência contra a ação dos principais fármacos de uso clínico (IONIVE, 2013).

Dentre os principais mecanismos de resistência às tetraciclinas, destaca-se a proteína de proteção ribossomal Tet(O), codificada pelo gene *tet(O)*, que pode estar presente tanto no DNA cromossomal quanto no DNA plasmidial, facilitando a disseminação da resistência a esse antimicrobiano entre bactérias (IONIVE, 2013). Além deste, a resistência às tetraciclinas em *Campylobacter* spp. pode estar relacionada à presença de bombas de efluxo, como a bomba de efluxo Tet(A), codificada pelo gene *tet(A)*, cuja função é exportar o princípio antimicrobiano para fora da célula (CHOPRA; ROBERTS, 2001).

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a resistência às tetraciclinas, bem como identificar alguns dos mecanismos moleculares relacionados a esta resistência em isolados de *C. jejuni* provenientes da cadeia produtiva de frangos da região sul do Rio Grande do Sul.

2. METODOLOGIA

Foram avaliados 29 isolados de *C. jejuni* provenientes de diversos pontos da cadeia produtiva de frangos da região sul do Rio Grande do Sul: cloaca de frangos, cama do aviário, ambiente de abate, carcaças de frangos e cortes de frangos resfriados.

A resistência fenotípica aos antimicrobianos foi testada pela técnica de disco difusão em ágar, através do método Kirby-Bauer (BAUER et al., 1966), utilizando-se ágar MuellerHinton (Acumedia®) com adição de sangue equino desfibrinado e 20mg.L⁻¹ de β-NAD, com incubação a 42 °C por 48 h, em condições de microaerofilia (5% O₂, 10% CO₂ e 85% N₂), de acordo com o European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2017). Como controle positivo se utilizou a cepa padrão *C. jejuni* ATCC 33560. As análises foram realizadas utilizando os antimicrobianos doxiciclina (30µg) e tetraciclina (30µg). Os critérios de interpretação foram estabelecidos de acordo com o EUCAST (2017).

Para a caracterização genotípica de resistência às tetraciclinas os isolados foram cultivados em ágar Sangue nº 2 (Acumedia®) sob condições de microaerofilia, a 42 °C por 48 horas. Em seguida foram inoculados em caldo Brucella (Acumedia®) para a extração de DNA, conforme o protocolo descrito por Sambrook e Russel (2001), com adaptações. Posteriormente, o DNA foi quantificado através do equipamento NanoVue™ Plus e armazenado a - 20°C. A resistência genotípica às tetraciclinas foi avaliada pela presença dos genes *tet(O)* e *tet(A)* por meio de *Polimerase Chain Reaction* (PCR), de acordo com as condições descritas por THAKUR et al. (2013) e ABDI-HACHESOO et al. (2014)

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que 62,07% (n=18) dos 29 isolados de *C. Jejuni* avaliados apresentaram resistência à tetraciclina e à doxiciclina (WIECZOREK; OZEK, 2015).

Avaliaram carcaças de frangos, na Polônia, entre os anos de 2009 e 2013, e encontraram resistência à tetraciclina em 56,1% dos isolados de *C. jejuni*, resultado semelhante ao obtido neste estudo. Já GARCÍA-SÁNCHEZ et al. (2018), avaliaram a resistência à tetraciclina em isolados de *Campylobacter* spp. provenientes de produtos resfriados de frango comercializados na Espanha, e encontraram 98,2% dos isolados resistentes a esse antimicrobiano, enquanto NISAR et al. (2017), detectaram 19% de isolados de *C. Jejuni*, de carne de frango comercializada no Paquistão.

A classe das tetraciclinas já foi amplamente utilizada em animais de produção, principalmente devido ao seu amplo espectro de ação, baixo custo e segurança (CHOPRA; ROBERTS, 2001). O uso inadequado de antimicrobianos, bem como sua utilização em subdoses na medicina animal e humana, pode estar relacionado com os crescentes relatos de resistência bacteriana aos antimicrobianos (IOVINE, 2013).

Entre os isolados que apresentaram resistência fenotípica às tetraciclinas (n=18), 77,8% (n=14) carregavam o gene *tet(O)*, entretanto, o gene *tet(A)* não foi encontrado em nenhum isolado.

A presença do gene *tet(O)* é amplamente descrita em isolados de *Campylobacter* spp. (IOVINE, 2013; NGUYEN et al., 2016; NARVAEZ-BRAVO et al., 2017); podendo estar presente em 100% dos isolados (NGUYEN et al., 2016).

ABDI-HACHESOO et al. (2014) encontraram o gene *tet(O)* em 74,4% dos isolados, resultado semelhante ao obtido neste estudo, entretanto, 16,3% dos isolados avaliados portavam o gene *tet(A)*.

4. CONCLUSÕES

C. jejuni isolados da cadeia produtiva de frangos do sul do Rio Grande do Sul apresentam resistência fenotípica à tetraciclina e à doxiciclina, princípios ativos amplamente utilizados em medicina humana e animal. A presença do gene *tet(O)* na maioria dos isolados denota a relevância deste gene na resistência desses micro-organismos às tetraciclinas. A presença de *C. Jejuni* resistentes às tetraciclinas na cadeia produtiva de frangos evidencia a importância da conscientização quanto ao uso de antimicrobianos na produção animal, medicina humana e medicina veterinária, ressaltando ainda, a importância de constantes estudos acerca da resistência bacteriana a esses fármacos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDI-HACHESOO, B.; KHOSHBAKHT, R.; SHARIFIYAZDI, H.; MOHAMMAD, T.; HOSSEINZADEH, S.; ASASI, K. Tetracycline resistance genes in *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolated from poultry carcasses. **Jundishapur Journal of Microbiology**, Shiraz, IR, 7(9):e12129, 2014.

AGUNOS, A., WADDELL, L., LEGER, D., TABOADA, E. A systematic review Characterizing on-farm sources of *Campylobacter* spp. for broiler chickens. **PLoS One** 9, Netherlands, 2014.

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

CHOPRA I, ROBERTS M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiol Mol Biol Rev**, Leeds UK, v.65, p. 232-60, 2001.

EFSA (European Food Safety Authority), ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. **EFSA Journal**, v. 13, 399, 2015.

EFSA/ECDC (European Food Safety Authority/European Centre for Disease Prevention and Control), 2017. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2015. **EFSA Journal**, v.15(2):4694, 2017.

EPPS, S.V.R., HARVEY, R.B., HUME, M.E., PHILLIPS, T.D., ANDERSON, R.C., NISBET, D.J. Foodborne *Campylobacter*: infections, metabolism, pathogenesis and reservoirs. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, Texas US, v.10, p. 6292-6304, 2013.

EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). **Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters**, 7 abr.

2013. Acessado em: 30. Jun. 2017. Online.v 7.1, 2017. Disponível em: <http://www.eucast.org>.

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

HALD, B.; SKOV, M.N.; NIELSEN, E.M.; RAHBK, C.; MADSEN, J.J.; WAINØ, M.; CHRIÉL, M.; NORDENTOFT, S.; BAGGESEN, D.L.; MADSEN, M. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in wild birds on Danish livestock farms. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 58, 2015.

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

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

NGUYEN, T. N. M.; HOTZEL, H.; EL-ADAWY, H.; TRAN, H. T.; LE, M. T. H.; TOMASO, H.; NEUBAUER, H.; HAFEZ, H. M. Genotyping and antibiotic resistance of thermophilic *Campylobacter* isolated from chicken and pig meat in Vietnam. **Gut Pathogens**, Vietnam, 8:19, 2016.

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

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Third Edition, New York, **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York v.1, Chapter 6, Protocol 7, 2001.

SZCZEPANSKA, B.; KAMINSKI, P.; ANDRZEJEWSKA, M.; SPICA, D.; KARTANAS, E.; ULRICH, W., et al. Prevalence, virulence and antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in White stork Ciconia. **Foodborne Pathogens and Disease**, Ciconia in Poland, v. 12, p. 24-31, 2015.

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

WHO (World Health Organization). **Campylobacter**. World Health Organization, 23 jan. 2018. Acessado em 9 set. 2018. Online. Disponível em: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/campylobacter>.

WIECZOREK, K.; OSEK, J. A five-year study on prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* from poultry carcasses in Poland. **Food Microbiology**, Pulawy, Poland, v. 49, p. 161 – 165, 2015.