

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**Detecção dos genes codificantes da toxina CDT e pesquisa de fatores que influenciam a produção de hemolisinas por amostras de *Campylobacter jejuni* de origem avícola.**

**Dissertação de Mestrado**

**Michele Martins Trindade**

**Porto Alegre, Março de 2014**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**Detecção dos genes codificantes da toxina CDT e pesquisa de fatores que influenciam a produção de hemolisinas por amostras de *Campylobacter jejuni* de origem avícola.**

Autora: Michele Martins Trindade,  
Dissertação apresentada  
como requisito parcial para  
obtenção do grau de  
Mestre em Ciências  
Veterinárias na área  
de Sanidade Avícola.

Orientador: Prof. Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento

Porto Alegre, Março de 2014

## CIP - Catalogação na Publicação

Martins Trindade, Michele

Detecção dos genes codificantes da toxina CDT e Pesquisa de fatores que influenciam na produção de hemolisinas por amostras de *Campylobacter jejuni* de origem avícola. / Michele Martins Trindade. -- 2014. 53 f.

Orientador: Vladimir Pinheiro do Nascimento.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Quelantes . 2. Íons. 3. PCR. 4. Atividade hemolítica. 5. Toxina citoletal distensiva. I. Pinheiro do Nascimento, Vladimir, orient. II. Título.

**MICHELE MARTINS TRINDADE**

**Detecção dos genes codificantes da toxina CDT e pesquisa de fatores que influenciam a produção de hemolisinas por amostras de *Campylobacter jejuni* de origem avícola.**

APROVADA EM 31 de MARÇO DE 2014

APROVADA POR:

---

Prof. Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento – UFRGS  
(Orientador-Presidente da banca examinadora)

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Maristela Lovato – UFSM  
(Examinador externo)

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Anderlise Borsoi – USP  
(Examinador externo)

---

Prof. Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes - UFRGS  
(Examinador interno)

Dedico este trabalho ao meu amado filho

Vitor, minha inspiração maior na vida.

## **AGRADECIMENTOS**

A minha família de sangue e de coração, por acreditarem em mim, pela paciência nos momentos difíceis, pelo incentivo, por ajudarem a cuidar de meu filho Vitor.

Ao Prof. Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento, pela orientação, confiança e oportunidade que me foi dada para o desenvolvimento deste trabalho.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maristela Lovato, pela amizade, carinho, conselhos durante esta importante etapa, ajudando sempre a evoluir como pessoa e profissional.

Aos amigos e companheiros do CDPA, em especial Flávia Fortes, Yuli Sierra, Gustavo Perdoncini, Camila Gonsalves e Rafaela Bom Morgan. Foi ótimo conhece-los, aprender e trabalhar com vocês. À amizade de vocês fizeram esta jornada mais agradável.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Anderlise Borsoi pelos ótimos conselhos e sugestões, os quais fizeram a diferença na confecção desta dissertação.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade e qualidade de ensino proporcionada.

A CAPES pelo apoio financeiro.

E a todos que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho.

Obrigada!

## RESUMO

Membros termofílicos do gênero *Campylobacter* são reconhecidos como importantes enteropatógenos para o ser humano e animais. A grande diversidade ecológica destes microorganismos em diferentes habitats tais como: água, animais e alimentos predispõem ao aparecimento de novos fatores de virulência. Este trabalho teve por objetivo detectar os genes codificantes da Toxina Distensiva Citoletal (CDT) por meio da técnica de PCR, pesquisar a atividade de hemolisinas e a influência de soluções quelantes e de íons nesta atividade. Foram utilizadas 45 amostras de *C. jejuni* de origem avícolas para pesquisa de atividade hemolítica, cultivadas em Caldo Triptona de Soja (TSB). Após o crescimento bacteriano, as amostras foram semeadas em Ágar tríptico de soja (TSA) contendo 5% de sangue de ovino, equino e bovino, sendo cada sangue testado isoladamente. Para verificar a influência de agentes quelantes e solução de íons na atividade hemolítica, as amostras de *C. jejuni* foram cultivadas em TSB contendo separadamente os quelantes EDTA, ácido acético, soluções de íons  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$  e  $\text{FeCl}_3$ , em atmosfera de microaerofilia. Quanto à atividade de hemolisina de *Campylobacter jejuni* em placas de TSA – sangue, foi possível observar que houve hemólises em 48,89% das amostras quando utilizado sangue equino, em 40% em sangue de bovino e em 31,11% quando de ovino. Quanto à influência de agentes quelantes e íons em caldo TSB na atividade de hemolisinas em amostras de *Campylobacter jejuni* semeadas em placas de TSA – sangue ovino, foi observada atividade hemolítica em 26,67% quando utilizado  $\text{CaCl}_2$ , 15,55% ( $\text{FeCl}_3$ ), 22,22% (EDTA), 11,11% ( $\text{MgCl}_2$ ) e apenas 2,22% (ácido acético). No tocante à atividade hemolítica, o TSA - sangue bovino apresentou 15,55% ( $\text{CaCl}_2$ ), 24,44% ( $\text{FeCl}_3$ ), 26,26% (EDTA), 20% ( $\text{MgCl}_2$ ) e 11,11% (ácido acético). A atividade hemolítica para o sangue equino foi de 24,44% ( $\text{CaCl}_2$ ), 22,22% ( $\text{FeCl}_3$ ), 28,89% (EDTA), 28,89% ( $\text{MgCl}_2$ ) e 8,89% (ácido acético). Para detecção dos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* através da técnica da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), foram utilizadas 119 amostras de *C. jejuni* de origem avícolas. Foi possível observar que 38% possuíam os três genes, e foram identificados somente os genes *cdtA* e *cdtC* em 19% do total de amostras, sendo que o gene *cdtB* foi encontrado em 14%, o gene *cdtC* foi observado em 12%, os genes *cdtA* e *cdtB* em somente 1%, os genes *cdtB* e *cdtC* em 1% e para *cdtA* em 1%. Observou-se que os resultados são dignos de atenção, pois demonstraram em amostras avícolas a presença de estirpes de *C. jejuni* com potencial virulento. A atividade hemolítica apresentou significativo aumento quando utilizado sangue de origem equina. A mesma foi diminuída quando utilizados agentes quelantes ou íons, nos três tipos de sangue.

Palavras-chaves: *Campylobacter jejuni*, PCR, atividade hemolítica, íons, quelantes.

## ABSTRACT

Thermophilic members of the *Campylobacter* genus are recognized as important enteropathogenics for humans and also for other animals. The great diversity of ecological habitats in different organisms such as water, food, and animals may promote new virulence factors. This study aimed at detecting the distending cytolethal toxin (CDT) encoding genes by PCR, studying the activity of hemolysin and also the influence of chelation solutions and ions. A total of 45 samples of *C. jejuni* from poultry origin, grown in Tryptone Soy Broth (TSB) were used for investigating hemolytic activity. After bacterial growth, samples were plated on Tryptic Soy Agar (TSA) containing 5% sheep, equine or bovine blood, being each blood tested individually. In order to check the influence of chelation agents and ions solution on the hemolytic activity, samples of *C. jejuni* strains were grown in TSB containing chelation agents individually: EDTA, acetic acid, CaCl<sub>2</sub> ion, MgCl<sub>2</sub> and FeCl<sub>3</sub> solutions, all in microaerophilic atmosphere. Regarding the detection of *Campylobacter jejuni* hemolysin activity on TSA plates, blood hemolysis were observed in 48.89 % of samples when equine blood was used; in 40% of samples when bovine blood was used and in 31.11 % when the blood used was of sheep origin. The influence of ions and chelation agents in hemolysin activity in TSB when *Campylobacter jejuni* was plated on TSA with sheep blood can be described as: hemolytic activity was observed at 26.67% of samples when CaCl<sub>2</sub> was used, at 15.55 % for FeCl<sub>3</sub>, 22.22 % for EDTA, 11.11 % for MgCl<sub>2</sub> and only 2.22% when acetic acid was used. The hemolytic activity detected when bovine blood - TSA was used indicated 15.55% for CaCl<sub>2</sub>, 24.44% for FeCl<sub>3</sub>, 26.26 % for EDTA, 20 % for MgCl<sub>2</sub> and 11.11% for acetic acid. In terms of the hemolytic activity when equine blood was used, the results indicated 24.44% for CaCl<sub>2</sub>, 22.22 % for FeCl<sub>3</sub>, 28.89 % for EDTA, 28.89 % for MgCl<sub>2</sub> and 8.89% for acetic acid. Finally, regarding the detection of *cdtA*, *cdtB* and *cdtC* through PCR, 119 samples of *C. jejuni* from poultry origin were used. The results indicated that all three genes were present in 38 % of the samples, whereas only two genes were identified in 19 % of samples, while the *cdtB* gene was singly found in 14%, the *cdtC* gene was independently observed in 12%, *cdtA* and *cdtB* genes together were found in 1% of the samples; the *cdtB* and *cdtC* genes associated were detected in 1%, while *cdtA* alone answered for 1% of detections. The results also showed the presence of *C. jejuni* strains with virulence potential. The hemolytic activity increased significantly when blood of equine origin was used, and that this activity was reduced when ions or chelating agents were used in combination with the three types of blood cells.

Keywords: *Campylobacter jejuni*, PCR, hemolytic activity, ions, chelants.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Resultados obtidos por PCR para identificação dos genes codificantes da toxina CDT em gel de ágarose 2% em UV.....36
- Figura 2 - Resultados obtidos pela amplificação por PCR para detecção dos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* nas amostras de *Campylobacter jejuni* de origem avícola.....37
- Figura 3 – Atividade hemolítica de amostra de *C. jejuni* de origem avícola, observada em TSA-sangue equino, após ser cultivada em caldo TSB.....39

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1: Sequências nucleotídicas dos <i>primers</i> utilizada para os genes <i>cdtA</i> , <i>cdtB</i> e <i>cdtC</i> de <i>Campylobacter jejuni</i> .....  | 33 |
| Tabela 2: Concentrações e volume dos reagentes utilizados para composição do mix para PCR para detecção dos genes <i>cdtA</i> , <i>cdtB</i> e <i>cdtC</i> em <i>Campylobacter jejuni</i> .....  | 34 |
| Tabela 3: Atividade hemolítica de <i>Campylobacter jejuni</i> em placas de TSA – sangue (ovino/bovino/equino).....  | 38 |
| Tabela 4: Influência de agentes quelantes e íons em caldo TSB na atividade de hemolisinas em amostras de <i>Campylobacter jejuni</i> semeadas em placas de TSA – sangue ovino.....  | 40 |
| Tabela 5: Influência de agentes quelantes e íons em caldo TSB na atividade de hemolisinas em amostras de <i>Campylobacter jejuni</i> semeadas em placas de TSA – sangue bovino.....   | 41 |
| Tabela 6: Influência de agentes quelantes e íons em caldo TSB na atividade de hemolisinas em amostras de <i>Campylobacter jejuni</i> semeadas em placas de TSA – sangue equino.....   | 42 |
| Tabela 7: Análise da média percentual da influência de agentes quelantes e íons em caldo TSB na atividade hemolítica em amostras de <i>Campylobacter jejuni</i> , quando semeadas em TSA+ sangue equino/sangue bovino/sangue ovino..... | 42 |
| Tabela 8 - Perfil de genes <i>cdtABC</i> das amostras de <i>Campylobacter jejuni</i> que apresentaram atividade hemolítica com ou sem uso de quelantes e íons, independente do tipo de sangue utilizado.....                            | 44 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC –American type culture collection – Coleção Americana de tipos de cultura

°C – Graus Celsius

CaCl<sub>2</sub> – Cloreto de Cálcio

CDPA – Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária

CDT – Toxina Citoletal Distensiva

CHO – Células de ovário de hamster chinês transformada

CLO –Campylobacter –like organiss

CRLT –Toxina citoletal de arredondamento

DNA – Ácido dexorribonúleico

dNTP – Desoxirribonúcleotídeo

EDTA – Etileno-tetra ácido acético

FBP – Sulfato ferroso, metassulfito de sódio, piruravato de sódio

FeCl<sub>3</sub> – Cloreto férrico

GBS – Síndrome de Güillian Barré

HeLa – Células de carcinoma de útero humano

Hep-2 – Células de carcinoma de laringe humana

Kb – Quilobase (=1000 pares de base)

kDa – quiloDalton (= 1000 Da)

mCCDA – Modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar

MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de Magnésio

mM – Milimolar

pb – Pares de base

PCR – Reação em cadeia de polimerase

pH – Potencial hidrogeniônico

RNAr – Ácido ribunúcleio ribossomal

RT-PCR - Reação em cadeia polimerase via transcriptase reversa

TSA – Ágar triptona de soja

TSB – Caldo triptona de soja

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Y-1 - Células de tumor de glândula adrenal de rato

## SUMÁRIO

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....             | 14 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA .....  | 16 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS.....      | 31 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO ..... | 35 |
| 5. CONCLUSÕES.....              | 44 |

## 1. INTRODUÇÃO

A produção de carnes no Brasil é um importante segmento do agronegócio. Sendo na avicultura, o terceiro país em produção mundial, ficando atrás dos Estados Unidos da América e China, sendo líder em exportações atingindo 142 países (MAPA, 2014). A produção de carne de frango em 2012 foi de 12,64 milhões de toneladas (UBABEF, 2013).

Quanto ao mercado interno, em 2012, o consumo per capita foi de 45kg de carne de frango, caracterizando a relevância do segmento (UBABEF, 2013). Estes dados revelam a representatividade da cadeia produtiva da carne de frango, fruto da organização, do uso de tecnologias, da inserção direta de pesquisas científicas associadas ao gerenciamento ostensivo dos padrões genéticos, práticas de manejo, nutrição, ambiência, sanidade, processamento e industrialização.

Neste contexto, quando considerado alimento de origem avícola, deve-se avaliar o estado sanitário dos plantéis, o que reflete na qualidade do alimento produzido. Frangos de corte estão entre os principais carreadores de patógenos em abatedouros e apresentam alta correlação com a contaminação cruzada por *Salmonella* spp. e *Campylobacter* sp. (FAO/WHO, 2009).

No caso, de *Campylobacter*, tanto em surtos naturais, como em condições experimentais, aves infectadas com mais de uma semana não apresentam sinais clínicos. Esses são observados somente quando pintinhos de um dia são inoculados com este patógeno, onde os mesmos apresentam diarreia e prostração (BACK, 2010).

A contaminação da carne de frango com *Campylobacter* sp., pode ocorrer durante o abate, sendo mais comum na escaldagem e na evisceração quando há possibilidade da transmissão de microorganismos do intestino para a superfície das carcaças (PRENCIPE et al., 2007).

A legislação atual do Brasil impõe o controle de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos (BRASIL, 2003), porém para *Campylobacter* sp., não há legislação específica para sua avaliação e que regulamente seu controle em lotes de frangos de corte,

evidenciando a necessidade de maiores estudos sobre a ocorrência deste patógeno no país e seus potenciais riscos a saúde humana (CORTEZ, 2006).

O gênero *Campylobacter* compreende bactérias Gram negativas que colonizam o trato gastrointestinal de uma variedade de hospedeiros, podendo também ter uma localização extra-intestinal (BUTZLER, 2004). Dentre as espécies enteropatogênicas, o *Campylobacter jejuni*, recebe maior atenção, pois estima-se que cerca de 90% dos casos de campilobacteriose em humanos sejam causados pelo agente (WASSENAAR; NEWLL, 2000). Em muitos países industrializados, a infecção por *C. jejuni* é considerada como a maior causa de doenças diarreicas no homem, superando aquelas causadas por bactérias “tradicionais” enteropatogênicas, como por exemplo, as salmonelas (VUGIA, 2003; THOMÉ, 2006). Nos países em desenvolvimento a incidência de *Campylobacter* spp. é ainda pouco investigada estimando-se haver um número significativo de infecções assintomáticas, provavelmente devido a imunidade adquirida (VAN VLIET; KETLEY, 2001).

A produção de trabalhos científicos abordando este importante enteropatógeno em nosso país é sobremaneira inferior aos destinados a outros patógenos, tornando assim necessários estudos em diversos campos da biologia desta bactéria para melhor entendimento do comportamento, epidemiologia e fatores críticos no desenvolvimento desta zoonose.

Em decorrência da importância na saúde pública, no que se refere a sua presença nos alimentos de origem animal, principalmente carne de frango e seus subprodutos, este trabalho teve por objetivo pesquisar a atividade hemolítica e influência de soluções quelantes e de íons em sua atividade; detecção dos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* codificantes da toxina Citoletal Distensiva (CDT) em amostras avícolas de *C. jejuni* oriundas da bacterioteca do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Avícola da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CDPA), sendo provenientes de toda linha de abate abatedouros sob Inspeção Federal no RS.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Os primeiros relatos de *Campylobacter* datam do final do século XIX, por Escherich em 1886, quando observou uma bactéria não cultivável, espiralada, associada a enterites em neonatos, crianças e gatos. Em 1909, McFadyean; Stockman isolaram bactérias parecidas com vibriões a partir de fetos de ovinos abortados. Em 1918, Smith, ao encontrar bactérias espiraladas em fetos bovinos abortados, concluiu que estes microorganismos seriam da mesma espécie que os relatados por McFadyean e Stockman por se apresentarem morfológicamente similares as espécies do gênero *Vibrio*. Smith; Taylor, em 1919, isolaram novamente uma bactéria espiralada em fetos bovinos abortados e chamaram-na de *Vibrio fetus* (BUTZLER, 2004).

O gênero *Campylobacter* foi inicialmente proposto por Sebald e Véron em 1963, incluindo apenas as espécies *C. fetus* e *C. bubulus*, tendo *C. fetus* como espécie tipo, para incluir as bactérias originalmente classificadas no gênero *Vibrio*, por sua morfologia celular, mas que diferiam dos vibrios clássicos por serem microaeróbios, não oxidarem nem fermentarem carboidratos e por apresentarem diferença na composição de bases nitrogenadas (BUTZLER, 2004).

No ano de 1973, Véron e Chatelain, estabeleceram *Campylobacter* como um gênero reconhecido e distinto. Eles agruparam outros vibrios descritos anteriormente, por vários autores, no gênero *Campylobacter*, com base nas análises sorológicas e bioquímicas, na composição do DNA e nas relações de parentesco com as duas espécies já pertencentes ao gênero, sendo incluídas as espécies *C. coli* e *C. jejuni*, além de duas subespécies de *C. sputorum* (ON, 2001).

Porém, o isolamento de *Campylobacter* sp. continuava a ser barreira para a pesquisa do microorganismo até que a publicação de Butzler et al. (1973) apresentou um método de cultivo, proporcionando um isolamento mais eficaz desta bactéria, mostrando desta forma a sua alta prevalência em casos de diarreia humana. Os primeiros isolamentos de *Campylobacter* sp. no Brasil foram feitas a partir de fezes de crianças saudáveis e também com diarreia, no estado do Rio de Janeiro (RICCIARDI et al., 1979).

O interesse por *Campylobacter* aumentou na década de 1980, logo muitos organismos similares foram isolados de diversas fontes, promovendo o reconhecimento de novas espécies. Contudo, pela dificuldade de diferenciação gerando muitas dúvidas,

foi proposto o grupo CLO (Campylobacter – like organisms) englobando todos os organismos similares (VANDAMME, 2000).

Os estudos com o gene RNAr 16S permitiu inferir relações filogenéticas entre todos organismos deste grupo e levou a um grande rearranjo na taxonomia de *Campylobacter*, da década de 80 até o fim da de 90. Com isso vários membros do grupo CLO foram transferidos para outros gêneros, destacando-se a transferência de *C. pylori* para o gênero *Helicobacter* e a proposta da criação do gênero *Arcobacter* (ON, 2001).

Um distinto grupo foi designado para *Campylobacter* e os organismos relacionados à superfamília RNAr VI, conhecida atualmente como divisão épsilon ( $\epsilon$ ) da Proteobactéria. Esta superfamília compreendeu os grupos I, II e III, representados pelos gêneros *Campylobacter*, *Arcobacter* e *Helicobacter*, respectivamente, além de algumas outras espécies não inclusas nestes gêneros. Os gêneros *Campylobacter* e *Arcobacter* demonstram uma relação filogenética muito grande, além de outras características genotípicas e fenotípicas comuns, sendo subsequentemente proposta a criação e a inclusão de ambos na família *Campylobacteraceae* por Vandamme; De Ley (1991).

A família *Campylobacteraceae* é composta de três gêneros: *Campylobacter*, *Arcobacter* e *Sulfuopirillum*. O gênero *Campylobacter* possui uma taxonomia complexa e que ainda se encontra em evolução, sendo que a cada ano, desde 1988, surge uma espécie ou subespécie a ser relatada (FEISTEL et al., 2013). Dentre as espécies, *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* e *C. helveticus* formam um grupo geneticamente próximo e são frequentemente isolados de animais e do homem com diarreia (SILVA et al, 2011). Já *C. concisus*, *C. showae*, *C. curvus*, *C. recus*, *C. graciis*, *C. sputorum* e *C. hominis* parecem estar mais relacionados entre si e, a maioria destas espécies, ocorre na cavidade oral humana, com exceção do *C. hominis* que foi encontrado no intestino grosso humano e do *C. sputorum* que também foi isolado no trato genital de animais. *C. mucosalis*, por hibridização de DNA-DNA, é bastante similar a *C. sputorum* e dividem entre si as características fenotípicas e genotípicas (ON, 2001).

O gênero *Campylobacter*, apesar de ter sido descrito há mais de quatro décadas e contar com inúmeros trabalhos publicados relatando sua importância como patógenos humano e animal, ainda não teve o destaque necessário em nosso meio (veterinário e acadêmico). Este panorama provavelmente decorre do discreto número de grupos de

pesquisa envolvidos no estudo deste gênero bacteriano, e da pouca solicitação de sua pesquisa nos laboratórios de análises clínicas, além da não obrigatoriedade de notificação dos casos diagnosticados de campilobacteriose às instituições estatais de saúde. Entretanto, já foi demonstrada por Ricciardi et al. (1979), a associação de *Campylobacter jejuni* a casos de diarreia na cidade do Rio de Janeiro. Mais recentemente foi realizada uma comparação entre pacientes infectados por *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* e *Campylobacter fetus* por Besséde et al. (2014), e Melo et al. (2011) pesquisaram a prevalência de *Campylobacter* spp. em frangos de corte e reprodutoras pesadas, assim como Santos et al. (2011) pesquisaram em embriões de galinhas a alteração da mucosa intestinal provocada por *Campylobacter jejuni*.

O gênero *Campylobacter* é constituído de várias espécies de bactérias Gram negativas com morfologia típica de bastonetes curvos, espiralados ou em forma de "S", Não produzem endósporos, e apresentam um tamanho de 0,2 a 0,9µm de largura por 0,5 a 5µm de comprimento. Em culturas mais antigas, ou em exposição ao ar por períodos prolongados, as células de *Campylobacter* podem adquirir formas esféricas ou cocóides, o que representa um estágio degenerativo de seu ciclo de vida sem, contudo, levar à perda de seu poder infectante (SNELLING et al., 2005; [MSFFG], 2008). São altamente móveis (movimentos do tipo saca-rolha ou vaivém), devido ao flagelo presente em um ou ambos os pólos, sendo monotríquios ou anfitríquios (HOLT et al., 1994). Frequentemente mudam de direção e a mobilidade diminui rapidamente na lâmina à fresco devido ao embaraço do flagelo e à aerotoxicidade (PATHOGENIC, 2000). Reduzem nitrato a nitrito, são oxidase – positiva e não fermentam ou oxidam carboidrato (ANDREATTI FILHO, 2007).

As bactérias do gênero *Campylobacter jejuni* são organismos quimiorganotróficos, com o metabolismo essencialmente respiratório obtendo energia de aminoácidos ou de substratos intermediários do ciclo dos ácidos tricarbóxicos e não possuem atividade metabólica fermentativa ou oxidativa sobre carboidratos e lipídios, tampouco hidrolisam a ureia e a gelatina, produzem a enzima oxidase. São tipicamente microaerófilos, requerendo uma tensão de 5 a 7% O<sub>2</sub> e de 3 a 5% de CO<sub>2</sub> para seu desenvolvimento, podendo algumas espécies crescer em condições anaeróbicas e, ocasionalmente, também se desenvolver em aerobiose. Por sua condição microaerófila, é uma bactéria considerada de difícil cultivo, sendo altamente sensível as condições

ambientais como temperatura, ressecamento e tensão de oxigênio (NACHAMKIN, 1995; LAURIA-FILGUEIRAS, 2000).

A faixa de pH ótimo está em 6,5 a 7,5 podendo o *Campylobacter* ser inibido em valores inferiores ao pH 5,1 (DOYLE, 1988). Em função da produção ou não da catalase, as espécies do gênero *Campylobacter* dividem-se em dois grandes grupos, sendo o grupo das produtoras de catalase onde se encontram as espécies mais importantes do ponto de vista patogênico (NACHAMKIN, 1995).

Outra divisão importante dentro do gênero *Campylobacter* se refere à capacidade de crescimento acima da temperatura de 37°C. Algumas espécies crescem bem entre 25 e 37°C, mas não a 42°C, e há espécies que não apresentam crescimento a 25°C, crescem a 37°C, porém, apresentam um crescimento preferencial a 42°C. Este último grupo é denominado termofílico ou termotolerante e contém espécies principalmente envolvidas com processos gastroentéricos (ALLOS; TAYLOR, 1998; LAURIA-FILGUEIRAS, 2000).

Quanto às características moleculares, o genoma de *Campylobacter* possui aproximadamente de 1600Kb a 1700Kb, embora a espécie *C. upsaliensis* tenha cerca de 2000Kb. Este genoma é considerado pequeno, quando comparado a outras bactérias como *Escherichia coli*, que possui 4500Kb. Acredita-se que este pequeno tamanho possa explicar o comportamento fastidioso no cultivo e sua incapacidade de fermentar carboidratos (VANDAMME, 2000).

O número de células em uma amostra é pequeno e, por poder estar acompanhada por uma flora mais numerosa, torna-se fundamental recorrer a um isolamento em meio de cultura enriquecido e seletivo, conferido pelo acréscimo de sangue desfibrinado de carneiro (5%) ou carvão ativado (0,4g%) e por diferentes misturas de antimicrobianos. O uso da cefalotina é corriqueiro nas formulações, pois inibe grande parte da flora bacteriana entérica acompanhante (BUTZLER, 2004).

A identificação presuntiva das colônias suspeitas é feita pela coloração de Gram, favorecida pela morfologia típica das células. Para a identificação definitiva, realizam-se os testes da produção das enzimas oxidase e catalase que serão sempre positivas para espécies termofílicas e o teste de sensibilidade aos antimicrobianos ácido nalidíxico e cefalotina (VANDAMME, 2000). O aparecimento de um halo de

sensibilidade ao ácido nalidíxico (disco de 30 mg, Oxoid) superior a 19 mm e a resistência a cefalotina (30 mg, Oxoid), são características pertinentes às espécies *C. jejuni* e *C. coli* permitindo assim a separação de outras espécies também termofílicas como *C. lari*, que apresenta um perfil de resistência ao ácido nalidíxico e ainda *C. upsaliensis* e *C. hyointestinalis*, uma vez que ambos são sensíveis à cefalotina (SNELLING et al., 2005).

*C. lari* é a única espécie resistente ao ácido nalidíxico, entretanto, estão surgindo amostras de *C. jejuni* e *C. coli* resistentes às quinolonas (VANDAMME, 2000), fazendo-se necessário, para completa separação das espécies *C. jejuni* e *C. coli* de *C. lari*, a associação do teste de hidrólise do acetato de indoxila, que é positivo para as espécies *C. jejuni* e *C. coli* e negativo para *C. lari*.

Como etapa de identificação posterior, utiliza-se a prova da hidrólise do hipurato de sódio, prova clássica e única utilizada para separar estas duas espécies, sendo sempre positiva para *C. jejuni* e negativa para *C. coli*, (NACHAMKIN, 1995). Porém, há relatos na literatura de culturas incomuns de *C. jejuni* com o fenótipo hipurato-negativo (NICHOLSON; PATTON, 1995), o que dificulta a identificação baseada essencialmente nestes testes. Para completar a identificação fenotípica utiliza-se o esquema de biotipificação, pesquisando a produção da enzima desoxirribonuclease (DNAse) e produção de gás sulfídrico (LIOR, 1984). Embora seja em grande parte simples a execução e a leitura das referidas provas, a identificação fenotípica enfrenta problemas, com a falta de padronização dos testes, que leva a resultados interlaboratoriais diferentes (ON, 1996).

Num panorama mais moderno, no que diz respeito à identificação de bactérias do gênero *Campylobacter*, a técnica da Reação em Cadeia de Polimerase - PCR, tornou-se muito difundida e bastante utilizada para o diagnóstico laboratorial de *Campylobacter* sp., principalmente pelas vantagens que oferece, aliadas à alta sensibilidade e especificidade, além da facilidade de sua execução (BUTZLER, 2004).

O fluxograma indicado para isolamento e identificação de *Campylobacter* spp. adaptado de Theophilo; Jakabi, 2008, inclui diversas etapas:

Enriquecimento em caldo seletivo: (Caldo Brucella/caldo Bolton/caldo TSB) +FBP (sulfato ferroso, metassulfito de sódio, piruvato de sódio) + antibiótico

(vancomicina, trimetropina, polimixina B, cefalotina, anfotericina) → 41,5 -42°C/48h (microaerofilia) → Plaqueamento em ágar seletivo (CCDA, CEFEX) + suplemento seletivo → 41,5 -42°C/48h (microaerofilia) → Isolamento → Identificação Bioquímica → Identificação Molecular.

As infecções causadas por *Campylobacter* spp. têm sido relatadas como uma das mais frequentes causas de gastroenterites em vários países do mundo. As espécies bacterianas termofílicas pertencentes ao gênero *Campylobacter*, principalmente *C. jejuni*, representam, atualmente um dos mais importantes enteropatógenos para a Saúde Pública, principalmente, nos países desenvolvidos (ROHNER et al., 1997).

Nos Estados Unidos da América (EUA), foram estimados mais de 845 mil casos de campilobacteriose em 2011, colocando este microorganismo na lista dos cinco patógenos que mais causam doenças de origem alimentar no país, estando atrás somente de *Norovirus*, *Salmonella* spp. Gerou mais de 8.400 hospitalizações e 76 mortes resultantes de complicações da infecção (SCALLAN et al., 2011). No Reino Unido, foram estimados mais de 320.000 casos de gastroenterites causadas por *Campylobacter* spp., somente na Inglaterra e País de Gales no ano de 2008, tornando este microorganismo o principal patógeno transmitido por alimentos da região (FSA, 2011). Segundo dados do Departamento de Saúde da Austrália, foram notificados mais de 16.900 casos documentados de *Campylobacter* spp. em 2010, tornando-o o maior causador de gastroenterites do país (DHA, 2010). A complexidade destas infecções é reconhecida mundialmente no cenário epidemiológico, atribuída à grande diversidade ecológica do microrganismo, encontrado em inúmeros habitats, tais como: águas, animais e alimentos, independente da posição geográfica (ALLOS; TAYLOR, 1998).

A grande maioria dos casos de gastroenterite humana ocorre esporadicamente. Por conta disso, torna-se mais difícil identificar as fontes de contaminação e os veículos de transmissão. Assim sendo, apesar da aplicação de muitos métodos fenotípicos e genotípicos nos estudos com estas bactérias, eles ainda não se encontram em escala suficiente para permitir uma discussão global acerca dos aspectos epidemiológicos da campilobacteriose (FROST, 2001).

Dentre as espécies associadas à gastroenterite encontram-se *C. jejuni*, a mais incidente, seguida de *C. coli*, *C. lari* e *C. upsaliensis*, formando o grupo das espécies termofílicas (KETLEY, 1997). Considerando-se que *C. jejuni* e *C. coli* produzem uma

doença com sintomas clinicamente indistinguíveis, e por possuírem muitas características metabólicas em comum, alguns autores referem-se a ela como “diarreia causada por *C. jejuni* / *C. coli*, não atribuindo muita importância à diferenciação entre as espécies (ALLOS; TAYLOR, 1998). Entretanto, conforme mostrado por Gillespie et al. (2002), os fatores de risco e as fontes de transmissão podem ser diferentes para a infecção por *C. jejuni* e *C. coli*, o que justifica a distinção dentro de uma abordagem epidemiológica.

O reservatório natural de *Campylobacter* são as aves, que eliminam, em cada grama de fezes, quantidades superiores a  $10^6$  bactérias, revelando sua importância na disseminação da bactéria para o ambiente (ALTEKRUSE et al., 1994). Contudo, não há evidências de transmissão vertical nas aves e, por conta disso, investigações vêm sendo realizadas em busca de identificar as maiores fontes de transmissão, principalmente em criadouros de frangos (JONES, 2001; PATTINSON, 2001).

Deve-se destacar, no entanto, que a maior preocupação está no potencial das aves em transmitir a bactéria ao homem através dos alimentos de origem animal. O consumo de frangos e derivados de aves representa a forma mais comum de aquisição da gastroenterite em todo o mundo, estimando-se sua implicação em 50 a 70% das infecções esporádicas humanas representadas principalmente pela possibilidade da contaminação cruzada (CANALS; ROSELL, 2002).

Outras ocorrências de surtos por *Campylobacter* estão associadas ao consumo de leite não pasteurizado e de água não tratada ou contaminada por fezes humanas ou de animais. A água também representa um poderoso meio de veiculação de espécies de *Campylobacter* (FROST, 2001). Convém ressaltar que a simples presença deste microrganismo em tal habitat pode ser utilizada como indicador biológico de contaminação fecal recente, já que o tempo de sobrevivência desta bactéria em tal ambiente é menor que indicadores bacterianos usuais (JONES, 2001).

*Campylobacter* faz também parte da microbiota intestinal de uma variedade de animais homeotermos, sejam domésticos ou selvagens, sem apresentar sinais clínicos de doença (ALTEKRUSE et al., 1994). Por outro lado, alguns trabalhos apontam sua implicação em infecções entéricas em alguns animais, principalmente quando estes estão confinados a locais fechados como zoológicos e centros de criação, onde a contaminação oral-fecal é frequente (VANVLIET; KETLEY, 2001).

Os primatas não humanos apresentam-se tanto como portadores assintomáticos, quanto doentes e compartilham muitas das características clínico-epidemiológicas notadas na campilobacteriose humana (FOX, 1992). Nas décadas de 1980 e 1990, vários trabalhos relataram a frequência comum da bactéria em primatas não humanos, demonstrando que estes animais podem ser excelentes fontes de investigação de *Campylobacter* sp. (NEWELL, 2001).

Russell e colaboradores (1990) publicaram um trabalho resultante de um ano de estudo com macacos jovens da espécie *Macaca nemestrina*, acometidos ou não por diarreia, e relataram a ocorrência de múltiplas reinfecções com diferentes cepas de *C. jejuni* e *C. coli*, durando cada uma cerca de 3 a 4 semanas, tal como ocorre em seres humanos. Neste contexto, em pesquisas brasileiras, ressalta-se um estudo detalhado sobre a circulação de cepas de *Campylobacter* em primatas não humanos mantidos em cativeiro apresentado por Lauria-Filgueiras (2000), tendo sido determinada a frequência de *Campylobacter* nos animais desta colônia durante um período de cinco anos de estudo.

Espécies aviárias, especialmente domésticas são, frequentemente, infectadas por *Campylobacter* termofílicos, principalmente *C. jejuni* e *C. coli*. Bactérias do gênero encontram-se mundialmente distribuídas, em especial nas regiões onde a criação comercial de frangos está estabelecida, sendo a alta densidade um fator facilitador para disseminação do agente entre as aves (ZHANG, 2008).

A transmissão de *Campylobacter* entre as aves ocorre principalmente via horizontal, por meio do contato com roedores, aves selvagens, cascudinhos, moscas, cama, pessoas, água e equipamentos contaminados. Não há evidências de que o *Campylobacter* possa ser transmitido por via vertical, nem que o ovo seja fonte de contaminação para o homem (BACK, 2010). Cerca de 2 a 4 dias após o início da eliminação bacteriana, 90-100% do lote está infectado, devido à alta capacidade de transmissão horizontal do agente entre as aves. Após a infecção a ave elimina a bactéria por várias semanas (SHANE, 2003).

As bactérias do gênero *Campylobacter* habitam o trato digestivo, sendo bem adaptadas aos hospedeiros aviários, que normalmente não apresentam sinais clínicos (ZHANG, 2008). *C. jejuni* coloniza principalmente as criptas profundas do ceco, sendo encontrado na camada de muco, perto das células epiteliais, onde números

extremamente altos (até  $10^{10}$  UFC/g de intestino infectado) podem ser detectados (YOUNG, 2007).

Trabalhos realizados no Brasil demonstram frequência elevada dessa bactéria em produtos avícolas. Carvalho et al. (2003) identificaram apenas 32,6% de *C. jejuni* em carcaças adquiridas em supermercados e casa comerciais em Jaboticabal, no estado de São Paulo. Já Franchin (2004) analisou 335 amostras coletadas durante o processamento de frango de corte entre 2002 e 2003 em um abatedouro no sul do Brasil. *Campylobacter* sp. foi encontrado em 71,34% do material analisado. As ocorrências de positividade nas carcaças foram: 68,05% após o processo de depenagem, 69,44 % após o processo de evisceração, 84,72% após resfriamento em chiller e 63,33% após congelamento.

Kuana et al. (2009) analisaram 546 amostras a partir de alguns pontos de abate e carcaças de frango. *C. jejuni* foi identificada em 68% das amostras, seguida de *Campylobacter coli* (8,3%), *Campylobacter doylei* (6,3%), *Campylobacter upsaliensis* (4,2%) e *Campylobacter fetus subsp. fetus* (2,1%). Freitas & Noronha (2007) analisaram 16 amostras de carne e miúdos de frango oriundas de abatedouros clandestinos, feiras livres e supermercados em Belém, no estado do Pará. *Campylobacter* sp. foi isolado em 93,7% das amostras independente do local de procedência. Em outro estudo conduzido por Medeiros (2009) no mesmo estado, verificou que 70% (7/10) das amostras de coxa e sobrecoxa, foram positivas para *Campylobacter* sp. No Rio Grande do Sul, Boufleur (2009) encontrou positividade em 61,1% em amostras frescas de fígado, coração, moela e asa coletados em supermercados.

No Rio de Janeiro, Medeiros (2011) detectou a presença de *Campylobacter* sp. em 70% (21/30) das amostras oriundas de carcaças refrigeradas. Dessas, seis (28,57%) eram de provenientes de abatedouros, oito (38,10%) de supermercados e sete (33,33%) de feiras livres, sendo 85,71% identificadas como *C. jejuni*. Perdoncini (2012) analisou 57 carcaças após o resfriamento por imersão (*chiller*). Do total de amostras analisadas, 72% estavam contaminadas por *Campylobacter* sp., e foram identificados *Campylobacter jejuni* e *C. coli* como única espécie em 82% e 8% respectivamente das amostras positivas. Os 10% restantes das amostras positivas apresentaram ambas as espécies.

A aquisição da enterite por *Campylobacter* ocorre pela via fecal-oral, via comum a várias bactérias intestinais, mas um agravante é a baixa dose infectante, de cerca de 500 a 800 células/mL, sendo consideravelmente baixa quando comparada a outros patógenos como *Yersinia pestis* ( $10^9$ ), salmonelas e vírios ( $10^5$ - $10^8$ ) e até mesmo *Shigella* sp. ( $10^3$ ). Embora o período médio de incubação seja de três dias, podendo variar de 18h à oito dias, o paciente continua a excretar esta bactéria em média durante duas a três semanas, após a sua recuperação clínica, a menos que tenha feito uso de medicamento. No homem, os sintomas da enterite por *C. jejuni* e pelas espécies relacionadas são indistinguíveis daqueles causados por outros enteropatógenos. A doença tem amplo aspecto e o seu curso típico é moderado. Sintomas da diarreia causada por *Campylobacter* incluem diarreia aquosa com quadro brando, podendo progredir para diarreia com sangue e muco, desencadeando febre ou não, acompanhada de vômitos e dores abdominais (BUTZLER, 2004).

A maioria das infecções é auto-limitada, não necessitando do uso de medicamentos, apenas de reposição hidro-eletrolítica. Nos casos mais graves, recomenda-se o uso de antimicrobianos, sendo a droga de eleição a eritromicina, uma vez que, na maioria dos casos, a resistência a este antimicrobiano está abaixo de 5%, e aparenta ser mais frequente na espécie *C. coli*. Ciprofloxacina e outras fluoroquinolonas foram inicialmente utilizadas com sucesso, mas mediante o aumento de resistência em alguns países, a indicação a esta droga passou a ser menos frequente (SNELLING et al., 2005).

Complicações decorrentes de enterite não são comuns, embora, tenham sido relatados casos de septicemias, artrite reativa, endocardites, infecção do trato urinário (Síndrome urêmica hemolítica), peritonites, meningites e abortos (BUTZLER, 2004).

Uma importante complicação vem sendo estudada nos últimos anos com bastante interesse dos pesquisadores. Poucos pacientes desenvolvem uma complicação tardia específica, uma neuropatia periférica conhecida como Síndrome de Guillain Barré. Em muitos casos uma infecção causada por *C. jejuni*, e em especial por determinados sorogrupos, antecede o aparecimento desta síndrome, creditando este fato a uma resposta imune a antígenos específicos de *Campylobacter*. Esta síndrome auto-imune é uma doença inflamatória aguda desmielinizante do sistema nervoso periférico, que leva à paralisia flácida e pode comprometer os músculos da respiração e levar à

morte. Desde a erradicação da poliomielite, a Síndrome de Guillain Barré (GBS) é a causa mais frequente de paralisia neuro - muscular em países industrializados (HADDEN; GREGSON, 2001).

Tem-se demonstrado a implicação de *C. jejuni* no desencadeamento de GBS, que ocorre por um mecanismo de mimetismo molecular. Estudos com anticorpos monoclonais produzidos contra o lipo - oligossacarídeo de superfície da bactéria, causa o bloqueio da neurotransmissão em ratos (LINTON et al., 2001). Os sistemas de tipagem têm sido de grande contribuição para o entendimento da epidemiologia desta infecção, mostrando que o desencadeamento da GBS pode estar mais associado a algumas linhagens de *C. jejuni* do que a outras, como é o caso do sorotipo de Penner HS:19 (MORAN; PENNER, 1999).

Outra complicação após a infecção causada por *C. jejuni* é a Síndrome de Miller Fisher, caracterizada pelo início agudo de quadros de oftalmoplegia, ataxia e arreflexia, levando a perda dos reflexos oculomotores e relativa perda da força nas extremidades e no tronco. Ataxia é produzida pela disfunção do nervo periférico sensorial e não por um ferimento cerebelar. Fraqueza facial e perda sensorial podem também ocorrer. O processo é mediado por anticorpos-autoimunes dirigidos aos componentes da mielina encontrados nos nervos periféricos e está associado a infecções prévias de *C. jejuni* e *Haemophilus influenzae*. Estudos neurofisiológicos sugerem a ocorrência de uma transmissão neuromuscular anormal que somente está presente nos casos de Síndrome de Guillain Barré e Síndrome de Miller Fisher (OVERELL; WILLISON, 2005).

A atuação de vários fatores ou determinantes de virulência que têm sido estudados e propostos, sendo atualmente reconhecidas como principais atividades patogênicas: a invasão e a adesão de células epiteliais e a produção de toxinas (KETLEY, 1997). Não se sabe se a atuação destes fatores se dá de maneira isolada, ou se é a combinação deles que leva à produção dos sintomas da infecção, mas observa-se que estabelecida à colonização da mucosa, seguida da adesão à superfície das células epiteliais, os *Campylobacters* spp. perturbam a capacidade normal de absorção do intestino, causando dano à própria função da célula epitelial, seja diretamente, através da invasão ou da produção de toxinas ou ainda indiretamente, levando ao desencadeamento de uma resposta inflamatória. Em relação aos fatores envolvidos na

colonização do muco, adesão e invasão de células epiteliais, a motilidade bacteriana, obviamente representada pelo flagelo, é o determinante de virulência mais bem investigado. Suas características únicas, combinadas com a forma em espiral da célula bacteriana, conferem à mesma uma motilidade distinta que permite a eficiente penetração na barreira de muco que recobre as vilosidades (WOOLDRIDGE; KETLEY, 1997).

Devido a motilidade, as células bacterianas, algumas vezes, penetram mais profundamente localizando-se nas criptas do intestino. O filamento flagelar possui duas proteínas denominadas flagelina A (*FlaA*) e flagelina B (*FlaB*) (BHAVSAR; KAPADNIS, 2007). As flagelinas parecem estar envolvidas também na adesão e na invasão às células hospedeiras, conforme mostram os estudos com mutantes que, tendo seu movimento flagelar paralisado apresentaram reduzida capacidade de aderir e ausência de invasão. Ainda dentro deste panorama, temos que destacar que tanto a motilidade quanto a quimiotaxia são essenciais para a colonização por *C. jejuni*, que é atraído por mucina, L-serina e L-fucose e é repelido por ácidos biliares. Após o *C. jejuni* atravessar a barreira do muco, é necessária sua aderência na superfície epitelial para que a efetiva colonização ocorra. A adesão tem sido estudada de maneira bastante intensa *in vitro* (KETLEY, 1997).

Não há na literatura nenhuma descrição de uma estrutura fimbrial, apenas um relato da produção de uma “fimbria-like” quando a bactéria é cultivada na presença de sais biliares. Porém, estudos do genoma de *Campylobacter* não apresentam sequências relacionadas a esta característica. Estruturas pilus-like também já foram documentadas quando a bactéria foi cultivada na presença de sais biliares e algumas adesinas já foram descritas como as proteínas PEB1 e CadF (VAN VLIET; KETLEY, 2001).

No homem, a reação inflamatória e a bacteremia muitas vezes observadas na enterite, sugerem fortemente que a invasão celular é um importante passo no mecanismo patogênico, embora a habilidade e a intensidade de invasão de *Campylobacter* pareça ser cepa-dependente, como foi demonstrado nos estudos *in vitro* com diferentes cultivos celulares, como em Hep-2 (Células de carcinoma de laringe humana), em HeLa (Células de carcinoma de útero humano) e também em células de origem epitelial intestinal humana INT-407 (VAN VLIET; KETLEY, 2001).

Observou-se que para que ocorra a invasão é necessária a síntese de determinadas proteínas pela bactéria e a transdução de sinais pela célula hospedeira. O co-cultivo de *C. jejuni* e células INT-407 leva à produção e secreção de um grupo de aproximadamente oito proteínas, incluindo a proteína CiaB. *C. jejuni* CiaB-mutante adere a mucosa intestinal, mas não é internalizada pela mesma e ainda não secreta nenhuma das outras sete proteínas (TAY et al., 1996). Van Vliet; Ketley (2001) sugerem que CiaB seja um membro do sistema de secreção tipo III.

Porém, um foco de atenção tem se voltado para a caracterização das toxinas produzidas por *Campylobacter* sp., acreditando-se que somente a invasão não seria responsável pelos efeitos citopáticos observados nas enterites (VAN VLIET; KETLEY, 2001). As toxinas bacterianas foram definidas como substâncias que alteram o metabolismo normal das células do hospedeiro, com efeitos prejudiciais ao mesmo, e representando o mais potente fator de virulência bacteriano (SCHMITT et al., 1999). De acordo com Pickett (2000), a caracterização da produção de toxinas por *Campylobacter* é considerada um processo ainda lento na pesquisa deste gênero.

A produção de várias toxinas por *Campylobacter* foi documentada anteriormente (PANCORBO et al., 1999), mas seus mecanismos de ação e sua importância na doença causada por este patógeno se mantém ainda indefinida. Dois grupos de toxinas são isoladas deste gênero bacteriano: enterotoxinas e citotoxinas, além de cepas que apresentam, simultaneamente, a produção de ambas (WASSENAAR, 1997).

A atividade das enterotoxinas em sobrenadantes de cultura de *C. jejuni* tem sido detectada em cultivos celulares como CHO (Célula de ovário de hamster chinês transformada) e Y-1 (célula de tumor de glândula adrenal de rato). Alguns trabalhos sugerem a produção de enterotoxina semelhante à toxina colérica, mas a sua real existência ainda não foi comprovada, pois ainda não houve caracterização de genes que codifiquem a toxina cólera-like. Com futuros estudos pode ser que se descreva alguma outra enterotoxina produzida por *C. jejuni* com a capacidade de deflagrar a diarreia aquosa, mais ainda não houve uma caracterização efetiva desta toxina (BERESWILL; KIST, 2003).

No estudo das citotoxinas é onde se concentram as maiores controvérsias, pois diferentes grupos de pesquisadores utilizam diferentes linhagens celulares com

protocolos também diferentes (WASSENAAR, 1997). A proposta mais caracterizada de toxina em *Campylobacter* é a toxina de citoletal distensiva (CDT), já detectada em várias amostras de *Campylobacter* (PURDY et al., 2000). A CDT é determinada por um cluster de três genes adjacentes (*cdtA*, *cdtB* e *cdtC*) que codificam proteínas de 30, 29 e 21 kDa (LARA-TEJERO; GALÁN, 2001). A proteína produzida pelo gene *cdtB* potencializa o bloqueio do ciclo celular; e as proteínas dos genes *cdtA* e *cdtC* transportam a proteína do *cdtB* e a interiorizam na célula hospedeira. Uma vez dentro da célula a proteína *cdtB* entra no núcleo e exibe uma atividade de corte no DNA dupla fita. As células eucarióticas respondem aos cortes no DNA, bloqueando a fase G2/M da divisão celular, induzindo uma distensão citoplasmática que leva à morte da célula (JEON, 2005; SMITH, 2006; DASTI, et al., 2010).

A presença dos três genes *cdt* é requerida para uma plena atividade da toxina (ASAKURA et al, 2007). No entanto, mutações podem ocorrer nos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* causando perda da função em alguma das três subunidades, impedindo a célula bacteriana de induzir citotoxicidade (SMITH, 2006).

Outra citotoxina bastante documentada é a toxina citoletal de arredondamento (CLRT) sua denominação é baseada no aspecto de arredondado, observado principalmente em células CHO. De ocorrência relevante, pode ser observada numa mistura de efeito junto a toxina CDT (SCHULZE et al., 1998).

Já foram relatadas diversas outras citotoxinas como: a Citotoxina de 70-kDa, inativa em Vero, que torna a célula afetada arredondada, finalizando o efeito em morte celular (THORNLEY et al, 2001); a citotoxina ativa em Vero, pouco documentada, e também promovendo arredondamento e morte celular (PANCORBO et al., 1999); a toxina Shiga-like, é representada por apenas um relato descrito em literatura, e em estudos recentes não se encontrou genes em *C. jejuni* com homologia aos genes da toxina shiga-like. Existe ainda a hepatoxina, com poucos relatos e responsável pela desordem hepática crônica desenvolvida em ratos infectados intragastricamente (WASSENAAR et al., 1997).

Outro fator de virulência discutido em *C. jejuni* é a produção de hemolisinas (MISAWA et al, 1995). A existência da citotoxina hemolítica não é totalmente comprovada, porém Van Vliet; Ketley (2001) relatam a existência de genes contendo domínios para esta toxina. Hemolisinas produzidas por bactérias Gram-positivas e Gram

negativas representam um grupo de toxinas bacterianas que, diferentemente de muitas outras toxinas, não são internalizadas pelas células, atuando como agentes ativos de membranas levando à lise e morte celular (ROWE; WELCH,1994), principalmente de eritrócitos. Hemolisinas não são líticas apenas aos eritrócitos, mas causam danos também aos fibroblastos, plaquetas, monócitos, granulócitos e células endoteliais e do miocárdio (JURGENS, 2002).

*In vitro* a síntese de hemolisinas pode ser dependente de uma série de fatores presentes no meio de cultura. Em presença de quelantes de ferro, a atividade hemolítica em algumas bactérias pode aumentar. O cálcio foi descrito como sendo essencial para ativação de  $\alpha$ -hemolisina, para a sua estabilidade e para a ligação da toxina às membranas dos eritrócitos (BARATÉIA et al, 2001). Boehm e colaboradores (1990) descreveram que algumas hemolisinas bacterianas são dependentes de íons bivalentes como o cálcio e o magnésio para sua ativação e/ou ligação com os eritrócitos e, por outro lado, outras apresentam redução na sua produção quando em presença de íons Ferro.

Poucos são os trabalhos a respeito das hemolisinas, no gênero *Campylobacter*, esses trabalhos sugerem um comportamento variável entre as espécies e em relação aos diferentes tipos de hemácias testadas. O *Campylobacter* embora não seja considerado hemolítico em ágar sangue, algumas cepas apresentam atividade hemolítica (Misawa et al., 2005) Em 1993, Hossain et al., analisaram a atividade hemolítica em diferentes eritrócitos na tentativa de avaliar a cinética de ativação da hemolisina produzida por *C. jejuni*. Em 1995, Misawa et al., pesquisaram as condições ideais (temperatura da cultura, pH médio, concentração de CO<sub>2</sub>, período de incubação, meio utilizado) e a frequência da produção de hemolisinas em amostras de *C. jejuni* de origem humana e não humana, obtendo em 100% das mesmas, atividade hemolítica.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### **Procedência das amostras de campo**

As amostras de *C. jejuni* estudadas neste trabalho foram oriundas da bacterioteca do Centro de Diagnóstico e Pesquisas em Patologia Avícola da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CDPA/UFRGS), provenientes de isolados de matadouros-frigoríficos de aves, sob Inspeção Federal.

#### **Manutenção das amostras**

Todas as amostras de *C. jejuni* estavam estocadas em tubos contendo Caldo Brucella, acrescidas de 25% de glicerol e mantidas em biofreezer a temperatura de -80°C. As amostras foram recuperadas através do enriquecimento em Caldo Bolton - cultivadas em ágar mCCDA e incubadas por 48h em temperatura de 41,5°C, sob ambiente de microaerofilia (<sup>®</sup> Microaerobac - Probac).

#### **Deteção da atividade hemolítica**

##### **Pesquisa de hemolisina em meio sólido**

As amostras de *C. jejuni* em estudo foram cultivadas em caldo TSB e incubadas a 41,5°C/ 48hs. Após o crescimento bacteriano, as amostras foram semeadas em Ágar tríptico de soja (TSA) contendo 5% de sangue de carneiro, equino e bovino, sendo cada sangue testado isoladamente.

O resultado foi positivo quando observado a presença de halo hemólise ao redor ou sob as colônias. A leitura foi realizada no segundo dia de incubação em atmosfera de microaerofilia comercial, segundo metodologia descrita por MISAWA (1995).

##### **Cultivo *Campylobacter jejuni* na presença de agentes quelantes e soluções de íons - Influência da condição de cultivo na deteção de atividade hemolítica.**

Para verificar a influência de agentes quelantes e solução de íons na expressão da atividade hemolítica, as amostras de *C. jejuni* foram cultivadas em TSB contendo

separadamente os quelantes EDTA (etileno diamina-tetra ácido acético, Synth - 5mM - Baratéia et al., 2001), ácido acético( Sigma - 100g); solução de íons  $\text{CaCl}_2$  (Cloreto de cálcio - 10mM - Boehm et al., 1990);  $\text{MgCl}_2$  (Cloreto de Magnésio - 10mM - Boehm et al., 1990) e  $\text{FeCl}_3$  (Cloreto férrico - 5mM – Baratéia et al., 2001) por 48h a 41, 5°C em atmosfera de microaerofilia comercial. Posteriormente foram semeadas, como descrito anteriormente. Como controle dos testes foi utilizado somente o caldo TSB sem inoculação bacteriana, acrescido dos agentes químicos em teste.

### **Detecção dos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* através da técnica da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)**

#### **Obtenção do DNA bacteriano**

A obtenção do DNA bacteriano foi realizada através de lise térmica, por fervura das amostras, seguindo protocolo de Blanco (1997).

#### **Detecção dos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC***

Foram utilizados como controle positivo *C. jejuni* ATCC 33560 e controle negativo *Arcobacter* sp. para as reações da PCR.

#### ***Primers***

Os *primers* ou oligonucleotídeos utilizados foram sintetizados baseados em trabalhos anteriores (DATTA et al, 2003 e WIECZOREK; OSEK, 2008). As sequências dos *primers* utilizados encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1: Sequências nucleotídicas dos *primers* utilizada para os genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* de *Campylobacter jejuni*.

| <i>Primer</i>       | <i>Sequência</i>              |
|---------------------|-------------------------------|
| <i>cdtA</i> forward | 5' CCTTGTGATGCAAGCAATC 3'     |
| <i>cdtA</i> reverse | 5' ACACTCCATTTGCTTTCTG 3'     |
| <i>cdtB</i> forward | 5' CAGAAAGCAAATGGAGTGTT 3'    |
| <i>cdtB</i> reverse | 5' AGCTAAAAGCGGTGGAGTAT 3'    |
| <i>cdtC</i> forward | 5' CGATGAGTTAAAACAAAAAGATA 3' |
| <i>cdtC</i> reverse | 5' TTGGCATTATAGAAAATACAGTT 3' |

(Adaptado de DATTA et al, 2003 e WIECZOREK; OSEK, 2008).

### Padronização dos protocolos

Foram otimizados dois protocolos de PCR para os genes pesquisados (*cdtA*, *cdtB* e *cdtC*), baseados nos trabalhos de Datta et al. (2003) e Wieczorek; Osek (2008).

As reações de amplificação consistiram do preparo do mix de reagentes (Tabela 2) composto de água ultrapura, solução tampão, desoxirribonucleotídeos trifosfoatados (dNTPs), um par de primers específico para cada gene pesquisado, cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ), enzima taq-polimerase e o DNA extraído. Os dois protocolos diferiram nas concentrações de  $MgCl_2$ , com base nas variações encontradas na literatura. Assim, para os genes *cdtA* e *cdtC* testaram-se a concentração de 2mM de  $MgCl_2$  e para *cdtB* a concentração de 1,5mM.

Tabela 2: Concentrações e volume dos reagentes utilizados para composição do mix para PCR para detecção dos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* em *Campylobacter jejuni*.

| Reagentes                | <i>cdtA</i> e <i>cdtC</i> | <i>cdtB</i>   |
|--------------------------|---------------------------|---------------|
| Água mili-Q(μL)          | 20,15                     | 20,15         |
| Tampão 10X(μL)           | 3                         | 3             |
| dNTP(2,5mmol)            | 2,4                       | 2,4           |
| MgCl <sub>2</sub> (μL)   | 1 (1mM)                   | 1,25 (1,5 mM) |
| Primer (20Pmol) (μL)     | 1                         | 1             |
| Taq polimerase (1U) (μL) | 0,2                       | 0,2           |
| DNA (μL)                 | 1                         | 1             |
| Total                    | 30                        | 30            |

(Adaptado de DATTA et al, 2003; WIECZOREK, 2008).

Os dois protocolos iniciaram com a temperatura de desnaturação de 94°C por cinco minutos seguido por 30 ciclos com as temperaturas de desnaturação, anelamento dos *primers* e extensão descritas na tabela. A temperatura de extensão final para os dois protocolos foi de 72°C por cinco minutos.

Após amplificação, os produtos do PCR (*amplicons*) foram submetidos à eletroforese realizada em gel de ágarose a 2% corado com brometo de etídio. Os fragmentos do DNA amplificados foram visualizados em trans-iluminador ultravioleta, onde esperava-se observar bandas de 370pb para o gene *cdtA*, 620pb para o gene *cdtB* e 182pb para o gene *cdtC*.

**Análise Estatística:** ANOVA (um fator completo com variável de grupo) com o programa BioStat (versão 2009) Analyst Soft. Inc.testes: sw Turkey – Krames, Bonferroni e Fisher LSD.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as dificuldades que envolvem a pesquisa de *Campylobacter*, citam-se, como fator preponderante, as próprias características biológicas deste microorganismo, que o torna particularmente distinto da maioria dos enteropatógenos bacterianos, requerendo condições únicas para seu isolamento e identificação. Outro aspecto importante que deve ser ressaltado é de que o *Campylobacter* por ser uma zoonose, naturalmente transmitida de animais vertebrados para o homem, tendo como principais veículos de transmissão o alimento de origem animal, a água com contaminação fecal recente, ou ainda mais raramente, o contato direto com animais portadores ou doentes (FROST, 2001).

A toxina CDT contribui para a patogênese através da inibição da imunidade humoral e celular via apoptose das células de resposta imune, e pode gerar necrose do epitélio celular e fibroblastos envolvidos na reparação de lesões produzidas por patógenos, resultando em lenta cicatrização e indução de sintomas da doença (SMITH, 2006). Portanto, interfere na divisão e diferenciação das células das criptas intestinais, contribuindo para o desenvolvimento da diarreia (PARK, 2002).

Quanto a identificação dos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* codificantes da toxina CDT, os dois protocolos de PCR adaptados foram capazes de detectar a presença dos genes de virulência nas amostras pesquisadas. Da mesma forma, todas as reações foram específicas aos genes selecionados, pois não ocorreu a amplificação das amostras utilizadas como controle negativo. A figura 1, apresenta uma foto (máquina Canon, suporte para o gel Alpha Innotech) do gel de ágarose a 2% corado com brometo de etídeo visualizado em Ultravioleta quanto à presença de *cdtB* em 22/119 amostras pesquisadas.

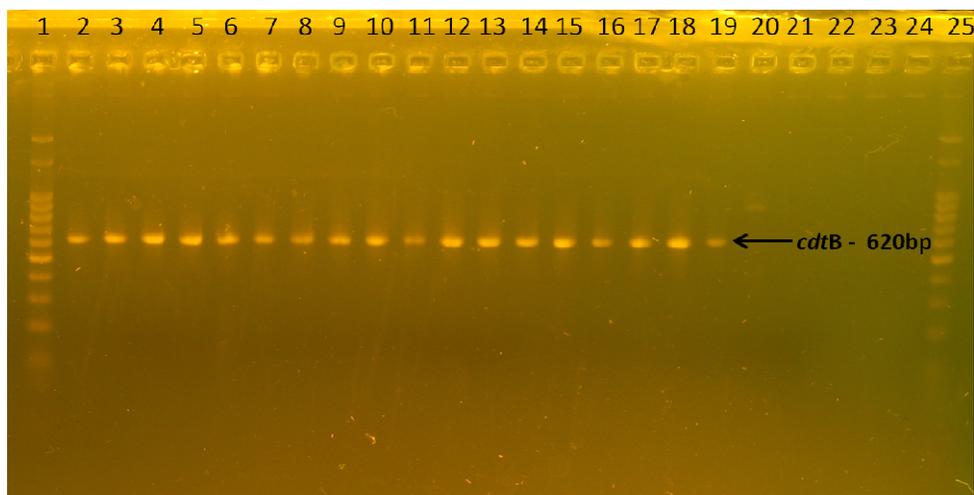


Figura 1: Resultados obtidos por PCR para identificação dos genes codificantes da toxina CDT em gel de ágarose 2% em UV. 1 e 25 – marcador, 2 – controle positivo, 3 a 19 amostras positivas para *cdtB*, 20 a 23 amostras negativas para *cdtB*, 24 controle negativo.

Das 119 amostras analisadas por meio do método de PCR foi possível observar que 38% (45) possuíam os três genes, em 23 amostras foram identificados somente os genes *cdtA* e *cdtC* representando 19% do total de amostras. O gene *cdtB* foi encontrado em 17 amostras (14%), o gene *cdtC* foi observado em somente 14 amostras (12%) e os genes *cdtA* e *cdtB* em somente uma amostra perfazendo 1%. Os genes *cdtB* e *cdtC* também em uma amostra equivalendo a 1%(1/119) e somente para *cdtA* em uma amostra (1%), conforme demonstrado na Figura 2.

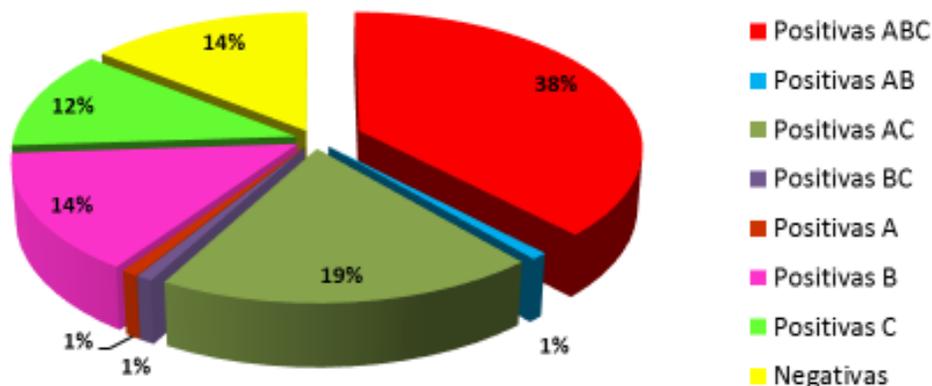


Figura 2: Resultados obtidos pela amplificação por PCR para detecção dos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* nas amostras de *Campylobacter jejuni* de origem avícola.

Os resultados obtidos quantos aos genes *cdt* neste trabalho são diferentes do encontrado na literatura consultada, que relata frequências geralmente próximas a 100% para os três genes: *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*. Datta et al. (2003) e Rozynek et al. (2005) relatam uma frequência de 100% para os três genes nas amostras pesquisadas. Wiczorek; Osek (2008) relataram, em amostras de fezes de aves, 76,6% positivos para *cdtA*, 85,3% para *cdtB* e 83,2% para *cdtC*. Martinez et al. (2006) em suas pesquisas encontraram os três genes em 98% das estirpes isoladas. Talukder et al. (2008) identificaram os três genes *cdt* em 98% das amostras de *C. jejuni* de origem humana (diarreia) e Van Deun et al. (2007) encontraram os genes em 100% das amostras de origem humana e avícolas, concordando com Wardak (2006) que afirmaram que a toxina CDT esta associada com as estirpes causadoras de enterites em humanos, indicando que os genes são importantes fatores de virulência.

Por outro lado, Carvalho et al. (2010) ao pesquisarem *C. jejuni* em carcaças de aves, relatou todos os genes do complexo CDT em apenas 36,4% das amostras. Resultado esse mais próximo do encontrado no presente estudo. Também Hanel et al (2007) pesquisaram na Alemanha a toxina CDT em perus e encontraram os três genes

em 53% das estirpes pesquisadas de *C. jejuni*. No Japão, Kabir et al. (2011) analisaram amostras de a partir de fezes de pacientes com diarreia, das quais quatro foram positivas para *C.jejuni* e os três genes CDT, observando-se assim a importância em saúde pública desse patógeno.

Segundo Martinez et al. (2006) todas as estirpes de *C. jejuni* apresentam os genes *cdt*, e a maioria tem atividade da toxina. Porém, há exceções de isolamentos que sofrem mutações e não expressam a atividade do gene. Asakura et al. (2007) também observaram que alguns genes *cdt* não são identificados devido a mutações como deleção, inserção ou substituição de nucleotídeos e sugerem que essas mutações possam afetar a atividade da toxina. Bang et al. (2003) relataram que a produção da toxina é baixa ou negativa quando há mutações em regiões de codificação dos genes *cdt*, podendo influenciar a hibridização de iniciadores no PCR de CDT, bem como na produção. Porém, segundo Park (2002), mesmo algumas estirpes sendo CDT negativas mutantes, ainda mantêm alguma atividade toxigênica. Podendo, com base nesses dados, ser dada sequência ao presente trabalho, com avaliação mais aprofundada dos resultados, a fim de comprovar possíveis mutações para os genes *cdt* nas amostras pesquisadas e/ou novas utilizando métodos como RT-PCR e/ou Western blotting. Abu Oun et al. (2005) realizaram pesquisa utilizando estes métodos a fim de identificar mutações, deleções e/ou inserções em amostras humanas e avícolas de CDT-negativa com o objetivo de identificar as alterações que as tornaram não detectáveis em outro método.

Das 45 amostras avaliadas de *Campylobacter jejuni* os resultados encontrados em presente estudo para avaliação da atividade hemolítica, podem ser observados nas Tabelas 3 a 6.

Tabela 3: Atividade hemolítica de *Campylobacter jejuni* em placas de TSA – sangue (equino/bovino/ovino).

| TSA + SANGUE | AMOSTRAS COM ATIVIDADE HEMOLÍTICA (n- %) |
|--------------|--|
| Equino       | 22/45 - 48,89                            |
| Bovino       | 18/45 – 40                               |
| Ovino        | 14/45 - 31,11                            |

Rowe; Welch (1994) descrevem que as hemolisinas podem variar grandemente quanto sua ação em diferentes eritrócitos, o que foi possível observar no presente trabalho, onde houve maior na atividade hemolítica quando utilizada hemácia de origem equina (Figura 3).

Em trabalho desenvolvido por Wassenaar (1997) foi obtido 92% de atividade hemolítica nas amostras analisadas, mas apenas em bactérias em envelhecimento, sugerindo que um componente intracelular é liberado quando o microorganismo morre e lisa após quatro dias de incubação.



Figura 3: Atividade hemolítica de amostra de *C. jejuni* de origem avícola, observada em TSA-sangue equino, após ser cultivada em caldo TSB.

De maneira geral, foi demonstrado que a oferta de agentes de íons bivalentes de Cálcio e Magnésio diminuiu a de atividade hemolítica, conforme demonstrado nas Tabelas 4 a 6.

Tabela 4: Influência de agentes quelantes e íons em caldo TSB na atividade de hemolisinas em amostras de *Campylobacter jejuni* semeadas em placas de TSA – sangue ovino.

| TSB + AGENTE QUELANTE OU ÍONS | AMOSTRAS COM ATIVIDADE HEMOLÍTICA (n - %) |
|-------------------------------|---|
| CaCl <sub>2</sub>             | 12/45 - 26,67                             |
| FeCl <sub>3</sub>             | 7/45 - 15,55                              |
| EDTA                          | 10/45 - 22,22                             |
| MgCl <sub>2</sub>             | 5/45 - 11,11                              |
| Ácido Acético                 | 1/45 - 2,22                               |

A utilização de quelantes de ferro no meio de cultura para aumentar a produção de toxinas bacterianas foi relatada (CARBONELL; VIDOTTO, 1992, CHART et al., 1998). Thomé (2006) também observou aumento de atividade hemolítica em amostras de *C. jejuni*, quando utilizado FeCl<sub>3</sub> e TSA-sangue ovino. O presente trabalho obteve resultados diferentes, o uso FeCl<sub>3</sub> inibiu a atividade hemolítica num percentual de 50% das amostras em hemácias de ovinos, 38,88% em bovino e 54,54% para hemácias de equino, conforme demonstrado nas Tabelas 4 a 6. No entanto, os resultados estão de acordo com o que afirma Baratéia et al. (2001) em estudos da atividade hemolítica em *Plesiomonas shigelloides*, nas quais a síntese de hemólise também está parcialmente regulada por íons de ferro, e a produção máxima ocorre em condições de limitação de ferro.

Van Vliet; Kitley em 2001 relatam a existência de genes contendo domínios específicos para hemolisinas. Picket (1992) testou a habilidade de amostras de *C. jejuni* em adquirir ferro a partir de várias fontes presentes no metabolismo humano quando crescidas em meios sem fontes de ferro e concluiu que a atividade hemolítica não demonstrava ser regulada por íons ferro, uma vez que as amostras demonstraram serem incapazes de retirar ferro dessas substâncias.

Tabela 5: Influência de agentes quelantes e íons em caldo TSB na atividade hemolisinas em amostras de *Campylobacter jejuni* semeadas em placas de TSA – sangue bovino.

| TSB + AGENTE QUELANTE OU ÍONS | AMOSTRAS COM ATIVIDADE HEMOLÍTICA (n - %) |
|-------------------------------|---|
| CaCl <sub>2</sub>             | 7/45 - 15,55                              |
| FeCl <sub>3</sub>             | 11/45 - 24,44                             |
| EDTA                          | 12/45 - 26,26                             |
| MgCl <sub>2</sub>             | 9/45 - 20                                 |
| Ácido Acético                 | 5/45 - 11,11                              |

Hossain et al. (1993) detectaram atividade hemolítica em amostras oriundas de quadros clínicos de diarreia, mostrando que as amostras se comportavam com diferentes aspectos e atividade máxima com eritrócitos de coelho e atividade mínima com eritrócitos de galinha. Misawa et al. (1995) pesquisaram determinados fatores que contribuíam positivamente para atividade hemolítica como variação de pH e de concentração de CO<sub>2</sub> utilizada na atmosfera de incubação.

Na influência de CaCl<sub>2</sub> e EDTA sobre a atividade hemolítica se observou uma diminuição de 14,28% (ovino), 38,89% (bovino) e 50% (equino), quando usado CaCl<sub>2</sub> e 28,58%(ovino), 33,34% (bovino) e de 40,90% (equino) com o uso de EDTA. Boehm et al (1990), obtiveram resultados diferentes deste estudo quando pesquisou atividade hemolítica em *Escherichia coli*, em que o CaCl<sub>2</sub> é necessário para atividade *in vitro* de hemolisina, não sendo inibida quando utilizado EDTA no mesmo meio.

Com o uso de EDTA não foi observada alteração na atividade hemolítica em trabalho realizado por Simi (2004) com *Enterobacter Cloacae*, diferente do ocorrido no presente trabalho. O mesmo autor afirma de que o crescimento bacteriano em estresse não altera a expressão de hemolisinas. Em relação ao CaCl<sub>2</sub>, há trabalhos que afirmam que para que haja atividade hemolítica não é necessária a adição de íons de cálcio, sugerindo que os meios de cultura utilizados contenham cálcio suficiente para hemólise (CHART, et al., 1998). Baratéia et al. (2001) observaram que o uso de CaCl<sub>2</sub> e EDTA

aumentou significativamente a atividade hemolítica de, sugerindo que *Plesiomonas shigelloides* requeira íons cálcio da mesma maneira que *Escherichia coli* para atividade hemolítica.

Tabela 6: Influência de agentes quelantes e íons em caldo TSB na atividade de hemolisinas em amostras de *Campylobacter jejuni* semeadas em placas de TSA – sangue equino.

| TSB + AGENTE QUELANTE OU ÍONS | AMOSTRAS COM ATIVIDADE HEMOLÍTICA (n- %) |
|-------------------------------|--|
| CaCl <sub>2</sub>             | 11/45 - 24,44                            |
| FeCl <sub>3</sub>             | 10/45 - 22,22                            |
| EDTA                          | 13/45 - 28,89                            |
| MgCl <sub>2</sub>             | 13/45 - 28,89                            |
| Ácido Acético                 | 4/45 - 8,89                              |

Tabela 7: Análise da média percentual da influência de agentes quelantes e íons em caldo TSB na atividade hemolítica em amostras de *Campylobacter jejuni*, quando semeadas em TSA+ sangue equino/sangue bovino/sangue ovino.

| TSB + AGENTE QUELANTE OU ÍONS | AMOSTRAS COM ATIVIDADE HEMOLÍTICA (%) |
|-------------------------------|---------------------------------------|
| TSB                           | 40 a*                                 |
| TSB+CaCl <sub>2</sub>         | 22,23 c*                              |
| TSB+FeCl <sub>3</sub>         | 20,74 c*                              |
| TSB+EDTA                      | 25,79 c*                              |
| TSB+Ác. Acético               | 7,41 b*                               |
| TSB+MgCl <sub>2</sub>         | 20 bc*                                |

\* Letras diferentes significam que resultados apresentam uma diferença estatística com  $p < 0.05$ .

Através de uma análise percentual da influência de agentes quelantes e íons na atividade hemolíticas das amostras, quando semeadas nos três tipos de AS-TSA (equino, bovino, ovino) (Tabela 7), nota-se que houve maior atividade hemolítica quando a amostra foi cultivada anteriormente apenas no TSB não suplementado (a) e menor hemólise no TSB suplementado com ácido acético (b), Quando utilizado CaCl<sub>2</sub>,

FeCl<sub>3</sub> ou EDTA observou - se menor atividade hemolítica do que quando utilizado apenas o caldo TSB, mas ainda menor que quando utilizado o ácido acético; estatisticamente mantendo mesmo resultado (c). O caldo TSB com MgCl<sub>2</sub> não apresentou diferença frente aos demais grupos, somente tendo menor percentual de atividade hemolítica quando utilizado apenas o caldo TSB (bc).

Com os resultados apresentados neste trabalho foi possível verificar o perfil dos genes *cdtABC* das amostras de *Campylobacter jejuni* que apresentaram atividade hemolítica com ou sem uso de quelantes e íons, independente do tipo de sangue utilizado (Tabela 8), embora os genes da toxina CDT não tenha sido referenciada como hemolítica, a análise dos diferentes perfis de genes frente a média de atividade hemolítica com s sem usos de quelantes e íons, é considerada neste trabalho como dado adicional.

Tabela 8 - Perfil de genes *cdtABC* das amostras de *Campylobacter jejuni* que apresentaram atividade hemolítica com ou sem uso de quelantes e íons, independente do tipo de sangue utilizado.

| Genes | TSB  | CaCl <sub>2</sub> | FeCl <sub>3</sub> | EDTA | MgCl <sub>2</sub> | Ac acético |
|-------|------|-------------------|-------------------|------|-------------------|------------|
| A     | 2 b  | 0                 | 0                 | 0    | 1                 | 0          |
| ABC   | 23 a | 12 a              | 15 a              | 13   | 8                 | 3          |
| AB    | 0    | 0                 | 0                 | 0    | 0                 | 2          |
| AC    | 11 c | 10 a              | 5 b               | 6    | 6                 | 3          |
| B     | 10 c | 5 b               | 4 b               | 8    | 6                 | 2          |
| BC    | 1 b  | 0                 | 0                 | 0    | 0                 | 0          |
| C     | 7 b  | 2 b               | 4 b               | 7    | 5                 | 0          |

\* Letras diferentes significam que resultados apresentam uma diferença estatística com  $p < 0.05$ .

Para o caldo TSB não suplementado e suplementado com FeCl<sub>3</sub> a combinação de genes *cdtABC* em *Campylobacter jejuni*, mostrou maior percentagem de atividade hemolítica. Para o caldo suplementado com CaCl<sub>2</sub> as combinações de genes *cdtABC* e *cdtAC* apresentaram maior percentagem de atividade hemolítica. *Campylobacter jejuni* com a combinação de genes *cdtBC* apresentaram menor percentual. Para os suplementos EDTA, MgCl<sub>2</sub> e ácido acético não houve diferenças quanto a presença de diferentes genes e atividade hemolítica. Pode ser que os quelantes e íons interfiram

diferentemente quanto a atividade hemolítica para cada cepa de *Campylobacter jejuni* dada a diversidade clonal delas.

Como a produção de hemolisinas e de enterotoxinas são considerados importantes fatores de virulência (SIMI, 2004), a atividade hemolítica estudada pode ser considerada um possível fator de virulência entre amostras de *Campylobacter jejuni*.

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados demonstraram em amostras avícolas, a presença de estirpes de *C. jejuni* com potencial patogênico. Houve significativa atividade hemolítica quando utilizado sangue de origem equina. A mesma foi diminuída quando utilizados agentes quelantes ou íons, nos três tipos de sangue (equino, bovino, ovino). A utilização de ácido acético teve resultados mais expressivos, em apenas 2,22% a 11,11% das amostras, demonstraram atividade hemolítica, podendo ser observado seu alto potencial como forma de controle de *Campylobacter jejuni*.

Quanto à detecção dos genes *cdt*, pela técnica de PCR é rápida, precisa, confiável e simples na obtenção dos dados.

Foi possível observar que os três genes CDT (*cdtA*, *cdtB* e *cdtC*), estavam presentes na maioria das amostras que apresentaram atividade hemolítica. Já quanto aos suplementos EDTA,  $MgCl_2$  e ácido acético não houve diferenças quanto a presença de diferenças genes e atividade hemolítica. Os quelantes e íons utilizados podem interferir diferentemente quanto a atividade hemolítica para cada cepa de *Campylobacter jejuni* dada sua diversidade clonal.

Estudos da caracterização fenotípica e genotípica de *Campylobacter* spp. , mais especificadamente netes trabalho com *C.jejuni*, servem como embasamento para futuro desenvolvimento de formas de controle desta bactéria da granja ate a mesa do consumidor final, já que esse microorganismo pode vir a ser uma barreira sanitária.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLOS, B. M; TAYLOR, D. N. Campylobacter infections. In: EVANS, A. S & BRACHMAN, P.S. **Bacterial Infection of Humans: Epidemiology and Control.** Phenum Medical. Book Company, 3rd edition, chapter 8, p. 169-190, 1998.
- ALTEKRUSE, S. F; HUNT, J. M; TOLLEFSON, L. K; MADDEN, J. M. Food and animal sources of human *Campylobacter jejuni* infection. **JAVMA.** v.204, n.1, p 57-61, 1994.
- ANDREATI FILHO, L. P. **Saúde Aviária e Doenças.** 1ed. ROCA, 2007, São Paulo. p. 144-150.
- ASAKURA, M; SAMOSORNSUK, W; TAGUCHI, M; KOBAYASHIC, K; MISAWA, N; KUSUMOTO, M; NISHIMURA, K; MATSUHISA, A; YAMASAKI, S. Comparative analysis of cytolethal distending toxin(*cdt*) genes among *Campylobacter jejuni*, *C. coli* and *C. fetus* strains. **Microbiology Pathogenesis.** v.42, p.174-183. 2007.
- ABU OUN, M; MANNING, G; CAWTHRAW, S. A; RIDLEY, A; AHMED, I. H; WASSENNAR, T. M; NEWELL, D. G. Cytolethal Distending Toxin (CDT) – Negative *Campylobacter jejuni* strains and anti-CDT neutralizing antibodies are induced during human infection but not during colonization in chickens. **Infection and Immunity.** v.73, n.5, p.3053-3065, 2005.
- BACK, A. Campilobacteriose. **Manual de Doenças de Aves.** 2ed.Cascavel:Integração. p.119-122. 2010.
- BANG, D. D; NIELSEN, E. M; SCHEUTZ, F; PEDERSEN, K; HANDBERG, K; MADSEN, M. PCR detection of seven virulence and toxin genes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from Danish pigs and cattle and cytolethal distending toxin production of the isolates.. **Journal Applied Microbiology.** v.94, p.1003-1014. 2003.
- BARATÉIA, R. C; SARIDAKIS, H. O; GAZIRI, L. C. J; PELAYO, J. S. Effects of medium composition, calcium, iron and oxygen on haemolysin production by *Plesiomonas shigelloides* isolated from water. **Journal Applied Microbiology.** v. 90, p.482-87, 2001.
- BERESWILL, S; KIST, M. Recent developments in Campylobacter pathogenesis. **Current Op. Infect. Dis.** n.16, p. 487-491, 2003.
- BESSÈDE, E; LEHOURS, P; LABADI, L; BAKARI, S; MÉGRAUD, F. Comparison of characteristics of patients infected by *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter fetus*. **Journal of Clinical Microbiology.** v.52, n.2, p328-330. 2014.
- BHAVSAR, S; KAPADNIS, B. Virulence factors of *Campylobacter*. The Internet **Journal of Microbiology.** [online], v.3, n.2, 2007. Disponível em: [http://www.ispub.com/journal/the\\_internet\\_journal\\_of\\_microbiology/volume\\_233\\_number\\_2\\_27/article/virulence\\_factors\\_of\\_campylobacter.html](http://www.ispub.com/journal/the_internet_journal_of_microbiology/volume_233_number_2_27/article/virulence_factors_of_campylobacter.html) .Acesso em: 28 fev 2014.
- BLANCO, M; BLANCO, J. E; RODRÍGUEZ, E; ABALIA, I; ALONSO, M. P; BLANCO, J. Detection of virulence genes in uropathogenic *Escherichia coli* by

polymerase chain reaction (PCR): comparison with results obtained using phenotypic methods. **Journal Microbiology Methods**. 31: 37-43, 1997

BOEHM, D. F; WELCH, R. A; SNYDER, I. S. Calcium is required binding of *Escherichia coli* hemolysin (HlyA) to erythrocyte membranes. **Infection Immunity**. v.58, p. 6, p: 1951-1958, 1990.

BOUFLEUR, R. ***Campylobacter jejuni* em frangos de corte, carne e vísceras de frango no Rio Grande do Sul e efeito do congelamento sobre a contaminação nos cortes**. 2009. 47p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Santa Maria.

BUTZLER, J. P; DEKEYSER, P; DETRAIN, M. DEHAEN, F. Related vibrios in stools. **Journal of Pediatrics**. n.32, p. 493-95, 1973.

BRASIL. Instrução Normativa n.70, de 06 de outubro de 2003. **Programa de redução de patógenos – monitoramento microbiológico, controle de *Salmonella* sp. em carcaças de frangos e perus** 2003. Disponível em: [http://www.avisite.com.br/legislação/in\\_70\\_reduc\\_patogenos.asp](http://www.avisite.com.br/legislação/in_70_reduc_patogenos.asp). Acesso em 19/02/2014.

BUTZLER, J. P. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. **Clinical Microbiology and Infection**. n.10, p. 868-876, 2004.

CANALS, I; ROSSEL, A. ***Campylobacteriosis* en aves de corral** [on-line], 2002. Ciências Veterinárias. Catalunya, Espanha. Disponível em: [http://www.colvet.es/infovet.ene02/ciencias\\_v/articulo1.htm](http://www.colvet.es/infovet.ene02/ciencias_v/articulo1.htm) [acesso em 28/12/13].

CHART, H; JENKINS, C; SMITH, H. R; HEDGES, D; ROWE, B. Haemolysin production by strain of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. **Microbiology**, 144: 103-107, 1998.

CARBONELL, G.V; VIDOTTO, M. C. Virulence factors in *Serretia marcescens*: cell bound hemolysin and aerobactin. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 25:1-8, 199.

CARVALHO, A. C. F. B; CORTEZ, A.L.C. Contaminação de produtos avícolas industrializados e seus derivados por *Campylobacter jejuni* e *Salmonella* sp. **Ars Veterinária**. Jaboticabal, v.19, n.1, p.57-62. 2003. Disponível em: <http://www.arsveterinaria.org.br/arquivo/2003/v.19,%20n.1,%202003/57-62.pdf>. Acesso em: 08/01/2014.

CARVALHO, A.F; SILVA, D. M; AZEVEDO, S. S; PIATTI, R. M; GENOVEZ, M. E; SCARCELLI, E. Detecção dos genes da toxina citotética distensiva em estirpes de *Campylobacter jejuni* isoladas de carcaças de frangos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootec**.v.62, n.5, p.1054-1061. 2010.

CORTEZ, A. L. L; CARVALHO, A. C. F. B; SCARCELLI, E; MIYASHIRO, S; VIDAL-MARTINS, A. M. C; BÜRGER, A. P. Survey of chicken abattoir for the presence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **Revista inst. Med. Trop. São Paulo**. v.48, p.307-310. 2006.

DASTI, J.I; TAREEN, A.M; LUGERT, R; ZAUTNER, A.E; GROB, U. *Campylobacter jejuni*: A brief overview on pathogenicity – associated factors and disease-mediating

mechanisms. **International Journal of Medical Microbiology**. n.300, p.205-211. 2010.

DATTA, S; NIWA, H; ITOH, K. Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler and bovine faeces. **Journal of Medical Microbiology**. v.52, p.345-348. 2003.

DHA (DEPARTMENT OF HEALTH AND AGEING) Monitoring the incidence and causes of diseases potentially transmitted by food in Australia: Annual Report of the OzFoodNet Network, 2010. Online. Acessado em 19 de fevereiro de 2014. Disponível em: [http://www.health.gov.au/internet/main/publishing.nsf/content/cda-cdi3603-pdf-cnt.htm/\\$FILE/cdi3603a.pdf](http://www.health.gov.au/internet/main/publishing.nsf/content/cda-cdi3603-pdf-cnt.htm/$FILE/cdi3603a.pdf).

DOYLE, M. P. *Campylobacter jejuni*. In: OBLINGER, J.L. (Ed). **Bacteria associated with foodborne disease: A scientific stratus sumarry**. Chicago: IFT, 1988, p. 1-18.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations Worlds Helth Organization. *Salmonella* and *Campylobacter* in chicken meat.meeting Report 2009.**Microbiological Risk assessment series**.69p.2009.

FEISTEL, J. C; REZENDE, C. S. M; OLIVEIRA, J. J; OLIVEIRA, A. P; MOREIRA, N.M. Mecanismos de patogenicidade de *Campylobacter* spp. isoladas em alimentos. **Enciclopédia Biosfera**. Centro Científico Conhecer. v.9, n.17, p.1861-1882. 2013.

FREITAS, J.A; NORONHA, G.N. Ocorrência de *Campylobacter* spp. em carne e miúdos de frango exposto ao consumo em Belém, Pará. **Arquivo de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.59,n.3,p.813-815. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v59n3/a38v59n3.pdf>. Acesso em: 09/jan/2014.

FOX, J. G. In vivo models of enteric Campylobacteriosis: natural and experimental infections. In: I Nachamkin, M J Blaser, L S Tompkins. ***Campylobacter jejuni: Current Status and Future Trends***. Washington: Americam Society for Microbiology. p.131-38, 1992.

FRANCHIN, P. R. **Ocorrência de *Campylobacter* termofilicos em pontos antes do abate e durante o processamento de frangos de corte**. 2004. 77p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina

FROST, J. A. Current epidemiological issue in human campylobacteriosis. **Journal of Applied Microbiology**. n.90, p. 85S-95S, 2001.

FSA (FOOD STANDRS AGENCY). **Food disease strategy 2010-15. United Kingdom, 2011**. Online. Disponível em: <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs2015.pdf>. Acesso em 09/01/2014.

GILLESPIE, I. A; O'BRIEN, S. J; FROST, J. A; ADAK, G. K; HORBY, P; SWAN, A. V; PAINTER, M.J; NEAL, K.R. A case-case comparison of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* infection: a tool for generating hypotheses. **Emerg. Infect. Dis**. v.8, n.(9), p.937- 942, 2002.

HADDEN, R. D. M; GREGSON, N. A. Guillain-Barré Syndrome and *Campylobacter jejuni* infection. **Journal of Apllied Microbiology** n.90, p. 145S-154S, 2001.

- HANNEL, I; BORRMANN, E; MULLER,J; ATLER,T. Relationships between bacterial genotypes and in vitro virulence properties of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from Turkeys. **Journal of Applied Microbiology** .Oxford, G.B. v.102, p.433 -441. 2007.
- HOLT, J. G KRIEG, N.R; SNEATH, P. H. A; STALY, J. T; WILLIAMS, S. T. Grupo 2 aerobic/microaerophilic, motile, helical/vibrioid Gram negative bacteria. **Bergey's Manual of determinative bacteriology**. 9 ed. Baltimore, Williams e Wilkins, p. 41-61. 1994.
- HOSSAIN, A; STEWART-TULL, D. E. S. & FREER, J. H. Heat-labile and heat-stable haemolysins of *Campylobacter jejuni*. **FEMS Immun. Med. Microbiol.** n.6, p. 331-340, 1993.
- JEON,B; ITOH,K; RYU,S. Promoter analysis of cytolethal distending toxin genes (*cdtA*, B and C) and effect of *luxS* mutation on CDT production in *Campylobacter jejuni*. **Microbiology and Immunology**.Tokyo.v.49, n.7, p.599-603. 2005.
- JONES, K. *Campylobacters* in water, sewage and the environment, **Journal of Applied Microbiology**. n.90, p. 68S-79S. 2001.
- KABIR, S. M.L; KIKUCHI, K; ASAKURA, M; SHIRAMARU, S; TSURUAKA, N; GOTO, A; HININOYA, A; YAMASAKI, S. Evaluation of Cytolethal Distending Toxin (*cdt*) gene-based species-specific Multiplex PCR assay for the identification of *Campylobacter* strains isolated from diarrheal patients in Japan. **Jpn.J.Infect.Dis.** n.64, p.19-27.2011.
- KETLEY, J. M. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. **Microbiology**. n.143,p. 5-21. 1997.
- KUANA, S.L; dos SANTOS, L. R; RODRIGUES, L. B; do NASCIMENTO, V. P. Sistema Api Campy para caracterização de amostras de *Campylobacter* isoladas de descarga cecal, fezes, swabs cloacais e carcaças de frango de corte. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.76, n.2, p.273-277. 2009. Disponível em: [http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v76\\_2/kuana.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v76_2/kuana.pdf). Acesso em: 08/01/14.
- LARA-TEJERO, M; GALÁN, J. E. *CdtA*, *CdtB*, and *CdtC* from a tripartite complex that is required for cytolethal distending toxin activity. **Infect Immun**. v.69, n.7, p. 4358-4365, 2001.
- LAURIA-FILGUEIRAS, A. L. **Circulação de espécies termofílicas de *Campylobacter* em primatas não humanos mantidos em cativeiro**. Rio de Janeiro, 2000. [Tese de Doutorado em Biologia Parasitária – Fundação Oswaldo Cruz]. 82f.
- LINTON, D; KARLYSHEV, A. V; WREN, B. W. Deciphering *Campylobacter jejuni* cell surface interactions from the genome sequence. **Curr.Opi.in.Microbiol.** n.4, p.35-40.2001.
- LIOR, H. A new extended biotyping scheme for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and "*Campylobacter laridis*". **Journal of Clinical Microbiology**. 20: 636-640, 1984.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Online: [www.agricultura.gov.br/aniaml/especies/aves](http://www.agricultura.gov.br/aniaml/especies/aves). Acesso em 06/01/2014.

MARTINEZ, I; MATEO, E; CHURRUCA, E; GIRBAU, C; FERNANDEZ-ASTORGA, R. A. A. Detection of *cdtA*, *cdtB* and *cdtC* genes in *Campylobacter jejuni* by multiplex PCR. **International Journal of Medical Microbiology**. v.296, n.1.p.45-48.2006.

MEDEIROS, V. M. **Implantação de metodologia de pesquisa de *Campylobacter* spp. no setor de alimentos do departamento de microbiologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS**. 47p. Monografia (Especialização). Fundação Oswaldo Cruz. 2009

MEDEIROS, V. M. **Isolamento e identificação fenotípica e molecular das espécies termofílicas de *Campylobacter* a partir de frango resfriado**. 2011. 94p. (Mestrado). Fundação Oswaldo Cruz. Disponível em: <http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CDAQFjAA&url=http%3A%2F%2Fseses.icict.fiocruz.br%2Fildbi%2Fdocsonline%2Fget.php%3Fid%3D319&ei=KlK6ULbaBJOc8wSw4Ag&usq=AFQjCNHgVZhGH6T6EngPYF8UZyCD91jMNA&sig2=x2koVdOLFX1JVVoAg2pm5g>. Acesso em 08/01/2014.

MELO, R.T; FONSECA, B. B; COELHO, L. R; MENDONÇA, E. P; MONTEIRO, G.P; CHAGAS, L. G. S; ROSSI, D.A. Prevalência de *Campylobacter* spp. em frangos de corte e reprodutoras pesadas. Conferencia Apinco. **Anais do Premio Lamas**. 2011.

MICROBIOLOGICAL SAFETY OF FOOD FUNDERS GROUP [MSFFG]. UK publicly funded research relating to *Campylobacter*.2008. Disponível em: <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/campylobacte2.PDF>. Acesso em 28/01/2014.

MISAWA, N; HIRAYAMA, K; ITOH, K; TAKAHASHI, E. Detection of alfa and beta - hemolytic – like activity from *Campylobacter jejuni*. **Journal of Clinical Microbiology**. v.33,n.3, p.729-731.1995.

MOONEY, A; CLYNE, M; CURRAN, T; DOHERTY, D; KILMARTIN, B; BOURKE, B. *Campylobacter upsaliensis* exerts a cytolethal distending toxin effect on HeLa cells an T lymphocytes. **Microbiology**.n.147,p.735-743.2001.

MORAN, A. P; PENNER, J. L. Serotyping of *Campylobacter jejuni* based on heat stable antigens relevance, molecular basis implications in pathogenesis. **Journal of Applied Microbiology**. n.86, p.361-377.1999.

NACHAMKIN, I. *Campylobacter* and *Arcobacter*. In P. Murray., E. J. Baron., C. F. Tenover., R. H. Tenover. **Manual of Clinical Microbiology**. 6th edition, p. 483-491, 1995.

NEWELL, D. G. Animal models of *Campylobacter jejuni* colonization and disease and the lessons learned from similar *Helicobacter pylori* models. **Journal of Applied Microbiology**. 90: 57S-67S, 2001.

NICHOLSON, M. A; PATTON, C. M. Evaluation of disk method for hippurate hydrolysis by *Campylobacter* species. **Journal of Clinical Microbiology**. v.33, n.5, p.1341-43, 1995.

ON, S. L. W. Identification methods for *Campylobacters*, *Helicobacters*, and related organisms. **Clinical Microbiology**. v. 9, n.3, p. 405-422. 1996.

ON, S. L. W. Taxonomy of *Campylobacters*, *Arcobacter*, *Helicobacters*, and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns. **Journal of Applied Microbiology**. n.90,p.: 1S-15S, 2001.

OVERELL, J. R; WILLISON, H. J. Recent developments in Miler Fisher syndrome and related disorders. **Curr. Opin. Neurol**. n.18, p. 562-566. 2005.

PANCORBO, P. L; PABLO, M. A; ORTEGA, E; GALLEGO, A. M; ALVAREZ, C; CIENFUEGOS, G.A. Evaluation of cytokine production and phagocytic activity in mice infected with *Campylobacter jejuni*. **Current Microbiology**. n.39,p. 129-133. 1999.

PATHOGENIC MICROBIOLOGY. **Campylobacter**. University of Maryland, 2000. Disponível em: <http://www.life.umd.edu/classroom/bsci424/PathogenDescriptions/Campylobacter.htm>. Acesso em: 20/12/2013.

PATTINSON, M. Practical intervention strategies for *Campylobacter*. **Journal of Applied Microbiology**. n.90, p.121S-125S. 2001.

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

PERDONCINI, G. **Prevalência de *Campylobacter jejuni* e *C. coli* em carcaças de aves após o pré-resfriamento por imersão**. 35p. Monografia (Especialização em Produção, Tecnologia e Higiene de Produtos de Origem Animal), Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2012.

PICKET. C. L. *Campylobacter* toxins and their role in pathogenesis. In: Nachamkin, I. & Blaser, M. J. **Campylobacter**. 2nd. Washington, D. C.: ASM Press p.3-26, 2000.

PRENCIPE,V; PARISCIANI, G;CALISTRI, P; CAPORALE, C.M; IANNITTO,G; MORELLI,D; POMILIO,F; PROCHOWSKI,D; MIGLIORATI,G. Thermotolerant *Campylobacter* in poultry meat marketed in the Abruzzo and Molise regions of Italy:prevalence and contaminations levels. **Veterinaria Italiana**.Teramo.v.43, n.1,p.157-165.2007.

PURDY, D; BUSWELL, C. M; HODGSON, A. E; MCALPINE, K; HENDERSON, I; LEACH. S. A. Characterization of cytolethal distending toxin (CDT) mutants of *Campylobacter jejuni*. **J. Med. Microbiol**. n.49, p. 473-479, 2000.

RICCIARDI, I. D; FERREIRA, M. C. S; OTTO, S. S; OLIVEIRA, N; SABRA, A; FONTES, C. F. Thermophilic *Campylobacter* associated diarrhoea in Rio de Janeiro. **Rev. Bras. de Pés. Méd. e Biol**. n.12, p. 189-191, 1979.

ROHNER, P; PITTET, D; PEPEY, B; NIJE-KINGE, T; AUCKENTHALER, R. Etiological agents of infectious diarrhea: implications for request for microbial culture. **Journal of Clinical Microbiology**. v.35, p.6, p.1427-1432. 1997.

ROWE, G. E; WELCH, R. A. Assays of hemolytic toxins. **Meth. Enzymol**. v.235, p.657-667, 1994.

- ROZYNEK, E. DZIERZANOWSKA-FRANGAT, K; JOZWIAK,P; POPOWSKI,J; KORSKAK, D; DZIERZANOWSKA, D. Prevalence of potential virulence markers in Polish *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates obtained from hospitalized children and from chicken carcasses. **Journal of Medical Microbiology**.London.v.54, p.615-619. 2005.
- RUSSEL, R. G; SARMIENTO, J. I; FOX, J; PANIGRAHI, P. Evidence of reinfection with multiple strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in *Macaca nemestrina* housed under hyperendemic conditions. **Infect. Immun.** v.58, n.7, p. 2149-55. 1990.
- RYCKE, J. D; OSWALD, E. Cytolethal distending toxin (CDT): a bacterial weapon to control host cell proliferation? **FEMS Microbiol. Letters.** n.203,p.141-148. 2001.
- SANTOS, I.L; FONSECA, B.B; ROSSI, D.A; SILVA, P.L; BELETTI, M.E. Alteração da mucosa intestinal de embriões de galinhas (*Gallus gallus*)provocadas por *Campylobacter jejuni*. Conferência Apinco. **Anais Prêmio Lamas.** 2011.
- SCALLAN, E; HOEKSTRA, R.M; ANGULO, F.J; TAUXE, R.V; WIDDOWSON, M.A; ROY, S.L; JONES, J.L; GRIFFIN, P.M. Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. **Emerg.Infect.Dis.** n.17, p.7-15. 2011.
- SCHMITT, C.K; MEYSICK, K.C; O'BRIEN,A.D. Bacterial toxins:friends or foes? **Emergin of Infectious Diseases.** v.5, n.2, p.224-234. 1999.
- SCHULZE, F; HANEL, I; BORRMANN, E. Formation of cytotoxins by enteric *Campylobacter* in humans and animals. **Zent. Bakteriol.** n.288, p. 225-236. 1998.
- SHANE, S. M; STERN, N. J. *Campylobacter* infection. In: SAI F, Y.M. **Diseases of poultry.** 11ed. Ames: Iowa State Press. Cap.17,p.615-625. 2003.
- SKIRROW, M. B. *Campylobacter* enteritis: a new disease. **Br. Med. J.** n.2, p. 9 -11. 1977.
- SMITH, J.L; BAYLES, D.O. The contribution of cytolethal distending toxin to bacterial pathogenesis. **Critical reviews in microbiology.** Pennsylvania. [online]. v.32, n.4, p227-248.2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17123907>. Acesso em 20/02/2014.
- SNELLING, W. J., MATSUDA, M., MOORE, J.E., DOOLEY, J. S. G. Under the Microscope – *Campylobacter jejuni*. **Lett. Appl. Microbiol.** n.41, p. 297-302. 2005.
- SILVA, J; LEITE, D; FERANDES, M; MENA, C; GIBBS, P. A; TEXEIRA, P. *Campylobacter* spp. as foodborne pathoge: a review. **Frontiers in Microbiology.** v.2, p.1-12. 2011.
- SIMI, S. **Caracterização físico – química e biológica de uma hemolisina de baixo peso molecular produzida por linhagem clínica de Enterobacter cloacae.** Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas. 2004.72f.
- TALUKDER, K.A; ASLAM, M; ISLAM, Z; AZM, I.J; DUTTA, D.K; HOSSAIN, S; NUR-E-KAMAL, A; NAIR,G.B; CRAVIOTO,A;SACK,D.A; ENDTZ, H.P. Prevalence of virulence genes and cytolethal distending toxin, production in *Campylobacter jejuni*

- isolates from diarrheal patients in Bangladesh. **Journal of Clinical Microbiology**. Washington. v.4, n.4, p.1485-1488. 2008.
- TAY, S. T; DEVI, S; PUTHUCHEARY, S; KAUTNER, I. In vitro demonstration of the invasive ability of *Campylobacter*s. **Zbl. Bakt.** n. 283, p. 306 - 313. 1996.
- THEOPHILO, G.N.D; JAKABI,M. *Campylobacter* spp.: Diagnóstico Laboratorial – métodos clássicos e moleculares. Capacitação Integrada. **Who Global Salm-surv**. Nível III. 35p. 2008
- THOMÉ, J.D S. **Citotoxinas e hemolisinas produzidas por *Campylobacter jejuni* isolados de diferentes origens**. Dissertação de mestrado. 88f. Universidade Estadual de Campinas. 2006.
- THORNLEY, J. P; JENKINS, D; NEAL, K; WRIGHT, T; BROUGH, J; SPILLER, R. C. Relationship of *Campylobacter* toxigenicity In Vitro to the development of post infectious irritable bowel syndrome. **Journal Infectious Dis**. n.184, p. 606-611. 2001.
- UBABEF. União Brasileira De Avicultura. [www.ubabef.com.br](http://www.ubabef.com.br). Acesso em 15/12/2013.
- VAN VLIET, A. H. M; KETLEY, J. M. Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. **Journal Applied Microbiology**. n.90, p. 45S-56S, 2001.
- VANDAMME, P; DE LEY, J. Proposal of a new family, *Campylobacteraceae*. **Inter. Journal Syst. Bacteriology**. n.41, p. 451-55. 1991.
- VANDAMME, P. Taxonomy of the family *Campylobacteriaceae*. In: I Nachamkin & M. J Blaser. **Campylobacter**. Washington, D.C:ASM Press, 2nd edition. p. 3-26. 2000.
- VAN DEUN, K; HAESBROUCK, F; HEYNDRIKX, M. FAVOREEL, H; DEWULF,J; CELEN,L; DUMEZ,L; MESSENS,W; LELEU, S; IMMERSEEL,F .V; DUCATELLE,R; PASMANS, F. Virulence properties of *Campylobacter jejuni* isolates of poultry and human origin. **Journal Medical Microbiology**. v.56, p.1284-1289. 2007.
- VUGIA, D; CRONQUIST, A; HADLER,J; TOBIN-D' ANGELO, M; BLYTHE, D; SMITH, K; THORNTON, K; MORSE, D; CIESLAK, P; JONES, T; VARGHESE, R; GUZEWICH, J; ANGULO, F; TAUXE, R; DUNN, J. Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food – 10 sites. United States, 2004. **M M W R** v.54, n.14, p.340-343. 2005.
- WARDAK, S; SZYCH, J. Prevalence of pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* isolated from humans in Poland between 2003-2005. **Med. Dosw. Mikrobiol**. v.58, p.217-222. 2006.
- WASSENAAR, T. M. Toxin production by *Campylobacter* spp. **Clinical. Microbiology Review**. v.10, n.3, p.466-476. 1997.
- WASSENAAR, T. M; NEWELL, D. G. Genotyping of *Campylobacter* spp. **Appli. Environ. Microbiol**. v.66, n.1, p. 1-9. 2000.
- WIECZOREK, K; OSEK, J. Identification of virulence genes in *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolates by PCR. **Bull Vet Inst Pulawy**.v.52, p.211-216. 2008.

WOOLDRIDGE, K. G; KETLEY, J. M. Campylobacter-host cell interactions. **Trends in Microbiol.** v.5, n.3, p.96-102. 1997.

YOUNG, K.T; DAVIS.L.M; DIRITA,V.J. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. **Nature reviews microbiology.** v.5, n.9, p.665-679. 2007.

ZHANG, Q. Campylobacteriosis. In: SAIF, Y.M (Ed). **Diseases of Poultry.** 12ed.Iowa: Brackwell Publishing. p.675-690. 2008.