

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

DETECÇÃO DE GENES ASSOCIADOS À VIRULÊNCIA EM CEPAS DE
Campylobacter jejuni DE ORIGEM AVIÁRIA E HUMANA

LEONARDO MOREIRA LIMA

PORTO ALEGRE, 2016

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

DETECÇÃO DE GENES ASSOCIADOS À VIRULÊNCIA EM CEPAS DE
Campylobacter jejuni DE ORIGEM AVIÁRIA E HUMANA

LEONARDO MOREIRA LIMA

Dissertação apresentada como requisito
para a obtenção de grau de Mestre em
Ciências Veterinárias na área de
concentração em Medicina Veterinária
Preventiva e Patologia, da
Universidade Federal do Rio Grande
do Sul

Orientador: Vladimir Pinheiro do
Nascimento

PORTO ALEGRE, 2016

CIP - Catalogação na Publicação

Lima, Leonardo Moreira
DETECÇÃO DE GENES ASSOCIADOS À VIRULÊNCIA EM CEPAS
DE *Campylobacter jejuni* DE ORIGEM AVIÁRIA E HUMANA /
Leonardo Moreira Lima. -- 2016.
46 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, 2016.

1. Saúde Pública. 2. Campilobacteriose. 3.
Sanidade Avícola. 4. *Campylobacter jejuni*. 5. Genes
de virulência. I. Nascimento, Vladimir Pinheiro do,
orient. II. Título.

LEONARDO MOREIRA LIMA

DETECÇÃO DE GENES ASSOCIADOS À VIRULÊNCIA EM CEPAS DE
Campylobacter jejuni DE ORIGEM AVIÁRIA E HUMANA

Aprovado em 28 de abril de 2016

APROVADO POR:

Prof. Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Gustavo Perdoncini
Membro da Comissão

Prof. Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes
Membro da Comissão

Profa. Dra. Laura Beatriz Rodrigues
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor orientador Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento e demais professores do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes e Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle;

À minha família em especial à minha mãe Nilza Maria Keenan Moreira;

Aos professores Dra. Laura Beatriz Rodrigues e Dr. Gustavo Perdoncini;

Aos colegas e amigos do CDPA Daiane Carvalho, Flávia Fortes, Gabriela Zottis Chitolina, Juliana Herpich, Karen Apellanis Borges, Leonardo Isolan, Mariana Paravisi, Sara Gehlen, Silvio da Silveira Rocha, Thales Quedi Furian, Yuli Melissa Sierra Arguello;

Aos amigos e antigos colegas de CDPA Elisar Camilotti, Gabriel Luz, José Volnei Ávila, Saulo Marques Pasko e Thiago Moreira Tejkowsky;

Ao amigo e colega de pós-graduação Matheus Bianchi Viezzer;

Aos amigos Júlio Henrique Ely Zibetti, Nara Cledi Rodrigues e Vinícius Dias Mathies;

Aos funcionários do PPGCV e demais funcionários da UFRGS que sempre me atenderam com austeridade e dedicação;

Obrigado a todos pelos ensinamentos, apoio, exemplos e cordialidade.

*“Lembre-se de que ninguém vence sozinho.
Tenha gratidão no coração e reconheça prontamente aqueles que o ajudaram”*

Johnny De' Carli

RESUMO

A demanda por carne de frango vem crescendo globalmente, assim como as exigências com relação à qualidade microbiológica do produto final. Associa-se a frequência de *Campylobacter* spp. em aves às enterites em humanos. O principal reservatório do agente é o trato digestivo de animais de diversas espécies, como aves de corte. *Campylobacter* spp. possui ampla diversidade genotípica e fenotípica, e apresentam diversos mecanismos de virulência para se aderir e colonizar o epitélio intestinal no hospedeiro. Apesar de o controle sanitário e biossegurança implementados nas granjas refletirem na redução de contaminação das carcaças no matadouro-frigorífico, esses procedimentos não eliminam o *Campylobacter* completamente das aves, podendo comprometer a qualidade microbiológica do produto final e propiciar casos de toxinfecção de origem alimentar aos consumidores. Esse trabalho tem como objetivo verificar a ocorrência de seis genes de virulência de *Campylobacter jejuni* em amostras de carcaças de frango e em casos de campilobacteriose em humanos. Foram avaliadas 50 amostras de *C. jejuni*, das quais 25 eram de origem aviária, provenientes da coleção do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA - UFRGS), e 25 eram de origem humana, cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizada para detecção dos genes *iam*, *flaA*, *cdtA*, *cdtB*, *cdtC* e *wlaN*. Das amostras analisadas, 92% (23/25) de origem humana e 88% (22/25) de origem aviária foram positivas para o gene *cdtB*, 44% (11/25) de origem humana e 84% (21/25) de origem aviária para o gene *cdtA*; 20% (5/25) de origem humana e 80% (20/25) de origem aviária para o gene *flaA*; 48% (12/25) de origem humana e 76% (19/25) de origem aviária para o gene *cdtC*; 16% (4/25) de origem aviária para o gene *wlaN* e 12% (3/25) de origem humana e 4% (1/25) de origem aviária foram positivas para o gene *iam*. Em nenhuma das amostras pesquisadas de origem humana (0/25) foi observado o gene *wlaN*. Com este trabalho concluiu-se que os genes pesquisados podem estar presentes em cepas de *C. jejuni* provenientes de carne de frango e nas cepas isoladas de casos de infecção alimentar em humanos. Ainda assim, conforme os resultados apresentados, o gene *cdtB* teve maior frequência nas amostras provenientes de origem humana e aviária.

Palavras-chave: Saúde Pública, Campilobacteriose, Sanidade Avícola, *Campylobacter jejuni*, Genes de virulência

ABSTRACT

The demand for poultry meat has increased globally, as well as the microbiologic requirements of the final product. The frequency of Campylobacter spp. in poultry meat has been related to enteritis in humans. The digestive tract of several animals' species, as poultries, is the main reservoir of the agent. Campylobacter spp. has a wide genotypic and phenotypic diversity, and, in addition to that, it presents several virulence factors which allow to adhere and colonize the intestinal epithelium of the host. Although good hygienic and biosecurity practices employed at poultry farms help to reduce the carcass contamination, these procedures do not completely eliminate Campylobacter spp. at the slaughterhouses and it may affect the microbiologic quality of the final product, which may cause alimentary toxoinfection cases. This study aims to verify the occurrence of six virulence genes of Campylobacter jejuni from poultry carcasses samples and campylobacteriosis cases in humans. 50 samples of C. jejuni were evaluated, of which 25 were originated from poultry collected at the Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA - UFRGS), and 25 were originated from human samples of the Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Polymerase chain reaction (PCR) technique was employed to detect the following genes: iam, flaA, cdtA, cdtB, cdtC and wlaN. In the samples analyzed, 92% (23/25) from human origin and 88% (22/25) from poultry for cdtB gene; 44% (11/25) from human origin and 84% (21/25) from poultry for cdtA gene; 20% (5/25) from human origin and 80% (20/25) from poultry for flaA gene; 48% (12/25) from human origin and 76% (19/25) from poultry for cdtC gene; 16% (4/25) from poultry for wlaN and gene 12% (3/25) from human origin and 4% (1/25) from poultry were positive for iam gene. This study concludes that the researched genes may be present in Campylobacter from poultry meat origin and from isolates of human cases of alimentary toxoinfection. However, according to the results found, the cdtB gene had a higher frequency in samples of human and avian origin.

Key-words: Public Health, Campylobacteriosis, Poultry Health, Campylobacter jejuni, Virulence genes

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências dos <i>primers</i> utilizados para detecção dos genes pesquisados.....	26
Tabela 2. Resultado da pesquisa por genes associados à virulência de <i>Campylobacter jejuni</i> nas 25 amostras de origem humana e 25 de origem aviária.....	27
Tabela 3. Perfil genético para os genes <i>cdtA</i> , <i>cdtB</i> e <i>cdtC</i> de <i>Campylobacter jejuni</i>	28
Tabela 4. Perfil genético das amostras positivas.....	28
Tabela 5. Análise estatística pelo Teste do Qui-Quadrado.....	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotomicrografia eletrônica da penetração de *C. fetus* subsp. *jejuni* em células epiteliais no intestino de aves com ruptura da membrana..... 19

Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo com os produtos de amplificação compatíveis com os genes de virulência pesquisados. Legenda: PM = marcador de peso molecular (100pb); 1 e 2 = *flaA* (1700 pb); 3 e 4 (*multiplex* – PCR) = *cdt A* (370 pb) e *cdtC* (182 pb); 5 e 6: *cdtB* (620pb); 7 e 8: *iam* (518 pb); 9 e 10: *wlaN* (434 pb). A seta indica fragmento de 1000 pb.....27

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABPA** – Associação Brasileira de Proteína animal
- ATR** – *Adaptive Tolerance Responsention*
- CDC** – *Center for Disease Control and Prevention*
- CDPA** – Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária
- CDT** – *Citotoxina Letal Distensiva*
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico
- DTA** – Doenças Transmitidas por Alimentos
- EFSA** – *European Food Safety Authority*
- FAO** - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
- LOS** – Lipo-oligossacarídeos
- mCCDA** – Ágar *charcoal cefoperazone deoxychocolate* modificado
- pb** – pares de bases
- SGB** – Síndrome de *Guillain-Barré*
- UFRGS** – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
- WHO** – *World Health Organization*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2.1 Histórico	13
2.2 <i>Campylobacter</i> spp. no plantel brasileiro	13
2.3 Etiologia	14
2.4 Epidemiologia	16
2.5 Patogenia e sinais clínicos	17
2.6 Diagnóstico	19
2.7 Prevenção e controle	20
3. GENES DE VIRULÊNCIA	21
3.1 Genes <i>cdtA</i>, <i>cdtB</i> e <i>cdtC</i>	21
3.2 Gene <i>iam</i>	22
3.3 Gene <i>wlaN</i>	22
3.4 Gene <i>flaA</i>	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Amostragem	24
4.2 Reativação das amostras	24
4.3 Identificação dos genes do complexo CDT, gene <i>iam</i>, <i>flaA</i> e <i>wlaN</i>	24
5. RESULTADOS e DISCUSSÃO	27
7. CONCLUSÕES	35
REFERÊNCIAS	36
APÊNDICE A	44
APÊNDICE B	45
APÊNDICE C	46

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior exportador de carne de frango e segundo maior produtor do mundo, tendo produção de 13,146 milhões de toneladas do produto e o consumo *per capita* de 43,25 kg no ano de 2015 (ABPA, 2015). Com o crescimento do setor e a importância em produzir alimentos seguros, é fundamental que ocorra controle sanitário nas granjas e nas indústrias, os quais devem ser somados a estudos sobre possíveis patógenos de potencial zoonótico. Nos últimos anos, houve uma modificação no foco da segurança alimentar, antigamente voltada a resíduos químicos nos alimentos, e que atualmente passou a dar maior importância ao envolvimento de micro-organismos patogênicos para humanos nos alimentos de origem animal. Todavia, esses agentes, por vezes, são inócuos aos animais, e não necessariamente resultam em doença clínica (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

No Brasil, entre os anos de 2000 e 2014 foram notificados 9.928 surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA), com 195.753 pessoas afetadas. Em 45,66% destes surtos, o alimento relacionado não foi investigado. Alimentos de origem cárnea, tanto bovina, suína e aves, estão relacionados em 8,72% dos casos notificados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

A campilobacteriose, doença em humanos causada por *Campylobacter* spp., está entre as doenças de origem alimentar mais frequentes no mundo. Embora existam vários veículos de contaminação, a carne de frango é considerada o principal veículo alimentar para esta infecção (FAO, 2009). Em alguns países, o *Campylobacter* é isolado com maior frequência do que as salmonelas em casos clínicos de gastroenterites em humanos (WALDROUP, 1996). Segundo estudo publicado pela WHO (2015), *Campylobacter* spp. é um dos agentes mais frequentes relacionados a doenças transmitidas por alimentos.

Nas aves, *Campylobacter* spp. tem distribuição mundial e localiza-se de forma comensal no trato gastrointestinal, ou seja, na maioria dos casos, as aves não desenvolvem doença clínica (KUANA, 2008). Essas bactérias são também comensais em múltiplas espécies de animais selvagens e domésticos, e têm a capacidade de sobreviver em uma grande quantidade de ambientes (KEENER *et al.*, 2004). A infecção nos humanos ocorre através da ingestão de carnes de aves cruas ou mal cozidas, de leite não pasteurizado, do consumo de água e de alimentos de origem

animal e vegetal contaminados, além do contato direto com animais portadores (KUMAR *et al.*, 2001; SCARCELLI *et al.*, 2005).

Campylobacter spp. é hoje reconhecido como um dos principais agentes etiológicos de gastroenterite bacteriana em humanos em âmbito mundial, porém seu mecanismo patogênico não foi totalmente esclarecido. Isso se deve ao fato de que as espécies pertencentes ao gênero possuem ampla diversidade genotípica e fenotípica (LEMOS, 2010).

Essas bactérias utilizam mecanismos de virulência para se aderir e colonizar o epitélio intestinal e se desenvolverem no hospedeiro. Os genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*, que codificam a Citotoxina Letal Distensiva (CDT), e o gene *flaA*, que codifica proteínas flagelares, são considerados importantes fatores de virulência do *Campylobacter jejuni*, o qual é a principal espécie envolvida em casos confirmados de campilobacteriose. Os genes *cdtA* e *cdtC* estão relacionados com a aderência e penetração da célula hospedeira, enquanto o *cdtB* está envolvido com a produção da toxina que causa dano ao DNA através de sua atividade enzimática, sendo que a expressão dos três genes é requerida para uma plena atividade da toxina (JEON; ITOH; RYU, 2005). O gene *flaA* codifica proteínas flagelares, que auxiliam na quimiotaxia e adesão do micro-organismo nas estruturas intestinais, e também tem sido relatado em estudos com isolados de *Campylobacter* spp. em casos de infecção alimentar. A presença do gene *wlaN* é relacionada com a biossíntese e variação da estrutura do lipo-oligossacarídeo (LOS) e implicado na síndrome de *Guillain-Barré* (SGB). Com isso, induz uma resposta imunitária cruzada entre estes e o LOS presente na superfície deste microrganismo (GILBERT *et al.*, 2008). Outra região codificada pelo gene *iam*, relacionado à invasão celular, foi identificada em algumas estirpes de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* (CARVALHO *et al.*, 2001).

A presença de *Campylobacter* spp. em produtos avícolas tem colocado em pauta e evidenciado esse agente, tal como as salmonelas, em importantes comitês mundiais (PERDONCINI, 2015). Além disso, o gênero *Campylobacter* destaca-se como um dos principais agentes etiológicos de diarreia humana e lidera os relatos de DTA registrados nos Estados Unidos e em diversos países da Europa (CDC, 2016; EFSA, 2015).

Devido à crescente importância desse micro-organismo, este trabalho teve como objetivo verificar a ocorrência de seis genes de virulência (colocar os genes) de *C. jejuni*

isoladas de amostras de carcaças de frango e de casos de campilobacteriose em humanos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico

As bactérias do gênero *Campylobacter* foram descritas pela primeira vez pelo pesquisador alemão Theodor Von Escherich no ano de 1886. Em sua pesquisa foram usadas amostras provenientes de cólon de neonatos que apresentaram diarreia e morreram devido à enfermidade. Nestas amostras foram observadas microscopicamente bactérias espiraladas denominadas de *Vibrio felinus* (ESCHERICH, 1886). Em 1913, ocorreu a primeira identificação associada a abortos em ovinos, sendo confirmado através de testes realizados em 1918 quando micro-organismos bastante similares àqueles foram identificados em fetos de bovinos e denominaram de *Vibrio fetus* (MOORE, 2005). Em 1947, uma gestante sofreu um aborto causado por uma infecção que foi associada ao micro-organismo conhecido na época como *Vibrio microaerofilo*. Em 1957, a pesquisadora Elisabeth King descreveu o isolamento de um *Vibrio* spp. em sangue de crianças com diarreia (MOORE, 2005). Finalmente, no ano de 1963, o gênero *Campylobacter*, que significa bactéria encurvada, foi proposto por Sebald e Véron. Estes pesquisadores englobaram nesse gênero as bactérias antes denominadas de *Vibrio fetus*, *Vibrio jejuni* e *Vibrio coli* porque avaliaram que esses apresentavam características muito diferentes do *Vibrio* spp., tanto no metabolismo quanto na composição dos pares de bases do material genético (MOORE, 2005). *Campylobacter* spp. foi isolado pela primeira vez de pessoas com diarreia, em 1972 pelos microbiologistas Dekeyser e Butzler, através de métodos de cultivos mais eficientes para o isolamento de micro-organismos termofílicos e microaerófilos (BUTZLER, 2004). Desde então, *Campylobacter* spp. continua sendo um patógeno relacionado à enfermidade gastrointestinal em humanos em vários países (HANSSON *et al.*, 2015; JENSEN; LAWSON; LUND, 2015).

2.2 *Campylobacter* spp. no plantel brasileiro

Informações sobre a prevalência de *Campylobacter* spp. em planteis brasileiros são variáveis, assim como a outros países. Os planteis brasileiros são, na grande maioria das criações, livres das principais doenças avícolas. Todavia, *Campylobacter* spp. é considerado comensal no intestino das aves e não como um problema para avicultura no

campo, visto que não causam prejuízos aos padrões zootécnicos dos animais (BACK, 2010).

Dados sobre a ocorrência e disseminação desse agente na cadeia avícola são escassos e baseados em métodos qualitativos e não quantitativos, sendo este último uma tendência por caracterizar melhor a contaminação (PERDONCINI, 2015). Estudos realizados no Brasil demonstraram que a ocorrência desse patógeno na cadeia avícola possui variação de prevalência (GOMES *et al.*, 2006, FONSECA *et al.*, 2007, KUANA, 2008, BOUFLEUR, 2009, OLIVEIRA, *et al.*, 2013, HUNGARO *et al.*, 2014, PERDONCINI *et al.*, 2015).

Segundo Perdoncini (2015), para manter a qualidade dos produtos e atender as exigências dos mercados internacionais, o Brasil dispõe de uma ampla legislação para o controle sanitário no campo e no abate de aves de corte, porém carece de normas que abordem o controle de bactérias do gênero *Campylobacter* spp.

2.3 Etiologia

Campylobacter spp. é uma bactéria pertencente à família Campylobacteraceae, que atualmente possui 33 espécies e 14 subespécies relatadas (*List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*, 2016). Dentre essas, a espécie *C. jejuni* pode ser distinguida através da capacidade de hidrolisar o hipurato (VANDAMME, 2000). Essas bactérias têm como características serem Gram negativas, morfologia em forma de bastonetes curvos ou espiralados, com formato de “asa de gaivota” ou de “S”, com dimensão de 0,2 μm a 0,9 μm de largura e 0,5 μm a 5 μm de comprimento (BUTZLER, 2004; DUBRUYNE *et al.*, 2008). Tem melhor crescimento em ambiente de microaerofilia, com atmosfera de 5 a 7% de O₂, 10% de CO₂ e 85% de N₂ a temperatura de 41,5°C. O pH ótimo para o desenvolvimento do gênero *Campylobacter* situa-se entre 5,8 e 8,0, ficando inativos em pH inferior a 4,9 (BOXALL, 2005).

As unidades formadoras de colônias mais velhas ou estressadas apresentam formato celular cocoide, caracterizadas como “Células Viáveis, porém Não Cultiváveis” (CVNC) (DUBRUYNE *et al.*, 2008). Porém, possuem a capacidade de manter a virulência e reverter este quadro quando o meio de cultivo for adequado (OLIVER, 2005). O formato cocoide e a incorporação e/ou a formação de biofilmes permite este micro-organismo sobreviver por longos períodos em ambientes hostis (BUSWELL *et al.*, 1998). Apesar dos sistemas de água permitirem sua sobrevivência em biofilmes

junto com outros microcosmos naturais, não é frequente o isolamento na água, principalmente quando tratada. Da mesma forma, a ração é outro local que não favorece o desenvolvimento de *Campylobacter*, ou seja, não é considerado como importante fonte de infecção (HANSSON *et al.*, 2007). A grande maioria dos isolados de *Campylobacter* são móveis e apresentam somente um flagelo. Exceções são observadas no *Campylobacter gracilis*, que não é móvel, e no *Campylobacter showae*, que é multiflagelar. No entanto, a sua forma tende a alterar-se, tornando-se mais alongada, quando expostos a concentrações mais elevadas de oxigênio, o que provoca uma perda da sua capacidade de movimento (BOYSEN; KNOCHEL; ROSENQUIST, 2006). Apresentam oxidase positiva em todas as espécies, com exceção do *C. gracilis* (VANDAMME; DE LEY, 1991).

Bactérias patogênicas podem crescer em ambiente com temperatura de 37°C, próxima a dos seres humanos (QUINN *et al.*, 2005). Entretanto, bactérias do gênero *Campylobacter*, em especial *C. jejuni* e *C. coli*, por terem características termofílicas e com cultivo fastidioso (JOES, 2010), crescem melhor na temperatura de 41,5°C (BOLTON *et al.*, 1984; ISO, 2006). *C. jejuni* apresenta ainda a capacidade de adquirir tolerância adaptativa quando é submetido a estresse subletal. Este mecanismo é conhecido como ATR (*Adaptive Tolerance Response*). Ainda assim, possui habilidade de adquirir ferro, fator necessário para o desenvolvimento e virulência para o hospedeiro (KONKEL *et al.*, 2001).

A tolerância à bile é outra característica importante, pois os sais biliares são reconhecidos pela bactéria como estímulos que sinalizam o ingresso no intestino do hospedeiro. Entretanto, a bile tem atividade antimicrobiana, sendo de suma importância que o agente desenvolva estratégias para escapar desta atividade, como, por exemplo: bile porinas, bombas de efluxo, proteínas de transporte, entre outros (BHAVSAR; KAPADNIS, 2007). Para *C. jejuni* estes processos incluem transporte de nutrientes, glicosilação de proteínas e proteção contra o estresse oxidativo (ATACK, 2009).

A membrana externa permite a passagem de pequenas moléculas através das porinas e, deste modo, as proteínas presentes no espaço periplasmático são mais expostas às variações químicas do meio externo do que as proteínas citoplasmáticas (BAEK, 2011). Devido ao estresse, as proteínas do periplasma perdem sua forma original podendo formar agregados e com isso causar injúrias celulares. Para prevenir a agregação, existem proteínas auxiliadoras, chamadas de chaperonas, que fazem com que as proteínas periplasmáticas retornem ao seu estado original. As chaperonas são

sintetizadas no citoplasma e são ativadas no periplasma. A ativação depende do estímulo externo, em presença de ambientes hostis (BAEK, 2011).

2.4 Epidemiologia

Bactérias do gênero *Campylobacter* encontram-se distribuídas mundialmente (SHANE; STERN, 2003). As bactérias são comensais do trato digestivo de hospedeiros aviários, os quais normalmente não apresentam sinais clínicos, sendo a alta densidade um fator facilitador para a disseminação do agente entre as aves (ZHANG, 2008). A transmissão de *Campylobacter* spp. entre as aves ocorre principalmente por via horizontal, por meio do contato com ratos, aves selvagens, cascudinhos, moscas, cama, equipamentos, pessoas, água e equipamentos contaminados (BACK, 2010). As fontes infectantes de *Campylobacter* spp. para frangos incluem a água com a presença de biofilmes formado por esta bactéria e a associação do *Campylobacter* spp. com protozoários permitem a manutenção da contaminação (PERDONCINI, 2015).

Aves silvestres, insetos, roedores e animais de produção podem contaminar-se pela ingestão de água ou ração contaminada ou através do contato direto entre os animais. Fômites também contribuem para sua disseminação. Após os frangos serem colonizados, tornam-se a principal fonte de contaminação para humanos. (PERDONCINI, 2015).

Aproximadamente 2 a 4 dias após o início da eliminação bacteriana, 90 a 100% do lote de aves torna-se infectado, devido à alta capacidade de transmissão horizontal do agente entre as aves. Após a infecção, o frango elimina a bactéria por várias semanas (SHANE; STERN, 2003). Tanto em surtos naturais, como em condições experimentais, aves infectadas com mais de uma semana não apresentam sinais clínicos. Esses são observados apenas quando pintinhos de um dia são inoculados com *Campylobacter* spp. e consistem em diarreia e prostração (BACK, 2010).

Dados fornecidos pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, 2016) indicam que a infecção por *Campylobacter* spp. é a causa mais comum de diarreia bacteriana nos Estados Unidos da América, afetando 2,4 milhões de pessoas a cada ano. Assim, o gênero é apontado como uma das principais causas em todo o mundo, inclusive em países desenvolvidos (CDC, 2010), sendo *C. jejuni* responsável por 95% dos casos nos casos de campilobacteriose. Outras espécies termofílicas são relatadas em casos de infecção como o *C. coli*, que é responsável por 4%, e o *C. lari*, que representa

cerca de 1% dos casos diagnosticados (CDC, 2005). Em 2013, a Rede de Vigilância de Doenças Transmitidas por Alimentos Active (*FoodNet*) estimou a incidência de 13 casos diagnosticados para cada 100.000 habitantes por ano. A *FoodNet* (2013) identificou 6.611 casos de infecção, 1.010 hospitalizações e 12 mortes decorrentes do envolvimento do *Campylobacter* spp. no país norte americano (CDC, 2014). Em 2016, estima-se que sejam 14 casos para cada 100.000 habitantes por ano e que houve cerca 76 óbitos relacionados à infecção por *Campylobacter* spp. naquele país (CDC, 2016).

Na Dinamarca, 95% dos casos registrados de enterite bacteriana foram causados por *C. jejuni* (NIELSEN *et al.*, 2000). No Japão, *C. jejuni* foi responsável por 95% dos casos de intoxicação alimentar no país (ASAKURA *et al.*, 2007). Na França, bactérias do gênero *Salmonella*, associadas às espécies de *Campylobacter* foram responsáveis por causar gastroenterites em 71 a 85% de todos os casos de infecções de origem alimentar no país em 2005 (VAILLANT, 2005).

Na Europa, *C. jejuni* é o agente causador de gastroenterite mais notificado (EFSA, 2015), com cerca de 200 mil casos registrados em surtos decorrentes de *Campylobacter* spp., superando, em 4%, os dados encontrados em 2008. No Brasil, a situação ainda é pouco conhecida, uma vez que a pesquisa de *Campylobacter* spp. não é conduzida como rotina em alimentos envolvidos em casos de toxinfecção alimentar (CARDOSO, 2009).

2.5 Patogenia e sinais clínicos

Em humanos, a dose infectante da campilobacteriose é bastante baixa, sendo suficiente a ingestão de 500 células deste patógeno para a ocorrência de doença no homem (ROBINSON, 1981). O período de incubação varia de dois a cinco dias, mas pode se estender por até dez dias (WHO, 2011).

De acordo com CARVALHO (2009), *C. jejuni* pode desencadear diarreia aquosa ou muco-hemorrágica, através de quatro mecanismos de patogenicidade: motilidade, aderência, invasão e produção de toxina. A fase aguda da diarreia tem duração de até três dias, enquanto as dores abdominais podem persistir por até três semanas. A recuperação é rápida, de geralmente uma semana (SKIRROW; BLASER, 2000).

Entretanto, *Campylobacter* spp. pode provocar algumas complicações e sequelas a longo prazo, observados após o quadro clássico de campilobacteriose. Estas sequelas envolvem problemas gastrintestinais, reumatológicos (Síndrome de Reiter), pulmonares,

dermatológicos, intravasculares, renais, neurológicos e abortos (CRUSHELL *et al.*, 2004). Além disso, o *C. jejuni* é um dos responsáveis pela síndrome de *Guillain-Barré* (SGB) que é uma doença neurológica aguda e auto limitante mediada por linfócitos T contra a bainha de mielina que recobre os nervos e que resulta na inibição da atividade neural funcional (HADDEN *et al.*, 2001) e a Síndrome de Muller-Fisher (MFS), uma rara variante da GBS (DUIM *et al.*, 2000; ENDTZ *et al.*, 2000). O mecanismo de desenvolvimento dessas síndromes envolve a resposta imune ao agente com produção de anticorpos específicos voltados aos lipo-oligossacarídeos da parede. Todavia, compostos similares, com exatamente a mesma estrutura molecular, são encontrados na membrana celular das células nervosas humanas. Assim, a estrutura do lipo-oligossacarídeo de *C. jejuni* imita a estrutura molecular do gangliosídeo, e os anticorpos produzidos em reação à membrana da célula de *C. jejuni* também reagem contra a membrana das células nervosas. O resultado é o dano do nervo que evolui em paralisia característica da SGB (REES, 1995).

A campilobacteriose nas aves não apresenta sinais clínicos, diferindo de casos clínicos em seres humanos. Entretanto, nas aves, algumas associações de *C. coli* tem sido relatadas em casos de hepatites em perus (STEPHENS *et al.*, 1998), lesões necróticas de fígado causada por *Campylobacter* spp. (LEMOS *et al.*, 2015) e outras hepatites em frangos (JENNINGS *et al.*, 2011).

O período de incubação varia de dois a cinco dias, mas pode se estender por até dez dias (WHO, 2011). De acordo com CARVALHO (2009) *C. jejuni* pode desencadear diarreia, aquosa ou muco-hemorrágica, através de quatro mecanismos de patogenicidade: motilidade, aderência, invasão e produção de toxina. A fase aguda da diarreia dura até três dias e as dores abdominais podem persistir por até três semanas, porém a recuperação é rápida, de geralmente uma semana. O tratamento com antibióticos só é recomendado em casos graves da doença. Repouso e fluidoterapia são indicados para reverter a maior parte da sintomatologia desta doença, que na maioria dos casos é auto limitante (SKIRROW; BLASER, 2000).

Campylobacter spp. possui diversos mecanismos que permitem não só adaptar-se a diferentes hospedeiros (aves, gado e humanos), mas também manipular a resposta imunitária, permitindo-lhe estabelecer uma infecção crônica, mas assintomática. Entre os fatores de virulência destacam-se: a variação genética, os lipo-oligossacarídeos, a cápsula, o flagelo e o sistema de secreção associado a este, a toxina CDT e os diversos fatores implicados na adesão do micro-organismo à célula-alvo (YOUNG *et al.*, 2007).

As variações genótípicas existentes entre os isolados e as condições que o meio oferece para o desenvolvimento bacteriano são fatores que devem ser avaliados para melhor caracterizar o processo patogênico, a virulência e interação das estirpes com o hospedeiro (BACKERT *et al.*, 2013). Apesar dos mecanismos de patogenicidade ainda não estarem completamente elucidados, estima-se que os potenciais fatores de virulência deste agente são a mobilidade, quimiotaxia, adesão, invasão e produção de toxinas (SNELLING *et al.*, 2005; BHAVSAR; KAPADNIS, 2007). A Figura 1 mostra a penetração de *C. fetus* subsp. *jejuni* em células epiteliais no intestino de aves com ruptura da membrana.

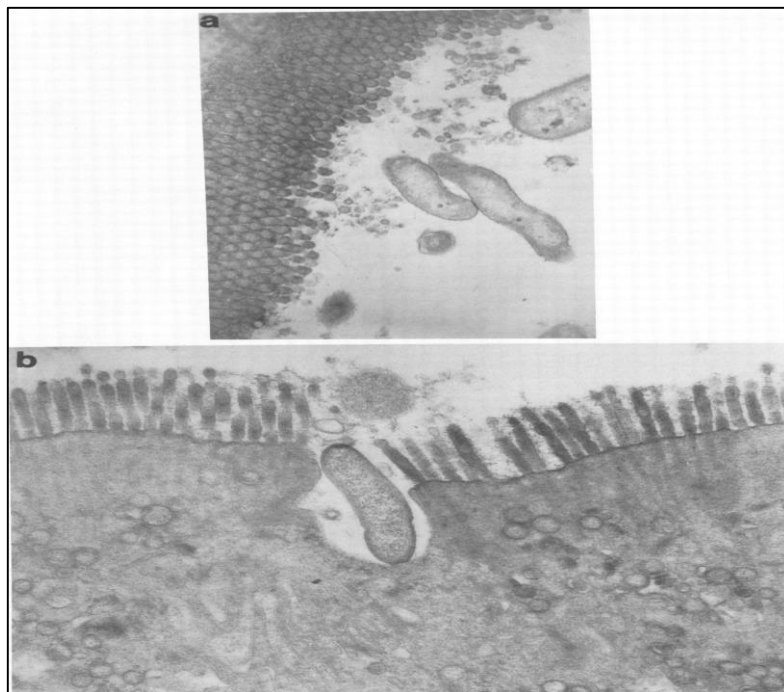


Figura 1. Fotomicrografia eletrônica da penetração de *C. fetus* subsp. *jejuni* em células epiteliais no intestino de aves com ruptura da membrana.

Fonte: Ruiz-Palacios *et al.*, 1981.

2.6 Diagnóstico

O diagnóstico definitivo de *Campylobacter* spp. pode ser realizado através da detecção desta bactéria nas fezes (BLASER; ENGBERG, 2008) por cultivo microbiológico (CDC, 2016), o qual é considerado o padrão-ouro para o isolamento e caracterização de *Campylobacter* spp. A complementação da identificação pode ser realizada com os ensaios bioquímicos e moleculares (PERDONCINI *et al.*, 2015).

Todavia, os testes bioquímicos para identificação da espécie de *Campylobacter* têm a limitação da ocorrência de estirpes com reações atípicas. Pequenas alterações na quantidade do inóculo, excesso de subcultivos, deleções no gene *hip* ou até mesmo a presença deste gene mas ausência de sua transcrição, podem interferir na correta identificação da espécie (LINTON *et al.*, 1997; KOLACKOVA; KARPISKOVA, 2005).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é o método utilizado para realizar a caracterização genotípica do agente e identificar as espécies (DENIS *et al.*, 1999). É uma alternativa que substitui a identificação através de testes fenotípicos que não apresentam padrões característicos para 100% dos isolados da espécie (ZORMAN *et al.*, 2002). Essa técnica tem se mostrado mais eficiente na recuperação de *Campylobacter* spp. em relação ao método convencional ou técnicas baseadas em ensaios bioquímicos (ALMEIDA *et al.*, 2011; MARINOU *et al.*, 2012).

2.7 Prevenção e controle

A prevenção e o controle da colonização de frangos por *Campylobacter* spp. passa pelas condições de planos de estratégias de biossegurança nas granjas. Devido à disseminação ser basicamente horizontal, não transmitida pela progênie, o foco é voltado em intervenções e estratégias para evitar a entrada do agente ou reduzir a contaminação nas propriedades avícolas (PERDONCINI *et al.*, 2015).

3. GENES DE VIRULÊNCIA

3.1 Genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*

A Toxina Citoletal Distensiva (CDT) foi primeiramente descrita em 1988 (JOHNSON; LIOR, 1988) e é um dos principais fatores de virulência do *C. jejuni*, induzindo secreção inflamatória nas células epiteliais do intestino, o que contribui para o desenvolvimento da diarreia (JEON; ITOH; RYU, 2005; ASAKURA *et al.*, 2007). A CDT é um dos fatores de virulência de *Campylobacter* mais estudados e caracterizados. Esta toxina é produzida em diversas bactérias Gram negativas, como é o caso de *Escherichia coli*, *Haemophilus ducreyi*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Shigella dysenteriae* e *Helicobacter* spp. (GE *et al.*, 2008). A CDT é determinada por um *cluster* de três genes adjacentes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* os quais codificam, respectivamente, proteínas de 30, 29 e 21 kDa (LARA-TEJERO; GALÁN, 2001).

Evidências indicam que o gene *cdtB* codifica a atividade e toxicidade dos componentes da toxina, enquanto que os genes *cdtA* e *cdtC* estão envolvidos na aderência e interiorização na célula hospedeira (ABUOUN *et al.*, 2005). A proteína produzida pelo gene *cdtB* potencializa o bloqueio do ciclo celular. 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 (DASTI *et al.* 2010).

A presença dos três genes do complexo *cdt* é requerida para plena atividade da toxina (ASAKURA *et al.*, 2007). Mutações nos genes *cdtA*, *cdtB* ou *cdtC* que possam causar perda da função em alguma das três subunidades inibem a citotoxicidade bacteriana. Sendo assim, a toxina CDT pode funcionar como um fator de virulência em patógenos que produzem essa toxina, desde que os genes estejam ativos (SMITH; BAYLES, 2006). Lee *et al.* (2003) verificaram que a combinação de *cdtB* e *cdtA* não teve nenhum efeito sobre uma determinada linhagem celular, mas a combinação de *cdtB* e *cdtC* era tão eficaz quanto a combinação das três proteínas. Estudos de competição indicaram que *cdtA* e *cdtC* se ligam ao mesmo sítio na superfície da célula (LEE *et al.*, 2003).

3.2 Gene *iam*

O gene *iam* é relacionado à invasão celular e pode ser identificado em algumas estirpes de *Campylobacter* spp. (CARVALHO *et al.*, 2001). A análise da sequência do gene *iam* apresentada por Carvalho *et al.* (2001) mostrou que o gene pode codificar um mecanismo transportador e que o *locus iam* possui polimorfismo, o que acarreta em diversidade genética de estirpes.

3.3 Gene *wlaN*

A presença do gene *wlaN* em *C. jejuni* está relacionada com a biossíntese e variação da estrutura do lipo-oligosacárideo (LOS) e implicado na SGB. A ocorrência de mutação no gene *wlaN*, que o codifica para uma galactosiltransferase, está ligado a diferenças na capacidade de colonizar o trato gastrointestinal de aves, e invadir de células Caco-2, similares às células epiteliais do intestino humano (MÜLLER *et al.*, 2006). *C. jejuni* é uma das poucas bactérias que possui a capacidade de sintetizar, de forma endógena, o ácido siálico e incorporá-lo na constituição dos LOS, mimetizando a estrutura presente em gangliosídeos humanos. Esse mimetismo pode levar ao aparecimento neuropatias autoimunes, como a SGB ou MFS, uma vez que são produzidos anticorpos contra a estrutura do LOS, ocorrendo uma reação cruzada entre estes e os gangliosídeos do hospedeiro (GUERRY; SZYMANSKI, 2008).

3.4 Gene *flaA*

O gene *flaA* codifica a formação do flagelo que favorece a motilidade, a colonização e penetração do agente nas criptas intestinais do hospedeiro. Esse codifica duas proteínas, denominadas flagelina A (codificada pelo gene *flaA*) e flagelina B (codificada pelo gene *flaB*), que parecem estar envolvidas também na adesão e na invasão às células hospedeiras. *C. jejuni* com ausência da flagelina *flaB* (*flaA+B-*), consegue se mover e produzir um filamento que possui comprimento equivalente ao de cepas selvagens. Em contraste, um *C. jejuni* que não apresenta *flaA*, um mutante (*flaA-B+*) não é móvel e produz um filamento extremamente truncado (GUERRY, 1991). Mutantes de *C. jejuni* imóveis, com flagelo incompleto ou com ausência de flagelo não conseguem colonizar o trato gastrointestinal ou requerem grandes quantidades de

inóculo, em relação às cepas móveis com flagelo completo (GUERRY, 2007; LODGE, 2007). Os flagelos desempenham um papel fundamental no processo de aderência e penetração nas células epiteliais da mucosa intestinal, bem como no processo de quimiotaxia (YOUNG *et al.*, 2007). Estudos mostram que a ausência do movimento flagelar reflete em reduzida capacidade de aderência e ausência de invasão. A interação com a microbiota intestinal é um fator que contribui para a interação da célula com o hospedeiro. A presença de lactobacilos, incluindo o *Lactobacillus acidophilus*, podem inibir a expressão por exemplo, do gene *flaA* ou interferem com outros genes, modulando a virulência das cepas (DING *et al.*, 2005).

Autores que pesquisaram a presença do gene *flaA* encontraram a frequência de até 100% nas amostras testadas, o que pode sugerir que o gene *flaA* é necessário para a colonização bacteriana do trato digestivo dos animais e permite às bactérias aderirem à superfície das carcaças de aves contaminadas (BANG *et al.*, 2001; DATTA; NIWA; ITOH, 2003; WIECZOREK; OSEK, 2008).

Observando à importância desse micro-organismo no cenário internacional e nacional em casos de toxinfecção de origem alimentar e aos poucos estudos no tocante a presença de genes de virulência de *Campylobacter* spp. em amostras de origem humana e principalmente provenientes de origem aviária, este trabalho teve como objetivo verificar a ocorrência de seis genes de virulência de *Campylobacter jejuni* isoladas de amostras de carcaças de frango e de casos de campilobacteriose em humanos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os equipamentos e estruturas físicas onde foram desenvolvidos os trabalhos pertencem ao CDPA e à UFRGS.

4.1 Amostragem

Foram analisadas 50 amostras de *Campylobacter jejuni*, sendo 25 exemplares originários de casos clínicos de campilobacteriose em humanos, cedidas cordialmente pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), e 25 amostras de origem aviária, provenientes da coleção de *Campylobacter* spp. do CDPA-UFRGS. Essas foram isoladas e identificadas a partir de carcaças de frango *in natura* coletadas em matadouros-frigoríficos da região sul do Brasil. O APÊNDICE A contém a relação da origem das amostras de origem aviária e o ano de isolamento.

4.2 Reativação das amostras

As amostras estavam armazenadas em nitrogênio líquido e foram reativadas através do cultivo microbiológico. Cada amostra foi suspensa em caldo *Brucella* e incubadas em ambiente de microaerofilia (5% O₂, 10% CO₂ e 85% N₂) por 48 h sob temperatura de 41,5 °C. Após, as amostras foram plaqueadas em ágar mCCDA modificado (CM739, Oxoid®) e incubadas em microaerofilia (5% O₂, 10% CO₂ e 85% N₂) por 48h a temperatura de 41,5°C. Depois deste período, as colônias foram coletadas das placas, suspensas em água ultrapura, transferidas para microtubos e congeladas a uma temperatura de -20 °C até o momento da extração do DNA.

4.3 Identificação dos genes do complexo CDT, gene *iam*, *flaA* e *wlaN*

O DNA das amostras foi obtido pelo método de extração térmica, conforme a técnica descrita por Borsoi *et al.* (2009), e empregados em cinco protocolos em Termociclador (Biocycler – Peltier Thermal Cycler MJ96+MJ96G) listados a seguir. Protocolo 1: identificação dos genes *cdtA* e *cdtC* através de duplex-PCR; Protocolo 2:

identificação do gene *cdtB*; Protocolo 3: identificação do gene *iam*; Protocolo 4: identificação do gene *flaA*; Protocolo 5: identificação do gene *wlaN*. Os *primers* empregados em todas as reações estão descritos na Tabela 1.

Protocolo 1: para a identificação dos genes *cdtA* e *cdtC* foram otimizados dois protocolos de PCR baseados nos trabalhos de Datta *et al.* (2003) e Wieczorek & Osek (2008). A reação final empregada possuiu 30 μL composto por um tampão 10X, 1mM de MgCl_2 , mix de 2,5mM de dNTP's, 20 pmol/ μL dos *primers*, 2 unidades de *Taq polimerase*, DNA e completado o volume final com água ultrapura. As condições de amplificação foram: desnaturação (5 min a 94 °C), 30 ciclos de desnaturação (1 min a 94 °C), anelamento (1 min a 49° C), extensão (1 min a 72 °C), seguido por extensão final (5 min a 72 °C).

Protocolo 2: para a identificação do gene *cdtB* foi otimizado protocolo de PCR baseado no trabalho de Wieczorek & Osek (2008). O controle positivo utilizado foi uma amostra clínica de *Arcobacter* sp. positiva para o gene *cdtB* e como controle negativo um *C. jejuni* negativo para este gene. A reação final empregada possuiu 30 μL composto por um tampão 10X, 1,5mM de MgCl_2 , mix de 2,5mM de dNTP's, 20 pmol/ μL dos *primers*, 2 unidades de *Taq polimerase*, DNA e completado o volume final com água ultrapura. As condições de amplificação foram: desnaturação (5 min a 94 °C), 30 ciclos de desnaturação (1 min a 94 °C), anelamento (1 min a 51 °C), extensão (1 min a 72 °C), seguido por extensão final (5 min a 72 °C).

Protocolo 3: para a identificação do gene *iam* foi otimizado o protocolo de PCR baseado no trabalho de Carvalho *et al.* (2001). O controle positivo de *C. jejuni* utilizado foi a amostra c+camp CDPA3 da coleção do CDPA/UFRGS, positiva para o gene *iam* e como controle negativo *C. jejuni* negativo para este gene. A reação final empregada possuiu 25 μL composto por um tampão 10X, 1,5mM de MgCl_2 , mix de 2,5mM de dNTP's, 20 pmol/ μL dos *primers*, 4 unidades de *Taq polimerase*, DNA e completado o volume final com água ultrapura. As condições de amplificação foram: desnaturação (5 min a 94 °C), 30 ciclos de desnaturação (1 min a 94 °C), anelamento (1 min a 55 °C), extensão (1 min a 72 °C), seguido por extensão final (5 min a 72 °C).

Protocolo 4: para a identificação do gene *flaA* foi otimizado protocolo de PCR baseado no trabalho de Ertas *et al.* (2004). O controle positivo utilizado foi *C. jejuni* ATCC 33560 e controle negativo um isolado de origem avícola de *C. jejuni*. A reação final foi composta por 25 μL com: tampão 10X, 1,2mM de MgCl_2 , mix de 2,5mM de dNTP's, 10 pmol/ μL dos *primers*, 2 unidades de *Taq polimerase*, DNA e completado

o volume final com água ultrapura. As condições de amplificação foram: desnaturação (5 min a 94 °C), 30 ciclos de desnaturação (1 min a 94 °C), anelamento (1 min e 30 s a 48 °C), extensão (01 min a 72°C), seguido por extensão final (10 min a 72 °C).

Protocolo 5: para a identificação do gene *wlaN* foi otimizado o protocolo de PCR baseados no trabalho de Linton *et al.* (2000). O controle positivo utilizado foi *C. jejuni* ATCC 33560 e controle negativo um isolado de origem avícola de *C. jejuni*. A reação final foi composta por 25µL com: tampão 10X, 1,2mM de MgCl₂, mix de 2,5mM de dNTP's, 10 pmol/µL dos *primers*, 2 unidades de *Taq polimerase*, DNA e completado o volume final com água ultrapura. As condições de amplificação foram: desnaturação (10 min a 95 °C), 25 ciclos de desnaturação (30 s a 95 °C), anelamento (30 s a 60 °C), extensão (1 min a 72 °C), seguido por extensão final (5 min a 72 °C).

Após amplificação, os produtos (*amplicons*) da PCR dos Protocolos 1, 2, 3 e 5 foram submetidos à eletroforese realizada em gel de agarose a 2% e os do Protocolo 4 realizado em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídio.

Tabela 1 – Sequências dos *primers* utilizados para detecção dos genes pesquisados.

Gene	Sequência (5'→3')	Amplicon (bp)	Referência
<i>flaA</i>	F – GGA TTT CGT ATT AAC ACA AAT GGT GC	1700	Ertas <i>et al.</i> (2004)
	R – CTG TAG TAA TCT TAA ACA TTT TG		
<i>iam</i>	F – GCG CAA AAT ATT ATC ACC C R – TTC ACG ACT ACT ATG CGG	518	Carvalho <i>et al.</i> (2001)
	F – TTA AGA GCA AGA TAT GAA GGT G R – TGC TGG GTA TAC AAA GGT TGT G		
<i>wlaN</i>	F – CCT TGT GAT GCA AGC AAT C R – ACA CTC CAT TTG CTT TCT G	434	Linton <i>et al.</i> (2000)
	F – CAG AAA GCA AAT GGA GTG TT R – AGC TAA AAG CGG TGG AGT AT		
<i>cdtA</i>	F – CGA TGA GTT AAA ACA AAA AGAT A R – TTG GCA TTA TAG AAA ATA CAG TT	370	Wieczorek; Osek (2008)
	F – CAG AAA GCA AAT GGA GTG TT R – AGC TAA AAG CGG TGG AGT AT		
<i>cdtB</i>	F – CGA TGA GTT AAA ACA AAA AGAT A R – TTG GCA TTA TAG AAA ATA CAG TT	620	Datta <i>et al.</i> (2003)
	F – CGA TGA GTT AAA ACA AAA AGAT A R – TTG GCA TTA TAG AAA ATA CAG TT		
<i>cdtC</i>	F – CGA TGA GTT AAA ACA AAA AGAT A R – TTG GCA TTA TAG AAA ATA CAG TT	182	Datta <i>et al.</i> (2003)
	F – CGA TGA GTT AAA ACA AAA AGAT A R – TTG GCA TTA TAG AAA ATA CAG TT		

5. RESULTADOS e DISCUSSÃO

As amostras de *C. jejuni* de origem aviária e humana analisadas apresentaram variação na frequência dos genes pesquisados, conforme descrito na Tabela 2. O gene *wlaN* não foi identificado em amostras de origem humana. Nenhuma amostra continha todos os genes pesquisados.

A Figura 2 apresenta a eletroforese em gel de agarose 1,5% com os produtos de amplificação visualizados por PCR para os genes de virulência pesquisados.

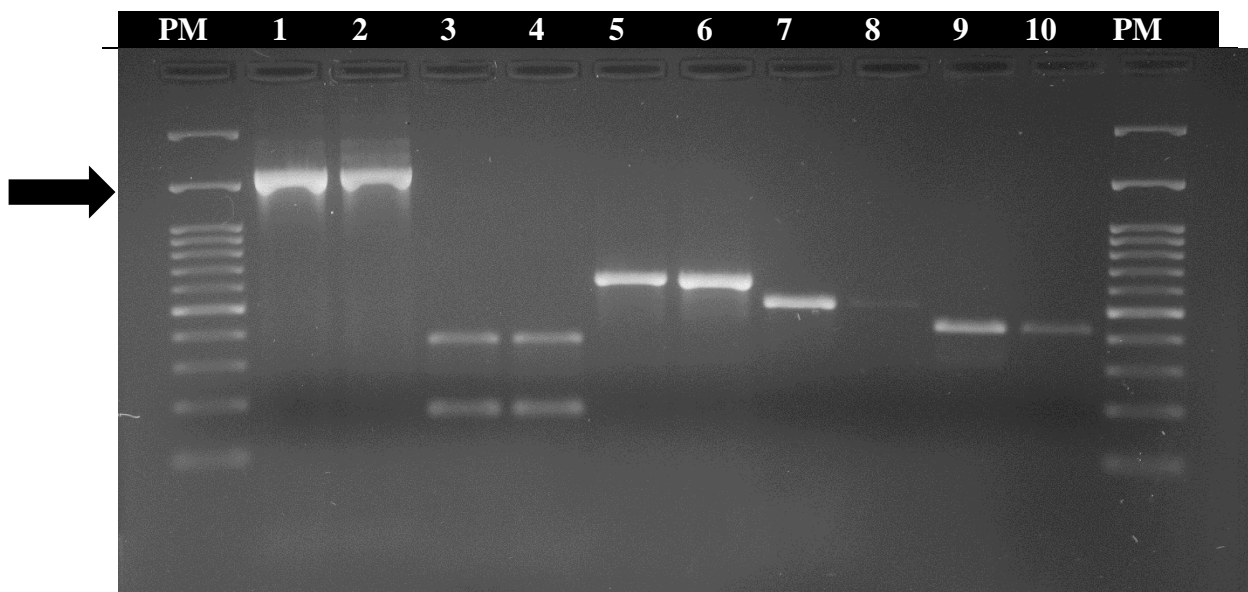


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo com os produtos de amplificação compatíveis com os genes de virulência pesquisados. Legenda: PM = marcador de peso molecular (100pb); 1 e 2 = *flaA* (1700 pb); 3 e 4 (*multiplex* – PCR) = *cdt A* (370 pb) e *cdtC* (182 pb); 5 e 6: *cdtB* (620pb); 7 e 8: *iam* (518 pb); 9 e 10: *wlaN* (434 pb). A seta indica fragmento de 1000 pb.

Tabela 2 – Resultado da pesquisa por genes associados à virulência de *Campylobacter jejuni*.

Gene	Amostras de origem humana		Amostras de origem aviária		Total Humana e aviária	
	(n=25)	(%)	(n=25)	(%)	(n=50)	(%)
<i>cdtA</i>	11	44	21	84	32	64
<i>cdtB</i>	23	92	22	88	45	90
<i>cdtC</i>	12	48	19	76	31	62
<i>iam</i>	03	12	01	04	04	08
<i>flaA</i>	05	20	20	80	25	50
<i>wlaN</i>	00	00	04	16	04	08

Em relação à presença ou ausência concomitante dos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*, os quais codificam a CDT, em amostras de origem humana e aviária estão demonstradas na Tabela 3.

Tabela 3 – Perfil genético para os genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* de *Campylobacter jejuni*.

Gene	Amostras de origem humana		Amostras de origem aviária		Total	
	(n=25)	(%)	(n=25)	(%)	(n=50)	(%)
	<i>cdtA+</i> <i>cdtB+</i> <i>cdtC-</i>	02	08	04	16	06
<i>cdtA+</i> <i>cdtB-</i> <i>cdtC+</i>	00	00	02	08	02	04
<i>cdtA-</i> <i>cdtB+</i> <i>cdtC+</i>	01	04	02	08	03	06
<i>cdtA+</i> <i>cdtB+</i> <i>cdtC+</i>	09	36	15	60	24	48
<i>cdtA+</i> <i>cdtB-</i> <i>cdtC-</i>	00	00	00	00	00	00
<i>cdtA-</i> <i>cdtB+</i> <i>cdtC-</i>	10	40	00	00	10	20
<i>cdtA-</i> <i>cdtB-</i> <i>cdtC+</i>	00	00	00	00	00	00

+ presença do gene, - ausência do gene.

A Tabela 4 apresenta a correlação dos genes positivos nas amostras estudadas.

Tabela 4 – Perfil genético das amostras positivas para os genes de virulência.

Presença do Gene	Amostras de origem humana		Amostras de origem aviária		Total	
	(n=25)	(%)	(n=25)	(%)	(n=25)	(%)
	<i>cdtA+</i> <i>cdtB+</i> <i>cdtC+</i>	09	36	15	60	24
<i>cdtA+</i> <i>cdtB+</i> <i>cdtC+</i> <i>flaA+</i>	03	12	15	60	18	36
<i>cdtA+</i> <i>cdtB+</i> <i>cdtC+</i> <i>flaA+</i> <i>wlaN+</i>	00	00	01	04	01	02
<i>cdtA+</i> <i>cdtB+</i> <i>cdtC+</i> <i>flaA+</i> <i>iam+</i>	01	04	01	04	02	04

+ presença do gene.

A Tabela 5 apresenta análise estatística pelo Teste do Qui-Quadrado, que evidencia a diferença significativa em relação à presença dos genes *flaA* e *wlaN* entre amostras provenientes de carcaça de frango e casos de campilobacteriose em humanos.

Tabela 5 – Análise estatística através do Teste Qui-Quadrado.

Gene	Humana	Animal	Teste Qui-Quadrado
	Presente	Presente	p-valor
<i>cdtA</i>	11	21	0.0771
<i>cdtB</i>	23	22	0.88209
<i>cdtC</i>	12	19	0.20862
<i>iam</i>	3	1	0.31731
<i>flaA</i>	5	20	0.0027*
<i>wlaN</i>	0	4	0.0455*

* Rejeita-se a hipótese nula de igualdade entre as proporções de amostras de origem humana e animal. Ou seja, há evidências de que há diferença significativa ao nível de 5%.

As variabilidades da presença dos genes nas amostras pesquisadas corroboram com a literatura sobre o assunto, por implicar no potencial de virulência do *C. Jejuni*. Lemos (2010), que afirmou ser o *Campylobacter* spp. reconhecido como um dos principais agentes etiológicos de gastroenterite bacteriana em humanos em âmbito mundial, porém seu mecanismo patogênico ainda não foi totalmente esclarecido. Isso se deve ao fato da ampla diversidade genotípica e fenotípica do gênero. Potenciais fatores de virulência, incluindo estruturas de superfície, estão previstos na diversidade genética que caracterizam cepas distintas de *C. jejuni* (McCARTHY *et al.*, 2007). Essas estruturas das bactérias interagem com o tecido e influenciam o *C. jejuni* a colonizar o trato gastrointestinal. (FAUCHERE *et al.*, 1986).

A incidência de *Campylobacter* em produtos avícolas varia de ausente a 100%. Todavia, a capacidade de cada isolado causar efeito patogênico em seres humanos difere entre eles (PERDONCINI *et al.*, 2015). A presença de alguns fatores intrínsecos e extrínsecos que envolvem o desenvolvimento de diarreia, febre e outros processos inflamatórios nos animais e nos seres humanos são cruciais para a infecção por *Campylobacter* (VAN VLIET; KETLEY, 2001; ZHANG *et al.*, 2010).

Cardoso (2009) relatou que a situação da prevalência de *Campylobacter* spp. no Brasil ainda é pouco conhecida, uma vez que a pesquisa por esse micro-organismo não é conduzida como rotina em alimentos envolvidos em casos de doenças de origem alimentar. Recentemente, tem aumentado o número de estudos objetivando a detecção dos genes *cdt* em estirpes de *C. jejuni* de diferentes fontes. Entretanto, a prevalência desses genes nessa espécie de *Campylobacter* isolada de diferentes reservatórios e potenciais fontes de infecção, ainda não está plenamente investigada (MARTINEZ *et al.*, 2006). Assim, são poucos os trabalhos que têm como objetivo a detecção de genes de virulência em *Campylobacter* spp. no território nacional. Estes dados tornam-se ainda mais escassos quando relacionados às amostras isoladas em aves.

No presente estudo, foram detectados os três genes envolvidos na produção da CDT sendo 44% (11/25) para o gene *cdtA*, 92% (23/25) para o *cdtB* e 48% (12/25) para o *cdtC* em amostras isoladas de casos de campilobacteriose em humanos. Em isolados de origem avícola foram encontrados para o gene *cdtA* em 84% (21/25), 88% (22/25) para o gene *cdtB* e 76% (19/25) para o gene *cdtC*. Neste estudo os três genes estiveram presentes, concomitantemente, em 36% (9/25) das amostras de humanos e 60% (15/25) em aviárias.

Em estudo realizado por Perdoncini *et al.* (2015) foi encontrado 82,85% para a presença dos três genes do *cluster* CDT - *cdtA*, *cdtB*, *cdtC* - em amostras provenientes de carne de frango. Em experimento desenvolvido por Martinez *et al.* (2006), foram analisados isolados de *C. jejuni* provenientes de humanos e animais e constataram que os isolados apresentavam uma elevada prevalência (98%) dos três genes que codificam a toxina. O mesmo foi observado por Samosornsuk *et al.* (2007), que verificaram que os três genes se encontram igualmente presentes em isolados de fezes de frangos e aves silvestres. Todavia, no presente trabalho as prevalências observadas em amostras isoladas a partir de carne de frango e de casos de humanos foram distintas....

Segundo Ripabelli *et al.* (2009), nem todas as estirpes observadas que possuem

os três genes da toxina CDT apresentaram efeitos citotóxicos em ensaios com células Hep-2. Apesar da elevada frequência dos genes pesquisados nos isolados, possivelmente nem todos possuem a capacidade de produzir uma toxina ativa. Segundo Martinez *et al.* (2006), essencialmente todas as estirpes de *C. jejuni* apresentam os genes *cdt*, e a maioria tem atividade da toxina. Porém, há exceções de isolamentos que sofrem mutação e não expressam a atividade do gene. Ainda assim, a presença desses genes no genoma das bactérias isoladas de produto avícola e humano, pode implicar benefício para o *C. jejuni*, uma vez que podem estar envolvidos em outros processos de patogenicidade através de associações com demais genes de virulência. A capacidade de aderência na mucosa intestinal, invasão e produção de toxinas são distintas entre os isolados, e caracteriza a patogenicidade de cada cepa como dependente de uma gama de fatores (FAUCHERE, 1986; GUERRY, 2007; GOMZÁLES-HEIN *et al.*, 2013).

Estudos realizados por Wieczorek e Osek (2008) identificaram 100% de amostras positivas para o gene *cdtB* a partir de isolados de *Campylobacter* de carcaças de frango. Rozynek *et al.* (2005) obteve 98,9% de amostras positivas para o gene *cdtB* a partir de isolados de frango. Rizal *et al.* (2010) verificou a partir de isolados de *Campylobacter* spp. provenientes de amostras de intestino de frango que em 20% desses o gene *cdtB* estava presente. Evidências indicam que o gene *cdtB* codifica a atividade e toxicidade dos componentes da toxina, enquanto que os genes *cdtA* e *cdtC* estão envolvidos na aderência e interiorização na célula hospedeira (ABUOUN *et al.*, 2005). 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 (DASTI *et al.*, 2010) acarretando em morte celular. No presente estudo, foi detectada a presença do gene *cdtB* nas amostras de origem humana sem a presença dos demais genes do *cluster* CDT (*cdtA* e *cdtC*) em 40% das amostras. Além disso, 36% das amostras de origem humana apresentaram o gene *cdtB* isoladamente - sem a presença dos demais genes pesquisados *cdtA*, *cdtC*, *wlaN*, *flaA* e *iam*. Esses dados sugerem que o gene *cdtB* isoladamente ou associado a gene de virulência não pesquisado no presente trabalho, possibilitaram a invasão nas células do sistema gastrointestinal e capacitaram ao desenvolvimento de lesão no hospedeiro. Corroborando essa hipótese, Jain *et al.* (2008) verificaram que a presença do *cdtB* em *C. jejuni* está associado a aderência, invasão e a toxicidade nas células Hela e o cólon é o principal local de

desenvolvimento das lesões. A mutação, deleção ou inserção de nucleotídeos podem impedir a identificação dos genes (ASAKURA *et al.*, 2007), porém estas sequências não caracterizam as cepas como não propensas a causar lesões (JAIN *et al.*, 2008).

Em estudo conduzido por Perdoncini *et al.* 2015 foi observado que amostras positivas para o *cluster* CDT mais o gene *flaA* totalizaram 25 amostras (71,42%). Segundo os autores Osek e Wieczorek (2008), o gene *flaA* tem sido relatado como essencial para a motilidade bacteriana, e consequente, adesão e colonização.

As amostras positivas para os três genes do *cluster* CDT - *cdtA*, *cdtB*, *cdtC* e gene *flaA* totalizaram 60 % (15/25) das amostras de origem aviária. Diferentemente do perfil para os outros genes, nas amostras de origem aviária, todas as que apresentaram o *cluster* CDT também continham o gene *flaA*. A motilidade mediada por flagelo e secreção de proteínas não flagelares, que modulam a virulência, são cruciais para a patogênese (GUERRY *et al.*, 2007). Todavia, a presença de lactobacilos, incluindo o *Lactobacillus acidophilus*, inibem a expressão por exemplo do gene *flaA* ou interferem com outros genes, modulando a virulência das cepas (DING *et al.*, 2005).

Na pesquisa pelo gene *flaA* foi observado que 80% (20/25) das amostras isoladas de carcaças de frango foram positivas para esse gene. Bang *et al.* (2001), Datta, Niwa & Itoh (2003) detectaram o gene *flaA* em 100% das amostras testadas, resultados que podem sugerir que o produto do gene *flaA* é necessário para a colonização bacteriana do trato digestivo dos animais e permite às bactérias aderirem à superfície das carcaças de aves contaminadas, conforme estudo relatado por Wieczorek e Osek (2008).

Nas amostras de origem humana, 20% (5/25) foram positivas para o gene *flaA* sugerindo outras vias de contaminação por cepas distintas das encontradas em carcaça de frango ou a presença de genes distintos dos pesquisados que possivelmente estariam influenciando na colonização e penetração do agente nas criptas intestinais do hospedeiro. Outras fontes de infecção por *Campylobacter* em humanos que não sejam relacionadas ao consumo da carne de aves contaminadas têm sido postuladas por autores que encontraram diferença nos padrões de susceptibilidade aos antimicrobianos entre cepas humanas e de aves (LUBER *et al.*, 2003).

Os genes *cdtA* e *cdtC* estão relacionados com a aderência e na penetração da célula hospedeira (JEON; ITOH; RYU, 2005). O gene *iam* é relacionado à invasão celular e pode ser identificado em algumas estirpes de *Campylobacter* sp. (CARVALHO *et al.*, 2001). Todavia, apenas 4% (1/25) das amostras de origem

aviária e 8% (2/25) de origem humana apresentaram os três genes concomitantemente (*cdtA*, *cdtC* e *iam*). Ainda assim, o gene *flaA*, relacionado a motilidade, a colonização e penetração do agente nas criptas intestinais do hospedeiro, estava presente em somente uma das amostras positivas para *cdtA*, *cdtC* e *iam* de origem humana e presente na amostra de origem aviária.

No presente estudo, uma amostra (1/25) de origem aviária e 12% (3/25) de origem humana foram *iam* positivas. Em estudo realizado por Rozynek *et al.* (2005) para a detecção de genes de virulência de *Campylobacter* sp., em amostras provenientes de crianças com campilobacteriose, 1,6% (1/62) foram *iam* positivas. Entretanto, em carcaças de frango, foi observado que, das 53 amostras analisadas, 7% (9/53) foram positivas para o gene. As baixas prevalências da sequência *iam* em *Campylobacter* spp. isoladas de crianças assintomáticas, observado por Carvalho *et al.* (2001), pode indicar que esse gene é um marcador da gravidade da infecção por *Campylobacter*. Ainda assim, as diferenças na distribuição de genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* e a sequência *iam* encontradas entre isolados de humano e carcaça de frango, sugere que as infecções de *Campylobacter* spp. nos pacientes pode ter outras fontes de infecção diferentes do consumo de carne de frango (ROZYNEK *et al.*, 2005).

O gene *wlaN* não foi encontrado nas amostras de origem humana, mas teve presença em 16% (4/25) das amostras de origem avícola. Em nenhuma das amostras foi observado o *wlaN* concomitante com todos os demais genes de virulência. A presença do gene *wlaN* é relacionada com a biossíntese e variação da estrutura do LOS e implicado na SGB (GILBERT *et al.*, 2008). Em 4% das amostras foi observado a presença dos genes *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*, *flaA* e *wlaN*, o que possivelmente caracterizam essa cepa com melhor habilidade para infecção, aderência e invasão, produção da toxina e lesão no DNA celular e também sinais neurológicos tardios em humanos. Müller *et al.* (2007) afirmou que estirpes que não apresentam o gene *wlaN* associado a outros genes de virulência apresenta uma menor ou total ausência de capacidade de invasão.

Em estudo conduzido por Datta *et al.* (2003) foi detectado o gene *wlaN* em 25% das amostras isoladas de casos clínicos em humano e 23,8% nas de carne de frango. Santos (2011) pesquisou genes de virulência em 50 isolados de fezes humanas e 37 de carne de frango e encontrou em todas a presença dos genes do *cluster* CDT e gene *flaA*. Para o gene *wlaN* a presença foi detectada em 19,5% dos isolados analisados. Nas amostras de carne de frango, observou-se uma baixa frequência do

gene *wlaN* em 8,1% das amostras e para origem humana o gene estava presente em 28% dos isolados. O gene *wlaN* encontrado nas amostras de carcaça de frango pode sugerir que esses são isolados com maior capacidade para induzir complicações pós-infecção em humanos, já que a presença de *wlaN* está envolvido na expressão de um tipo de oligossacárido-GM1 semelhante ao encontrado em gangliosídeos humanos; o que pode induzir a uma resposta imunitária cruzada entre estes e o LOS presente na superfície do micro-organismo (Gilbert *et al.*, 2008). Todavia, nas amostras isoladas de campilobacteriose em humanos, não foi detectado o gene. Possivelmente essas amostras possuem menor capacidade de invasão celular e complicações tardias.

Embora a porcentagem de isolados positivos para o *wlaN* tenha sido baixa ou ausente, continua sendo importante a avaliação deste e de outros genes de virulência, bem como as fontes de infecção e a resistência antimicrobiana, de forma a avaliar a prevalência de estirpes mais propensas ao desenvolvimento da SGB em humanos.

7. CONCLUSÕES

1. A técnica de PCR permitiu identificar os genes do complexo CDT, gene *iam*, *flaA* e *wlaN*;
2. As amostras de *Campylobacter jejuni* de origem aviária e humana analisadas apresentaram variação nas frequências dos genes pesquisados;
3. O gene *cdtB* foi o mais frequente observado em amostras de frangos e de origem humana;
4. O gene *wlaN* não foi identificado nas amostras de origem humana;
5. Nesse estudo houve diferença significativa na presença dos genes *flaA* e *wlaN* entre amostras provenientes de carcaça de frango e casos de campilobacteriose em humanos;
6. Em nenhuma amostra foi observada a presença de todos os genes concomitantemente.

REFERÊNCIAS

- ABPA - Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual 2015**. Disponível em: <http://www.ubabef.com.br/files/publicações/8ca705e70f0cb110aed67d29c8842.pdf> Acesso em: nov-2015.
- ABUOUN, M. *et al.* 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**, United Kingdom, [online], v. 73, p. 3053-3062, 2005.
- ALMEIDA, T.L. *et al.* Comparação entre ensaio imunoenzimático VIDAS® *Campylobacter* e reação em cadeia pela polimerase em tempo real para a detecção de *Campylobacter* spp. em carcaças e moelas provenientes de abatedouros goianos. **Anais 63º Reunião Anual SBPC**. Anais, 2011.
- ATAACK, J.M.; KELLY, D.J. Oxidative stress in *Campylobacter jejuni*: responses, resistance and regulation. **Future Microbiol**, Sheffield, [online], v. 4, p. 677–690, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19659424>. Acesso em: 12 mar. 2016.
- ASAKURA, M. *et al.* Comparative analysis of cytolethal distending toxin (cdt) genes among *Campylobacter jejuni*, *C. coli* and *C. fetus* strains. **Microbial Pathogenesis**, London, v.42, n.5/6, p.174-183, 2007.
- BACK, A. Campilobacteriose. **Manual de Doença das Aves**. 2 ed. Cascavel: Integração, p.119-122. 2010.
- BACKERT, S.; HOFREUTER, D. Molecular methods to investigate adhesion, transmigration, invasion and intracellular survival of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. **J. Microbiol. Methods** 95, 8–23 (2013).
- BAEK, K.T., *et al.* Different Contributions of HtrA Protease and Chaperone Activities to *Campylobacter jejuni* Stress Tolerance and Physiology, **Applied and Environmental Microbiology**, Copenhagen, [online], v. 77, p. 57-66, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3019702/>. Acesso em: 27 mar. 2016.
- BANG, D.D. *et al.* Prevalence of cytolethal distending toxin (cdt) genes and CDT production in *Campylobacter* spp. isolated from Danish broilers. **Journal of Medical Microbiology**, London, v.50, p.1087- 1094, 2001.
- BLASER, M.J., ENGBER, J. Clinical aspects of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* infections In: Nachamkin I. Szymanski CM, Blaser M.J. *Campylobacter*. **ASM Press**, Washinton, D.C., 2008.
- BHAVSAR, S.; KAPADNIS, B. Virulence factors of *Campylobacter*. **The Internet Journal of Microbiology**, [online] v. 3, n. 2, 2007. Disponível em: <http://ispub.com/IJMB/3/2/4606>. Acesso em: 04 mar. 2016.

BOYSEN, L.; KONOCHEL, S.; ROSENQUIST, H. Survival of *Campylobacter jejuni* in different gas mixtures. **FEMS Microbiology Letters**, n. 266, 2006, p. 152-157.

BOLTON F.J.; HUTCHINSON D.N., COATES D. 1984. Blood-free selective medium for isolation of *Campylobacter jejuni* from feces. **J. Clin Microbiol.** 19:169-171.

BORSOI, A. *et al.* An inoculation of newly hatched broiler chicks with two Brazilian isolates of Salmonella Heidelberg strains with different virulence gene profiles, antimicrobial resistance and pulsed field gel electrophoresis patterns to intestinal changes evaluation. **Poultry Science**, v. 88, p. 750-758, 2009.

BOUFLEUR. R. **Dissertação de Mestrado: *Campylobacter jejuni* em frangos de corte e efeito do congelamento de carne e vísceras de frango sobre a contaminação.** 2009. Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2009.

BOXALL, N. **Doctoral Thesis: The epidemiology of *Campylobacter jejuni* in commercial broiler flocks in New Zealand.** New Zealand: Massey University, 2005.

BUSWELL, C.M. *et al.* Extended Survival and Persistence of *Campylobacter* spp. in Water and Aquatic Biofilms and Their Detection by Immunofluorescent-Antibody and -rRNA Staining. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 64, p. 733-741, 1998.

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

CARDOSO, M. O que representam os suínos na transmissão de zoonoses para humanos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 37 (Supl 1), p. s81-s89, 2009.

CARVALHO, A.C. *et al.* Molecular characterisation of invasive and noninvasive *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates. **J Clin Microbiol** 39, 1353–1359, 2001.

CARVALHO, A. F. Detecção dos genes da toxina citoletaldistensiva (CDT) em estirpes de *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* isoladas de frangos de corte e hortaliças [online], 2009. **Dissertação (Mestrado)** – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, São Paulo, 2009. Disponível em: www.biologico.sp.gov.br/pos_graduacao/pdf/carvalho.pdf. Acesso em: 15 mar. 2016.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. **Emerging Infectious Diseases**, 2005. Disponível em: www.cdc.gov/eid. Acesso em: 10 de set de 2012.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. **Health Information for International Travel 2016**. New York: Oxford University Press; 2016. Gary W. Brunette, Editor in Chief, Centers for Disease Control and Prevention, Division of Global Migration and Quarantine.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. **National Center for Zoonotic, Vector-Borne, and Enteric Diseases**. July, 2010. Disponível em:

<http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/campylobacter/>. Acesso em: 15 nov. 2012.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention (2014) Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food — Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2006–2013. *Morb. Mortal. Wkly Rep.* 63:328-332.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. *Campylobacter*, 2016. Disponível em: [fohttp://www.cdc.gov/foodsafety/diseases/campylobacter/index.html](http://www.cdc.gov/foodsafety/diseases/campylobacter/index.html). Acesso em: 12 mar. 2016.

CHEN, B.; CLEJAN, S. Rapid preparation of tissue DNA from paraffin-embedded blocks and analysis by polymerase chain reaction. **J Histochem Cytochem**, v. 41, n. 5, p. 765-768, May 1993.

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**. v. 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.

DENIS M., *et al.* Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. **Lett Appl Microbiol** 29:406–410, 1999.

DING,W.; WANG, H.; GRIFFITHS, M.W. Probiotics down-regulate flaA sigma28 promoter in *Campylobacter jejuni*. **Journal of Food Protection**. v.68, p.2295–2300, 2005.

DUBRUYNE L., GEVERS D. & VANDAMME P. Taxonomy of the Family Campylobacteraceae. In: NACHAMKIN I. SZYMANSKI CM, BLASER M.J. *Campylobacter*. Washinton, D.C.: **ASM Press**, p. 3-25, 2008.

EFSA - European Food Safety Authority. Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007. **The EFSA Journal**, 2009, 310p.

EFSA - ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2015. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013. **EFSA Journal** 2015; v.13, n.1, 3991, 165 p.

ERTAS H.B., *et al.* Genotyping of broiler-originated *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates using fla typing and random amplified polymorphic DNA methods. **Int J Food Microbiol** 94:203–209, 2004.

ESCHERICH, T. Beitrage zur Kenntniss der Darmbakterien. III. Ueber das Vorkommen von Vibrionen im Darmcanal und den Stuhlgangen der Sauglinge. (The knowledge of

intestinal bacteria. III. On the existence of vibrios in the intestines and feces of babies.) **Münchener Med Wochenschrift**. v. 33 p. 815817, 1886.

FAUCHERE J.L. *et al.* Association with HeLa cells of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from human feces. **Infect Immun** 54:283-7, 1986.

FONSECA, B. B. *et al.* *Campylobacter* sp. em mecônio de pintainhos e em cloaca de reprodutoras de corte. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 23, n. 3, p. 128-132, May/June. 2007.

GILBERT, M.; PARKER, C.T.; MORAN, A.P.. *Campylobacter jejuni* Lipooligosaccharides: Structures and Biosynthesis. 3rd ed., **ASM Press**, Washington, DC, 2008.

GOMES, F.R.; CURCIO, B., LADEIRA, S.R.L.; FERNÁNDEZ, H.; MEIRELES, M.C.A. *Campylobacter jejuni* occurrence in chicken fecal samples from small Properties in Pelotas, southern of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.375-378, 2006.

GUERRY, P.; ALM, R. A.; POWER, M. E.; LOGAN, S. M.; TRUST, T.J. Role of two flagellin genes in *Campylobacter* motility. **Journal Bacteriology**, v. 173, p. 4757–4764, 1991.

GUERRY, P. *Campylobacter* flagella: not just for motility. Review. Trends in **Microbiology**, vol. 15, N.10, 2007.

GUERRY, P.; SZYMANSKI C.M.. *Campylobacter* sugars sticking out. Trends in **Microbiology**. p. 428-435, 2008.

HANSSON, I.; NYMAN, A.; LAHTI, E.; GUSTAFSSON, P.; ENGVALL, E. O. Associations between *Campylobacter* levels on chicken skin, underlying muscle, caecum and packaged fillets. **Food Microbiology**, v. 48, p. 178–181, 2015.

HUNGARO H. M., *et al.* Low contamination of *Campylobacter* spp. on chicken carcasses in Minas Gerais state, Brazil: molecular characterization and antimicrobial resistance. **Food Control**. 51:15–22. doi:10.1016/j.foodcont.2014.11.001, 2015.

ISO - International Standard Organization. 2006. ISO 10272-1:2006 describes a horizontal method for the detection of *Campylobacter* spp.

ISOLA, J.; DE VRIES, S.; CHU, L. *et al.* Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. **Am J Pathol**, v. 145, n. 6, p. 1301-1308, Dec. 1994.

JAIN D., PRASAD K.N., SINHA S., HUSAIN N. Differences in virulence attributes between cytolethal distending toxin positive and negative *Campylobacter jejuni* strains. **J Med Microbiol** 57:267–272, 2008.

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.

JENNINGS, J.L.; SAIT, L.C.; PERRETT, C.A.; FOSTER, C.; WILLIAMS, L.K.; HUMPHREY, T.J.; COGAN, T.A. *Campylobacter jejuni* is associated with, but not sufficient to cause vibronic hepatitis in chickens. **Veterinary Microbiology**. v. 149, p. 193-199, 2011.

JENSEN, J. D.; LAWSON, L. G.; LUND, M. Systemic cost-effectiveness analysis of food hazard reduction – *Campylobacter* in Danish broiler supply. **European Journal of Operational Research**, v. 241, p. 273–282, 2015.

JEON, B.; ITOH, K.; RYU, S. Promoter analysis of Cytolethal Distending Toxin genes (cdtA, Band C) and effect of a luxS mutation on CDT production in *Campylobacter jejuni*. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v.49, n.7, p.599-603, 2005.

JOES, L. A.; HAESEBROUCK, F.; PASMANS, F. *Campylobacter* and *Helicobacter*, In: GYLES, C. L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, G.; THOEN, C. O. Pathogenesis of bacterial Infections in animals. Iowa: Blackwell Publishing, 4 ed, 2010, p. 484-501.

JOHNSON W.M., LIOR H. A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Campylobacter* spp. *Microb Pathog* 4:115-126, 1988.

KEENER, K.M.; BASHOR, M.P.; CURTIS, P.A.; SHELDON, B.W.; KATHARIOU, S. Comprehensive Review of *Campylobacter* and Poultry Processing. **Comprehensive reviews in food science and food safety**. vol. 3, 2004.

KONKEL, M.E.; MONTEVILLE, M.R.; RIVERA-AMILL, V.; JOENS, L.A. The Pathogenesis of *Campylobacter jejuni*-Mediated Enteritis. **Current Issues in Intestinal Microbiology**. v. 2, v. 2, p. 55-71, 2001.

KOLACKOVA, I; KARPISKOVA, R. Species level identification of thermotolerant campylobacteres. **Veterinary Medicine**, Slezka, Praha, v.12, p.543-547, 2005.

KUANA, S. L.; Ocorrência de *Campylobacter* em lotes de frangos de corte e nas carcaças correspondentes. *Ciência Animal Brasileira*, Goiás, v. 9, n. 2, p. 480-486, abr./jun. 2008.

KUMAR, A. *et al.* Occurrence of *Campylobacter jejuni* in vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.67, n.1/2, p.153-155, 2001.

LARA-TEJERO, M. & GALAN, J. E. CdtA, CdtB, and CdtC form a tripartite complex that is required for cytolethal distending toxin activity. **Infectious Immunology**. V. 69, p. 4358 4365, 2001.

LEE, R. B., HASSANE, D. C., COTTLE, D. L. & PICKETT, C. L. Interactions of *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin subunits CdtA and CdtC with HeLa cells. **Infectious Immunology**. V. 71, p. 4883 4890, 2003.

LEMOS, A. D. M. Ocorrência de *Campylobacter* spp. em fígados de frangos com e

sem lesão de necrose hepática. 2010. 69f. **Dissertação (mestrado)**, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, 2010.

LEMOS, A. et al. *Campylobacter* spp. isolation from infected poultry livers with and without necrotic lesions. **Food Control**. v. 50, p. 236-242, 2015.

LINTON W. Phase variation of a α -1,3- galactosyltransferase involved in generation of the ganglioside GM1-like lipo-oligosaccharide of *Campylobacter jejuni*. *Mol Microbiol* 37, 501–514, 2000.

McCARTHY ND, COLLES FM, DINGLE KE, BAGNALL MC, MANNING G, DONZELA MC, FALUSH D: import genético associado - Host no *Campylobacter jejuni*. *Emerg Infect Disease*. De 2007, 13: 267-272. 10.3201 / eid1302.060620.

MARINO, I. et al. Identification and antimicrobial resistance of *Campylobacter* species isolated from animal sources. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. FEB, p. 1–6, 2012.

MARTINEZ, I. et al. Detection of *cdtA*, *cdtB*, and *cdtC* genes in *Campylobacter jejuni* by multiplex PCR. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, DE, v.296, n.1, p.45-48, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos – VE-DTA**. Dados de surtos de DTA entre 2000 e 2014, 2014. Disponível em: http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3_PAINEL_1_ApresentacaoRejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto_2014_PDF.pdf. Acesso em: 29 jan. 2016.

MÜLLER, J., et al. PCR detection of virulence-associated genes in *Campylobacter jejuni* strains with differential ability to invade Caco-2 cells and to colonize the chick gut. **Vet. Microbiol.** 113, 123–129, 2006.

MOORE J.E. et al. *Campylobacter*. **Veterinary Research**, Chicago, v. 36, n. 3, p. 351-382, 2005.

NIELSEN, E. M. et al. Evaluation of phenotypic and genotypic methods for subtyping *Campylobacter jejuni* isolates from humans, poultry, and cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.38, n.10, p.3800-3810, 2000.

OLIVEIRA A. F.; R.B.P. OLIVEIRA. Enumeração de *Campylobacter* spp. e presença de *Campylobacter jejuni* em carcaças de frango no Estado de Minas Gerais. **Ciência Rural** 43: 480-484, 2013.

OLIVEIRA, K. A. M. et al. Ocorrência de *Campylobacter* no ambiente de criação de frango de corte. **Revista Ceres**, Belo Horizonte, v. 55, n. 6, nov./dez. 2008.

OLIVER, J. The Viable but Nonculturable State in Bacteria. **The Journal of Microbiology**. v. 43, p. 93-100, 2005.

PERDONCINI G., *et al.* Occurrence of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* on broiler carcasses after chilling in southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 35(4): 349-352, 2015.

PERDONCINI G., 2015. **Tese de Doutorado**: Avaliação de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* em etapas do processamento de frangos de corte. 2015. 134p. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, 2015.

QUINN, P.J. *et al.* Microbiologia Veterinária e Doenças infecciosas. In Cultivo, preservação e inativação de bactérias. **Editora ArtMed**, Porto Alegre 2005, cap. 3, p. 26-30.

ROBINSON, D.A. Infective dose of *Campylobacter jejuni* in milk. **British Medical Journal**, London, v. 282, n. 6276, p. 1584, May, 1981.

ROZYNEK, E. *et al.* Prevalence of potential virulence markers in Polish *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates obtained from hospitalized children and from chicken carcasses. **J Med Microbiol** 54:615-619, 2005.

RUIZ-PALACIOS, G.M.; ESCAMILLA, E.; TORRES, N. Experimental *Campylobacter* Diarrhea in Chickens. **Infection and Immunity**. v. 34, n.1, p. 250-255, 1981.

SALMONELLA and *Campylobacter* in chicken meat: meeting report. [S.l.]: **FAO, WHO**, 2009. Disponível em: <<http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/MRA19.pdf>>. Acesso em: 27 jan. 2016.

SANTOS, J.F.A., 2011. **Dissertação de Mestrado**: Caracterização de isolados de *Campylobacter jejuni* de origem animal e humana quanto aos seus factores genéticos de virulência. 2011. 54p. Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Departamento de Biologia Vegetal, Campus da FCUL, 1749-016 Lisboa, Portugal, 2011.

SCARCELLI, E. *et al.* Molecular subtyping of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* strains isolated from different animal species in the state of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.36, n.4, p.378-382, 2005.

SNELLING, W.J. *et al.* Under the Microscope: *Campylobacter jejuni*. **Lett. Appl. Microbiol.** 41: 297-302, 2005.

SEPP, R. *et al.* Rapid techniques for DNA extraction from routinely processed archival tissue for use in PCR. **J Clin Pathol**, v. 47, n. 4, p. 318-323, Apr. 1994.

SHANE, S.M.; STERN, N.J. *Campylobacter* Infection. In.: SAIF, Y.M. **Diseases of poultry**. 11ªed. Ames: Iowa State Press. Cap.17, p.615-625. 2003.

SKIRROW, M.B; BLASER, M.J. Clinical aspects of *Campylobacter* infection. **Campylobacter**, Washington , 2 ed, cap 4, p. 69-88, 2000.

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, p.227-248, 2006.

STEPHENS, C.P.; ON, S.L.W.; GIBSON, J.A. An outbreak of infectious hepatitis in commercially reared ostriches associated with *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*. **Veterinary Microbiology**. v. 61 p. 183-190, 1998.

VAILLANT, V. *et al.* Foodborne Infections in France. **Foodborne Pathogens and Disease**, France, p. 221- 232, 2005.

VAN VLIET, A.H.; KETLEY, J.M. Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. **J Appl Microbiol** 90:45S–56S, 2001.

VANDAMME, P. Taxonomy of the family Campylobacteraceae. **Campylobacter**, Washington, 2 ed, p 3-44, 2000.

VANDAMME, P.; De LEY, J. Proposal for a New Family, Campylobacteraceae. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v.41, p.451-455, 1991.

WALDROUP, A. L. Contamination of raw poultry with pathogens. **World's Poultry Science Journal**. v. 52, p.7-25, 1996.

WHO. World Health Organization. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. 2015. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/199350/1/9789241565165_eng.pdf?ua= Acesso em: abril-2016.

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.

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**. 12 ed. Iowa: Brackwell Publishing, p.675-690. 2008.

ZHAN, *et al.* Genomic Characterization of the Guillain-Barre Syndrome-Associated *Campylobacter jejuni* ICDCJ07001 Isolate. **PLoS ONE** 5: e15060, 2010.

ZORMAN, T.; MOZINA, S.S. Thermotolerant Campylobacters in Poultry Meat, **Food Technology and Biotechnology**. v.40, n. 3, p. 177–184, 2002.

APÊNDICE A – Amostras de *Campylobacter jejuni* (Bacterioteca CDPA): origem e ano de isolamento.

Amostra	Origem	Ano de isolamento
1	Carcaça resfriada	2012
2	Carcaça resfriada	2012
3	Carcaça resfriada	2012
4	Carcaça resfriada	2012
5	Carcaça resfriada	2011
6	Carcaça resfriada	2012
7	Carcaça resfriada	2012
8	Carcaça resfriada	2012
9	Carcaça resfriada	2012
10	Carcaça resfriada	2012
11	Carcaça resfriada	2012
12	Carcaça resfriada	2012
13	Carcaça resfriada	2012
14	Carcaça resfriada	2012
15	Carcaça resfriada	2012
16	Carcaça resfriada	2012
17	Carcaça resfriada	2012
18	Carcaça resfriada	2012
19	Carcaça congelada 60 dias	2012
20	Carcaça resfriada	2012
21	Carcaça resfriada	2012
22	Carcaça após a lavagem final	2012
23	Carcaça resfriada	2012
24	Carcaça congelada	2012
25	Carcaça refrigerada	2012

APÊNDICE B – Amostras de origem humana positivas para os genes pesquisados

FIOCRUZ						
Amostra	<i>iam</i>	<i>wlaN</i>	<i>flaA</i>	<i>cdtA</i>	<i>cdtB</i>	<i>cdtC</i>
n°	amostra	amostra	amostra	amostra	amostra	amostra
1	419	419	419	419	419	419
2	489	489	489	489	489	489
3	491	491	491	491	491	491
4	492	492	492	492	492	492
5	496	496	496	496	496	496
6	500	500	500	500	500	500
7	509	509	509	509	509	509
8	511	511	511	511	511	511
9	588	588	588	588	588	588
10	589	589	589	589	589	589
11	593	593	593	593	593	593
12	596	596	596	596	596	596
13	598	598	598	598	598	598
14	599	599	599	599	599	599
15	600	600	600	600	600	600
16	601	601	601	601	601	601
17	602	602	602	602	602	602
18	603	603	603	603	603	603
19	607	607	607	607	607	607
20	611	611	611	611	611	611
21	613	613	613	613	613	613
22	678	678	678	678	678	678
23	679	679	679	679	679	679
24	680	680	680	680	680	680
25	1495	1495	1495	1495	1495	1495
Total positivas	3/25	0/25	5/25	11/25	24/25	12/25
Gene	<i>iam</i>	<i>wlaN</i>	<i>flaA</i>	<i>cdtA</i>	<i>cdtB</i>	<i>cdtC</i>
%	12%	0%	20%	44%	96%	48%

APÊNDICE C – Amostras de origem aviária positivas para os genes pesquisados

Bacterioteca CDPA						
Amostra n°	<i>iam</i> amostra	<i>wlaN</i> amostra	<i>flaA</i> amostra	<i>cdtA</i> amostra	<i>cdtB</i> amostra	<i>cdtC</i> amostra
1	26	26	26	26	26	26
2	28	28	28	28	28	28
3	29	29	29	29	29	29
4	30	30	30	30	30	30
5	56	56	56	56	56	56
6	58	58	58	58	58	58
7	61	61	61	61	61	61
8	62	62	62	62	62	62
9	63	63	63	63	63	63
10	64	64	64	64	64	64
11	71	71	71	71	71	71
12	83	83	83	83	83	83
13	85	85	85	85	85	85
14	86	86	86	86	86	86
15	87	87	87	87	87	87
16	106	106	106	106	106	106
17	133	133	133	133	133	133
18	145	145	145	145	145	145
19	146	146	146	146	146	146
20	160	160	160	160	160	160
21	161	161	161	161	161	161
22	212	212	212	212	212	212
23	180	180	180	180	180	180
24	190	190	190	190	190	190
25	208	208	208	208	208	208
Total positivas	1/25	4/25	20/25	21/25	22/25	19/25
Gene %	4%	16%	80%	84%	88%	76%