

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE
CAMPYLOBACTER JEJUNI DE ORIGEM
ANIMAL E HUMANA QUANTO AOS SEUS
FACTORES GENÉTICOS DE VIRULÊNCIA**

José Filipe Abreu dos Santos

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

2011

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE
CAMPYLOBACTER JEJUNI DE ORIGEM
ANIMAL E HUMANA QUANTO AOS SEUS
FACTORES GENÉTICOS DE VIRULÊNCIA**

José Filipe Abreu dos Santos

Dissertação orientada por Professora Doutora Maria João Fraqueza e
Professora Doutora Ana Maria Reis

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

2011



CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *CAMPYLOBACTER JEJUNI* DE ORIGEM ANIMAL E HUMANA QUANTO AOS SEUS FACTORES GENÉTICOS DE VIRULÊNCIA

José Filipe Abreu dos Santos

Mestrado em Microbiologia Aplicada

Dissertação orientada pela Professora Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza (Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária Departamento de Produção Animal e Segurança Alimentar Secção de Tecnologia dos Produtos Animais, Avenida da Universidade Técnica – Pólo da Ajuda 1300-477 Lisboa) e pela Professora Doutora Ana Maria de Fátima da Silva Martins Gonçalves Reis (Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Departamento de Biologia Vegetal, Campus da FCUL, 1749-016 Lisboa, Portugal).

Lisboa, 2011

Agradecimentos

À Faculdade de Medicina Veterinária por me ter acolhido e me ter proporcionado as condições necessárias à realização deste trabalho.

À minha orientadora Doutora Maria João Fraqueza, por me ter facultado todas as condições para o desenvolvimento desta dissertação, pela sua disponibilidade e orientação na realização deste trabalho.

À minha co-orientadora Doutora Ana Reis, a minha ligação à Faculdade de Ciências, por se ter mostrado sempre disponível em me receber sempre com um sorriso.

À Zezinha e à Lena, por todos os bons momentos passados na secção de Tecnologia, por tornarem os dias mais divertidos e por se terem tornado mais do que colegas de trabalho.

Às minhas colegas de laboratório e de Mestrado, Ana, Sara e Cláudia, por me apoiarem e me fazerem rir nos dias piores.

Aos meus pais e irmão, por me apoiarem incondicionalmente, por me terem ajudado a chegar onde cheguei e me lembrarem de que temos de lutar, se queremos vencer.

Aos meus amigos “Micro”, Sara, Né, Henrique, Espiga, Catarina, Elis, Sofia, Rui, Mariana, por todas as lutas que travámos, por todo o apoio e amizade que sempre me deram.

À Rita, Joana e Ana, amigas de outros tempos mas que sempre estiveram ao meu lado e me apoiaram nas decisões que tomei.

À Filipa, por ter estado sempre presente, por me apoiar, mesmo nas alturas mais difíceis, não me deixar cair, e me fazer sorrir quando tudo parecia correr mal, tornando difícil expressar por palavras o quanto lhe estou agradecido.

Caracterização de isolados de *Campylobacter jejuni* de origem animal e humana quanto aos seus factores genéticos de virulência

Resumo

Campylobacter jejuni é o principal agente causal de gastroenterite, sendo a carne de aves apontada como a principal fonte de infecção. O último relatório da EFSA indicou que a notificação de campilobacteriose aumentou em 2009 continuando a ser a zoonose mais comum na UE.

O objectivo deste estudo foi avaliar a presença de diversos genes de virulência em isolados de *Campylobacter jejuni*, de origem animal (frangos, n = 37), de diferentes sistemas de produção (intensivo, extensivo e biológico), bem como isolados de fezes Humanas (n=50). Os factores de virulência estudados foram os genes *cdtABC* (toxina), os genes *cgtB* e *wlaN*, relacionados com a biosíntese e variação da estrutura do LOS e implicados na síndrome de Guillain-Barré (SGB), o gene *cadF*, que codifica para uma proteína envolvida no processo de adesão, o gene *ciaB*, que codifica para um factor envolvido na invasão celular e por último, a presença do plasmídeo pVir que foi detectada através da pesquisa do gene *virB11*. Todas as amostras foram tipificadas através da técnica de RFLP do gene *flaA*.

Os resultados revelaram que todos os isolados apresentavam os três genes *cdt* (*cdtABC*) e o gene *flaA*. O gene *cgtB* apresentou uma baixa prevalência nos isolados (4,6%). O gene *wlaN* foi detectado em 19,5% de todos os isolados analisados, tendo sido maioritariamente detectado em isolados de origem Humana. Os genes *ciaB* e *cadF* foram detectados em 87% e 99% dos isolados, respectivamente. O plasmídeo pVir foi apenas encontrado em 4 isolados de origem animal.

Através do RFLP-Fla observou-se uma grande heterogeneidade dos isolados, não se tendo observado um subtipo predominante associado a determinada origem. No entanto, verificou-se a presença de perfis genéticos semelhantes, entre isolados de origem humana e de aves, nomeadamente com isolados do sistema de produção extensivo. Tal facto poderá indicar que existe uma relação entre doença e fonte de contaminação, ou seja, observa-se que existe semelhança entre as estirpes encontradas nos frangos e na sua carne, com as encontradas em pacientes humanos.

Palavras-chave: Campylobacter, virulência, aves, campilobacteriose, RFLP

Characterization of *Campylobacter jejuni* isolates from human and animal origin for their genetic virulence factors

Abstract

Campylobacter jejuni is the leading cause of gastro enteritis illness and poultry meat is pointed out as the principal source of infection. The last EFSA report shows that the notification of campylobacteriosis has increased in 2009 and remains the most common zoonosis in the EU.

The aim of this study was to evaluate the presence of several virulent related genes in isolates of *Campylobacter jejuni*, from animal origin (poultry, n=37), from three different production systems (intensive, extensive and biologic), and isolates from Human faeces (n=50). The virulence factors studied were the *cdtABC* genes, the *cgtB* and the *wlaN* gene, related to the biosynthesis and variation of LOS structure and implicated in Guillan Barré Síndrome (GBS), the *cadF* gene, which codes for an outer membrane protein concerned to adhesion, the *ciaB* gene, involved in cellular invasion and finally, the *virB11* gene to access the presence of the pVir plasmid. All strains were typed through the RFLP of the *flaA* gene.

The results obtained revealed that both isolates collected from poultry and humans were all positive for the presence of three *cdt* genes (*cdtABC*) and *flaA* gene. The *cgtB* gene was only detected in 4,6% of the isolates. The *wlaN* gene was detected in 19,5% of all the isolates and it was mostly detected in isolates from Human origin. The *ciaB* and *cadF* genes were detected in 87% and 99% in all the isolates, respectively. The pVir plasmid was only founded in 4 isolates from animal origin.

Through the analysis the RFLP profiles was observed a high heterogeneity among all the isolates, and we didn't observe a predominant subtype associated to a single origin. However, there was the presence of similar genetic profiles among isolates from human and poultry isolates, namely those from the extensive production system.

Keywords: *Campylobacter*, virulence, poultry, Campylobacteriosis, RFLP

Índice

1. Introdução	1
2. Características gerais de <i>Campylobacter</i> spp.	3
3. Taxonomia	5
4. Epidemiologia	6
4.1. Incidência em Humanos.....	6
4.2. Reservatórios, fontes de contaminação e vias de transmissão.....	7
4.3. Principal fonte e via de transmissão – Carne de aves	8
4.3.1. Sistemas de produção de frango.....	8
5. Manifestação clínica da doença.....	9
6. Mecanismos de patogénese.....	10
7. Factores de virulência.....	12
7.1. Capacidade de adesão.....	12
7.2. Secreção de proteínas	14
7.3. Toxina CDT	14
7.4. Mobilidade e quimiotaxia.....	15
7.5. Lipooligossacárido (LOS).....	15
8. Caracterização de isolados de <i>Campylobacter jejuni</i> de origem animal e humana quanto aos seus factores genéticos de virulência	17
8.1. Materiais e métodos	18
8.1.1. Colecção de isolados de <i>Campylobacter</i>	18
8.1.2. <i>Estirpes de referência</i>	19
8.1.3. <i>Condições de conservação e crescimento</i>	19
8.1.4. <i>Extracção de DNA e reacções de amplificação</i>	19
8.1.5. <i>Análise por RFLP-flaA: Restrição por endonuclease do fragmento amplificado do gene flaA</i>	20
8.1.6. <i>Tratamento estatístico de resultados</i>	21
9. Apresentação de resultados e discussão.....	21
9.1. Avaliação da presença de genes de virulência em <i>Campylobacter jejuni</i>	21
9.2. Análise dos perfis de RFLP flaA.....	29
10. Conclusão	37
11. Bibliografia	39

Índice de Figuras

Figura 1 - Fontes de contaminação de <i>Campylobacter</i> (adaptado de Young <i>et al.</i> , 2007)	7
Figura 2 - Comparação da resposta imunitária à infecção por <i>Campylobacter</i> (adaptado de Young <i>et al.</i> , 2007)	11
Figura 3 – Auto-imunidade induzida por <i>C. jejuni</i> . O LOS de determinadas estirpes de <i>C. jejuni</i> mimetiza a estrutura encontrada nos gangliosídeos humanos (adaptado de Guerry <i>et al.</i> , 2008).....	16
Figura 4 - Isolados de <i>Campylobacter jejuni</i> em estudo, consoante a sua origem.....	18
Figura 5 – Electroforese em gel de agarose (1,5%), dos produtos de PCR dos genes <i>cdtA</i> (a); <i>cdtB</i> (b) e <i>cdtC</i> (c).....	22
Figura 6 - Electroforese em gel de agarose (1,5%) do produto de PCR do gene <i>flaA</i> ..	23
Figura 7 - Electroforese em gel de agarose (1,5%) do produto de PCR do gene <i>ciaB</i> ..	25
Figura 8 - electroforese em gel de agarose do produto de PCR do gene <i>cgtB</i>	26
Figura 9 - Dendrograma do RFLP-Fla utilizando a correlação de Pearson e o método de aglomeração UPGMA. Os números de I-XI, representam os grupos formados.	33

Índice de tabelas

Tabela 1 - Estirpes de referência utilizadas como controlo positivo e negativo.....	19
Tabela 2 - Condições das reacções de PCR dos genes de virulência pesquisados para <i>Campylobacter jejuni</i>	20
Tabela 3 – Número de isolados positivos de <i>Campylobacter jejuni</i> de diferentes origens quanto aos genes de virulência e da toxina.....	27

1. Introdução

As zoonoses são doenças infecciosas que são naturalmente transmitidas directa ou indirectamente dos animais ao homem e inversamente, sendo uma das vias o consumo de alimentos de origem animal contaminados com agentes zoonóticos. A severidade dessas doenças nos humanos pode variar entre o aparecimento de sintomatologia ligeira até a morte (Konkel *et al.*, 2001).

Campilobacteriose surge como a zoonose bacteriana mais comum de doença com origem alimentar em muitos países industrializados.

De acordo com o último relatório da European Food Safety Authority (EFSA), a taxa de notificação de campilobacteriose na União Europeia aumentou ligeiramente em 2009, quando comparada com o ano anterior, sendo que esta foi a zoonose mais relatada pelos estados-membros, tendo sido confirmados 198.252 casos de infecção humana. Apesar deste elevado número de casos, a taxa de mortalidade observada para esta zoonose foi bastante baixa (0,02%). Tal como noutros anos, foi na carne de frango fresca que se observou um maior número de amostras positivas contaminadas com este microrganismo, em média 31% das amostras das carcaças eram positivas. A sua presença foi também comum noutros animais de talho, tais como suínos e bovinos. A ocorrência de *Campylobacter* em carcaças de frango e nos próprios bandos ao longo da cadeia de produção manteve-se bastante elevada na maior parte dos estados-membros (EFSA, 2011).

Segundo o painel da EFSA, esta recomenda a criação de um sistema de vigilância activa de campilobacteriose em todos os Estados-Membros, bem como a criação de medidas que visem diminuir a subnotificação da doença, a fim de estimar com maior precisão o risco da doença, permitindo avaliar os efeitos na saúde humana. De forma a proporcionar uma melhor compreensão da epidemiologia molecular da campilobacteriose, assim com uma melhor percepção de quais são as principais fontes de infecção atribuídas a esta doença, o painel da EFSA também recomenda que seja organizada uma colecção representativa de isolados de humanos e de potenciais reservatórios e proceder à genotipagem destes isolados em todos os Estados-Membros. Este painel recomenda ainda que seja feita investigação no sentido de averiguar a prevalência de factores de virulência, capacidade de sobrevivência e ecologia de *Campylobacter*, a fim de quantificar qual o impacto da imunidade protectora adquirida na epidemiologia da campilobacteriose na UE.

O esforço para reduzir as infecções por *Campylobacter* em humanos está directamente ligado a uma melhor compreensão dos aspectos biológicos deste microrganismo e, particularmente, dos seus mecanismos de virulência, que contribuem directamente para a patogénese da doença. No entanto, as bases moleculares dos mecanismos de virulência de *C. jejuni*, não estão totalmente elucidadas. A conclusão da sequenciação do genoma *C. jejuni* NCTC11168 (1.6 megabases) em 2000 foi um passo importante que contribuiu para o desenvolvimento de um maior número de trabalhos sobre *Campylobacter* (Parkhill *et al.*, 2000). Verificou-se que os únicos genes tóxicos são os da toxina “cytolethal distending toxine” (CDT), não se identificando a presença de quaisquer genes que codifiquem estruturas do tipo *pilus* (Parkhill *et al.*, 2000). Além disso, a identificação de um grande número de regiões homopoliméricas indicou a importância destas no fenómeno de “*slipped-strand mispairing*” e consequentemente, levou à compreensão da importância do fenómeno de variação de fase e de variabilidade de estirpe para estirpe, que poderá desempenhar um papel nas diferenças observadas quanto a virulência e capacidade de sobrevivência destes microrganismos (Bourke, 2002).

Apesar da disponibilidade de informação genética de diferentes estirpes de *C. jejuni* e de ferramentas que as permitam analisar, é ainda desconhecida a totalidade, bem como o modo de funcionamento, dos factores de virulência desta bactéria. No entanto, diversos estudos têm sido realizados no sentido de promover uma maior compreensão da virulência deste microrganismo, tornando-se claro que *C. jejuni* não expressa um grande número de factores de virulência clássicos associados a outras bactérias que provocam gastroenterite.

A realização de estudos epidemiológicos que permitam apurar qual a prevalência factores de virulência quer nas estirpes que colonizam as aves, quer nas que infectam o Homem, permitirá averiguar se existe uma relação entre estas, ou seja, se as estirpes que colonizam o tracto gastrointestinal das aves e contaminam posteriormente as carcaças apresentam os principais factores de virulência que facilitam a infecção e provocam doença no Homem, avaliando-se assim fontes de infecção e as possíveis vias de transmissão. Neste sentido, a genotipicação de isolados bacterianos de diferentes origens, fornece informação epidemiológica necessária para o controlo da infecção, bem como permite avaliar o risco associado à transmissão de *Campylobacter* e estimar o número de casos humanos atribuídos ou associados ao consumo de carne de aves.

Este trabalho teve como objectivo a caracterização de isolados de *Campylobacter jejuni* de origem animal, nomeadamente aves e humana, quanto aos factores de virulência envolvidos na patogénese deste microrganismo. Foi estudada a frequência de genes associados a uma maior capacidade patogénica, como os genes envolvidos na codificação da toxina tripartida CDT (cytolethal distending toxin), codificada por três genes (*cdtA*, *cdtB* e *cdtC*); os genes *cgtB* e *wlaN*, ambos codificam para uma β -1,3-galactosiltransferase e estão envolvidos na biosíntese dos lipooligossacáridos; o gene *ciaB*, que codifica para o *Campylobacter invasion antigen B*; o gene *cadF*, que codifica uma proteína envolvida na adesão às células do hospedeiro e o gene *virB11*, codificado num plasmídeo pVir e associado a um componente putativo do sistema de secreção do tipo IV. Foi ainda realizada a genotipificação dos isolados através da técnica de RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*) do gene *flaA*, que codifica para a flagelina, de forma a avaliar a heterogeneidade dos isolados, bem como possíveis relações genéticas entre isolados de origem animal e isolados de origem humana.

Numa primeira parte do trabalho fez-se uma revisão bibliográfica sobre as características gerais do género *Campylobacter*, bem como os mecanismos de patogenia envolvidos no aparecimento de doença no Homem, e os principais factores de virulência envolvidos neste processo. Destacou-se também a epidemiologia desta doença, sobretudo na União Europeia, os principais reservatórios e fontes de contaminação do Homem, bem como as principais manifestações e complicações clínicas da doença. Foram descritos todos os procedimentos e materiais necessários ao desenvolvimento do trabalho experimental. Os resultados obtidos foram analisados e discutidos em comparação com trabalhos de outros autores.

2. Características gerais de *Campylobacter* spp.

Campylobacter é um bacilo Gram-negativo, cujo tamanho varia entre 0,2-0,5 μ m de largura e 0,5-5 μ m de comprimento. Esta bactéria, em forma de vírgula, apresenta um flagelo, que se pode encontrar numa ou em ambas as extremidades polares da célula. No entanto, a sua forma tende a alterar-se, tornando-se mais alongada, quando expostos a concentrações mais elevadas de oxigénio, o que provoca uma perda da sua capacidade de movimento (Boysen, Knøchel e Rosenquist, 2006). O aumento de escassez de nutrientes do meio envolvente assim como a introdução de outros factores de stress (O_2 , pH, temperatura) levam a que forma característica desta bactéria tenha tendência a desaparecer, e as células adoptam uma conformação do

tipo cocóide, mais esféricas (Vandamme, 2000, Keum-II *et al.*, 2007). A entrada das células numa conformação cocóide permite a este microrganismo entrar num estado viável mas não cultivável (VBNC), adquirindo desta forma uma maior capacidade para sobreviver às condições adversas e ao stress ambiental, mesmo sem formar esporos. Assim, é mantido o seu potencial patogénico e a capacidade de retornar à forma normal das suas células quando invadem as células intestinais do hospedeiro.

As bactérias *C. jejuni* e *C. coli* apresentam uma actividade positiva para as enzimas catalase e oxidase.

São várias as espécies deste género (32 espécies e 13 subespécies), das quais a espécie *C. jejuni* pode ser distinguida através da capacidade de hidrolisar o hipurato (Vandamme, 2000). No entanto, já foram descritas algumas estirpes de *C. jejuni* que não conseguem hidrolisar o hipurato, tornando inviável a sua distinção das outras espécies de *Campylobacter* (Totten *et al.*, 1987).

Campylobacter spp. é um microrganismo bastante fastidioso e com necessidades específicas para o seu crescimento em cultura. A maior parte dos membros deste género necessita de ambientes com uma atmosfera modificada para terem um crescimento óptimo (Humphrey *et al.*, 2007). A maior parte das espécies necessita de condições de microaerofília para crescer (níveis reduzidos de oxigénio, hidrogénio (5-7%) e dióxido de carbono (5-10%)). Isto deve-se ao facto de a maior parte das enzimas de *Campylobacter* serem sensíveis ao oxigénio, apesar deste possuir mecanismos que lhe permitem remover e inactivar as formas tóxicas de oxigénio formadas durante o seu crescimento (Kelly *et al.*, 2001). Por esta razão, utilizam-se meios de cultura contendo sangue ou carvão que ajudam no processo de remoção destes radicais de oxigénio, potenciando desta forma o crescimento de *Campylobacter*.

A temperatura óptima de crescimento das espécies termotolerantes de *Campylobacter* situa-se entre os 42-45°C, sendo o seu crescimento totalmente inibido a temperaturas abaixo dos 30°C ou superior a 47°C (Doyle e Roman, 1981). São necessárias 48 horas de incubação para o aparecimento de colónias de *Campylobacter* bem desenvolvidas em placa. As colónias caracterizam-se por apresentarem uma cor acinzentada ou ligeiramente rosadas, com um brilho metálico, em meios sólidos com agar.

Apesar de todos os requisitos mencionados (temperatura óptima de crescimento, necessidade de atmosferas modificadas com baixo teor de oxigénio, meios nutritivos

suplementados com sangue) o crescimento desta bactéria em cultura é bastante difícil, o que torna moroso o desenvolvimento de estudos.

Campylobacter spp. não fermenta açúcares, pelo que a produção de energia é efectuada somente através da degradação de aminoácidos ou através de compostos intermediários do ciclo de Krebs ou ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Através deste último, *Campylobacter* spp. tem a capacidade de utilizar diversos e diferentes receptores finais de electrões na sua cadeia respiratória, tanto em ambientes aeróbios como em anaeróbios. Recentemente, e através da sequenciação de estirpes de *Campylobacter jejuni*, verificou-se que poderão existir potenciais genes que codifiquem diferentes oxireductases, o que lhe permitirá utilizar diferentes substratos. Neste sentido, esta versatilidade de utilização de substratos poderá estar implicada na capacidade que este microrganismo tem de conseguir sobreviver em ambientes diferentes, seja no intestino de aves ou de mamíferos mas também noutros ambientes exteriores a um hospedeiro como, por exemplo, leite e água (Kelly *et al.*, 2001).

3. Taxonomia

Em 1906, num estudo financiado pelo governo Britânico e que pretendia investigar qual a causa de tantos abortos em bovinos e ovinos, dois cirurgiões veterinários detectaram pela primeira vez um microrganismo peculiar no muco uterino de ovelhas prenhes (Skirrow *et al.*, 2006). Denominado *Vibrio fetus*, o agente provocava abortos no gado. Em 1947, Vincent e colegas isolaram também este microrganismo em mulheres grávidas, que foram admitidas no hospital com septicemia, vindo mais tarde a abortar. Apenas em 1963, Sebald e Verón postularam o novo género *Campylobacter*, uma vez que até à data, este microrganismo era classificado como *Vibrio*.

Campylobacter jejuni pertence à classe épsilon das proteobactérias, na ordem *Campylobacteriales* e género *Campylobacter*. Até ao momento foram caracterizadas 32 espécies pertencentes ao género *Campylobacter*, tendo sido identificadas 13 sub-espécies (Euzéby, 2011). Esta ordem inclui mais dois géneros: *Helicobacter*, com a espécie *Helicobacter pylori*, causadora de úlceras gástricas e veiculada assintomaticamente por humanos; *Wolinella*, constituído por apenas uma espécie, a *Wolinella succinogenes*, que faz parte da flora gastrointestinal comensal dos ruminantes. Outros géneros próximos de *Campylobacter* e pertencentes à sua família são os géneros *Arcobacter* e *Sulfurospirillum* (Young, 2007).

4. Epidemiologia

4.1. Incidência em Humanos

A infecção por *Campylobacter* é a maior causa de gastroenterite bacteriana em todo o mundo, afectando sobretudo crianças, tanto em países desenvolvidos, como em países em desenvolvimento. Estima-se que cerca de 90% das infecções em Humanos sejam provocadas pela espécie *Campylobacter jejuni* e as restantes provocadas por outros membros deste género, como é o caso de *Campylobacter coli* e *Campylobacter lari*. Estas espécies são encontradas maioritariamente no tracto gastrointestinal de mamíferos e aves selvagens e domésticas, estabelecendo-se de forma comensal nestes. Os custos médicos e de produtividade relativos a infecções provocadas por este microrganismo ascendem a cerca de 4 a 8 biliões de dólares todos os anos, só nos Estados Unidos (Lin, 2009).

De acordo com o último relatório dos estados membro da União Europeia (*European Food Safety Authority* [EFSA], 2011), *Campylobacter* mantém-se o agente patogénico bacteriano gastrointestinal mais notificado em 2009. O número de casos relatados no ano de 2009 teve um aumento de 4%, face ao ano anterior, totalizando 198.252 casos. Este aumento também se reflectiu na taxa de notificação geral dos membros da União Europeia, verificando-se um aumento de 43,9 por 100.000 habitantes para cerca de 45,6 casos por cada 100.000 habitantes.

De uma forma geral, 18 dos estados membros relataram um aumento dos casos confirmados de campilobacteriose, sendo que 75,3% deste aumento foi atribuído ao Reino Unido e Hungria. Apenas seis dos estados membros declararam uma diminuição dos casos notificados, tendo esta sido atribuída maioritariamente à Alemanha e Áustria (82,6%). O maior aumento de casos de doença deu-se na Roménia de 2008 para 2009, muito provavelmente devido ao melhoramento do sistema de vigilância vigente no próprio país (EFSA, 2011). No período compreendido entre 2005 e 2009, verificou-se que o número de casos de campilobacteriose nos 20 estados-membros da EU apresentou uma ligeira flutuação ao longo do tempo, mas esta não é estatisticamente significativa (EFSA, 2009). Contudo, verificaram-se aumentos significativos nas taxas de notificação da Estónia, França, Luxemburgo, Polónia, Eslováquia e Reino Unido, enquanto na República Checa, Irlanda e Espanha, observou-se uma diminuição estatisticamente significativa da notificação dos casos. A Letónia, Grécia e Portugal não declararam qualquer caso de campilobacteriose. Nos casos da Grécia e Portugal, a ausência de dados relativamente a esta zoonose

contaminação de leite e água potável são os responsáveis por surtos maiores (Wilson *et al.*, 2008), ainda que estes não ocorram com frequência.

4.3. Principal fonte e via de transmissão – Carne de aves

As aves apresentam uma elevada prevalência de *C. jejuni*, sendo portadores assintomáticos, nomeadamente os frangos. A relação de comensalismo que este organismo estabelece nas aves dá origem a uma infecção de carácter persistente, mas benigna. No entanto, este tipo de infecção está ausente nas aves com apenas 2-3 semanas de vida, existindo uma fase *lag* até que se verifique a colonização do intestino por *Campylobacter* (Lin, 2009). Os mecanismos responsáveis por este fenómeno são ainda desconhecidos mas poderão estar relacionados com diversos factores, como a presença de anticorpos maternos, antibióticos (provenientes das rações) ou devido à flora intestinal e do próprio intestino não se encontrarem totalmente estabelecida. Apesar disto, uma vez infectada a primeira ave rapidamente ocorre a disseminação da infecção pelos restantes membros do bando, verificando-se que todas as aves do bando se encontram colonizadas com este microrganismo a partir do 7º dia de exposição ao mesmo (Lin, 2009).

O facto de se criarem em massa um grande número de animais num espaço fechado, propicia um ambiente favorável à propagação deste microrganismo, assim como no transporte dos animais para o matadouro. Se as condições de higiene nos pavilhões e veículos de transporte não forem controladas, poderão levar a uma rápida disseminação deste microrganismo por todos os membros de um bando, através das próprias fezes ou da água e ração.

Durante o processo de abate dos animais, e também devido à própria tecnologia utilizada neste processo, poderá ocorrer a contaminação das carcaças com o próprio conteúdo fecal dos intestinos das aves, assim como contaminação cruzada de possíveis animais que não estejam infectados. De facto, verificou-se que existe uma grande percentagem de carcaças que são contaminadas com matéria fecal durante o processo de abate, que se traduz num grande aumento da carga microbiana de *Campylobacter* (Humphrey *et al.*, 2007). Observou-se também que muitas das estirpes isoladas nas carcaças foram idênticas às isoladas de matéria fecal (Wagenaar *et al.*, 2006).

4.3.1. Sistemas de produção de frango

A avicultura é a criação de aves, como galinhas, perus patos e gansos, para produção de alimentos, nomeadamente a carne e ovos.

De facto, mais de 50 bilhões de frangos são criados anualmente como uma fonte de alimento, tanto pela sua carne, como pelos seus ovos. Os frangos criados exclusivamente para o consumo da sua carne são chamados frangos para consumo Humano (*broiler*), enquanto as galinhas criadas exclusivamente para a produção de ovos são chamadas de galinhas poedeiras.

A maioria das aves é criada através de técnicas de agricultura intensiva. De facto, cerca de 74% da carne de aves do mundo e 68% dos ovos são produzidos através de sistemas de produção intensivos (<http://www.smallstock.info/index.htm>)

Os vários sistemas de produção apresentam algumas diferenças nomeadamente, no tipo de alimentação utilizada; na idade em que os frangos são abatidos e na densidade de alojamento, ou seja, o número de aves existente por área (m²) (<http://www.smallstock.info/info/genhusb/poultry-house.htm>).

Podem ser distinguidos três sistemas de produção diferentes: o biológico, extensivo “*indoor*” e intensivo. No sistema de produção biológico as aves são alimentadas exclusivamente com alimentos de produção de tipo biológico e pastagem. Comparativamente a outros sistemas de produção, estas aves apresentam um ritmo mais baixo de crescimento até ao abate (81 dias), havendo uma baixa densidade de animais (>4m²/ave). Nos sistemas de produção extensivo “*indoor*” as aves são mantidas numa proporção de 12-14 por cada m², tendo acesso a forragens, podendo-se movimentar livremente para procurar alimento. As aves criadas segundo este sistema de produção necessitam de 56-81 dias para crescerem, antes de abatidas. Por ultimo, nos sistemas de produção intensivo as aves são criadas em ambiente fechado e de clima controlado, existindo um grande numero de animais por m² de área. As aves neste tipo de sistemas de produção são alimentadas exclusivamente com concentrado e alimento composto. Muitos dos produtores que utilizam estes sistemas de produção, incluem na alimentação das aves antibióticos de forma a controlar possíveis surtos de doenças já que a sua probabilidade de ocorrência é maior. As aves criadas segundo este método têm um tempo de crescimento nunca inferior a seis semanas antes de serem abatidas (<http://www.poultryhub.org/bird-health-and-disease/alternative-poultry-production-systems/>).

5. Manifestação clínica da doença

A dose infectante da zoonose provocada por *Campylobacter* é bastante baixa, sendo suficiente a ingestão de 500 células deste patógeno para o aparecimento de doença no Homem (Robinson, 1981). Após a exposição, *Campylobacter* coloniza o tracto

intestinal baixo (íleo, jejuno e cólon), muitas vezes sem que se observe qualquer tipo de sintomatologia. Nos casos em que se observam sintomas, estes normalmente iniciam-se nos primeiros 2-3 dias, sendo as dores de cabeça, vómitos e febre, os mais comuns. Posteriormente, observa-se o aparecimento de diarreia aquosa ou mesmo sanguinolenta, e dores abdominais, durante 3-7 dias, no entanto, na maior parte dos casos verifica-se uma evolução favorável do quadro clínico. No entanto, e apesar de normalmente ser uma doença auto-limitante, por vezes observa-se uma discrepância na severidade dos sintomas, já que estes podem variar entre o aparecimento de diarreia ligeira a uma desidratação grave, que pode levar à hospitalização do paciente.

A ocorrência de doença extra-intestinal, aquando da infecção por *Campylobacter* é baixa quando comparada com o aparecimento de doença entérica. A complicação pós-infecciosa mais observada em pacientes que foram infectados com *Campylobacter* é a síndrome de Guillain-Barré. Esta neuropatia consiste numa paralisia progressiva ascendente, que pode afectar os nervos periféricos e cranianos, podendo surgir a necessidade de ventilar mecanicamente o doente, uma vez que ocorre a paragem dos músculos respiratórios (Kuwabara, 2007). Nesta doença a inflamação aguda e desmielinização (perda da mielina, a membrana lipídica que envolve os nervos) é provocada por uma reacção auto-imune que tem origem numa reacção cruzada dos anticorpos produzidos contra um determinado antigénio; no caso da infecção por *Campylobacter*, contra o lipooligossacárido (LOS), com os componentes da mielina, nomeadamente o ácido siálico (Komagamine e Yuki, 2006).

6. Mecanismos de patogénese

Apesar dos mecanismos de patogenicidade ainda não se encontrarem completamente esclarecidos, pensa-se que os potenciais factores de virulência deste agente são a mobilidade, quimiotaxia, adesão, invasão e produção de toxinas (Snelling *et al.*, 2005; Bhavsar e Kapadnis, 2007). Numa fase inicial, *Campylobacter* coloniza o jejuno e o íleo, e posteriormente o cólon, em Humanos, sendo que os processos de quimiotaxia e mobilidade são extremamente importantes nesta fase. Após a migração da bactéria para a zona das criptas intestinais revestidas de muco, esta inicia o processo de adaptação ao meio envolvente, promovendo desta forma a interacção com as células intestinais do hospedeiro. A adesão às células do hospedeiro é um passo crucial no processo de patogénese deste organismo. Após a adesão às células do hospedeiro, a bactéria poderá iniciar o processo de internalização e invadir a células. Ainda não é totalmente clara a contribuição da invasão celular para a severidade da doença.

Campylobacter é também responsável pela destruição das células epiteliais do intestino, mais especificamente nas pontas das vilosidades intestinais. Esta necrose é provocada por uma ou mais toxinas, sendo a toxina CDT a única descrita até a data (Konkel *et al.*, 2001). Todo o processo de infecção é acompanhado de uma intensa resposta inflamatória, devido à produção de citocinas por parte das células do hospedeiro.

Apesar de provocar doença no Homem, esta bactéria estabelece-se de forma comensal em aves, ou seja, não se manifestam sintomas (Figura 2). No entanto, tanto as estirpes encontradas nas aves, como as encontradas nos Humanos, possuem os mesmos factores de virulência, pelo que, estes devem interagir de forma diferente, consoante o hospedeiro que infectam.

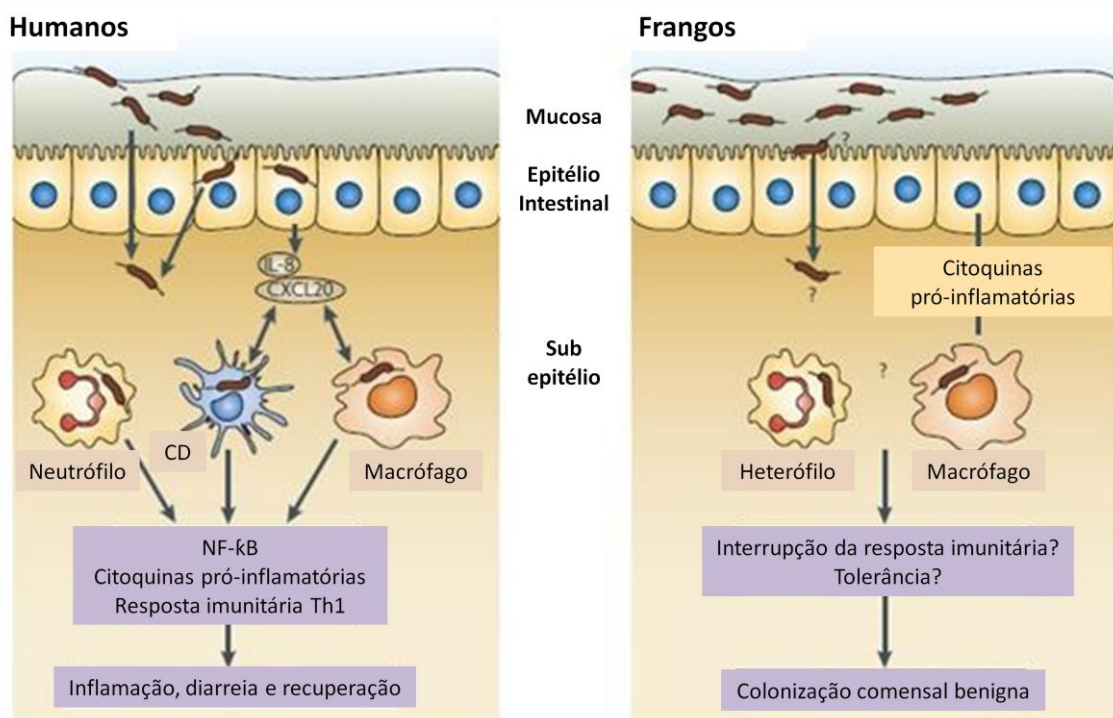


Figura 2 - Comparação da resposta imunitária à infecção por *Campylobacter* (adaptado de Young *et al.*, 2007)

Estudos recentes (Knudsen *et al.*, 2006; Byrne *et al.*, 2007; Van Deun *et al.*, 2008) demonstram que a resposta inflamatória nas galinhas à infecção por *Campylobacter* é lenta e moderada, e que esta se estabelece de forma sistêmica, podendo este organismo ser isolado de diversos locais (baço, fígado, intestino, sangue). A capacidade invasiva de *C. jejuni* apresentou uma correlação com a magnitude da colonização do baço de aves infectadas, tendo-se verificado que existiam algumas

estirpes que apresentavam uma elevada capacidade invasiva mas não conseguiam proliferar no interior das células, pelo que rapidamente se evadem das mesmas.

Estas observações levaram à criação de um novo modelo do mecanismo de colonização de *Campylobacter* (Van Deun *et al.*, 2008), que propõe que *C. jejuni* através de invasões/evasões rápidas de diversas células consegue escapar ao sistema imunitário, replicando-se de forma rápida no muco intestinal. No entanto, a forma específica como *Campylobacter* interage com o sistema imunitário das galinhas modelando uma resposta imunitária que lhe permita estabelecer uma infecção persistente mas benigna, ainda não é totalmente conhecida.

Assim, a identificação e caracterização dos factores de virulência tem sido alvo de variadas investigações. O conhecimento da natureza, regulação e mecanismos de acção dos factores de virulência é indispensável para a prevenção e tratamento das infecções.

7. Factores de virulência

Diversos estudos têm sido desenvolvidos no sentido de averiguar quais os mecanismos de patogénese do *Campylobacter* e de que forma se articulam com o estilo de vida dos diversos hospedeiros que coloniza. No entanto, deparam-se diversas dificuldades, pois trata-se de um microrganismo fastidioso e não estão desenvolvidos modelos animais que permitam o estudo aprofundado do seu ciclo infeccioso. Apesar disso, recentemente foi relatado o caso da utilização de um modelo com ratos que apresenta um futuro promissor descreve um pouco mais o modelo promissor (Chang e Miller, 2006).

Campylobacter possui diversos mecanismos que permitem não só adaptar-se a diferentes hospedeiros (aves, gado e humanos), como manipular a resposta imunitária, permitindo-lhe estabelecer uma infecção crónica, mas assintomática. De entre os múltiplos factores de virulência destacam-se: a variação genética, os lipooligossacáridos e a cápsula, o flagelo e o sistema de secreção associado a este, a toxina CDT e os diversos factores implicados na adesão do microrganismo à célula-alvo (Young *et al.*, 2007).

7.1. Capacidade de adesão

As bactérias de forma a poderem colonizar os seus hospedeiros necessitaram de desenvolver mecanismos de adesão que lhes permitissem aderir às células e aos tecidos.

A produção de diferentes apêndices membranares, como por exemplo pili, está presente na superfície de diversas bactérias, e implicados nos seus processos de adesão. Em *Campylobacter*, não foram identificados organelos responsáveis pela adesão deste microrganismo às células eucariotas, no entanto, foram já identificadas diversas proteínas que contribuem para este processo (Parkhill *et al.*, 2000, Fouts *et al.*, 2005).

A proteína CadF produzida por *Campylobacter* liga-se especificamente à fibronectina, que se encontra localizada na região basolateral das células epiteliais do intestino (Konkel *et al.*, 1997). De facto, esta proteína é necessária para que se dê a máxima invasão e aderência de *C. jejuni in vitro*, tendo-se verificado que os mutantes para esta proteína apresentavam taxas de colonização mais reduzidas em galinhas, quando comparados com a estirpe selvagem (Ziprin *et al.*, 1999, Monteville *et al.*, 2003). Em estudos realizados com inibidores da formação dos microfilamentos verificou-se que existe uma diminuição da internalização da bactéria em células intestinais INT 407 (Monteville *et al.*, 2003). A proteína CadF é semelhante à OmpA encontrada em *E. coli*, no entanto, o papel da sua actividade ainda não foi totalmente esclarecido (Mammelli *et al.*, 2006).

Outra adesina presente neste agente é a JlpA, uma lipoproteína envolvida na adesão a células HEp-2 (Konkel *et al.*, 2001, Young *et al.*, 2007). Estudos demonstram que a sua ligação a este tipo de células, desencadeia uma cascata de fosforilações, levando à activação do NF- κ B e outros factores celulares, que contribuem para o desenrolar de uma resposta proinflamatória (Jin *et al.*, 2003). Tal facto, indica que alguma da resposta inflamatória observada aquando da infecção por *Campylobacter*, poderá estar relacionada com esta proteína de adesão. Uma mutação nesta proteína resultou numa diminuição de 20% na capacidade de adesão, quando comparada com a estirpe selvagem, no entanto, não se observou qualquer perda de capacidade de invasão das células (Jin *et al.*, 2001)

A lipoproteína CapA, expressa à superfície das células, poderá ser outra estrutura envolvida na adesão desta bactéria já que se verificou que mutantes deficientes para esta proteína, exibem uma menor capacidade de adesão a células Caco-2 *in vitro*, bem como uma capacidade reduzida de colonização e persistência em modelos de galinhas (Ashgar *et al.*, 2007)

7.2. Secreção de proteínas

Os mecanismos de secreção de *Campylobacter* encontram-se insuficientemente caracterizados quando comparados com os de outros microrganismos patogénicos. Uma das proteínas mais importantes secretada por *C. jejuni* é a proteína CiaB, que apresenta um papel fundamental na invasão de células epiteliais *in vitro* (Konkel *et al.*, 1999a, Konkel *et al.*, 1999b). Os mutantes que não possuem esta proteína apresentam menor capacidade de colonização das galinhas, o que significa que a invasão celular poderá ser um factor importante, e que actualmente é menosprezado (Ziprin *et al.*, 2001). O mecanismo responsável pela secreção da proteína CiaB e o seu papel na invasão, tem sido associado ao sistema de secreção do tipo III, através dos quais as proteínas são injectadas directamente na célula hospedeira (Konkel *et al.*, 1999b, Rivera-Amill *et al.*, 2001). Contudo, *C. jejuni* não codifica um sistema de secreção do tipo III e não existem evidências de que a proteína CiaB seja directamente injectada. Esta e outras proteínas Cia são injectadas na célula-alvo através de um complexo flagelar de exportação (Konkel *et al.*, 2004) semelhante ao que existe em *Yersinia* spp. (Young *et al.*, 1999). O complexo formado pela estrutura flagelar apresenta uma importância enorme nos processos de invasão celular do hospedeiro pelo *Campylobacter*.

7.3. Toxina CDT

A toxina CDT é um dos factores 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). *Campylobacter* ao produzir esta toxina proteica provoca alterações no ciclo da célula hospedeira, fazendo com que este pare na transição da fase G2 para a fase M. A actividade desta toxina tripartida (AB₂) é mediada por três genes: *cdt A*, *cdt B* e *cdt C*, na qual CdtB é a unidade tóxica activa (Lara-Tejero e Galan, 2001).

A actividade da CDT é semelhante à DNase I, tal como se verificou em estudos realizados *in vitro*, pois a CDT danifica o DNA levando à activação de um *checkpoint* de controlo do ciclo celular, traduzido na paragem do mesmo em G2/M. Lara-Tejero e Galan (2000) verificaram que a injeção da subunidade CdtB em células do hospedeiro provocava um efeito tóxico nas mesmas, igual ao produzido pela holotoxina CDT. No entanto, quando os três componentes da toxina eram purificados por um método diferente (através da recombinação dos genes *cdt* em *E. coli* e posterior purificação dos sobrenadantes de forma individual), qualquer uma das três

proteínas não exibia acção tóxica quando aplicada individualmente em células. Este facto levou a crer que estes três componentes deveriam interagir entre si, de forma a compor uma holotoxina tripartida, ou seja, a CDT deverá ser uma toxina heterodimérica do tipo AB₂.

Quando ocorre mutação do gene *cdtB*, a sequência de aminoácidos produzida faz com que a toxina não seja activa (Dasti *et al.*, 2010).

7.4. Mobilidade e quimiotaxia

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). Konkel *et al.* (2004) demonstraram que *Campylobacter* utiliza o aparato flagelar para a secreção de diversas proteínas, envolvidas na sua patogénese. De facto, verificou-se que mutantes que não possuíssem os genes do aparelho de secreção flagelar (*flhA*, *flhB*, *flgB* e *flgE2*) apresentavam uma capacidade reduzida de invasão das células do hospedeiro, para além de apresentarem defeitos na junção do flagelo. Assim foi notória a redução de mobilidade e a menor capacidade de adesão e secreção de outras proteínas. A inactivação específica do gene *flhA* está ainda associada a uma menor capacidade de colonização do hospedeiro (Carrilo *et al.*, 2004).

Campylobacter demonstrou ter a capacidade de se mover, através de um flagelo polar, sendo através deste que consegue dirigir-se para outros locais do intestino por quimioatracção a locais ricos em biliar, mucina e L-fucose (Konkel *et al.*, 2001). Uma vez que o flagelo neste microrganismo parece apresentar um papel fundamental para uma eficiente colonização do hospedeiro, tem sido alvo de diversos estudos. A caracterização da sua biogénese, ou seja, a forma como é regulada a sua expressão, bem como a sua contribuição como mecanismo de exportação de proteínas e para o processo de quimiotaxia que deverá ter um papel determinante, quer no estilo de vida comensal, quer patogénico (Konkel *et al.*, 2004; Guerry, 2007).

7.5. Lipooligossacárido (LOS)

Um dos factores que contribui para que este agente patogénico confunda o sistema imunitário são os lipooligossacáridos (LOS) da sua membrana, estruturas semelhantes aos lipopolissacáridos (LPS), mas que não possuem as cadeias laterais. *C. jejuni* é uma das poucas bactérias que possui a capacidade de sintetizar de forma endógena ácido siálico e incorporá-lo na constituição dos LOS, mimetizando a estrutura presente nos gangliosídeos humanos. Este mimetismo (Figura 3) pode levar ao aparecimento

de neuropatias auto-imunes, como a síndrome de Guillain-Barré ou Miller-Fischer, uma vez que são produzidos anticorpos contra a estrutura do LOS, ocorrendo uma reacção cruzada entre estes e os gangliosídeos do hospedeiro (Guerry e Szymanski, 2008).

Estas neuropatias parálíticas afectam uma pessoa em cada mil casos de infecção por *Campylobacter* (Young *et al.*, 2007). No entanto, nem todas as estirpes de *C. jejuni* provocam o aparecimento destas doenças, tendo-se verificado que existem determinados factores de virulência que estão mais associados a estirpes que provocam esta síndrome. De facto, observou-se que os mutantes que não possuem a capacidade de produzir e incorporar na sua estrutura o ácido siálico não conseguem induzir uma resposta imunitária anti-gangliosídeo em ratos (Godschalk *et al.*, 2006).

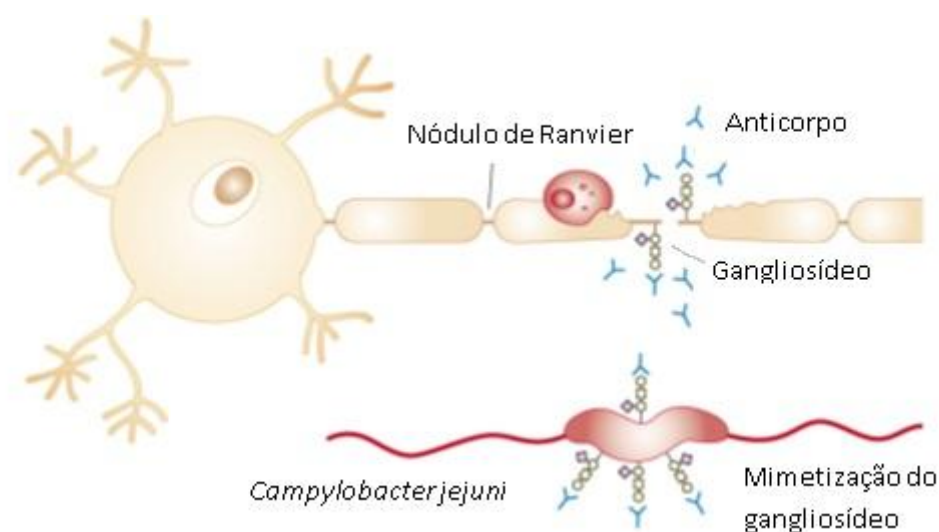


Figura 3 – Auto-imunidade induzida por *C. jejuni*. O LOS de determinadas estirpes de *C. jejuni* mimetiza a estrutura encontrada nos gangliosídeos humanos (adaptado de Guerry *et al.*, 2008).

A diversidade encontrada na estrutura do LOS deve-se não só, à incorporação de diferentes açúcares (número de carbonos diferente, formas isoméricas, formas em anel) mas também aos diferentes tipos de ligação que se podem estabelecer entre os diferentes açúcares que o constituem (Gilbert *et al.*, 2008). A formação destas ligações é determinada pelas glicosiltransferases e outras transferases codificadas no locus de biosíntese do LOS. De facto, a comparação entre os diversos locus de biosíntese de LOS de *C. jejuni*, demonstraram que existe uma grande diversidade genética nos mecanismos responsáveis pela variabilidade desta estrutura (Gilbert *et al.*, 2005). Neste sentido, e devido a diversidade genética encontrada neste locus, foi possível organizá-lo em 19 classes (A-S), consoante os genes que possui, a organização destes e o próprio tamanho do locus (pode variar entre os 5 e os 16 genes centrais).

Alguns destes genes são únicos para uma determinada classe, enquanto outros podem ser encontrados em mais do que uma classe diferente. As diferenças no conteúdo genético deste locus estão na base na variedade observada na constituição do LOS das diferentes estirpes de *Campylobacter*. Contudo, o mesmo conjunto de genes tem a capacidade de sintetizar uma estrutura de LOS diferente, isto porque esta bactéria tem a capacidade de ligar ou desligar determinados genes que modulam a síntese desta estrutura, bem como a afinidade e especificidade das diversas glicosiltransferases (Godschlack *et al.*, 2004; Gilbert *et al.*, 2008).

De facto, estudos demonstram que LOS está envolvido no processo de invasão das células epiteliais do hospedeiro (Guerry *et al.*, 2005). Recentemente, verificou-se que a ocorrência de mutações nos genes *cgtB* e *wlaN*, que codificam ambos para uma β -1,3-galactosiltransferase, estão ligadas a diferenças na capacidade de colonizar o tracto gastrointestinal de aves, e invadir de células Caco-2, similares às células epiteliais do intestino humano (Müller *et al.*, 2006).

8. Caracterização de isolados de *Campylobacter jejuni* de origem animal e humana quanto aos seus factores genéticos de virulência

Este trabalho teve como objectivo a caracterização de isolados de *Campylobacter jejuni* de origem animal, nomeadamente aves e humana, quanto aos factores de virulência envolvidos na patogénese deste microrganismo. Foi estudada a frequência de genes associados a uma maior capacidade patogénica, como os genes envolvidos na codificação da toxina tripartida CDT (cytolethal distending toxin), codificada por três genes (*cdtA*, *cdtB* e *cdtC*); os genes *cgtB* e *wlaN*, ambos codificam para uma β -1,3-galactosiltransferase putativa, e envolvidos na biosíntese dos lipooligossacáridos; o gene *ciaB*, que codifica para o *Campylobacter invasion antigen B*; o gene *cadF*, que codifica uma proteína envolvida na adesão às células do hospedeiro e o gene *virB11*, codificado num plasmídeo e associado a um componente putativo do sistema de secreção do tipo IV. Foi ainda realizada a genotipificação dos isolados através da técnica de *Restriction fragment length polymorphism* (RFLP) do gene *flaA*, que codifica para a flagelina, de forma a avaliar a heterogeneidade dos isolados, bem como possíveis relações genéticas entre isolados de origem animal e isolados de origem humana.

8.1. Materiais e métodos

8.1.1. Colecção de isolados de *Campylobacter*

Uma colecção de isolados de *Campylobacter* (Figura 4) pertencente à Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa, Laboratório de Tecnologia e Segurança Alimentar, foi constituída a partir de amostras de frango (*caecum*, pele do pescoço e peito) que foram recolhidas em matadouro, entre 2008 e 2009, sendo posteriormente processadas no laboratório para a pesquisa de *Campylobacter* spp. termofílicos, de acordo com a norma EN/ISO 10272-1:2006. Os isolados foram seleccionados através da observação de colónias características nos meios de isolamento utilizados, por observação microscópica de esfregaços a fresco e corados com a coloração de Gram, tendo sido posteriormente realizados testes bioquímicos (catalase, oxidase, reacção do hipurato).

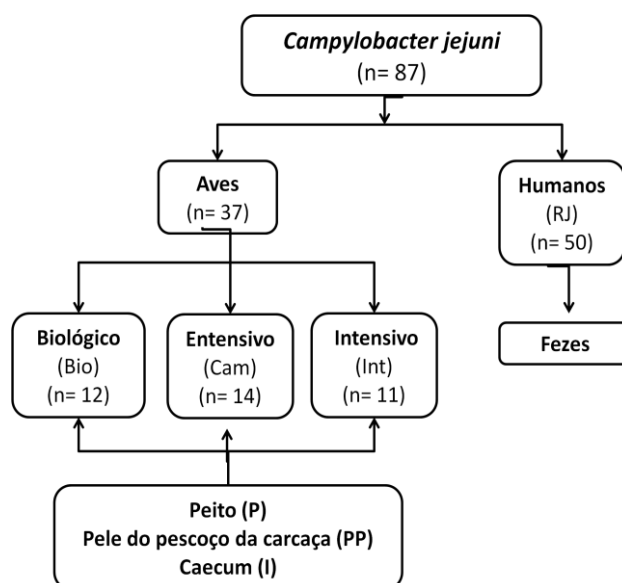


Figura 4 - Isolados de *Campylobacter jejuni* em estudo, consoante a sua origem

Os isolados foram identificados quanto ao nível de espécie através de um *Multiplex* PCR para *Campylobacter* termofílicos de acordo com Denis *et al.* (1999). Posteriormente, foram seleccionados 37 destes isolados de *Campylobacter jejuni* (Figura 4), provenientes de diferentes bandos de frangos e de diferentes sistemas de produção (biológico, intensivo e extensivo).

A colecção de *Campylobacter* de isolados clínicos de humanos foi obtida no período, 2008-2009, em diversos hospitais de Portugal. A sua identificação foi realizada no Instituto Nacional de Saúde Drº Ricardo Jorge, sendo gentilmente cedidos para a realização deste estudo 50 isolados de *Campylobacter jejuni* (Figura 4).

8.1.2. **Estirpes de referência**

Foram utilizadas diversas estirpes de referência de *Campylobacter jejuni* como controlo para as diferentes reacções de amplificação realizadas (Tabela 1):

Tabela 1 - Estirpes de referência utilizadas como controlo positivo e negativo

Estirpe	PCR
<i>Campylobacter jejuni</i> DSM 4688	Controlo positivo para os genes CDT
<i>Campylobacter coli</i> DSM 4689	Controlo positivo para os genes CDT
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> NCTC 11168	Controlo positivo para gene <i>wlaN</i>
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> 81-176	Controlo positivo para os genes <i>cgtB</i> , <i>ciaB</i> , <i>virB11</i> e <i>cadF</i>
<i>Escherichia coli</i> CCUG 42901	Controlo negativo para todos os genes

A estirpe *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* 81-176 foi cedida gentilmente pelo Professor Naoki Misawa, do Laboratório de Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária de Miyazaki.

8.1.3. **Condições de conservação e crescimento**

Os isolados estavam guardados em criotubos, em caldo de infusão cérebro-coração (Scharlau) suplementado com 15% de glicerol, a -76 °C. Todos os isolados foram cultivados durante 2-3 dias, a 42 °C em microaerofilia (GenBox Microaero, Biomérieux) em jarras de microaerofilia/anaerobiose (Anaeropack Rectangular Jar, Biomérieux), em meio COS (Biomérieux) ou Muller-Hinton (Scharlau), suplementado com 5% de sangue de cavalo.

8.1.4. **Extracção de DNA e reacções de amplificação**

O DNA cromossomal das bactérias foi extraído de acordo com o método do tiocianato de guanidina (Pitcher *et al.*, 1989). Os stocks das extracções de DNA foram guardados a -20 °C, sendo as suas diluições mantidas a 4 °C e usadas nos PCR's.

Os genes de virulência pesquisados através de reacções de amplificação (PCR), seus *primers* e temperaturas de *annealing* encontram-se resumidos na Tabela 3. Todos os primers foram adquiridos na STABVida. As reacções de PCR foram realizadas num volume total de 25 µl, utilizando-se as seguintes concentrações dos diversos componentes: 1x Tampão (10xReaction Buffer), 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM mix dNTP's (VWR dNTP Set 100 mM, VWR), 0,2 µM de ambos os *primers* e 1,25 U/µl de Taq Polimerase (NzyTaq DNA Polymerase, Nzytech). Todos os PCR's foram realizados no termociclador VWR Dópio (VWR), utilizando os seguintes parâmetros: 95 °C, durante 5 min para a desnaturação inicial seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 30 s. A temperatura de *annealing* foi de acordo com o exposto na Tabela 3, durante 1

min e a extensão a 72 °C durante 1 min, com um passo de extensão final a 72 °C durante 5 min. Todos os produtos de PCR foram analisados por electroforese em gel de agarose (Seakem LE Agarose, Seakem) a 1,5%, utilizando a tina VWR KuroGEL Mini-plus 10 (VWR). Todas as corridas foram realizadas utilizando tampão TBE 1x (Tris-Boro EDTA), 80 V, durante uma hora, tendo-se aplicado 5 µl de cada amostra e dos respectivos controlos. As bandas de DNA foram coradas com Gel Red 20x (Biotium) e visualizadas através de iluminação UV e tiradas fotos através de ImageMaster VDS DE 230 VAC (Pharmacia Biotech) utilizando o *software* LISCAP para a captura de imagens. O tamanho esperado dos vários produtos de PCR encontra-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Condições das reacções de PCR dos genes de virulência pesquisados para *Campylobacter jejuni*

Gene	Primers	Sequência	Annealing (°C)	PCR (pb)	Referência
<i>fla A</i>	FlaA1 FlaA2	5'-atg gga ttt cgt att aac ac- 3' 5'-ctg tag taa tct taa aac att ttg- 3'	45	1713	Wassenaar, 2000
<i>flh A</i>	CinvA22 CinvA3	5'-gga agc ggc act tgg ttt gc- 3' 5'-gct gtg agt gag att ata gca gc- 3'	54	735	Müller <i>et al.</i> , 2006
<i>ciaB</i>	CiaB-F CiaB-R	5'-ttt cca aat tta gat gat gc- 3' 5'-ggt ctt taa att ttt cat aat gc- 3'	50	1165	Rivera-Amill <i>et al.</i> , 2001
<i>virB11</i>	VirB11F VirB11R	5'-gaa cag gaa gtg gaa aaa cta gc-3' 5'-ttc cgc att ggg cta tat g- 3'	60	709	Bacon <i>et al.</i> , 2000
<i>cadF</i>	CadF-F2B CadF-R1B	5'-ttg aag gta att tag ata tg- 3' 5'-cta ata cct aaa gtt gaa ac- 3'	45	400	Konkel <i>et al.</i> , 1999a
<i>cdtA</i>	Cj-CdtAU2 Cj-CdtAR2	5'-agg act tga acc tac ttt c- 3' 5'-agg tgg agt agt taa aaa cc- 3'	55	631	Samosornsuk <i>et al.</i> , 2007
<i>cdtB</i>	Cj-CdtBU5 Cj-CdtBR6	5' -atc ttt taa cct tgc ttt tgc- 3' 5' -gca agc att aaa atc gca gc- 3'	55	714	Samosornsuk <i>et al.</i> , 2007
<i>cdtC</i>	Cj-CdtCU1 Cj-CdtCR2	5' -ttt agc ctt tgc aac tcc ta- 3' 5' -aag ggg tag cag ctg tta a- 3'	55	524	Samosornsuk <i>et al.</i> , 2007
<i>wlaN</i>	Cj1139cF DL39	5' -tcg tgg gta tac aaa ggt tgt g-3' 5' -tta aga gca aga tat gaa ggt g-3'	60	561	Wassenaar <i>et al.</i> , 2002
<i>cgtB</i>	cgtBrev DL39	5' -gca cat aga gaa cgc tac aa- 3' 5' -tta aga gca aga tat gaa ggt g- 3'	56	330	Linton <i>et al.</i> , 2000

8.1.5. Análise por RFLP-*flaA*: Restrição por endonuclease do fragmento amplificado do gene *flaA*

A tipificação do gene *flaA* foi realizada segundo o protocolo adaptado por Ertas *et al.* (2004). A reacção de PCR foi realizada de acordo com o descrito anteriormente, assim como a detecção de um produto de PCR com cerca de 1,7-Kb. Se fosse observada uma banda forte, eram utilizados 5 µl do produto de PCR para posterior digestão com a enzima de restrição Ddel (New England, Biolabs). As condições de restrição utilizadas foram as seguintes para um volume total de 20 µl: tampão NE Buffer 3 (1x) e concentração da enzima de restrição a 2U/30µl de volume total, seguido de incubação a 37 °C em banho-maria durante uma hora. Posteriormente, os

produtos digeridos (10 µl de amostra) com a Ddel foram analisados através de electroforese em gel de agarose a 2%, a 150v durante 2 h e 30 min e corados com Gel Red e visualizados através de iluminação UV e fotografados através ImageMaster VDS DE 230 VAC (Pharmacia Biotech). As fotos dos géis foram captadas utilizando o *software* Liscap.

8.1.6. Tratamento estatístico de resultados

Para o tratamento dos resultados obtidos foram utilizados os *softwares* informáticos Microsoft Excel 2010 e Bionumerics 6.6 (Applied Maths). A análise dos géis de electroforese do *RFLP-flaA* foram analisados através do programa informático Bionumerics (Applied Maths), tendo sido construídos os dendrogramas utilizando o coeficiente de correlação de Pearson e o método de aglomeração UPGMA.

9. Apresentação de resultados e discussão

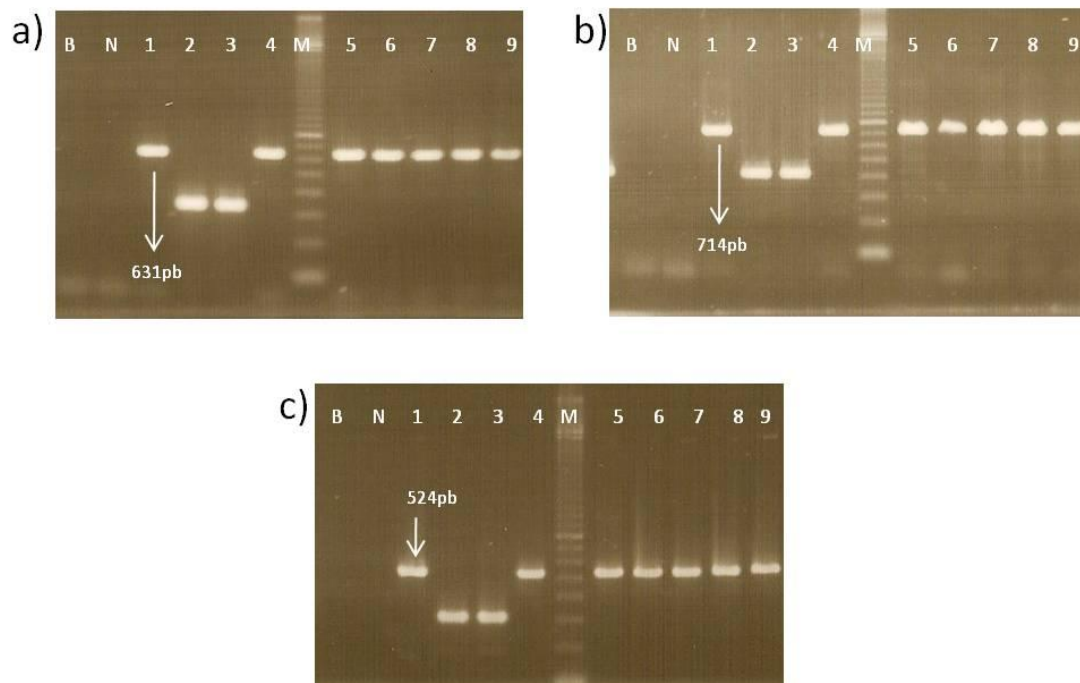
9.1. Avaliação da presença de genes de virulência em *Campylobacter jejuni*

Com este trabalho pretendeu-se fazer uma caracterização genética de isolados de *Campylobacter jejuni* de origem Humana e Animal, recolhidos em Portugal, quanto aos seus potenciais factores de virulência.

Foram estudados 10 genes de virulência diferentes, que codificam para factores que, normalmente, estão associados a uma maior capacidade invasiva das células do hospedeiro, bem como a um maior potencial patogénico. Dos 10 genes de virulência em estudo, apenas 4 foram detectados por PCR em todos os isolados (*cdtA*, *cdtB*, *cdtC*, *flaA*).

De facto, verificou-se a presença dos genes que codificam para a única toxina até agora identificada em *Campylobacter* (*cdtABC*) em todos os isolados em estudo quer de origem animal, representantes da principal fonte da infecção, quer humana (Figura 5). Tal como descrito por outros autores, a presença dos três genes da toxina CDT é bastante comum nas diferentes estirpes *Campylobacter jejuni* (Samosornsuk *et al*, 2007; Martínez *et al.*, 2005). No estudo efectuado por Martinez e colegas (2005), estes analisaram isolados de *C. jejuni* provenientes de diferentes origens (animais e Humanas) e constataram que os seus isolados apresentavam uma elevada prevalência (98%) para os três genes que codificam para a toxina. O mesmo foi também observado por Samosornsuk e colegas (2007), que verificaram que estes três genes se encontram igualmente presentes em isolados de fezes de frangos de dois locais diferentes na Tailândia, bem como em isolados recolhidos de aves selvagens.

Figura 5 – Electroforese em gel de agarose (1,5%), dos produtos de PCR dos genes *cdtA* (a); *cdtB* (b) e *cdtC* (c)



Legenda: Em todas as imagens, B – branco; N – controlo negativo (*E. coli*); poços 1-4 - controlo positivo (*C. jejuni* DSM 4688); poços 2-3 – controlo positivo (*C. coli* DSM 4689); M – marcador 100pb; poços 5 a 9 – amostras de frango de origem biológica.

A prevalência elevada destes três genes, mesmo em isolados de origens diferentes, poderá indicar que o operão *cdtABC* deverá desempenhar um papel fundamental na ecologia deste microrganismo e na própria etiologia da doença provocada no Homem. Neste sentido, os resultados encontrados em isolados de origem portuguesa são semelhantes aos reportados em publicações de estudos com isolados de outras origens e outros países.

Pelo facto de até à data, esta ser a única toxina identificada em *Campylobacter* responsável pelo desencadear de sinais clínicos de doença, torna-se bastante importante a avaliação da sua presença, quer em isolados de origem animal quer de origem Humana. No entanto, a simples presença dos três genes que codificam para toxina, não se traduz necessariamente em actividade tóxica activa.

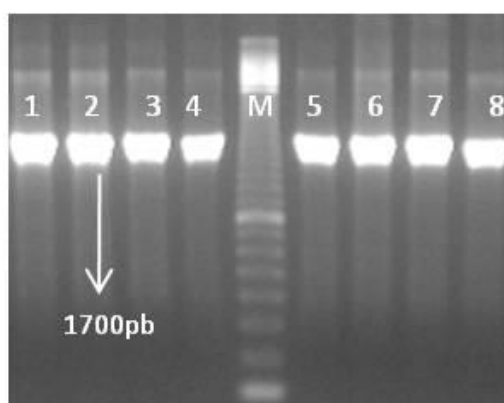
Segundo Ripabelli *et al.* (2009), nem todas as estirpes que possuíam os três genes da toxina CDT apresentaram efeitos citotóxicos em ensaios com células Hep-2. Apesar

da elevada frequência destes genes nos isolados, nem todos eles possuem a capacidade de produzir uma toxina activa. Assim, a presença destes três genes nos isolados de origem Humana e animal do presente estudo indica que mesmo não induzindo a produção de uma toxina activa a sua presença no genoma trará benefício para esta bactéria, uma vez que poderão estar envolvidos noutros processos da patogenicidade.

Como referido anteriormente, mais dois genes foram detectados em todos os isolados em estudo. O gene *flaA* (Figura 6), que codifica para a proteína flagelina, encontrou-se nos de origem animal e nos isolados de origem humana.

A flagelina é a principal proteína estrutural dos flagelos. Estes são determinantes na capacidade de sobrevivência deste patogénico quer nos processos de colonização de hospedeiros como as aves, quer no de invasão e patogénese, da infecção do tracto gastrointestinal humano (Zilbauer *et al.*, 2008). O facto de todos os isolados em estudo possuírem este gene, vai de encontro ao constatado por vários autores (Müller *et al.*, 2006; Ripabelli *et al.*, 2009). Não se observou a presença de estirpes “aberrantes”, que não possuam este gene activo. Este facto iria reduzir a capacidade de colonização e invasão de hospedeiros, com diminuição da capacidade de sobrevivência e persistência, e como tal, estas estirpes têm tendência a desaparecer, uma vez que apresentam menor aptidão para sobreviverem (Guerry, 2007; Young *et al.*, 2007; Dasti *et al.*, 2010).

Figura 6 - Electroforese em gel de agarose (1,5%) do produto de PCR do gene *flaA*.



Legenda: M – marcador 100pb; poços 1 a 8 – amostras de origem Humana.

O gene *cadF* codifica para uma proteína responsável pela adesão de *C. jejuni* à fibronectina, uma glicoproteína envolvida nos processos de formação da matriz extracelular do hospedeiro (Monteville *et al.*, 2003). Esta adesina codificada por

Campylobacter é bastante importante no seu processo de patogênese, já que é necessária para que ocorra adesão às células do hospedeiro e à matriz extracelular do epitélio intestinal e posterior internalização (Young *et al.*, 2007). Nos isolados analisados observou-se uma elevada prevalência deste gene, tanto nos isolados de origem Humana (98% positivos, n=49), nos quais apenas foi detectado um isolado negativo, quer nos isolados de origem animal, nos quais foi detectado o gene em todos os isolados (n=37).

A elevada frequência deste gene verificada nos isolados deste estudo vai de encontro ao referido por outros autores, como Rozynek e colegas (2005) e Datta e colegas (2003). De facto, segundo Rozynek e colegas (2005), que efectuaram a pesquisa deste gene tanto em isolados de carcaças de frango de várias regiões da Polónia, como em isolados de casos clínicos humanos, o gene *cadF* estava presente em 98% dos seus isolados. A elevada frequência deste gene em isolados de origem animal e humana pode ser explicada pela importância desta proteína, na colonização das aves, ou no processo patogénico em Humanos (Young *et al.*, 2007).

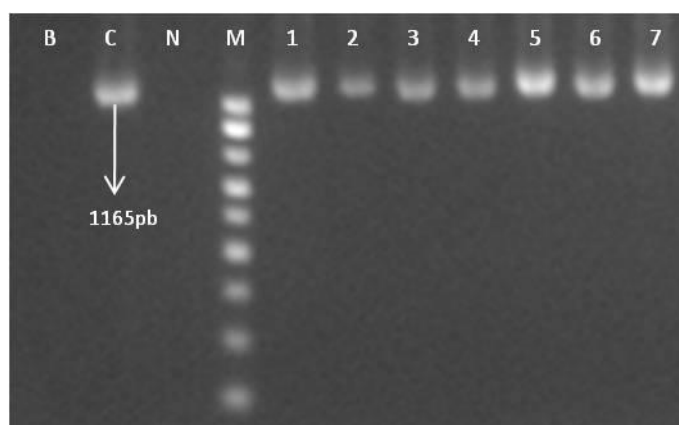
O produto de PCR do gene *virB11* foi detectado apenas em 4 isolados de origem animal, o que representou apenas 4% de todos os isolados analisados. Noutros estudos verificou-se que este gene foi detectado em cerca de 7-15% dos isolados (Bang *et al.*, 2003; Datta *et al.*, 2003), ainda que tenham sido em isolados de origem diferente (porco e gado). Neste sentido, verificou-se que apenas isolados de origem animal, possuíam o plasmídeo, no qual se encontra codificado o gene *virB11*, envolvido provavelmente nos processos patogénicos deste microrganismo. De facto, quando comparados com a estirpe *C. jejuni* 81-176, que possui este plasmídeo, verificou-se que estirpes que não o possuem, apresentaram uma redução na sua capacidade de aderência e de invasão (Bacon *et al.*, 2000; Dasti *et al.*, 2010). O facto de apenas ter sido detectado o plasmídeo nos isolados de origem animal, poderá estar relacionado com a maior diversidade microbiana que existe no meio ambiente envolvente onde os animais são criados. De facto, *C. jejuni* é naturalmente competente, o que significa que pode adquirir DNA do meio envolvente (Young *et al.*, 2007). Isto leva a recombinação entre estirpes, originando uma diversidade genética ainda maior. A transferência horizontal de DNA cromossomal, mas também de DNA plasmídico, pode ocorrer tanto em *in vitro*, como durante a colonização dos frangos, o que indica que a transformação natural, poderá ter um papel decisivo na plasticidade genómica deste microrganismo, e ter um papel importante na disseminação de novos factores de virulência (de Boer *et al.*, 2002). Neste sentido, o facto dos isolados de

origem animal apresentarem a presença deste plasmídeo, poderá estar relacionado com uma maior disponibilidade de material genético para incorporar, devido ao ambiente onde se encontram.

Uma das proteínas que é secretada pelo *Campylobacter* é a proteína CiaB. O gene que codifica para esta proteína (*ciaB*) foi encontrado em grande parte dos isolados (Figura 7), tanto de origem animal (86,4%, n=32), como de origem humana (88%, n=44). Esta proteína está associada a uma maior capacidade de invasão celular, ocorrendo uma diminuição da mesma, quando não é expressa por esta bactéria. Vários autores (Datta *et al.*, 2003, Müller *et al.*, 2006) observaram que este gene encontra-se presente tanto em isolados clínicos Humanos, como em isolados de origem animal (frangos, bovinos), com uma elevada prevalência (cerca de 100%). No entanto, também já foi constatada a presença relativamente baixa (40%) deste gene em isolados de fezes de frangos (broiler), pelo que a distribuição deste gene poderá variar, mesmo em isolados da mesma origem (Chansiripornchai e Sasipreeyajan, 2009).

No entanto, para que a proteína exerça o seu efeito, é necessário que a estirpe possua um mecanismo de secreção flagelar activo e funcional, já que é através deste que a proteína CiaB é secretada para o exterior, onde exerce a sua função na célula-alvo do hospedeiro (Konkel *et al.*, 2004).

Figura 7 - Electroforese em gel de agarose (1,5%) do produto de PCR do gene *ciaB*



Legenda: B- branco; C - controlo positivo (*C. jejuni* 81-176); N - controlo negativo (*E. coli*); M – marcador 100pb; poços 1 a 7 – amostras de origem Humana.

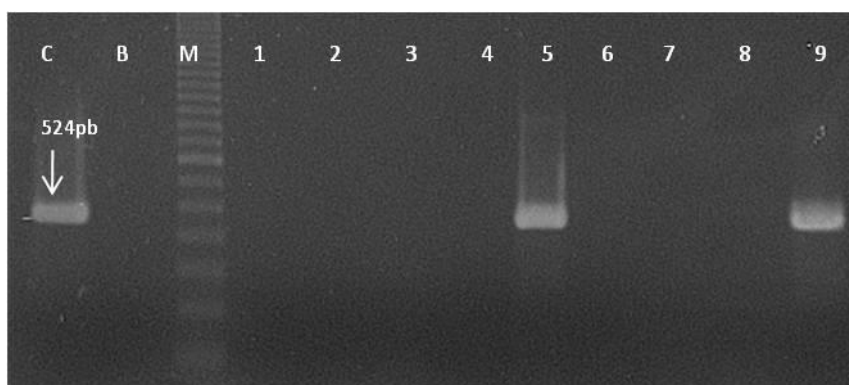
A pesquisa dos genes *wlaN* e *cgtB* foi efectuada neste estudo uma vez que estão envolvidos na biosíntese de lipooligossacáridos (LOS) deste patogénico, que codificam

para uma β -1,3-galactosiltransferase. Estes genes estão envolvidos nos processos de variação da estrutura dos LOS, o que facilita a evasão deste microrganismo ao sistema imunitário do hospedeiro. Nos isolados de origem animal analisados observou-se uma baixa frequência tanto do gene *wlaN* (8,1%, n=3), como para o gene *cgtB* (8,1%, n=3) (Figura 8).

Nos isolados de origem Humana observou-se uma baixa prevalência do gene *cgtB*, tendo sido apenas detectado um isolado positivo, no entanto, o gene *wlaN* estava presente em 28% dos isolados, o que correspondeu a 14 isolados positivos.

Apesar de serem genes que codificam para enzimas com funções similares, já foram encontradas estirpes que possuíam os dois genes codificados no seu genoma (Parker *et al.*, 2005; Müller *et al.*, 2007), no entanto, não foi encontrado nenhum isolado em estudo que possuísse os dois genes. Apesar da baixa frequência encontrada destes genes, especialmente do gene *cgtB*, é de salientar que se encontrou uma frequência relativamente alta de isolados Humanos que possuíam o gene *wlaN*. Kordinas e colegas (2005) encontraram também uma prevalência elevada (16%) do gene *wlaN* nos isolados de humanos no seu estudo.

Figura 8 - electroforese em gel de agarose do produto de PCR do gene *cgtB*



Legenda: B- branco; C - controlo positivo (*C. jejuni* 81-176); N - controlo negativo (*E. coli*); M – marcador 100pb; poços 1 a 4 – amostras de frango de produção biológica.

No entanto, nos isolados do seu estudo observaram uma elevada frequência do gene *cgtB* (24%), o que difere do encontrado em neste estudo. Referente aos isolados de carne de frango estudados por Datta e colegas (2003), verificou-se que cerca de 24% dos seus isolados possuíam este gene, o que contraria os resultados encontrados neste estudo, onde apenas 8% dos isolados de frango o possuíam. gene *wlaN* está envolvido na biosíntese do LOS, e implicado no processo de incorporação do ácido

siálico nestes (Gilbert *et al.*, 2008), o que faz com que se possa desenvolver Síndrome de Guillain-Barré no Homem, é importante destacar que estes isolados Humanos poderão possuir um maior potencial patogénico, e consequentemente, maior capacidade de induzir esta doença auto-imune no seu hospedeiro. Segundo estudos anteriores deverá existir uma correlação entre uma maior capacidade de invasão celular, tanto *in vitro* como *in vivo*, e a presença do gene *cgtB* ou do gene *wlaN*, já que foi verificado que cerca de 80% das estirpes que não possuem um destes genes, apresentou uma menor ou total ausência de capacidade de invasão (Müller *et al.*, 2007).

Na Tabela 3 apresenta-se o número de isolados positivos para cada um dos genes de virulência e da toxina, segundo a sua origem (humana ou animal).

Tabela 3 – Número de isolados positivos de *Campylobacter jejuni* de diferentes origens quanto aos genes de virulência e da toxina.

	Biológica (n=12)	Intensiva (n=11)	Extensiva (n=14)	Humana (n=50)
<i>cdtA</i>	100% (n=12)	100% (n=11)	100% (n=14)	100% (n=50)
<i>cdtB</i>	100% (n=12)	100% (n=11)	100% (n=14)	100% (n=50)
<i>cdtC</i>	100% (n=12)	100% (n=11)	100% (n=14)	100% (n=50)
<i>cgtB</i>	16,67% (n=2)	9,09% (n=1)	0% (n=0)	2% (n=1)
<i>wlaN</i>	8,34% (n=1)	18,18% (n=2)	0% (n=0)	28% (n=14)
<i>ciaB</i>	91,67% (n=11)	100% (n=11)	78,57% (n=11)	88% (n=44)
<i>virB11</i>	16,67% (n=2)	9,09% (n=1)	7,14% (n=1)	0% (n=0)
<i>cadF</i>	100% (n=12)	100% (n=11)	100% (n=14)	98% (n=49)
<i>flaA</i>	100% (n=12)	100% (n=11)	100% (n=14)	100% (n=50)

Como consta na Tabela 3, os genes do operão *cdtABC* que codificam para a toxina foram encontrados em todos os isolados, tanto nos isolados de frango dos três sistemas de produção diferente, como nos de origem Humana. O mesmo foi observado, relativamente ao gene *flaA*, que codifica para a flagelina, tendo-se verificado a sua presença em todos os isolados de ambas as origens.

O gene *cadF* foi detectado em todos os isolados (100%), tendo-se verificado que apenas um dos isolados de origem Humana não possuía este gene (Tabela 3), responsável pela codificação de uma adesina e envolvida no processo de adesão às células do hospedeiro.

Relativamente ao gene *ciaB*, apenas nos isolados de frango do sistema de produção intensiva se observou a presença deste gene em 100% dos isolados (Tabela 3). Nos isolados de frango de produção biológica foi detectado em 91,67% dos isolados; nos de frango de produção extensiva em 78,57% e finalmente, em 88% dos isolados de origem Humana (Tabela 3). Esperar-se-ia que este gene fosse encontrado em 100% dos isolados, como verificado noutros estudos com isolados de origens semelhantes (Datta *et al.*, 2003). No entanto, as diferenças observadas reflectem que no total foi apenas um isolado de frango de produção biológica, três de produção extensiva e seis de origem Humana que não apresentavam este gene.

Quanto aos genes *cgtB* e *wlaN*, estes foram encontrados em muito poucos dos isolados de frango em estudo. De facto, observou-se que não foram detectados os genes *wlaN* e *cgtB* em nenhum dos isolados de frango de produção extensiva, enquanto nos isolados de frango de produção biológica foi detectado o gene *cgtB* em 16,67% dos mesmos, e o gene *wlaN* em 8,34% (Tabela 3). Nos isolados de frango de origem intensiva foram detectados os genes *cgtB* e *wlaN* em 9,09% e 18,18% dos isolados, respectivamente (Tabela 3). Estas diferenças observadas quanto a estes dois factores de virulência nos isolados de frango de diferentes sistemas de produção poderá estar relacionada com o tipo de produção utilizado na criação dos mesmos. A alimentação utilizada em cada um dos sistemas de produção é diferente, nomeadamente na produção biológica, onde apenas são utilizados produtos segundo o modo de produção biológico.

No entanto, e como se observa na Tabela 3, estas diferenças percentuais observadas entre os três sistemas de produção diferentes, relativamente aos genes *cgtB* e *wlaN*, poderão não ser expressivas, uma vez que o número (n) de isolados positivos é baixo. No caso do gene *cgtB*, este foi apenas detectado em dois isolados de frango de produção biológica e um isolado de produção intensiva, não tendo sido detectado nenhum isolado de produção extensiva com este gene, pelo que em termos absolutos existem poucas diferenças entre os três sistemas. O mesmo se observa para o gene *wlaN*, tendo este sido detectado em apenas um isolado de frango de produção biológica e dois isolados de produção intensiva, não tendo sido detectado nenhum

isolado de produção extensiva (Tabela 3). A baixa frequência encontrada dos genes *cgtB* e *wlaN* nos isolados de frangos indica que estes possuem um menor potencial patogénico, uma vez que a presença destes genes está associada a uma maior capacidade de invasão celular, estando também envolvidos no aparecimento da Síndrome de Guillain-Barre.

No caso dos isolados de origem Humana, observou-se uma elevada frequência de isolados com o gene *wlaN* (28%), como se verifica na Tabela 3, e uma baixa frequência do gene *cgtB*, como nos isolados de frango. Como já referido anteriormente, a presença deste gene está associado a uma maior capacidade de invasão celular e, como tal, a uma maior capacidade de evasão do sistema imunitário do hospedeiro, bem como um maior potencial patogénico. Como tal, o facto de os isolados de origem Humana apresentarem uma maior frequência do gene *wlaN* poderá indicar que estes são isolados com maior capacidade para induzir complicações pós-infecção, já que a presença de *wlaN* está envolvido na expressão de um tipo de oligossacárido-GM₁ semelhante ao encontrado nos gangliosídeos humanos e, como tal, induz uma resposta imunitária cruzada entre estes e o LOS presente na superfície deste microrganismo (Gilbert *et al.*, 2008). Esta resposta imunitária poderá levar ao aparecimento da síndrome de Guillain-Barré, como referido anteriormente.

Tal como observado nos genes *cgtB* e *wlaN*, também se verificou uma baixa frequência de isolados positivos para o gene *virB11*, codificado no plasmídeo pVir. De facto, como referido anteriormente, este gene foi apenas encontrado em isolados de frango, tendo-se detectado em 16,67% dos isolados de sistema de produção biológico; 9,09% dos isolados de sistema de produção intensivo e em 7,14% dos isolados de produção extensiva. No entanto, e tal como nos genes *cgtB* e *wlaN*, as diferenças encontradas a nível percentual entre os isolados positivos dos três sistemas de produção diferentes poderão não ser expressivas, uma vez que o número absoluto de isolados positivos é semelhante entre estes (Tabela 3).

9.2. Análise dos perfis de RFLP *flaA*

A tipificação de isolados bacterianos de diferentes origens, fornece informação epidemiológica necessária para o controlo da infecção, bem como permite averiguar o risco associado à transmissão de *Campylobacter*. Através da comparação de diferentes estirpes de *Campylobacter*, provenientes de diferentes origens, como animais e produtos de origem animal, bem como os isolados clínicos humanos, poderá

ser possível estimar o número de casos humanos atribuídos ou associados a determinada fonte animal.

Neste sentido, procedeu-se à tipificação dos isolados em estudo através da técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Numa primeira fase procedeu-se à amplificação do gene *flaA* por PCR, originando um fragmento de 1,7 Kb, que posteriormente foi digerido utilizando uma enzima de restrição (DdeI), que está descrita como a que providencia os resultados mais discriminatórios (Ertas *et al.*, 2004). A construção do dendrograma representado na Figura 10 permite avaliar a heterogeneidade encontrada em isolados de *Campylobacter jejuni* recolhidos em Portugal, uma vez que existe muito pouca informação disponível relacionada com a diversidade genética de isolados presentes no país. Dentro dos isolados de origem animal e de cada um dos três sistemas de produção de aves, foram seleccionados isolados de diferentes bandos, correspondentes a produtores diferentes. Com esta selecção pretendeu-se averiguar se existia alguma homogeneidade entre os isolados das diferentes origens, e se são encontrados subtipos semelhantes em isolados com diferentes origens.

Através da análise do dendrograma verificou-se que existe uma grande diversidade genética dentro dos isolados em estudo de uma forma geral. Esta heterogeneidade vai de encontro ao constatado por outros autores, que verificaram que existe uma grande diversidade genética, mesmo em isolados da mesma origem (Nielsen *et al.*, 2000; Wassenaar e Newell, 2000). De facto, e segundo o observado no dendrograma (Figura 10), parece não existir homogeneidade, mesmo dentro dos isolados da mesma origem e provenientes do mesmo sistema produtivo.

O dendrograma (Figura 10) pode ser dividido em vários grupos (I-XI). A similaridade encontrada nestes grupos varia de 75% a 20%. De uma forma geral, observou-se que no grupo I são encontrados quatro isolados de frango de produção biológica, de quatro produtores diferentes, e que partilham um grau de semelhança de 70% entre si. O grupo II é constituído por isolados de frango de produção extensiva (n=6), de quatro produtores diferentes, e isolados de origem Humana (n=2), partilhando um grau de similaridade de 75% entre si. O grupo III apresenta um grau de semelhança de 62% entre os isolados presentes, sendo este constituído por isolados de origem Humana (n=7), isolados de frango de origem intensiva (n=2), de dois produtores diferentes e um isolado de frango de origem extensiva. O grupo IV é maioritariamente constituído por isolados de origem Humana (n=11) e um isolado de frango de produção intensiva,

partilhando entre si uma semelhança de 68%. Nos grupos de V a XI, o nível de semelhança encontrado foi menor do que nos anteriores. No grupo V, constituído por isolados de origem Humana (n=6) e um isolado de frango de produção intensiva, foi observada uma similaridade de 35% entre os isolados. O grupo VI apresenta isolados de origem Humana (n=3) e isolados de frango de produção extensiva (n=2), de dois produtores diferentes, com um nível de semelhança de 25%. O grupo VII é constituído por isolados de origem Humana (n=11), um isolado de frango de produção intensiva, um isolado de frango de produção extensiva e isolados de frango de produção biológica (n=2), do mesmo produtor, mas recolhidos de locais anatómicos diferentes no frango (peito e pele do pescoço da carcaça), partilhando uma semelhança de 20% entre si. No grupo VIII observa-se um grau de similaridade de 25% entre os isolados, sendo este constituído por isolados de origem Humana (n=4), isolados de frango de produção biológica (n=2), de dois produtores diferentes, isolados de frango de produção extensiva de produtores diferentes (n=2), e isolados de frango de produção intensiva (n=2). O grupo IX é constituído por apenas 3 isolados, sendo que cada um destes provém de frangos de cada um dos sistemas de produção diferentes, partilhando uma homologia de 37% entre si. O grupo X é constituído por isolados de frango de produção biológica (n=2), de dois produtores diferentes, isolados de frango de produção intensiva (n=3), de dois produtores diferentes e isolados de origem Humana (n=2), partilhando entre si uma homologia de 23%. Finalmente, o grupo XI apresenta na sua constituição isolados de origem humana (n=4), um isolado de frango de produção biológica e um isolado de frango de produção extensiva, com um grau de semelhança de 39% entre si.

No caso dos isolados de origem animal, poder-se-ia pensar que o sistema de produção utilizado na criação dos animais pudesse ter alguma influência na diversidade genética, e que os isolados recolhidos de frangos do mesmo sistema de produção apresentassem uma maior similaridade entre eles. No entanto, mesmo dentro dos isolados do mesmo sistema de produção observou-se uma grande diversidade genética, destacando-se apenas alguns pequenos grupos formados. De facto, observou-se que existe um pequeno grupo formado por isolados recolhidos de frangos de origem biológica (BioP5, BioPP3 e BioPP2) de 3 produtores diferentes, e que apresentam um grau de similaridade de cerca de 90%.

Também existe um grupo formado por isolados de origem animal de produção extensiva com um grau de similaridade elevado entre si, apresentando também semelhanças com isolados de origem Humana. De facto, verifica-se que existe uma

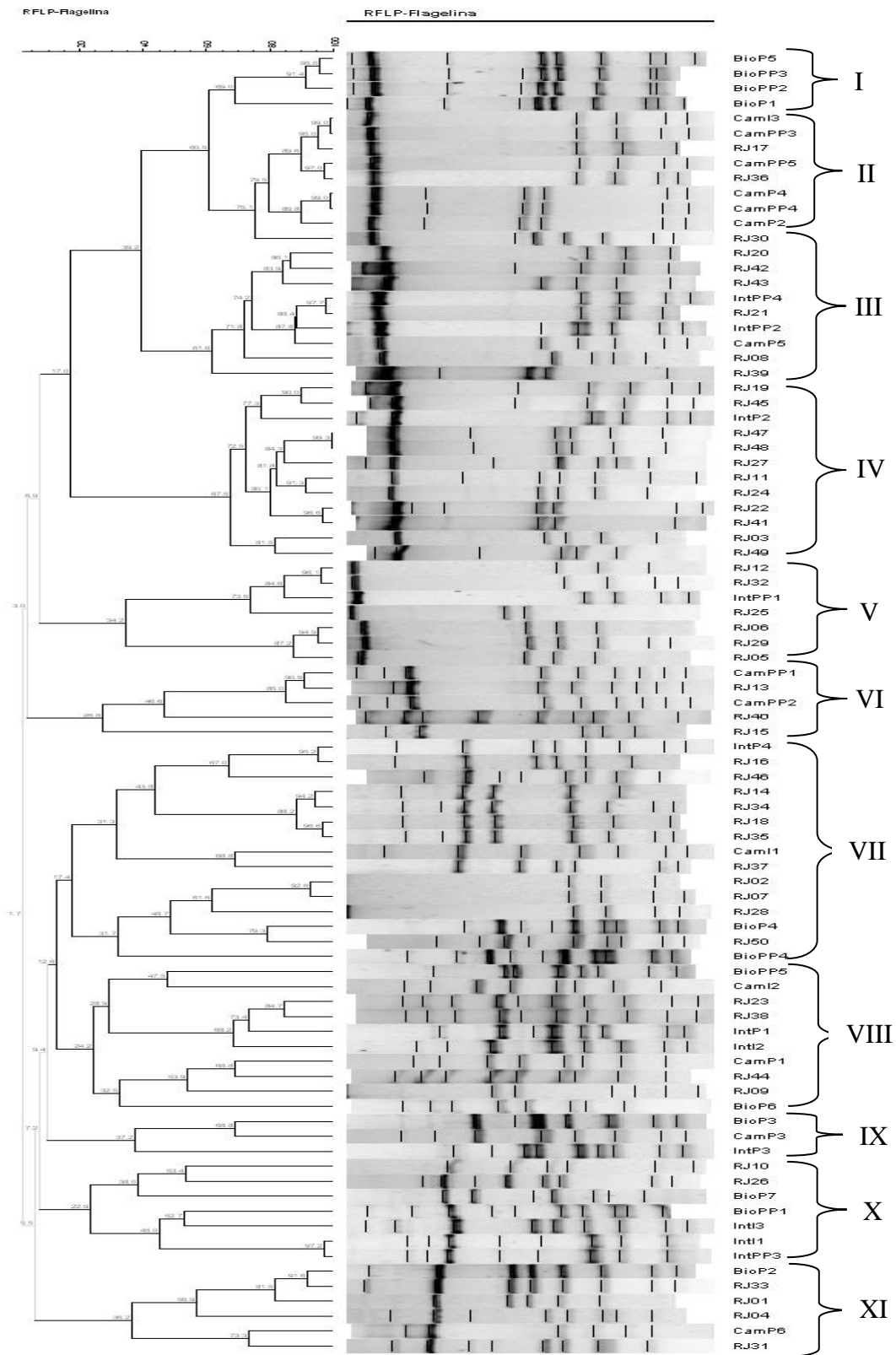
elevada similaridade entre os isolados CamI3 e CamPP3 (de cerca de 99%), e um isolado de origem humana (RJ17), com qual partilham um grau de semelhança de 95%. Neste caso é também importante destacar o facto de existir similaridade elevada entre um isolado recolhido do *caecum* (CamI3) e um isolado recolhido da pele do pescoço da carcaça (CamPP3).

O facto de existir similaridade entre isolados recolhidos de frangos do mesmo produtor, mas de locais anatómicos diferentes, nomeadamente do tracto gastrointestinal e da pele do pescoço, poderá indicar que ocorre contaminação da carcaça durante o processo de abate com conteúdo presente no intestino da própria ave (Alter *et al.*, 2005; Rosenquist *et al.*, 2006).

No entanto, foi também observada uma elevada semelhança entre dois isolados de origem intensiva de bandos diferentes, IntI1 (isolado do *caecum*) e IntPP3 (isolado da pele do pescoço da carcaça). A presença de estirpes nas carcaças de frangos, semelhantes às encontradas no conteúdo gastrointestinal de aves de outros bandos, poderá indicar que ocorre contaminação cruzada na linha de abate, uma vez que no dia de trabalho no matadouro poderão ser abatidos animais de produtores/bandos diferentes (Malher *et al.*, 2011).

Isto também se pode dever ao facto de os animais serem apenas colonizados por um subtipo, quer a nível gastrointestinal, quer na própria pele do animal, uma vez que o ambiente onde são criados propicia a propagação destes organismos. Neste grupo verificou-se ainda que existe um elevado grau de similaridade (90%) entre os isolados referidos anteriormente, RJ17, CamI3 e CamPP3 e os isolados RJ36 (origem humana) e CamPP5 (origem produção extensiva), sendo que estes dois últimos apresentam um grau de similaridade de 97%. Este elevado grau de semelhança encontrado entre isolados de origem animal, nomeadamente de frangos sujeitos a um regime de produção extensivo, e isolados recolhidos de pacientes Humanos, poderá indicar que existe uma relação entre doença e fonte de contaminação, ou seja, observou-se que existe semelhança entre as estirpes encontradas nos frangos e na sua carne, e as que encontradas em pacientes humanos. O mesmo se observou entre outros dois isolados, um de frangos de produção intensiva (IntPP4) e um isolado de origem Humana (RJ21), que partilham um grau de semelhança de 97,7%.

Figura 9 - Dendrograma do RFLP-Fla utilizando a correlação de Pearson e o método de aglomeração UPGMA. Os números de I-XI, representam os grupos formados.



Estes dois isolados partilham ainda um grau de semelhança de 87% com dois isolados de origem animal, um de origem intensiva (IntPP2) e um de origem extensiva (CamP5). Esta semelhança entre isolados recolhidos a partir de amostras de pele do pescoço de carcaças e do peito, de frangos de diferentes sistemas de produção, poderá estar relacionada com contaminações cruzadas que ocorrem durante o processo abate (Johannessen *et al.*, 2007)

No dendrograma pode-se também observar um grupo formado por 7 isolados exclusivamente de origem Humana, e que partilham um grau de semelhança de 83,1%. Dentro deste grupo, observa-se que existem isolados que partilham um grau de semelhança acima dos 90%, como é o caso dos isolados RJ19/RJ45 (93%), RJ47/RJ48 (99,3%), RJ11/RJ 24 (91,3%) e RJ22/RJ41 (91,6%). Este grupo formado por estes isolados, exclusivamente de origem Humana, indica que poderão existir alguns subtipos de *Campylobacter jejuni* com maior capacidade para provocar doença no Homem. Observou-se também a formação de um grupo semelhante, com isolados de origem Humana, nos quais se verificou-se que existem 4 isolados (RJ14, RJ34, RJ18 e RJ35) que partilham um grau de semelhança elevado entre eles (88,2%) e tal como no caso anterior, poderá corresponder a um subtipo com mais propensão para provocar doença no Homem. Encontrou-se homologia entre isolados de origem Humana e isolados de origem animal de produção intensiva, nomeadamente entre os isolados RJ12 e RJ32 com o isolado de IntPP1, bem com entre RJ16 e IntP4. Existe um grau de semelhança elevado (85%) entre 2 isolados de frango de produção extensiva (CamPP1 e CamPP2) e um isolado de origem Humana (RJ13). Entre um isolado de origem Humana (RJ33) e um isolado de origem animal de produção biológica (BioP2), com similaridade (91,6%).

Apesar dos grupos formados observou-se uma grande heterogeneidade entre os isolados em estudo, o que vai de acordo ao constatado por outros autores (Nachamkin *et al.*, 1996; Oporto *et al.*, 2011). De facto, não se observou a formação de grandes grupos formados exclusivamente por isolados de uma mesma origem, o que significa que existe uma grande diversidade genética deste microrganismo. Inicialmente, pensou-se que o tipo de regime de produção dos animais poderia afectar a diversidade encontrada, ou que existira uma predominância de um determinado subtipo deste microrganismo. Segundo os dados obtidos, verifica-se que, não só existe uma grande diversidade entre isolados de diferentes sistemas de produção dos frangos, como também existe uma grande diversidade genética dentro do mesmo sistema de produção animal. Tal como nestes isolados, foi observada também uma

grande diversidade nos isolados de origem Humana, o que indica que, tal como nas aves, não deverá existir um subtipo predominante responsável pelo aparecimento de doença no Homem. No entanto, foram observados alguns isolados de origens diferentes que possuíam uma elevada homologia entre si, como descrito anteriormente. De facto, os isolados de origem Humana apresentaram uma maior semelhança com os isolados de origem animal de produção extensiva, tendo sido encontrados 9 isolados de origem extensiva, que possuíam pelo menos uma homologia de 80% até 95%. O mesmo foi descrito por Krutkiewicz e Klimuszko (2010) que observaram a ocorrência de perfis de *RFLP-Fla* semelhantes (78% de similaridade) entre *C. jejuni* isolados de frangos e humanos e que tal facto poderá indicar as aves como potencial fonte de doença esporádica em humanos. No estudo realizado por Huang e colegas (2009) estes observaram que existiam perfis de *RFLP-Fla* semelhantes entre isolados de origem Humana e animais domésticos (frangos e bovinos), sugerindo que existem estirpes de *C. jejuni* que circulam entre estes. A ocorrência de perfis semelhantes entre isolados de diferentes origens, nomeadamente, entre isolados de origem Humana e isolados foi também observado mesmo utilizando técnicas diferentes. De facto, nos estudos realizados por Broman e colegas (2004) e Peterson e colegas (2001) estes observaram que os isolados de origem animal, nomeadamente de frangos de produção, são os que apresentam subtipos de *Pulse Field Gel Electrophoresis* (PFGE) mais próximos dos encontrados em isolados de origem Humana. Outros estudos utilizando a técnica de *Amplified fragment length polymorphism* (AFLP) podem também ser utilizados no sentido de averiguar de onde provem as estirpes que infectam o Homem. No entanto, existem poucas evidências na capacidade deste método predizer a origem das infecções no Homem (Wieland, 2006). Actualmente, não está definida uma técnica padrão que permita avaliar e tipificar os diferentes isolados de *Campylobacter* de diferentes origens. Uma das técnicas mais promissoras que se pode utilizar neste tipo de estudos é o *Multi Locus Sequence Typing* (MLST), uma vez que apresenta uma elevada reprodutibilidade e um elevado poder discriminatório, face a outros métodos. Para a análise dos diferentes isolados de *Campylobacter* são seleccionados 7 genes relacionados com funções metabólicas ("*house-keeping*"), e que provavelmente estarão presentes em todas as estirpes, permitindo tipificar todos os isolados e avaliar a relação genética entre estes (Maiden *et al.*, 2006). No entanto, e qualquer que seja técnica de tipificação utilizada, observa-se que existe uma grande variabilidade genética neste microrganismo, e que a estrutura populacional deste microrganismo não apresenta um grau elevado de clonalidade, muito em parte devido à recombinação genética que ocorre neste

microrganismo (McCarthy *et al.*, 2007). Neste sentido, para uma melhor análise da diversidade, deverão ser utilizados diferentes métodos de tipificação genómica dos diferentes isolados, nomeadamente utilizando as técnicas de MLST, PFGE e/ou RFLP. Neste estudo foi utilizado o método RFLP, do gene *flaA*. Este método permite de uma forma rápida e simples analisar possíveis ligações entre determinados genótipos de *Campylobacter jejuni* com determinada fonte de contaminação. De facto, este método molecular tem sido utilizado ao longo dos anos para diversos estudos epidemiológicos de *C. jejuni* (Nachamkin *et al.*, 1993, Petersen e On, 2000, Wittwer *et al.*, 2005). No entanto, tal como referido anteriormente, deverão ser utilizadas outras técnicas em conjunto de forma a uma melhor caracterização dos isolados. No estudo efectuado por Zorman e colegas (2006), utilizaram-se as técnicas de PFGE e RFLP para caracterizar os seus isolados (humanos e de carne de frango pronta-a-consumir). Estes autores observaram que existiam algumas diferenças entre as duas técnicas. A técnica de PFGE permitiu uma maior discriminação entre os isolados do que a técnica de RFLP. No entanto, e tal como referido por estes autores, esta técnica é mais dispendiosa e morosa, para além dos resultados serem bastante influenciados por rearranjos genómicos recombinação e mutações pontuais, uma vez que esta técnica analisa todo o genoma, e não apenas uma porção deste como no caso da técnica de RFLP (Nielsen *et al.*, 2000).

Neste sentido, e de forma a completar melhor este estudo e compreender a dinâmica dos isolados de *Campylobacter jejuni* encontrados em Portugal, tanto de origem animal, nomeadamente as aves, como as encontradas em casos esporádicos de campilobacteriose Humana, poder-se-ia adoptar conjuntamente com a metodologia de RFLP-Fla utilizada, uma outra técnica de tipificação molecular. Utilizando as metodologias de PFGE ou MLST poderia ser verificada qual o nível de heterogeneidade dos isolados em estudo que se mostram homólogos pelo RFLP-Fla, e se existem grupos que partilham subtipos semelhantes onde estejam incluídos isolados de diferentes origens animais (aves, bovinos, suínos) e Humanas, permitindo apurar quais as principais fontes de infecção do Homem em Portugal.

10. Conclusão

Uma vez que o consumo de carne de aves parece estar intimamente associado ao aparecimento de doença no Homem, torna-se indispensável o estudo e caracterização de estirpes que sejam isoladas das carcaças e da carne fresca destes animais, e dos isolados encontrados no Homem quando surge doença neste. Torna-se necessário que estas estirpes sejam caracterizadas quanto ao seu potencial patogénico, ou seja, averiguar qual a prevalência de genes implicados na virulência e patogénese deste microrganismo. São também necessários estudos epidemiológicos que permitam tipificar e averiguar quais as fontes de infecção do Homem em casos esporádicos de campilobacteriose, fazendo cruzando dados sobre perfis genéticos encontrados nos isolados Humanos e os encontrados nas principais fontes de infecção, como carne de aves e outros alimentos.

Os resultados obtidos revelaram que dos 9 genes de virulência estudados, cinco (*cdtA*, *cdtB*, *cdtC*, *cadF* e *flaA*) estavam presentes em todos os isolados em estudo, tanto de origem animal (n=37), como de origem Humana (n=50). Os genes responsáveis pelo aparecimento da síndrome de Guillain-Barré (*cgfB* e *wlaN*) estavam presentes em baixa percentagem, exceptuando no caso dos isolados de origem Humana, que apresentavam 28% de isolados positivos para o gene *wlaN*.

A presença dos três genes CDT em todos os isolados poderá indicar a capacidade de produção de toxina activa e, conseqüentemente, o aparecimento de sintomatologia em humano. Embora a percentagem de isolados positivos para genes *cgfB* e *wlaN* tenha sido baixa, continua a ser importante a avaliação da presença deste e de outros genes do locus LOS, de forma a avaliar a prevalência de estirpes mais propensas ao desenvolvimento da síndrome de Guillain-Barré em humanos.

Através da análise dos perfis genéticos dos diferentes isolados verificou-se que existe uma grande heterogeneidade e uma grande diversidade genética nos isolados em estudo, de uma forma geral.

No entanto, observaram-se isolados que possuíam um elevado grau de semelhança entre si (superior a 90%), mas de origens diferentes. De facto, observou-se que existiam diversos isolados de frango de produção extensiva que apresentavam perfis semelhantes aos encontrados em isolados Humanos. Foram também encontrados outros isolados de origem Humana que possuíam perfis semelhantes com isolados de frango de origem intensiva.

Isolados de *Campylobacter* do intestino de aves provenientes de bandos diferentes apresentaram perfis genéticos diferenciados, com baixo grau de semelhança entre si.

A presença de perfis RFLP-Fla semelhantes entre isolados de diferentes origens, nomeadamente, entre isolados de aves e Humana, indicia que foram causadores de doença no Homem, podendo-se estabelecer relação entre esta fonte de infecção com os casos clínicos humanos encontrados nos Hospitais Portugueses em 2009.

11. Bibliografia

- Alter, T., Gaull, F., Froeb, A. e Fehlhaber, K. (2005). Distribution of *Campylobacter jejuni* strains at different stages of a turkey slaughter line. *Food Microbiology*. 22, 345-351.
- Ashgar, S.S., Oldfield, N.J., Wooldridge, K.G., Jones, M.A., Irving, G.J., Turner, D.P. e Ala'Aldeen, D.A. (2007). CapA, an autotransporter protein of *Campylobacter jejuni*, mediates association with human epithelial cells and colonization of the chicken gut. *J. Bacteriol.* 189 (5), 1856-65.
- Bacon, D.J., Alm, R.A., Burr, D.H., Hu, L., Kopecko, D.J., Ewing, C.P., Trust, T.J. e Guerry, P. (2000). Involvement of a plasmid in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Infect. Immun.* 68, 4384–4390.
- Bang, D.D., Nielsen, E.M., Scheutz, F., Pedersen, K., Handberg, K. e Madsen, M. (2003). 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. *J. Appl. Microbiol.* 94, 1003-1014.
- Bhavsar, S. e Kapadnis, B. (2007). Virulence factors of *Campylobacter*. *The Internet Journal of Microbiology*, 3. Acedido em Fev. 26, 2011, disponível em: <http://www.ispub.com>
- Bourke, B. (2002). *Campylobacter* infection: small bowel and colon. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 18, 4-9.
- Boysen, L., Knøchel, S. e Rosenquist, H. (2006). Survival of *Campylobacter jejuni* in different gas mixtures. *FEMS Microbiology Letters*. 266, 152-157.
- Broman, T., Waldenstrom, J., Dahlgren, D., Carlsson, I., Eliasson, I. e Olsen, B. (2004). Diversities and similarities in PFGE profiles of *Campylobacter jejuni* isolated from migrating birds and humans. *J. Appl. Microbiol.* 96, 834-43.
- Byrne, C.M., Clyne, M. e Bourke, B. (2007). *Campylobacter jejuni* adhere to and invade chicken intestinal epithelial cells *in vitro*. *Microbiology*. 153, 561-569.
- Carrillo, C.D., Taboada, E., Nash, J.H.E., Lanthier, P., Kelly, J., Lau, P.C., Verhulp, R., Mykytczuk, O., Sy, J., Findlay, W.A., Amoako, K., Gomis, S., Willson, P., Austin, J.W., Potter, A., Babiuk, L., Allan, B. e Szymanski, C.M. (2004). Genome-wide expression analyses of *Campylobacter jejuni* NCTC11168 reveals coordinate regulation of motility and virulence by flhA. *J. Biol. Chem.* 279, 20317–20338.
- Chang, C. e Miller, J.F. (2006). *Campylobacter jejuni* colonization of mice with limited enteric flora. *Infect. Immun.* 74, 5261–5271.

Chansiripornchai, N. e Sasipreeyajan, J. (2009). PCR detection of four virulence-associated genes of *Campylobacter jejuni* isolates from Thai broilers and their abilities of adhesion to and invasion of INT-407 cells. J. Vet. Med. Sci. 71 (6), 839-844.

Dasti, J.I., Tareen, A.M., Lugert, R., Zautner, A.E. e Grob, U. (2010). *Campylobacter jejuni*: A brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. International Journal of Medical Microbiology. 300, 205-211.

Datta, S., Niwa, H. e Itoh, K. (2003). Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler and bovine faeces. J. Med. Microbiology. 52, 345-348.

de Boer, P., Wagenaar, J.A., Achterberg, R.P., van Putten, J.P.M., Schouls, L.M. e Duim, B. (2002). Generation of *Campylobacter jejuni* genetic diversity *in vivo*. Mol. Microbiol. 44 (2), 351-359.

Denis, M., Soumet, C., Rivoal, K., Ermel, G., Blivet, D., Salvat, G. e Colin, P. (1999). Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. Letters in Applied Microbiology. 29(6), 406-410.

Doyle, M.P. e Roman, D.J. (1981). Growth and survival of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* as a function of temperature and pH. Journal of Food Protection. 44, 596-601.

Ertas, H.B., Çetinkaya, B., Muz, A. e Öngör, H. (2004). Genotyping of broiler-originated *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates using *fla* typing and random amplified polymorphic DNA methods. International Journal of Food Microbiology. 94, 203-209.

European Food Safety Authority (EFSA). (2010). Scientific Opinion on Quantification of the risk posed by broiler meat to human campylobacteriosis. EFSA Journal. 8 (1), 1437.

European Food Safety Authority (EFSA). (2011). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. EFSA Journal. 9 (3), 2090.

Euzéby, J.P. (2011). List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Acedido em Set. 12, 2011, disponível em: <http://www.bacterio.net>.

Fouts, D.E., Mongodin, E.F., Mandrell, R.E., Miller, W.G., Rasko, D.A., Ravel, J., Brinkac, L.M., DeBoy, R.T., Parker, C.T., Daugherty, S.C., Dodson, R.J., Durkin, A.S., Madupu, R., Sullivan, S.A., Shetty, J.U., Ayodeji, M.A., Shvartsbeyn, A., Schatz, M.C., Badger, J.H., Fraser, C.M. e Nelson, K.E. (2005). Major structural differences and novel potential virulence mechanisms from the genomes of multiple *campylobacter* species. PLoS Biol. 3 (1), p.15.

Ge, Z., Schauer, D.B. e Fox, J.G. (2008). *In vivo* virulence properties of bacterial cytolethal-distending toxin. *Cellular Microbiology*. 10 (8), 1599-1607.

Gilbert, M., Godschalk, P.C.R.; Parker, C.T.; Endtz, H.P e Wakarchuk, W.W. (2005). Genetic basis for the variation in the lipooligosaccharide outer core of *Campylobacter jejuni* and possible association of glycosyltransferase genes with post-infectious neuropathies, p. 219-248. In J.M. Ketley and M.E. Konkel (ed), *Campylobacter*. Molecular and Cellular Biology.

Gilbert, M., Parker, C.T. e Moran, A.P. (2008). *Campylobacter jejuni* Lipooligosaccharides: Structures and Biosynthesis. 3rd ed., ASM Press, Washington, DC.

Godschalk, P.C.R., Gilbert, M., Jacobs, B.C., Kramers, T., Tio-Gillen, A.P., Ang, C.W., Van den Braak, N., Li, J., Verbrugh, H.A., Belkum, A.V. e Endtz, H. (2006). Co-infection with two different *Campylobacter jejuni* strains in a patient with the Guillain-Barré syndrome. *Microbes and Infection*. 8, 248-253.

Guerry, P. (2007). *Campylobacter* flagella: not just for motility. *Trends in Microbiology*. Vol. 15, No. 10.

Guerry, P. e Szymanski, C.M. (2008). *Campylobacter* sugars sticking out. *Trends in Microbiology*. p. 428-435.

Huang, J.L., Xu, H.Y., Bao, G.Y., Zhou, X.H., Ji, D.J., Zhang, G., Liu, P.H., Jiang, F., Pan, Z.M., Liu, X.F. e Jiao, X.A. (2009). Epidemiological surveillance of *Campylobacter jejuni* in chicken, dairy cattle and diarrhoea patients. *Epidemiology and Infection*. 137, 1111-1120.

Humphrey, T.J., O'Brien, S. e Madsen, M. (2007). *Campylobacters* as zoonotic pathogens: a food production perspective. *International Journal of Food Microbiology*. 117, 237-257.

ISO (2005). International Standard ISO/FDIS 10272-1. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs - Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. Part 1: Detection method. International Standard Organization. Geneva.

Jin, S., Joe, A., Lynett, J., Hani, E.K., Sherman, P. e Chan, V.L. (2001). JlpA, a novel surface-exposed lipoprotein specific to *Campylobacter jejuni*, mediates adherence to host epithelial cells. *Mol. Microbiol*. 39 (5), 1225-1236.

Jin, S., Song, Y.C., Emili, A., Sherman, P.M. e Chan, V.L. (2003). JlpA of *Campylobacter jejuni* interacts with surface-exposed heat shock protein 90 α and triggers signaling pathways leading to the activation of NF- κ B and p38 MAP kinase in epithelial cells. *Cell. Microbiol*. 5, 165-174.

Johannessen, G.S., Johnsen, G., Økland, M., Cudjoe, K.S. e Hofshagen, M. (2007). Enumeration of thermotolerant *Campylobacter* spp. from poultry carcasses at the end of the slaughter-line. *Letters in Applied Microbiology*. 44, 92–97.

Kelly, A.F., Park, S.F., Bovill, R. e Mackey, B.M. (2001). Survival of *Campylobacter jejuni* during stationary phase: evidence for the absence of a phenotypic stationary-phase response. *Applied and Environmental Microbiology*. 67, 2248-2254.

Keum-Il, J., Kim, M., Ha, S., Kim, K., Lee, K., Chung, D., Kim, C. e Kim, K. (2007). Morphology and adhesion of *Campylobacter jejuni* to chicken skin under varying conditions. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 17, 202-206.

Knudsen KN, Bang DD, Andresen LO, and Madsen M. (2006). *Campylobacter jejuni* strains of human and chicken origin are invasive in chickens after oral challenge. *Avian Dis*. 50, 10-14.

Komagamine, T. e Yuki, N. (2006). Ganglioside mimicry as a cause of Guillain-Barre syndrome. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*. 5, 391-400.

Konkel, M.E., Garvis, S.G., Tipton, S.L., Anderson Jr., D.E. e Cieplak Jr., W. (1997). Identification and molecular cloning of a gene encoding a fibronectin-binding protein (CadF) from *Campylobacter jejuni*. *Mol. Microbiol*. 24, 953-963.

Konkel, M.E., Kim, B.J., Rivera-Amill, V. e Garvis, S.G. (1999a). Identification of proteins required for the internalization of *Campylobacter jejuni* into cultured mammalian cells. *Adv. Exp. Med. Biol*. 473, 215-224.

Konkel, M.E., Kim, B.J., Rivera-Amill, V. e Garvis, S.G. (1999b). Bacterial secreted proteins are required for the internalization of *Campylobacter jejuni* into cultured mammalian cells. *Mol. Microbiol*. 32, 691-701.

Konkel, M.E., Klena, J.D., Rivera-Amill, V., Monteville, M.R., Biswas, D., Raphael, B. e Mickelson, J. (2004). Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is dependent on a functional flagellar export apparatus. *Journal of Bacteriology*. 186, 3296-3303.

Kordinas, V., Nicolaou, C., Ioannidis, A., Papavasileiou, E., John-Legakis, N. e Chatzipanagiotou, S. (2005). Prevalence of four virulence genes in *Campylobacter jejuni* determined by PCR and sequence analysis. *Mol Diagn*. 9 (4), 211-5.

Krutkiewicz, A. e Klimuszko, D. (2010). Genotyping and PCR detection of potential virulence genes in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from different sources in Poland. *Folia Microbiol*. 55 (2), 167-175.

Kuwabara, S. (2007). Guillain-barre syndrome. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep*. 7, 57-62.

- Lara-Tejero, M. e Galan, J.E. (2000). A bacterial toxin that controls cell cycle progression as a deoxyribonuclease I-like protein. *Science*. 290, 354–357.
- Lara-Tejero, M. e Galan, J.E. (2001). *CdtA*, *CdtB* and *CdtC* form a tripartite complex that is required for cytolethal distending toxin activity. *Infection and Immunity*. 69 (7), 4358-4365.
- Lin, J. (2009). Novel approaches for *Campylobacter* control in poultry. *Foodborne Pathogens and Disease*. 6 (7), 755-765.
- Linton, D., Gilbert, M., Hitchen, P.G., Dell, A., Morris, H.R., Wakarchuk, W.W., Gregson, N.A. e Wren, B.W. (2000). Phase variation of a β -1,3 galactosyltransferase involved in generation of the ganglioside GM1-like lipo-oligosaccharide of *Campylobacter jejuni*. *Mol. Microbiol.* 37, 501-514.
- Madden, R.H., Moran, L. e Scates, P. (1998). Frequency of occurrence of *Campylobacter* spp. in red meats and poultry in Northern Ireland and their subsequent subtyping using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism and the random amplified polymorphic DNA method. *Journal of Applied Microbiology*. 84, 703-708.
- Maiden, M.C. (2006). Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 60, 561-88.
- Malher, X., Simon, M., Charnay, V., Danguy des Déserts, R., Lehébel, A. e Belloc, C. (2011). Factors associated with carcass contamination by *Campylobacter* at slaughterhouse in cecal-carrier broilers. *International Journal of Food Microbiology*. 150, 8-13.
- Mamelli, L., Pages, J.M., Konkel, M.E. e Bolla, J.M. (2006). Expression and purification of native and truncated forms of CadF, an outer membrane protein of *Campylobacter*. *Int. J. Biol. Macromol.* 39, 135-140.
- Martínez, I., Mateo, E., Churruca, E., Girbau, C., Alonso, R. e Fernández-Astorga, A. (2005). Detection of *cdtA*, *cdtB*, and *cdtC* genes in *Campylobacter jejuni* by multiplex PCR. *International Journal of Medical Microbiology*. 296, 45-48.
- McCarthy, N.D., Colles, F.M., Dingle, K.E., Bagnall, M.C., Manning, G., Maiden, M.C. e Falush, D. (2007). Host-associated genetic import in *Campylobacter jejuni*. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 267-72.
- Monteville, M.R., Yoon, J.E. e Konkel, M.E. (2003). Maximal adherence and invasion of INT 407 cells by *Campylobacter jejuni* requires the CadF outer membrane protein and microfilament reorganization. *Microbiology*. 149, 153-165.
- Müller, J., Birgit, M., Hänel, I. e Hotzel, H. (2007). Comparison of lipooligosaccharide biosynthesis genes of *Campylobacter jejuni* strains with varying abilities to colonize the chicken gut and to invade Caco-2 cells. *Journal of Medical Microbiology*. 56, 1589-1594.

- Müller, J., Schulze, F., Müller, W. e Hänel, I. (2006). PCR detection of virulence-associated genes in *Campylobacter jejuni* strains with differential ability to invade Caco-2 cells and to colonize the chick gut. *Veterinary Microbiology*. 113, 123-129.
- Nachamkin, I., Bohachick, K. e Patton, C.M. (1993). Flagellin gene typing of *Campylobacter jejuni* by restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 31, 1531-1536.
- Nachamkin, I., Ung, H. e Patton, C.M. (1996). Analysis of HL and O serotypes of *Campylobacter* strains by the flagellin gene typing system. *Journal of Clinical Microbiology*. 34, 277-281.
- Nielsen, E.M., Engberg, J., Fussing, V., Petersen, L., Brogren, C.H. e On, S.L.W. (2000). Evaluation of phenotypic and genotypic methods for subtyping *Campylobacter jejuni* isolates from humans, poultry, and cattle. *Journal of Clinical Microbiology*. 38, 3800-3810.
- Oporto, B., Juste, R.A., López-Portolés, J.A. e Hurtado, A. (2011). Genetic Diversity among *Campylobacter jejuni* Isolates from Healthy Livestock and Their Links to Human Isolates in Spain. *Zoonoses and Public Health*. 58 (5), 365-375.
- Parker, C.T., Horn, S.T., Gilbert, M., Miller, W.G., Woodward, D.L. e Mandrell, R.E. (2005). Comparison of *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharide biosynthesis loci from a variety of sources. *Journal of Clinical Microbiology*. p. 2771-2781.
- Parkhill, J., Wren, B.W., Mungall, K., Ketley, J.M., Churcher, C. e Basham, D. (2000). The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature*. 403, 665-668.
- Petersen, L., Nielsen, E.M., Engberg, J., On, S.L. e Dietz, H.H. (2001). Comparison of genotypes and serotypes of *Campylobacter jejuni* isolated from Danish wild mammals and birds and from broiler flocks and humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3115-3121.
- Pitcher, D.G., Saunders, N.A. e Owen, R.J. (1989). Rapid extraction of bacterial DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology*. 8, 1511-1516.
- Ripabelli, G., Tamburro, M., Minelli, F., Leone, A. e Sammarco, M.L. (2009). Prevalence of virulence-associated genes and cytolethal distending toxin production in *Campylobacter* spp. isolated in Italy. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*.
- Rivera-Amill, V., Kim, B.J., Seshu, J. e Konkel, M.E. (2001). Secretion of the virulence-associated *Campylobacter* invasion antigens from *Campylobacter jejuni* requires a stimulatory signal. *J. Infect. Dis.* 183, 1607-1616.

Robinson, D.A. (1981). Infectious dose of *Campylobacter jejuni* in milk. *British Medical Journal*. 282, 1584.

Rosenquist, H., Sommer, H.M., Nielsen, N.L. e Christensen, B.B. (2006). The effect of slaughter operations on the contamination of chicken carcasses with thermotolerant *Campylobacter*. *International Journal of Food Microbiology*. 108, 226–232.

Rozynek, E., Dzierzanowska-Fangrat, K., Jozwiak, P., Popowski, J., Korsak, D. e Dzierzanowska, D. (2005). 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*. 54 (7), 615-619.

Samosornsuk, W., Asakura, M., Yoshida, E., Taguchi, T., Nishimura, K., Eampokalap, B., Phongsisay, V., Chaicumpa, W. e Yamasaki, S. (2007). Evaluation of a cytolethal distending toxin (cdt) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the identification of *Campylobacter* strains isolated from poultry in Thailand. *Microbiol. Immunol.* 51 (9), 909-917.

Sebald, M. e Véron, M. (1963). Teneur en bases de L'ADN et classification de vibrions. *Ann. de l'Inst. Pasteur*. 105, 897-910.

Skirrow, M.B. (2006). John McFadyean and the centenary of the first isolation of *Campylobacter* species. *Clin. Infect. Dis.* 43, 1213-1217.

Snelling, W.J., Matsuda, M., Moore, J.E. e Doodley, J.S. (2005). Under the microscope. *Campylobacter jejuni*. *Letters in Applied Microbiology*. 41, 297-302.

Totten, P.A., Patton, C.M., Tenover, F.C., Barrett, T.J., Stamm, W.E., Steigerwalt, A.G., Lin, J.Y., Holmes, K.K. e Brenner, D.J. (1987). Prevalence and characterization of hippurate-negative *Campylobacter jejuni* in King County, Washington. *Journal of Clinical Microbiology*. 25, 1747-1752.

Van Deun, K., Pasmans, F., Ducatelle, R., Flahou, B., Vissenberg, K., Martel, A., Van den, B.W., Van Immerseel, F. e Haesebrouck, F. (2008). Colonization strategy of *Campylobacter jejuni* results in persistent infection of the chicken gut. *Vet Microbiol.* 130, 285–297.

Vandamme, P. (2000). Microbiology of *Campylobacter* infections: taxonomy of the family *Campylobacteraceae*. In I. Nachamkin & M.J. Blaser (Eds.), *Campylobacter*. p. 3-26. Washington, DC: ASM Press.

Vincent, R., Dumas, J. e Picard, N. (1947). Septicémie grave au cours de la grossesse due à un Vibron. Avortement consécutif. *Bull. Acad. Nat. Med. Paris*. 90-92.

- Wagenaar, J.A., Mevius, D.J. e Havelaar, A.H. (2006). *Campylobacter* in primary animal production and control strategies to reduce the burden of human campylobacteriosis. *Revue Scientifique et Technique de L'Office International des Epizooties*. 25 (2), 581-594.
- Wassenaar, T.M. e Newell, D.G. (2000). Genotyping of *Campylobacter* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. 66, 1-9.
- Wassenaar, T.M., Wagenaar, J.A., Rigter, A., Fearnley, C., Newell, D.G. e Duim, B. (2002). Homonucleotide stretches in chromosomal DNA of *Campylobacter jejuni* display high frequency polymorphism as detected by direct PCR analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 212, 77-85.
- Wieland, B., Wittwer, M., Regula, G., Wassenaar, T.M., Burnens, A.P., Keller, J. e Stark, K.D. (2006). Phenon cluster analysis as a method to investigate epidemiological relatedness between sources of *Campylobacter jejuni*. *J Appl Microbiol.* 100, 316-24.
- Wilson, D.J., Gabriel, E., Leatherbarrow, A.J., Cheesbrough, J., Gee, S., Bolton, E., Fox, A., Fearnhead, P., Hart, C.A. e Diggle, P.J. (2008). Tracing the source of campylobacteriosis. *PLoS Genet*.
- Young, G.M., Schmiel, D.H. e Miller, V.L. (1999). A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 96, 6456-6461.
- Young, K.T., Davis, L.M. e DiRita, V.J. (2007). *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nature Reviews, Microbiology*. 5, 665-676.
- Zilbauer, M., Dorrel, N., Wren, B.W. e Bajaj-Elliott, M. (2008). *Campylobacter jejuni*-mediated disease pathogenesis: an update. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 102, 123-129.
- Ziprin, R.L. et al. (2001). Role of *Campylobacter jejuni* potential virulence genes in cecal colonization. *Avian Dis.* 45, 549-557.
- Ziprin, R.L., Young, C.R., Stanker, L.H., Hume, M.E. e Konkel, M.E. (1999). The absence of cecal colonization of chicks by a mutant of *Campylobacter jejuni* not expressing bacterial fibronectin-binding protein. *Avian Dis.* 43, 586-589.
- Zorman, T., Heyndrickx, M., Uzunovic-Kamberovic, S. e Smole Mozina, S. (2006). Genotyping of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from retail chicken meat and humans with campylobacteriosis in Slovenia and Bosnia and Herzegovina. *Internat. J. Food Microbiol.* 110, 24-33