

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Jacqueline Darc da Silva Thomé

**"CITOTOXINAS E HEMOLISINAS PRODUZIDAS POR
Campylobacter jejuni ISOLADOS DE DIFERENTES ORIGENS"**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Genética e Biologia Molecular
na área de Microbiologia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Tomomasa Yano

Campinas
2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

T369f

Thomé, Jacqueline Darc da Silva
Citotoxinas e hemolisinas produzidas por
Campylobacter jejuni isolados de diferentes origens /
Jacqueline Darc da Silva Thomé. -- Campinas, SP: [s.n.],
2006.

Orientador: Tomomasa Yano.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Campylobacter jejuni*. 2. Citotoxinas. 3.
Hemólise e hemolisinas. 4. Fatores de virulência. I.
Yano, Tomomasa. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Citotoxins and hemolysins produced for *Campylobacter jejuni* isolated from different sources.

Palavras-chave em inglês: *Campylobacter jejuni*; Cytotoxins; Hemolysis and hemolysins; Virulence factors.

Área de concentração: Microbiologia.

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Tomonasa Yano, Ana Luiza Lauria Filgueiras, Maria Silvia Viccari Gatti.

Data da defesa: 12/04/2006.

Campinas, 12 de Abril de 2006.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Tomomasa Yano
(Orientador)



Assinatura

Profa. Dra. Ana Luzia Lauria Filgueiras
(Titular)



Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti
(Titular)



Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Brocchi
(Suplente)

Assinatura

Dra. Gleize Villela Carbonel
(Suplente)

Assinatura

*“...Se não puder fazer tudo
Faça tudo que puder...”*
(Autor desconhecido)

Dedico este trabalho a meu querido
marido Roberto Carlos por todo seu
amor, carinho, apoio, compreensão
e total incentivo, sempre;

e

Ao meu amado baby que está por vir,
inspiração maior na minha vida,
me dando a força que
faltava na reta final

Agradecimentos:

Sozinha, com certeza não teria conseguido chegar até aqui, então é com muito prazer que venho agradecer:

Ao Prof. Dr. Tomomasa Yano, pela orientação e pela oportunidade que me foi dada para o desenvolvimento desse trabalho em seu laboratório;

À Profa. Dra. Ana Luzia Lauria Filgueiras por despertar meu interesse pela Microbiologia, por todo ensinamento, por toda amizade, pelo aceite e auxílio na banca examinadora e por tudo;

À Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti, por todo aprendizado e conhecimento compartilhado e pelo aceite e participação na banca examinadora;

À Dra. Gleize V. Carbonell e Prof. Dr. Domingos da Silva Leite, pelo aceite ao convite e valiosas contribuições durante a pré-banca;

Ao Prof Heriberto Fernandez, pela disponibilidade, simpatia e carisma que estimulam a todos no estudo da bactéria mais “charmosa” existente.

Aos funcionários Ana Lucia Soledade, Ana Stela Menegon, Erivaldo Silva, Evandro Silva, Mirtis Ferraz e Sandra Martins por todo auxílio e ajuda fundamental sempre que solicitados;

Aos colegas e companheiros de laboratório Ana Carolina Teles, Cláudio Ventura, Cleide Catani, Daniel Kota, Daniela Ribeiro, Luciano Martins, Marcelo Ananias, Márcia Tomy, Marilucia Ludovico, Patrícia Figueiredo e Silvia Simi por toda amizade e companheirismo que fizeram esta jornada bem mais agradável.

Aos colegas de departamento Cláudia Moura, Georgio Valadares, Mario Paulo, Monique Tiba e Tatiane Amabile pela ótima convivência e total disponibilidade para troca de idéias;

Às amigas Bianca Mandarinó e Juliana Vital Brasil pela amizade sincera e verdadeira e pelas palavras de auxílio nos momentos necessários;

Aos eternos amigos e companheiros de laboratório Mônica Vilaro e Wagner Thadeu, e aos mais recentes, Grazielle Mendes, Pricila Schvarstman e Sheila Duque por me fornecerem abrigo e ajuda quando necessário;

Aos amigos Luiz Pizzini, Cristina Schuch e André Strieder pelas risadas e momentos tão preciosos e necessários de descontração;

Aos meus familiares, em especial meus pais Miguel Arcanjo da Silva e Angela Darc da Silva, e a meu irmão Fabio Henrique da Silva Brocca, por acreditarem em mim mais do que eu mesma e pelo orgulho incondicional;

À Universidade Estadual de Campinas, por promover conhecimento e oportunidades aos seus alunos;

À Capes pelo apoio financeiro;

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

Finalizo agradecendo a Deus por me prover da força necessária para o término de mais uma etapa da minha vida, na qual adquiri importante experiência profissional e de vida, e por todas estas pessoas que cruzaram meu caminho.

Obrigada.

ÍNDICE GERAL

Páginas

Índice de Quadros.....	x
Índice de Figuras.....	x
Índice de Tabelas.....	xi
Índice de Esquemas.....	xii
Resumo.....	xiii
Abstract.....	xiv
1. - Introdução.....	15
1.1 - Histórico.....	16
1.2 - Descrição do gênero.....	19
1.3 - Métodos de identificação laboratorial	21
1.4 - Epidemiologia.....	23
1.5 - Aspectos clínicos.....	26
1.6 - Fatores de virulência.....	28
2. - Objetivos.....	35
3. - Materiais e Métodos.....	36
3.1 - Procedência das amostras de campo.....	36
3.2 - Amostra Padrão.....	37
3.3 - Manutenção da amostras.....	38
3.4 - Estudo das citotoxinas produzidas por <i>C. jejuni</i>	38
3.4.1 - Meios de cultura.....	38
3.4.2 - Preparo dos sobrenadantes	39
3.4.3 - Sonicação do crescimento bacteriano.....	39
3.4.4 - Preparo das culturas celulares.....	40
3.4.5 - Detecção de citotoxidade da <i>C. jejuni</i> em linhagens celulares.	40
3.4.6 - Teste de viabilidade celular.....	41
3.5 - Detecção da atividade hemolítica.....	42
3.5.1 - Pesquisa de hemolisina em meio sólido.....	42
3.5.2 - Atividade hemolítica no sobrenadante de cultura.....	42

3.5.3 - Cultivo na presença de agentes quelantes e soluções de íons - Influências da condição de cultivo na expressão da hemolisina	43
3.6 - Detecção do gene <i>cdtB</i> através da técnica da Reação da Polimerase em cadeia (PCR).....	43
3.6.1 - Obtenção do DNA bacteriano.....	43
3.6.2 - Detecção dos genes <i>cdtB</i> por PCR.....	44
3.6.3 - Condições para a realização da técnica da PCR.....	46
3.6.4 - Eletroforese do produto amplificado.....	46
4. - Resultados.....	47
4.1 - Estudos das citotoxinas produzidas por <i>C. jejuni</i>	47
4.1.1 - Seleção do meio de cultivo para obtenção das citotoxinas produzidas por <i>C. jejuni</i>	47
4.1.2 - Comparação da produção das citotoxinas após sonicação.....	48
4.1.3 - Detecção de citotoxinas.....	48
4.1.4 - Frequência da produção das citotoxinas de <i>C. jejuni</i> isolados de diferentes origens.....	49
4.1.5 - Efeito citotóxico da toxina CDT.....	50
4.2 - Detecção da atividade hemolítica.....	50
4.2.1 - Pesquisa de hemolisina em meio sólido.....	50
4.2.2 - Frequência de positividade para hemolisina nas amostras de <i>C. jejuni</i> de difentes origens, frente a diferentes hemácias.....	51
4.2.3. - Influência de agentes quelantes e solução de íons na expressão de hemolisina.....	51
4.2.4 - Associação entre produção de citotoxina e hemolisina.....	52
4.3 - Detecção dos genes de <i>cdtB</i> pela PCR.....	52
5. - Discussão.....	61
6. - Conclusões.....	70
7. - Anexo.....	72
8. - Referências Bibliográficas.....	81

ÍNDICE DE QUADROS

Páginas

Quadro 1 – Número e procedência das amostras de <i>C. jejuni</i> e sua identificação.....	36
Quadro 2 - Componentes e insumos necessários para a realização da técnica da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR).....	45
Quadro 3 - Seqüência de oligonucleotídeo utilizados para o ensaio da PCR e tamanho (pb) do fragmento produzidos na amplificação para o gene <i>cdtB</i> em <i>C. jejuni</i>	45
Quadro 4 - Programa de ciclos para amplificação em ensaio da PCR.....	46
Quadro 5 - Esquema de biotipificação proposto por Lior (1984).....	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Páginas

Figura 1 - Frequência das citotoxinas detectadas em amostras de <i>C. jejuni</i>	54
Figura 2 - Frequência das diferentes citotoxinas nas diferentes origens de amostras estudadas.....	55
Figura 3 - Efeito da citotóxico da toxina CDT da amostra Cj16 em células CHO.....	57
Figura 4 - Atividade hemolítica de amostras de <i>C. jejuni</i> nas diferentes hemácias testadas.....	58
Figura 5 - Influência na expressão da atividade hemolítica em amostras de <i>C. jejuni</i> após incorporação de quelantes e solução de íons.....	59
Figura 6 - Detecção da presença do gene <i>cdtB</i> através da técnica de PCR em amostras de <i>C. jejuni</i> comparando com a detecção da citotoxina CDT em culturas celulares.....	60
Figura 7 – Perfil eletroforético de amostras positivas e negativas para o gene <i>cdtB</i> Em amostras de <i>C. jejuni</i> , a partir de gel de agarose à 2%.....	60

ÍNDICE DE TABELAS

Páginas

Tabela 1 - Estudo comparativo para escolha do melhor meio de cultura a ser utilizado nos ensaios de cultura de célula.....	53
Tabela 2 - Estudo comparativo dos títulos de citotoxicidade pela citotoxina de distensão citoletal obtidos a partir de células Vero, dos sobrenadantes de sonicados ou não de <i>C. jejuni</i>	53
Tabela 3 - Presença de citotoxinas em amostras de <i>C. jejuni</i> isolados de diferentes origens.....	54
Tabela 4 - Citotoxinas CDT, CLTR e 70-kDa em amostras de <i>C. jejuni</i> isoladas de origem humana.....	55
Tabela 5 - Citotoxinas CDT, CLTR e 70-kDa em amostras de <i>C. jejuni</i> isoladas de origem animal.....	56
Tabela 6 - Citotoxinas CDT, CLTR e 70-kDa em amostras de <i>C. jejuni</i> isoladas de origem alimentar.....	56
Tabela 7 – Produção associada das citotoxinas CDT, CLTR e 70-kDa em amostras de <i>C. jejuni</i> de diferentes origens, detectadas por ensaio em células CHO, HeLa e Vero.....	57
Tabela 8 – Frequência da presença de hemolisina em amostras de <i>C. jejuni</i> isoladas de diferentes origens.....	58
Tabela 9 - Associação entre a produção de citotoxinas e hemolisina em amostras de <i>C. jejuni</i> isolados de diferentes origens.....	59
ANEXO	
Tabela 10 - Resultados e títulos dos efeitos cititóxicos das amostras de <i>C. jejuni</i> isoladas de origem humana testadas em diferentes linhagens celulares....	72
Tabela 11 - Resultados e títulos dos efeitos cititóxicos das amostras de <i>C. jejuni</i> isoladas de origem animal testadas em diferentes linhagens celulares.....	73

Tabela 12 - Resultados e títulos dos efeitos cititóxicos das amostras de <i>C. jejuni</i> isoladas de águas residuárias testadas em diferentes linhagens celulares..	74
Tabela 13 - Resultados e títulos dos efeitos cititóxicos das amostras de <i>C. jejuni</i> isoladas de alimentos testadas em diferentes linhagens celulares.....	74
Tabela 14 - Positividade de detecção de atividade hemolítica em diferentes hemácias nas amostras de <i>C. jejuni</i> de origem humana e animal.....	75
Tabela 15 - Positividade de detecção de atividade hemolítica em diferentes hemácias nas amostras de <i>C. jejuni</i> de origem ambiental e alimentar.....	76
Tabela 16 - Resultado da detecção do gene <i>cdtB</i> através da técnica de PCR nas amostras de <i>C. jejuni</i>	77
Tabela 17 - Resultado da identificação bioquímica - Amostras de origem humana....	78
Tabela 18 - Resultado da identificação bioquímica - Amostras de origem animal.....	80
Tabela 19 - Resultado da identificação bioquímica - Amostras de origem ambiental.	80
Tabela 20 - Resultado da identificação bioquímica - Amostras de origem alimentar..	79

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Páginas

Esquema 1 – Mapa dos genes <i>cdt</i> em <i>C. jejuni</i> e localização do iniciador usado neste estudo (Pickett <i>et al.</i> , 1996).....	44
---	----

RESUMO

Membros termofílicos do gênero *Campylobacter* são reconhecidos como importantes enteropatógenos para o homem e também para outros animais. A grande diversidade ecológica deste microrganismo, encontrado em diferentes habitats tais como: águas, animais e alimentos, indica que estudos sobre os diversos fatores de virulência poderiam contemplar este diferenciado nicho ecológico. Neste trabalho, pretendeu-se detectar fenotípica a frequência de quatro tipos de citotoxinas já descritas em *C. jejuni*: a toxina citoletal distensora (CDT); a citotoxina de 70k-Da, a citotoxina ativa somente em células Vero e a toxina citoletal de arredondamento (CLTR) em 80 amostras de *C. jejuni* isoladas de diferentes origens. Realizou-se também a detecção da toxina CDT pela técnica da PCR e ainda a detecção da atividade hemolítica em todas as amostras. Das 80 amostras estudadas, 57 foram positivas para CDT (71,25%), sendo 15 amostras positivas (18,75%) detectadas de fígado de frango, três (3,75%) de águas residuais, 19 (23,75%) de origem animal e 20 (25%) de origem humana. O percentual de positividade para toxinas CLTR (20%) representada por um número de 16 amostras, foi de duas amostras de origem alimentar (2,5%), 11 de origem animal (13,75%) e três de origem humana (3,75%) dentro do percentual total das amostras analisadas. Para a citotoxina de 70k-Da, de um total de 7 amostras positivas (8,75%), o percentual de positividade foi de duas amostras de origem animal (2,5%) e cinco amostras de origem animal (6,25%). Nenhuma amostra foi positiva para a citotoxina ativa somente em células Vero. Na análise da expressão de hemolisina obtivemos; três amostras positivas (3,75%) em hemácias de cavalo, uma amostra positiva (1,25%) em hemácias de carneiro, 22 (27,5%) em hemácias de boi, 27 (33,75%) em hemácias de cobaia e 16 (20%) em hemácias de galinha, no total das 80 amostras em estudo, sem correlação com a respectiva origem de isolamento. Os agentes quelantes de ferro (EDDA) e os íons bivalentes (EDTA, cálcio, magnésio e ferro) utilizados no meio de cultivo aumentaram a expressão da hemolisina quando testadas nas hemácias de carneiro e cavalo. O aumento foi de 25%, 21,25%, 7,5%, 8,75% e 15% em hemácias de carneiro acrescidas das soluções CaCl_2 , MgCl_2 , FeCl_3 , EDTA e EDDA, respectivamente, e de 12,5%, 6,25%, 0%, 6,25% e 12,5%, para as amostras testadas com hemácias de cavalo. Quanto a análise da presença do gene *cdtB*, o percentual de positividade encontrado, foi de 100%, 92%, 87% e 85% nas amostragens ambiental, humana, animal e alimentar, respectivamente. Finalizando, este trabalho vem colaborar com a demanda de mais estudos sobre a campilobacteriose no Brasil, uma vez que a pesquisa de fatores de virulência e dados epidemiológicos sobre este patógeno são ainda escassos em nosso país.

ABSTRACT

Thermophilic members of genus *Campylobacter* are recognized as important enteric pathogens for man and animals. The great ecological diversity of this microorganism, found in several habitat, such as waters, animals and foods, indicates that studies of many virulence factors must contemplate this differentiated ecological niche. The aim of this work was to detect fenotyping frequency of the four types of cytotoxin described in *C. jejuni*: Cytolethal distending toxin (CDT); 70k-Da cytotoxins, Vero cytotoxin and cytolethal rounding toxin (CLTR) produced by 80 samples of *C. jejuni* isolated from different sources. PCR technique was applied to molecular detection of the CDT toxin and the detection of the hemolytic activity of all samples was duet. Among 80 studied samples, 51 were positive for CDT (71,25%), being 15 positive strains (18,75%) from alimentary origin, three from environmental origin (3,75%), 19 from animal origin (23,75%) and 20 (25%) from human origin. The positive percentage for toxins CLRT (20%) representing for 16 strains; two strains from alimentary origin (2,5%), 11 from animal origin (13,75%) and three of human origin (3,75%) inside of the total percentage in samples analyzed. For 70k-Da cytotoxin, a total positive strains was seven (8,75%) and the positive percentage was two strains from animal origin (2,5%) and five strains from animal origin (6,25%). No samples were positive for Vero cytotoxin. In analysis of the hemolytic activity there were three positive samples (3,75%) tested in erythrocytes of horse, one (1,25%) in erythrocytes of sheep, 22 (27,5%) in erythrocytes of ox, 27 (33,75%) in erythrocytes of guinea pig and 16 (20%) in erythrocytes of hen, in a total of 80 strains in this study and without correlation from respective source of isolation. The EDDA and íons EDTA, calcium, magnesium and iron was included in the culture and increased the expression of the hemolysin in the tests of erythrocytes of sheep and horse. The increase was of 25%, 21,25%, 7,5%, 8,75%, 15% in erythrocytes of sheep in solutions of the CaCl_2 , MgCl_2 , FeCl_3 , EDTA and EDDA, respectively, and 12,5%, 6,25%, 0%, 6,25% and 12,5%, for the samples tested with erythrocytes of horse. Regarding the analysis of the presence of the *cdtB* gene, the positive percentage found was 100%, 92%, 87% and 85% in the samplings environmental, human, animal and alimentary respectively. Finally, this work collaborates to demands for more studies on campylobacteriosis in Brazil, once that the research of virulence factors and epidemiologists data on this pathogen is so scarce in our country.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Campylobacter* compreende um grupo de bactérias Gram negativas estreitamente relacionadas e que colonizam o trato gastrointestinal de uma variedade de hospedeiros, podendo também ter localização extra-intestinal (Butzler, 2004). Algumas espécies são comensais e outras têm particular importância como patógenos. Na área veterinária destacam-se como agentes etiológicos de doenças reprodutivas que ocasionam o aborto e a infertilidade principalmente em bovinos, ovinos e suínos, gerando grandes perdas econômicas ao setor pecuário (Butzler, 2004). Por outro lado, no homem, os casos de aborto são excepcionais, ao passo que as enterites por *Campylobacter* representam um grande problema de Saúde Pública (Frost, 2001). Gengivites e doenças periodontais são também infecções causadas por algumas espécies de *Campylobacter* que colonizam a cavidade oral (Allos & Taylor, 1998).

No grupo das espécies enteropatogênicas, *Campylobacter jejuni* é a que recebe maior atenção, estimando-se sua atuação em pelo menos 90% dos casos de campilobacteriose (Wassenaar & Newell, 2000). Em vários países industrializados, a infecção por *C. jejuni* é considerada a maior causa de doenças diarréicas no homem, superando aquelas causadas por bactérias tradicionais enteropatogênicas (Vugia *et al.*, 2003), levando a um intenso monitoramento por parte das entidades de vigilância epidemiológica (Canals & Rosell, 2002). Em contrapartida, nos países em processo de industrialização a incidência de *Campylobacter* spp é pouco investigada, estimando-se haver um número de infecções assintomáticas, provavelmente devido à aquisição de imunidade (Allos & Taylor, 1998; Van Vliet & Ketley, 2001).

Neste sentido, acredita-se que a compreensão da epidemiologia da campilobacteriose, por meio de mais estudos que abordem este agente etiológico, seja essencial para o controle e monitoramento desta doença, especialmente nos países em desenvolvimento.

1.1 Histórico

Os primeiros relatos sobre *Campylobacter* são datados do final do século XIX, nas observações de Escherich em 1886, a respeito de uma bactéria não cultivável, com forma espiralada, associada às enterites em neonatos, crianças e gatos. No entanto, seu isolamento somente teve sucesso anos mais tarde, em 1909, quando MacFadyean e Stockman isolaram bactérias similares aos vibriões a partir de fetos de ovinos abortados. Em 1918, Smith, ao encontrar bactérias espiraladas em fetos de bovinos abortados, conclui que estes microrganismos seriam da mesma espécie que os relatados por MacFadyean e Stockman por apresentarem-se morfológicamente similares às espécies do gênero *Vibrio*. Smith & Taylor, em 1919, isolam novamente uma bactéria espiralada em fetos bovinos abortados e denominaram-na *Vibrio fetus* (*apud* Butzler, 2004).

Nos anos subseqüentes, tais “vibriões” foram relatados esporadicamente por vários autores em diversos fluidos orgânicos de animais homeotermos e também de humanos (*apud* On, 2001).

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

No entanto, deve-se aos estudos de Véron e Chatelain, no ano de 1973, o estabelecimento de *Campylobacter* como um gênero reconhecido e distinto. Eles agruparam outros vibrios descritos anteriormente, por vários autores, no gênero *Campylobacter*, com base nas análises sorológicas e bioquímicas, na composição do DNA e nas relações de parentesco com as duas

espécies já pertencentes a este gênero. Desta maneira foram incluídas as espécies *C. coli* e *C. jejuni*, além de duas subespécies de *C. sputorum* (*apud* On, 2001).

Porém, o isolamento de *Campylobacter sp.* continuava a apresentar-se como uma das grandes dificuldades à pesquisa deste microrganismo, até a publicação de Butzler e colaboradores (1973) que apresentaram um método de cultivo, proporcionando um isolamento mais eficaz desta bactéria, mostrando, desta forma, a sua alta prevalência em casos de diarreia humana.

De grande contribuição foi também o trabalho de Skirrow em 1977, tornando *Campylobacter* conhecido mundialmente, quando tratou a enterite causada por esses organismos como uma “nova doença“. Neste trabalho, Skirrow descreve um suplemento seletivo, compreendendo uma mistura de antibióticos, que possibilitou aos laboratórios diagnosticar e isolar a bactéria com a inibição da flora fecal acompanhante, demonstrando sua importância clínica.

No Brasil, um dos primeiro relatos de isolamento de *Campylobacter* em fezes se deu em crianças normais e disentéricas, no Estado do Rio de Janeiro (Ricciardi *et al.*, 1979).

Os anos 80 foram marcados por um crescente interesse em investigar *Campylobacter*, agora contando com os procedimentos disponíveis para o seu isolamento. Conseqüentemente, muitos organismos similares foram isolados de diversas fontes, promovendo o reconhecimento de novas espécies, como pode ser visto pela descrição de 12 espécies de *Campylobacter sp.* entre os anos 1974 e 1988. Porém, o fato de serem inertes bioquimicamente, dificultava sua diferenciação, gerando ainda muitas dúvidas, razão pela qual foi proposto o grupo CLO (*Campylobacter*-like organisms) englobando todos os organismos similares (*apud* Vandamme, 2000).

Os estudos de homologia com o gene RNAr 16S permitiu inferir as relações filogenéticas entre todos organismos deste grupo e levou a um grande rearranjo na taxonomia de *Campylobacter*, desde meados da década de 80 até o final de década de 90. Com isso, vários

membros do grupo CLO foram transferidos para outros gêneros, destacando-se a transferência de *C. pylori* para o gênero *Helicobacter* e a proposta da criação do gênero *Arcobacter* (On, 2001).

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

Todo este panorama de novas espécies e organismos relacionados começou a ser alterado com a aplicação de novos métodos taxonômicos. Cabe destacar a contribuição dos extensivos estudos taxonômicos de Vandamme (2000), apoiando-se também na tecnologia de hibridização DNA-RNAr, que acabou por resolver muitas questões do complexo gênero *Campylobacter*, constituindo, a partir daí, grande parte da base da estrutura taxonômica usada nos dias de hoje.

Atualmente, o gênero *Campylobacter* compreende 16 espécies e seis subespécies. Alguns grupos de espécies mais relacionadas podem ser vistos através das comparações entre sequências do gene RNA 16S. As espécies *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* e *C. helveticus* formam um grupo geneticamente próximo que são mais frequentemente isolados de animais e do homem com diarreia. Já, *C. concisus*, *C. showae*, *C. curvus*, *C. rectus*, *C. gracilis*, *C. sputorum* e *C. hominis* parecem estar mais relacionados entre si e, a maioria destas espécies, ocorre na cavidade oral humana, a exceção de *C. hominis* que foi encontrado no intestino grosso humano e de *C. sputorum* que também foi isolado do trato genital e entérico de animais. *C. mucosalis*, por

hibridização DNA-DNA é bastante similar a *C. sputorum*, e dividem entre si características fenotípicas e genotípicas (On, 2001).

Taxonomicamente, o grupo ainda compreende as espécies *C. fetus*, *C. hyointestinalis* e *C. laniane*, que apresentam maior diversidade de habitat. *C. fetus*, espécie-tipo, está implicado em disfunção do aparelho reprodutivo de vários animais. *C. hyointestinalis* é de origem entérica e também encontrada no estômago de porcos e, por último, *C. laniane*, isolado a partir das fezes de trabalhadores sadios de abatedouros, foi descrita no ano de 2000 (On, 2001). Nenhuma outra mudança na taxonomia de *Campylobacter* foi registrada até o momento desta pesquisa (Moore *et al.*, 2005).

Com o avanço das pesquisas sobre o gênero *Campylobacter* e organismos relacionados, assim como, de novos métodos usados nos estudos taxonômicos, é provável que novas espécies continuem sendo adicionadas e outras espécies poderão ser reclassificadas.

1.2 Descrição do Gênero

O gênero *Campylobacter* é constituído de várias espécies de bactérias Gram negativas com morfologia típica de bastonetes curvos, espiralados ou em forma de "S", não produzem endósporos, e apresentam um tamanho de 0,2 a 0,9µm de largura por 0,5 a 5µm de comprimento. Em culturas mais antigas, ou sob condições de cultivo adversos, as células de *Campylobacter* podem adquirir formas esféricas ou cocóides, o que representa um estágio degenerativo de seu ciclo de vida, sem, contudo, levar à perda de seu poder infectante (Snelling *et al.*, 2005).

Campylobacter jejuni são organismos quimiorganotróficos, com o metabolismo essencialmente respiratório obtendo energia de aminoácidos ou de substratos intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos e não possuem atividade metabólica fermentativa ou oxidativa,

sobre carboidratos e lipídios, nem tampouco hidrolisam a uréia e a gelatina. Produzem a enzima oxidase e são microrganismos móveis, em sua grande maioria, devido a presença de um flagelo polar em uma ou em ambas as extremidades da célula (Nachamkin, 1995). São tipicamente microaerófilos, requerendo uma tensão de 5 a 7% oxigênio e de 3 a 5 % de CO₂ para seu desenvolvimento, podendo algumas espécies crescer sob condições anaeróbicas e, ocasionalmente, também se desenvolver em aerobiose (Nachamkin, 1995).

Em função da produção ou não da enzima catalase, as espécies do gênero *Campylobacter* dividem-se em dois grandes grupos, sendo o grupo das produtoras de catalase onde as espécies mais importantes do ponto de vista patogênico são encontradas (Nachamkin, 1995).

Outra divisão importante dentro do gênero *Campylobacter* se refere à capacidade de crescimento acima da temperatura de 37°C. Algumas espécies crescem bem entre 25 e 37°C, mas não a 42°C, e há espécies que não apresentam crescimento a 25°C, crescem a 37°C, porém, apresentam um crescimento preferencial a 42°C. Este último grupo é denominado termofílico ou termotolerante e encerra espécies principalmente incriminadas com processos gastroentéricos (Allos & Taylor, 1998).

Quanto às características moleculares, o genoma de *Campylobacter* possui aproximadamente de 1600Kb a 1700Kb, embora a espécie *C. upsaliensis* tenha cerca de 2000Kb. Este genoma é considerado pequeno, quando comparado a outras bactérias como *Escherichia coli*, que possui 4500Kb, o que corresponde a 30% do genoma total de *Campylobacter*; acredita-se que este pequeno tamanho possa explicar o comportamento fastidioso no cultivo e sua incapacidade de fermentar carboidratos (Vandamme, 2000).

1.3 Métodos de identificação laboratorial

O diagnóstico laboratorial das espécies termofílicas do gênero *Campylobacter* requer metodologia apropriada às suas características metabólicas. Pelo fato de só crescerem em concentração de 5% a 7% de O₂, torna-se prioritário e necessário uma incubação em atmosfera de microaerofilia, em temperatura preferencial de 42°C durante um período de 48h (Lauria-Filgueiras, 2000).

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

A identificação presuntiva das colônias suspeitas é feita pela coloração de Gram, favorecida pela morfologia típica das células que são bastonetes curvos, em forma de “S” ou em forma de “gaivota”. Para a identificação definitiva, realiza-se os testes da produção das enzimas oxidase e catalase que serão sempre positivas para espécies termofílicas e o teste de sensibilidade aos antimicrobianos ácido nalidíxico e cefalotina (Vadamme, 2000). O aparecimento de um halo de sensibilidade ao ácido nalidíxico (disco de 30 µg, Oxoid) superior a 19 mm e a resistência a cefalotina (30 µg, Oxoid), são características pertinentes às espécies *C. jejuni* e *C. coli* permitindo assim a separação de outras espécies também termofílicas como *C. lari*, que apresenta um perfil de resistência ao ácido nalidíxico e ainda *C. upsaliensis* e *C. hyointestinalis*, uma vez que ambos são sensíveis a cefalotina (Snelling *et al.*, 2005).

C. lari é a única espécie resistente ao ácido nalidíxico, entretanto, o aparecimento de amostras de *C. jejuni* e *C. coli* resistentes às quinolonas (Vamdamme, 2000) começam a

modificar o panorama anteriormente descrito das provas de identificação, fazendo-se necessário, para completa separação das espécies *C. jejuni* e *C. coli* de *C. lari* a associação do teste de hidrólise do acetato de indoxila, que é positivo para as espécies *C. jejuni* e *C. coli* e negativo para *C. lari*.

Como etapa de identificação posterior, utiliza-se a prova da hidrólise do hipurato de sódio, prova clássica e única utilizada para separar estas duas espécies, sendo sempre positiva para *C. jejuni* e negativa para *C. coli*, (Nachamkin, 1995). Porém, há relatos na literatura de culturas incomuns de *C. jejuni* com o fenótipo hipurato-negativo (Nicholson & Patton, 1995), o que dificulta a identificação baseada essencialmente nestes testes.

Para completar a identificação fenotípica utiliza-se o esquema de biotipificação (Lior, 1984), pesquisando a produção da enzima desoxirribonuclease (DNase) e produção de gás sulfídrico (Quadro 5).

Embora seja em grande parte simples a execução e a leitura das referidas provas, a identificação fenotípica enfrenta ainda alguns problemas, como a falta de padronização dos testes, que leva a resultados interlaboratoriais diferentes (On, 1996).

Num panorama mais moderno, no que diz respeito à identificação de bactérias do gênero *Campylobacter*, a técnica da PCR (“polymerase chain reaction”), uma revolução no campo da Biologia Molecular, tornou-se muito difundida e bastante utilizada para o diagnóstico laboratorial de *Campylobacter* sp., principalmente pelas vantagens que oferece, aliadas à alta sensibilidade e especificidade, além da facilidade de sua execução (Butzler, 2004).

1.4 Epidemiologia

As infecções causadas por *Campylobacter* spp. têm sido relatadas como uma das mais frequentes causas de gastroenterites em vários países do mundo. As espécies bacterianas termofílicas pertencentes ao gênero *Campylobacter*, principalmente *C. jejuni*, representam, nos dias de hoje, um dos mais importantes enteropatógenos para a Saúde Pública, principalmente, nos países desenvolvidos (Allos & Blaser, 1995; Rohner *et al.*, 1997).

Nos Estados Unidos da América, no ano de 2002, de 16.580 casos diagnosticados como infecção por patógenos intestinais, aproximadamente 5.000 foram causados pelo gênero *Campylobacter*, perdendo somente para *Salmonella* com o número de 6.100 casos diagnosticados (Vugia *et al.*, 2003). Em 2004, o número de casos diagnosticados tendo *C. jejuni* como agente etiológico foi de 5.665, novamente perdendo apenas para *Salmonella* com 6.464 casos num total de 15.806 casos de infecção analisados laboratorialmente (Vugia *et al.*, 2005). Neste último trabalho é registrado um declínio de 31% na incidência de casos de infecções por *Campylobacter*, quando comparados com dados do período de 1996-1998.

A complexidade destas infecções é reconhecida mundialmente no cenário epidemiológico, atribuída à grande diversidade ecológica do microrganismo, encontrado em inúmeros habitats, tais como: águas, animais e alimentos, independente da posição geográfica (Allos & Taylor, 1998).

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

Dentre as espécies associadas à gastroenterite encontram-se *C. jejuni*, a mais incidente, seguida de *C. coli*, *C. lari* e *C. upsaliensis*, formando o grupo das espécies termofílicas (Ketley, 1997). Considerando-se que *C. jejuni* e *C. coli* produzem uma doença com sintomas clinicamente indistinguíveis, e por possuírem muitas características metabólicas em comum, alguns autores referem-se a ela como “diarréia causada por *C. jejuni* / *C. coli*”, não atribuindo muita importância à diferenciação entre as espécies (Allos & Taylor, 1998). Entretanto, conforme mostrado por Gillespie *et al.*, (2002), os fatores de risco e as fontes de transmissão podem ser diferentes para a infecção por *C. jejuni* e *C. coli*, o que justifica a distinção dentro de uma abordagem epidemiológica.

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

Deve-se destacar, no entanto, que a maior preocupação está no potencial das aves em transmitir a bactéria ao homem através dos alimentos de origem animal. O consumo de frangos e derivados de aves representa a forma mais comum de aquisição da gastroenterite em todo o mundo, estimando-se sua implicação em 50 a 70% das infecções esporádicas humanas representadas principalmente pela possibilidade da contaminação cruzada (Frost, 2001; Canals & Rosell, 2002).

Outras ocorrências de surtos por *Campylobacter* estão associadas ao consumo de leite não pasteurizado e de água não tratada ou contaminada por fezes humanas ou de animais. A água também representa um poderoso meio de veiculação de espécies de *Campylobacter*, sendo na

verdade este ambiente inóspito para a bactéria (Allos & Taylor, 1998; Frost, 2001). Convém ressaltar que a simples presença deste microrganismo em tal habitat pode ser utilizada como indicador biológico de contaminação fecal recente, já que o tempo de sobrevivência desta bactéria em tal ambiente é menor que indicadores bacterianos usuais (Jones, 2001).

Campylobacter são também parte da microbiota intestinal de uma variedade de animais homeotermos, sejam domésticos ou selvagens, sem apresentar sinais clínicos de doença (Altekruse *et al.*, 1994; Skirrow, 1994). Por outro lado, alguns trabalhos apontam sua implicação em infecções entéricas em alguns animais, principalmente quando estes estão confinados a locais fechados como zoológicos e centros de criação, onde a contaminação oral-fecal é freqüente (Fox, 1992; VanVliet & Ketley, 2001).

Cabe ressaltar que nesta abordagem os primatas não humanos recebem especial atenção, pois apresentam-se tanto como portadores assintomáticos, quanto doentes e por compartilharem muitas das características clínico-epidemiológicas notadas na campilobacteriose humana (Fox, 1992). Nas décadas de 1980 e 1990, vários trabalhos relatam a freqüência comum da bactéria em primatas não-humanos, demonstrando que estes animais podem ser excelentes fontes de investigação de *Campylobacter* sp. (Bryant *et al.*, 1983; Russel *et al.*, 1988; Newell, 2001).

Russell e colaboradores (1990) publicaram um trabalho resultante de um ano de estudo com macacos jovens da espécie *Macaca nemestrina*, acometidos ou não por diarreia, e relataram a ocorrência de múltiplas reinfecções com diferentes cepas de *C. jejuni* e *C. coli*, durando cada uma cerca de 3 a 4 semanas, tal como ocorre em seres humanos.

Neste contexto, citando pesquisas brasileiras, ressaltamos um estudo detalhado sobre a circulação de cepas de *Campylobacter* em primatas não humanos mantidos em cativeiro apresentado por Lauria-Filgueiras, 2000, tendo sido determinada a freqüência de *Campylobacter* nos animais desta Colônia, durante um período de cinco anos de estudo. Dando prosseguimento a

esta pesquisa, Vilardo (2003) estuda esta mesma amostragem tangendo uma abordagem epidemiológica, detectando a diversidade genética das cepas circulantes nesta Colônia.

1.5 Aspectos clínicos

A aquisição da enterite por *Campylobacter* ocorre pela via fecal-oral, via comum a várias bactérias intestinais, mas um agravante é a baixa dose infectante, de cerca de 500 a 800 células/mL, sendo consideravelmente baixa quando comparada a outros patógenos como *Yersinia pestis* (10^9), salmonelas e víbrios (10^5 - 10^8) e até mesmo *Shigella* sp. (10^3). Embora o período médio de incubação seja de três dias, podendo variar de 18h a oito dias, o paciente continua a excretar esta bactéria em média durante duas a três semanas, após a sua recuperação clínica, a menos que tenha feito uso de medicamento (Allos & Taylor, 1998; Butzler, 2004).

No homem, os sintomas da enterite por *C. jejuni* e pelas espécies relacionadas são indistinguíveis daqueles causados por outros enteropatógenos. A doença tem amplo aspecto e o seu curso típico é moderado. Sintomas da diarreia causada por *Campylobacter* incluem uma diarreia aquosa com um quadro brando, podendo progredir para uma diarreia com sangue e muco, desencadeando febre ou não, acompanhada de vômitos e dores abdominais (Butzler, 2004).

A maioria das infecções é auto-limitada, não necessitando do uso de medicamentos, apenas de reposição hidro-eletrolítica. Nos casos mais graves, recomenda-se o uso de antimicrobianos, onde a droga de eleição é a eritromicina, uma vez que, na maioria dos casos, a resistência a este antimicrobiano está abaixo de 5%, que aparenta ser mais freqüente na espécie *C. coli*. Ciprofloxacina e outras fluoroquinolonas foram inicialmente utilizadas com sucesso, mas

mediante o aumento de resistência em alguns países, a indicação a esta droga passou a ser menos freqüente (Snelling *et al.*, 2005).

Complicações decorrentes de enterite não são comuns, embora, tenham sido relatados casos de bacteremias, septicemias, artrite reativa, endocardites, infecção do trato urinário, peritonites, meningites e abortos após a infecção intestinal (Butzler, 2004). Entretanto, uma importante complicação vem sendo estudada nos últimos anos com bastante interesse dos pesquisadores. Poucos pacientes desenvolvem uma complicação tardia específica, uma neuropatia periférica conhecida como Síndrome de Guillain Barré. Em muitos casos uma infecção causada por *C. jejuni*, e em especial por determinados sorogrupos específicos, antecede o aparecimento desta síndrome, creditando este fato a uma resposta imune a antígenos específicos de *Campylobacter* (Hadden & Gregson, 2001).

Esta síndrome auto-imune é uma doença inflamatória aguda desmielinizante do sistema nervoso periférico, que leva à paralisia flácida e pode comprometer os músculos da respiração e levar à morte. Desde a erradicação da poliomielite, a Síndrome de Guillain Barré (GBS) é a causa mais freqüente de paralisia neuro-muscular em países industrializados (Hadden & Gregson, 2001).

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

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

1.6 Fatores de virulência

Complementando a abordagem sobre as enterites causadas por *Campylobacter*, cabe acrescentar que os mecanismos de patogenicidade envolvidos na infecção intestinal por este microrganismo ainda não estão claramente definidos.

Um mecanismo de virulência específico para *Campylobacter* sp. ainda não está totalmente elucidado, porém, há a atuação de vários fatores ou determinantes de virulência que têm sido estudados e propostos, sendo atualmente reconhecidos duas principais atividades patogênicas: a adesão e invasão de células epiteliais e a produção de toxinas (Ketley, 1997). Não se sabe se a atuação destes fatores se dá de maneira isolada, ou se é a combinação deles que leva à produção dos sintomas clínicos da infecção, mas observa-se que estabelecida à colonização da mucosa, seguida da adesão a superfície das células epiteliais, os campylobacters perturbam a capacidade normal de absorção do intestino, causando dano à própria função da célula epitelial, seja

diretamente, através da invasão ou da produção de toxinas ou ainda indiretamente, levando ao desencadeamento de uma resposta inflamatória (Wooldridge & Ketley, 1997).

Em relação aos fatores envolvidos na colonização do muco, adesão e invasão de células epiteliais, a motilidade bacteriana, obviamente representada pelo flagelo, é o determinante de virulência mais bem investigado. Suas características únicas, combinadas com a forma em espiral da célula bacteriana, conferem à mesma uma motilidade distinta que permite a eficiente penetração na barreira de muco que recobre as vilosidades (Wooldridge & Ketley, 1997). Devido a motilidade, as células bacterianas, algumas vezes, penetram mais profundamente localizando-se nas criptas do intestino. A flagelina parece estar envolvida também na adesão e na invasão às células hospedeiras, conforme mostram os estudos com mutantes que, tendo seu movimento flagelar paralisado apresentaram reduzida capacidade de aderir e ausência de invasão (Van Vliet & Ketley, 2001). Ainda dentro deste panorama, temos que destacar que tanto a motilidade quanto a quimiotaxia são essenciais para colonização por *C. jejuni*, que é atraído por mucina, L-serina e L-fucose e é repelido por ácidos biliares (Van Vliet & Ketley, 2001).

Após *C. jejuni* atravessar a barreira do muco, é necessária sua aderência na superfície epitelial para que a efetiva colonização ocorra. A adesão tem sido estudada de maneira bastante intensa *in vitro* (Fox, 1992, Ketley, 1997). Não há na literatura nenhuma descrição de uma estrutura fimbrial, apenas um relato da produção de uma “fímbria-like” quando a bactéria é cultivada na presença de sais biliares. Porém, estudos do genoma de *Campylobacter* não apresentam seqüências relacionadas a esta característica. Estruturas pilus-like também já foram documentadas quando a bactéria é cultivada na presença de sais biliares e algumas adesinas já foram descritas como as proteínas PEB1 e CadF (Van Vliet & Ketley, 2001).

No homem, a reação inflamatória e a bacteremia muitas vezes observadas na enterite, sugerem fortemente que a invasão celular é um importante passo no mecanismo patogênico, embora a habilidade e a intensidade de invasão de *Campylobacter* pareça ser cepa-dependente, como foi demonstrado nos estudos *in vitro* com diferentes cultivos celulares, como em Hep-2 (Células de carcinoma de laringe humana), em HeLa (Células de carcinoma de útero humano) e também em células de origem epitelial intestinal humana INT-407 (Ketley, 1997; Van Vliet & Ketley, 2001).

O poder de invasão tem sido demonstrado *in vitro* (Fernandez & Trabulsi, 1995; Tay *et al.*, 1996), mas os fatores necessários para a invasão ainda não foram totalmente definidos. Recentemente observou-se que para que ocorra a invasão é necessária a síntese de determinadas proteínas pela bactéria e a transdução de sinais pela célula hospedeira. O co-cultivo de *C. jejuni* e células INT-407 leva à produção e secreção de um grupo de aproximadamente oito proteínas, incluindo a proteína CiaB. *C. jejuni* CiaB-mutante adere a mucosa intestinal, mas não é internalizada pela mesma e ainda não secreta nenhuma das outras sete proteínas. Van Vliet & Ketley (2001) sugerem que CiaB seja um membro do sistema de secreção tipo III.

Um foco de atenção tem se voltado para a caracterização das toxinas produzidas por *Campylobacter* sp., acreditando-se que somente a invasão não seria responsável pelos efeitos citopáticos observados nas enterites (Van Vliet & Ketley, 2001).

As toxinas bacterianas têm sido definidas como substâncias que alteram o metabolismo normal das células do hospedeiro, com efeitos prejudiciais ao mesmo, e representam o mais potente fator de virulência bacteriano (Schmitt *et al.*, 1999). Entretanto, de acordo com Pickett (2000), a caracterização da produção de toxinas por *Campylobacter* é considerada um processo lento na pesquisa deste gênero.

A produção de várias toxinas por *Campylobacter* vem sendo documentada (Misawa *et al.*, 1995; Pancorbo *et al.*, 1999; Tresierra-Ayala *et al.*, 1996), mas seus mecanismos de ação e sua importância na doença causada por este patógeno se mantém ainda indefinida. Toxinas têm sido consideradas um dos fatores mais importantes para a patogênese de *Campylobacter*. Dois grupos de toxinas são isoladas deste gênero bacteriano: enterotoxinas e citotoxinas, além de cepas que apresentam, simultaneamente, a produção de ambas (Ketley, 1997; Wassenaar, 1997).

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

No estudo das citotoxinas é onde se concentram as maiores controvérsias, pois diferentes grupos de pesquisadores utilizam diferentes linhagens celulares com protocolos também diferentes. Diversos grupos de pesquisadores descrevem tanto a produção de enterotoxinas, quanto a de citotoxinas e até mesmo de ambas em diversas amostras de *Campylobacter*, mas ainda não se isolou nenhum gene que codifique nenhuma outra toxina, exceto a toxina de distensão citoletal (CDT) (Wassenaar, 1997).

A proposta mais caracterizada de toxina em *Campylobacter* é a toxina de distensão citoletal (CDT), já detectada em várias amostras de *Campylobacter* (Pickett *et al.*, 1996; Purdy *et al.*, 2000; Wassenaar *et al.*, 1997). A toxina distensora citoletal (CDT) é determinada por um cluster de três genes adjacentes (*cdtA*, *cdtB* e *cdtC*) que codificam proteínas de 30, 29 e 21 kDa,

respectivamente, com papel ainda não totalmente elucidado na patogênese por *Campylobacter*. CDT constitui uma família de toxinas protéicas em bactérias geneticamente relacionadas que têm como característica principal parar a proliferação de várias linhagens celulares (Lara-Tejero & Galán, 2001). A CDT atua bloqueando o ciclo celular das células eucariotas na fase G2, havendo forte sugestão que a toxina CDT induza uma alteração no DNA. A efetiva entrada de CDT na célula eucariota, e subsequente translocação para dentro do núcleo, ainda não foram demonstradas por nenhum método direto (Rycke & Oswald, 2001). Essa toxina causa uma progressiva distensão celular levando à morte celular vários tipos de linhagens celulares como: CHO, Vero (Célula de rim de macaco verde africano), HEp-2, HeLa e Caco-2 (carcinoma de cólon humano) (Misawa *et al.*, 1994; Mooney *et al.*, 2001). A relação entre a propriedade de causar dano ao DNA, relacionada a esta família de toxinas, e seu papel como fator de virulência ainda não está totalmente compreendido, mas acredita-se que haja o envolvimento de CDT no processo de diarreia causando alteração na sobrevivência e na maturação das células da cripta epitelial levando a uma temporária erosão das mesmas e subsequente perda da função de absorção por estas células (Van Vliet & Ketley, 2001).

Outra citotoxina bastante documentada é a toxina citoletal de arredondamento (CLRT) tendo sua denominação baseada no aspecto de arredondamento, observado principalmente em células CHO. De ocorrência relevante, pode ser observada numa mistura de efeito junto a toxina CDT (Schulze *et al.*, 1998; Wassenaar, 1997).

Até o momento, já foram relatadas diversas outras citotoxinas: Citotoxina de 70-kDa inativa em Vero, que torna a célula afetada arredondada, finalizando o efeito em morte celular (Ketley, 1997; Thornley, 2001), citotoxina ativa em Vero, pouco documentada, e também promovendo arredondamento e morte celular (Pancorbo *et al.*, 1999), a toxina Shiga-like, representada por apenas um relato descrito em literatura, porém em estudos recentes não se

encontrou genes em *C. jejuni* com homologia aos genes da toxina shiga-like (Wassenaar *et al.*, 1997) e ainda a hepatoxina, com poucos os relatos e responsável pela desordem hepática crônica desenvolvida em ratos infectados intragastricamente (Wassenaar *et al.*, 1997).

Outro fator de virulência discutido em *C. jejuni* é a produção de hemolisina (Misawa *et al.*, 1995). A existência da citotoxina hemolítica não é totalmente comprovada, porém Van Vliet & Ketley (2001), relatam a existência de genes contendo domínios para esta toxina. Hemolisinas produzidas por bactérias Gram-positivas e Gram negativas representam um grupo de toxinas bacterianas que, diferentemente de muitas outras toxinas, não são internalizadas pelas células, atuando como agentes ativos de membranas levando à lise e morte celular (Rowe & Welch, 1994), além de sua característica principal de lisar eritrócitos.

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

Em se tratando do estudo do gênero *Campylobacter*, poucos foram os trabalhos nesta área. Em 1993, Hossain *et al.*, analisaram a atividade hemolítica em diferentes eritrócitos na tentativa de avaliar a cinética de ativação da hemolisina produzida por *C. jejuni*. Em 1995, Misawa *et al.*, pesquisaram as condições ideais e a frequência da produção de α e β -hemolisinas em amostras de *C. jejuni* de origem humana e não humana. Poucos são os registros sobre a

atividade hemolítica no gênero *Campylobacter* sugerindo um comportamento variável entre as espécies e em relação aos diferentes tipos de hemácias testadas.

A produção de trabalhos científicos abordando este importante enteropatógeno em nosso país é sobremaneira inferior aos destinados a outros patógenos, tornando assim necessários estudos em diversos campos da biologia desta bactéria para melhor entendimento desta zoonose.

Por este motivo, dentre outros, este trabalho tem como objetivo analisar a capacidade e a frequência da produção de citotoxinas e hemolisinas em amostras de *C. jejuni* isoladas de diferentes origens, tais como isolados clínicos, amostras ambientais, de animais e de origem alimentar.

2. OBJETIVOS

Geral:

- Detectar, em 80 amostras de *Campylobacter jejuni* isoladas de diferentes origens, a produção de toxinas e avaliar uma possível correlação entre a frequência de produção destas toxinas como sua origem de isolamento.

Específicos:

- Avaliação do melhor meio de cultura e melhor método de obtenção das citotoxinas de amostras de *C. jejuni*;
- Detecção e titulação de quatro citotoxinas: a toxina distensora citoletal (CDT), a toxina citoletal de arredondamento (CLRT), a citotoxina de 70-kDa inativa em células Vero e a citotoxina ativa em células Vero;
- Detecção do gen *cdtB* nas amostras de *C. jejuni*;
- Detecção da atividade hemolítica nas amostras de *C. jejuni*;
- Verificação da influência do cultivo bacteriano na presença de agentes quelante e soluções de íons na detecção da atividade hemolítica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Procedências das amostras de campo

As amostras de *C. jejuni* estudadas neste trabalho foram isoladas de crianças com diarreia (25 amostras), de primatas não humanos mantidos em cativeiro (26 amostras) e de fígado de frango pronto para consumo humano (21 amostras). Também foram estudadas outras duas amostras de fezes de galinha, duas amostras de fezes de aves marinhas e duas de cão doméstico, que foram incluídas, junto com as amostras de primatas, num grupo de amostras designadas amostras de origem animal compreendendo um total de 31 amostras. Três amostras obtidas de águas residuárias também foram incluídas no estudo. No total, foram analisadas 80 amostras. No quadro 1 estão demonstrados a origem do isolamento e o número de amostras correspondendo a cada um deles, com a identificação dessas amostra caracterizada.

Quadro 1 – Número e procedências das amostras de *C. jejuni* e sua identificação:

Amostra	Origem de isolamento	Total de amostras
Cj 01 - Cj 25	Amostras fecais de crianças com quadro clínico típico de diarreia.	25
Cj 26 - Cj 51	Amostras fecais de primatas, mantidos em cativeiro, sem diarreia.	26
Cj 52 - Cj 53	Amostras fecais de galinhas.	2
Cj 54 - Cj 55	Amostras fecais de aves marinhas.	2
Cj 56	Amostra fecal de cão doméstico.	1
Cj 57 - Cj 59	Amostras de água residuais.	3
Cj 60 - Cj 80	Amostras isoladas de fígado de frango comercializado e disponível para consumo humano.	21
TOTAL		80

Os isolados de *C. jejuni* de origem humana são oriundos de crianças de 0 a 5 anos com quadro clínico típico de diarreia, atendidas em hospitais municipais da rede pública e também de creches da cidade do Rio de Janeiro, e foram gentilmente cedidos pela Dra. Ana Luzia Lauria Filgueiras, pesquisadora do Setor de *Campylobacter* do Departamento de Bacteriologia da Fundação Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ.

A mesma pesquisadora também cedeu as amostras de primatas não-humanos pertencentes à espécie *Macaca mulatta* (macaco Rhesus), mantidos em cativeiro sob os cuidados do Setor de Primatologia do Centro de Criação de Animais de Laboratório-CECAL, Fundação Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ – R.J, e as amostras ambientais pertencentes ao esgoto das gaiolas desta Colônia de primatas.

Os demais isolados bacterianos, representados pelas amostras alimentares e ainda as amostras fecais de galinha, aves marinhas e de cão doméstico, foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Heriberto Fernández, professor titular do Instituto de Microbiologia Clínica da Faculdade de Medicina, Universidade Austral do Chile, Valdivia, Chile.

3.2 Amostras padrão

Utilizou-se como controle para as detecções realizadas neste trabalho, as seguintes amostras padrão pertencentes à Bacterioteca do Laboratório de Antígenos Bacterianos I, Departamento de Microbiologia e Imunologia, IB/UNICAMP:

- **CDT (controle+):** *E. coli* CDT 86-6136
- **Hemolisina (controle+):** *E. coli* P 46
- **CDT/Hemolisina (controle-):** *E. coli* K12

3.3 Manutenção das amostras

Todas as amostras de *C. jejuni* estavam estocadas em tubos contendo Água Peptonada Alcalina (APA), acrescidas de 25% de glicerol e mantidas em biofreezer em temperatura de -70°C. Esses estoques foram semeados em placas com meio Ágar Colúmbia contendo 5% de sangue desfibrinado de carneiro e suplementado com solução redutora de radicais livres FBP (Sulfato Ferroso, Bissulfito de sódio e Piruvato de sódio) (Lauria-Filgueiras, 2000). As placas semeadas foram contidas em jarras de anaerobiose com capacidade de 2,5 litros para o cultivo destes microrganismos e incubada por 48h em temperatura de 37°C, em atmosfera de microaerofilia gerada através de geradores de atmosfera de microaerofilia comerciais - Microaerobac (Probac do Brasil). Das colônias típicas, com aspecto espraído e com brilho d'água, foi realizado um esfregaço corado pelo método de Gram, a fim de se observar a presença de células com morfologia típica de *Campylobacter* (Lauria-Filgueiras, 2000).

3.4 Estudo das citotoxinas produzidas por *C. jejuni*

Para detecção e titulação das quatro citotoxinas em pesquisadas neste estudo: a toxina distensora citoletal (CDT), a toxina citoletal de arredondamento (CLRT), a citotoxina de 70-kDa e a citotoxina ativa em células Vero; avaliou-se o melhor meio de cultivo e melhor método para obtenção destas citotoxinas.

3.4.1. – Meios de cultura

Para a avaliação da produção das citotoxinas foram utilizados os seguintes meios de cultivo bacteriológico: caldo Simples, caldo Brucella, caldo Tryptic Soy Broth (TSB) e caldo Brain Heart Infusion (BHI) em volumes de 7mL. A incubação foi realizada em atmosfera de

microaerofilia (Probac), à temperatura de 37 °C, por um período de 72 horas.

Um subgrupo de 20 amostras foi utilizado para produção de sobrenadantes de cultura testando estes quatro meios de cultura. Adotou-se como parâmetro inicial para presença da produção de qualquer citotoxina, a capacidade do sobrenadante induzir alterações morfológicas em células Vero, em até 120 horas de ensaio, quando comparado com a aplicação do meio estéril.

3.4.2 - Preparo dos sobrenadantes

Todos os cultivos bacterianos foram submetidos à centrifugação de 12.000 rpm por 30 minutos em centrífuga refrigerada a 4 °C (Himac, CF 15D2, Hitachi, Japan) e os sobrenadantes coletados foram mantidos a 4 °C até o momento de serem utilizados. Caso não fossem utilizados no mesmo dia, eram armazenados em freezer na temperatura de -20 °C, de acordo com Lee *et al.*, 2000.

3.4.3. – Sonicação do crescimento bacteriano

Em ensaio preliminar, um grupo de 20 sobrenadantes de cultivo bacteriano foram submetidos à sonicação como o objetivo de avaliar a melhor maneira de obtenção das citotoxinas. A sonicação foi realizada durante 3 minutos, de maneira que houvessem três ciclos de 30 segundos, com intervalos de 30 segundos entre eles. Após sonicação, a suspensão bacteriana foi centrifugada a 12.000 rpm/4 °C por 30 minutos e o sobrenadante separado para posterior ensaio em culturas de células. Adotou-se como parâmetro de avaliação para detecção da citotoxina a produção de um efeito de alteração da morfologia celular compatível com o efeito de alongamento celular provocado pela toxina CDT.

3.4.4 - Preparo das culturas celulares

Células Vero (rim de macaco africano), HeLa (carcinoma de útero humano) e CHO (célula de ovário de hamster chinês transformada) provenientes do estoque pertencente ao Setor de Cultura Celular, Departamento de Microbiologia e Imunologia IB/UNICAMP, foram cultivadas em garrafas próprias para cultivo de células contendo Meio Mínimo Essencial (Eagle) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução de antibióticos (penicilina 1.000U/ml e estreptomicina 250 µg/mL). Os frascos de cultura foram incubados em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 48 horas, para formação de monocamada confluenta.

Após tratamento da cultura celular com solução de tripsina-Versene (ATV) para desprendimento da monocamada e individualização celular, a suspensão de células, em número estimado de $2,5 \times 10^5$ células/mL, foi distribuída em placas com 96 orifícios, em volume de 100 µL por cavidade, e incubada por 24 horas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂, para formação da monocamada celular (Misawa *et al.*, 1994).

3.4.5 – Detecção da citotoxicidade de *C. jejuni* em linhagens celulares

Após formação da monocamada celular, o meio MEM que estava presente foi substituído por 100µL de meio MEM contendo 1% da mesma solução de antibióticos utilizada anteriormente, porém com ausência de soro fetal bovino e adicionado 100 µL do sobrenadante a ser testado.

Todos os ensaios foram realizados em duplicata, sendo as diluições do sobrenadante das culturas de *C. jejuni* efetuadas no próprio meio MEM, na razão 2. Os ensaios para a observação dos efeitos citotóxicos foram realizados em células Vero, HeLa e CHO, nas diluições de 1/2 até 1/256 e as leituras foram realizadas em microscópio invertido (Nilcon).

Foram considerados positivos para a citotoxina CDT e CLRT aqueles ensaios em que, até um período máximo de 120 horas de leitura, um número igual ou maior de 50% das células apresentaram alteração na sua morfologia celular, levando a um alongamento e posterior morte celular e um arredondamento e posterior morte celular, respectivamente (Misawa *et al.*, 1994).

Foram considerados positivos para a Citotoxina de 70-kDa e Citotoxina ativa somente em Vero, aqueles ensaios em que, após 48 horas de leitura, um número igual ou maior de 50% das células apresentaram alteração em sua morfologia celular levando a um arredondamento e posterior morte celular. Os tempos de leitura dos ensaios biológicos foram aproximadamente em intervalos de 6 horas entre uma leitura e outra (Misawa *et al.*, 1994; Misawa *et al.*, 1995).

Como controle negativo utilizou-se o meio de cultura sem crescimento bacteriano e o meio MEM utilizado para o preparo dos cultivos celulares. Como controle positivo foi utilizado somente o sobrenadante da cultura da amostra de *E. coli* CDT 86-6136 para detecção da citotoxina CDT.

3.4.6 – Teste da viabilidade celular

O meio de cultura dos cultivos celulares foi retirado e substituído por 90µL, em cada orifício, de meio MEM sem soro fetal bovino contendo o MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium]} (1mg/mL). As células foram incubadas durante 2 horas em estufa a 37 °C, em atmosfera de 5% de CO₂ e, em seguida, foram adicionados 10µL de isopropanol ácido. As placas foram agitadas durante 5 minutos e a absorbância correspondente a cada amostra foi medida num leitor de placas (Multi Skan II - Flow Laboratories U.S.A) à 570nm. A absorbância obtida das células não tratadas foi considerada como 100% de viabilidade celular (adaptado de Gilbert & Slavik, 2004).

3.5 Detecção da atividade hemolítica

3.5.1 – Pesquisa de hemolisina em meio sólido

As amostras de *C. jejuni* em estudo foram cultivadas em caldo TSB e incubadas a 37°C/48hs. Após o crescimento bacteriano, as amostras foram semeadas sobre e em profundidade em Ágar tríptico de soja (TSA) contendo 5% das hemácias de carneiro, cavalo, boi, cobaia e galinha, lavadas e posteriormente não lavadas com salina fisiológica, sendo cada hemácia testada isoladamente.

Foi considerado como resultado positivo quando observava-se a presença de halo transparente de hemólise ao redor ou sob as colônias, com hemólise do tipo α (ou parcial) ou do tipo β (ou total). A leitura foi realizada do segundo até o quinto dia de incubação (Misawa *et al.*, 1995), em atmosfera de microaerofilia comercial (Probac). Como controle positivo foi utilizada a linhagem *E. coli* P 46.

3.5.2 – Atividade hemolítica no sobrenadante de cultura (Teste em microplaca)

Foi utilizado o método descrito por Bhakdi *et al.*, (1986). Alíquotas de 50 μ L de sobrenadantes das culturas de *C. jejuni* em TSB a 37°C, em cultivo estacionário, foram diluídas sucessivamente, na razão 2, em salina fisiológica. Uma alíquota de 50 μ L de suspensão de 1% de hemácias de carneiro, cavalo, boi, cobaia e galinha, previamente lavadas três vezes em salina fisiológica, foram adicionada isoladamente a cada orifício contendo os sobrenadantes dos cultivos bacterianos e o título (recíproco da maior diluição capaz de provocar a lise de 50% das hemácias) foi determinado visualmente após 60 min de incubação em banho de água a 37°C.

3.5.3 – Cultivo na presença de agentes quelantes e soluções de íons - Influência da condição de cultivo na expressão da hemolisina.

Para verificar a influência de agentes quelantes e solução de íons na expressão da atividade hemolítica, as amostras de *C. jejuni* foram cultivadas em TSB contendo separadamente os quelantes EDTA (etilenodiamina-tetra ácido acético, Synth - 5mM - Baratéia *et al.*, 2001) e EDDA (etileno-di-(o-hidrofenol) ácido acético, Sigma - 100µg – Stoeber *et al.*, 1988) e solução de íons CaCl₂ (Cloreto de cálcio - 10mM - Boehm *et al.*, 1990); MgCl₂ (Cloreto de Magnésio - 10mM - Boehm *et al.*, 1990) e FeCl₃ (Cloreto férrico - 5mM – Baratéia *et al.*, 2001) por 48h a 37°C em atmosfera de microaerofilia comercial (Probac). Posteriormente foram semeadas, como descrito no item 3.4.1. Como controle dos testes utilizou-se somente o caldo TSB sem o crescimento bacteriano, acrescido dos agentes químicos em teste.

3.6 Detecção do gene *cdtB* através da técnica da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

3.6.1 – Obtenção do DNA bacteriano

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

A partir do crescimento bacteriano em placa, foi retirado um raspado de colônias de *Campylobacter* que foi ressuspenso em 100 µL de água Mili Q estéril. O material foi homogeneizado em vórtex e submetido à lise térmica em água fervente por 10 minutos e, em seguida, foi centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos em centrífuga refrigerada a 4 °C (Centrífuga Sorvall MC 12). Os sobrenadantes, com o DNA bacteriano foram utilizados no ensaio da PCR.

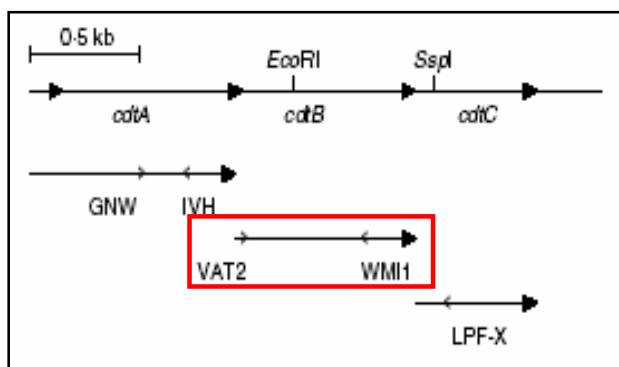
3.6.2 - Detecção dos genes de *cdtB* por PCR

Os iniciadores utilizados neste estudo foram iniciadores degenerados, os quais foram desenhados baseados em regiões de homologia com gene *cdtB* de *E. coli*.

Como não obtivemos amostras padrão do gênero *Campylobacter* correspondente ao gene *cdtB*, foi utilizado como controle positivo e negativo para as reações da PCR, amostras padrão de *E. coli*: Controle positivo - *E. coli* CDT 86-6136 e controle negativo - *E. coli* K12.

O DNA cromossomal de amostras de *C. jejuni* foi usado como “*template*” para as reações de PCR. O conjunto de oligonucleotídios testado (VAT2 e WMI1) amplificam fragmentos de 495 bp presentes em *C. jejuni*, representando a amplificação de uma área altamente conservada dos genes de *cdtB* em *E. coli*, porção esta mais conservada na estrutura genética que codifica a proteína CDT.

Esquema 1 - Mapa dos genes *cdt* em *C. jejuni* e localização do iniciador usado neste estudo (Pickett *et al.*, 1996).



Para a detecção e amplificação do gene de interesse foram utilizados para cada reação os reagentes descritos no quadro abaixo.

Quadro 2 - Componentes e insumos necessários para a realização da técnica da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR).

Componentes	Volume μL	Concentração final
10x “PCR Buffer” (Gibco-BRL)	3 μL	1x
10mM “Dntp mixture” (Gibco-BRL)	0,6 μL	0,2mM
Par de iniciadores	-	60ng
50mM MgCl_2 (Gibco-BRL)	1,5 μL	1,5mM
DNA bacteriano	7 μL	-
Taq – DNA polymerase (5U) (Gibco-BRL)	0,2 μL	1U
Água Mili-Q esterilizada	30 μL (qsp)	-
Total	30 μL	-

A concentração dos insumos utilizada para a realização da técnica da PCR foi aquela preconizada por diferentes autores (Bang, 2001; Pickett *et al.*, 1996). Assim, nos detemos apenas na padronização da concentração do par de iniciadores utilizados e obteve-se melhor resposta na concentração de 60ng.

A sequência de oligonucleotídeos pertencente ao iniciador utilizado está apresentada no quadro abaixo. A reação de amplificação foi realizada em Termociclador AppliedBiosystems-GeneAmp – PCR System 9700.

Quadro 3 - Sequências de oligonucleotídeos utilizados para o ensaio da PCR e tamanho (pb) do fragmento produzido na amplificação para o gene *cdtB* em *C. jejuni*.

Gene	Iniciadores	Sequências de oligonucleotídeos(5'-3')	Produto Amplificado	Referência Bibliográfica
<i>cdtB</i>	VAT2	GT(AGCT) GC(AGCT) AC(GCT) TGG AA(CT) CT(AGCT) CA(AG) GG	495 pb	Pickett <i>et al.</i> , 1996
	WMI1	(AG)TT (AG)TC (AGTC)CC (CT)AA (AGT)AT CAT CC'		

3.6.3 - Condições para a realização da técnica da PCR

Após testes para a padronização das condições ideais para a realização desta técnica, utilizando diferentes temperaturas de anelamento, chegou-se aos seguintes parâmetros:

Quadro 4 - Programa de ciclos para amplificação em ensaio da PCR:

1º. Passo	Denaturação inicial	94 °C	5 minutos
2º. Passo (30 ciclos)	Denaturação	94 °C	1 minuto
	Anelamento	54 °C	2 minutos
	Extensão	72 °C	1 minuto
3º. Passo	Extensão final	72 °C	7 minutos

3.6.4 – Eletroforese do produto amplificado

Para a visualização dos resultados, 10 µL do produto da PCR foram misturados com 4 µL do tampão de amostra para corrida (tampão TAE acrescidos de 25% de Ficoll, 0,25% azul de bromofenol, 0,25% Xileno cianol) e o volume total foi aplicado em gel de agarose horizontal a 2%, preparado com tampão TAE (Tris 1,6M; EDTA 0,025M e Ácido acético 0,8M, pH 7,9).

A corrida eletroforética foi realizada por 45 minutos a 100volts. Em seguida, o gel foi submerso em solução de brometo de etídeo (1,5 µg/mL) por 10 minutos. As bandas foram visualizadas em transluminador de luz ultravioleta e fotografadas no sistema Image Máster VDS (Pharmacia Biotech Inc. USA) (Moura, 2005).

4. RESULTADOS

4.1 Estudo das citotoxinas produzidas por *C. jejuni*

4.1.1 Seleção do meio de cultivo para obtenção das citotoxinas produzidas por *C. jejuni*

Os resultados encontrados num subgrupo de 20 amostras inicialmente testadas (Tabela 1) indicam que em todos os meios utilizados, exceto em Caldo Simples, observou-se alteração da morfologia celular representada por arredondamento e alongamento celular, para a presença de CDT e para CLRT, para a toxina de 70-kDa e para aquela ativa somente em células Vero, respectivamente.

No meio de cultivo Caldo Brucella, observou-se alteração na morfologia celular também onde foi realizado o controle do ensaio com meio estéril, após período de 30 horas, demonstrando uma descaracterização da monocamada celular, com a formação de grumos. Devido a este fato, não pudemos concluir observação para este meio, no tempo total do ensaio.

Tanto no meio BHI, quanto no meio TSB, não foi observado nenhuma alteração na monocamada celular quando os meios estéreis foram aplicados como controle do ensaio. Para o meio de cultivo BHI o título encontrado mais expressivo foi 4 (diluição 1/4), quanto que para o meio TSB encontramos inicialmente títulos de 16 (diluição 1/16).

O meio no qual obteve-se melhores resultados foi o caldo Tryptic Soy Broth (TSB), sendo o meio de cultivo escolhido então para prosseguimento dos ensaios.

4.1.2 – Comparação da produção de citotoxinas após sonicação

Os crescimentos bacterianos, de um grupo de 20 amostras de *C. jejuni*, foram submetidos à sonicação e testados em cultivo celular Vero. Estes resultados foram comparados com aqueles obtidos com os sobrenadantes das culturas livres de células e estão apresentados na Tabela 2.

Quando comparado o efeito citopático dos sobrenadantes da cultura livres de células com o sobrenadante obtido após sonicação do crescimento bacteriano, notamos um decréscimo no título do efeito citotóxicos. Os títulos obtidos a partir dos sobrenadantes de culturas livres de células foram superiores aqueles obtidos através da técnica de sonicação.

Os resultados estão apresentados na Tabela 2, onde demonstramos apenas três amostras como exemplo, sendo que os títulos obtidos são bem menores quando as amostras foram submetidas à sonicação. Desta forma, este método de obtenção das citotoxinas foi abandonado.

4.1.3 – Detecção de Citotoxinas

De acordo com o efeito biológico nos diferentes cultivos celulares constatou-se a produção de três citotoxinas diferentes: CDT (que provoca alongamento levando à morte celular em até 120 horas de ensaio), CLRT (que provoca arredondamento levando à morte celular em até 120 horas de ensaio) e Citotoxina de 70-kDa (que provoca arredondamento levando à morte celular em no máximo 48 horas de ensaio), sendo suas frequências demonstradas na Figura 1.

Das 80 amostras pesquisadas, 62 (77,5%) apresentaram sobrenadantes positivos para, pelo menos, uma das citotoxinas pesquisadas, sendo 57 amostras CDT+ (20 amostras de origem humana, 19 de origem animal, três de origem ambiental e 15 de origem alimentar). Ainda, 16 amostras foram CLRT+ (sendo três amostras de origem humana, 11 de origem animal e duas de origem alimentar).

Sete amostras foram positivas para a toxina 70-kDa, sendo cinco amostras de origem humana e duas de origem animal. Não foram detectadas amostras positivas para a toxina ativa somente em células Vero (Tabela 3). É importante ressaltar que muitas amostras foram positivas para mais de uma citotoxina ao mesmo tempo.

4.1.4 – Frequências de produção de citotoxinas de *C. jejuni* isolados de diferentes origens

Os percentuais das citotoxinas CDT, CLRT e 70-kDa detectadas em amostras de *C. jejuni* de diferentes origens estão demonstradas na Figura 2.

De um total de 80 amostras utilizadas neste estudo, o resultado da análise quanto a expressão de citotoxinas para a amostragem humana foi de 80%, 12% e 20% para as citotoxinas CDT, CLRT e 70-kDa, respectivamente. Já para a amostragem animal os percentuais são de 61,3%, 35,5% e 9,5% e para a amostragem de origem alimentar os percentuais são de 71,5%, 9,5% e 0%, para as citotoxinas CDT, CLRT e 70-kDa, respectivamente.

Estes resultados encontra-se demonstrados nas Tabelas 4, 5, e 6, e os títulos correspondentes encontram-se nas Tabelas 10, 11, 12 e 13 contidas no Anexo.

Quanto ao resultado da produção de citotoxinas obtido a partir da amostragem ambiental, todas as três amostras estudadas (Cj 57, Cj58 e Cj59) apresentaram o mesmo perfil, sendo positivas somente para citotoxina CDT.

De acordo com o efeito biológico observado nos diferentes cultivos celulares, podemos constatar a produção das citotoxinas CDT, CLRT e Citotoxina de 70-kDa nas diferentes amostragens estudadas e relacionar uma possível associação na produção das mesmas (Tabela 7).

4.1.5 – Efeito citotóxico da toxina CDT

Na figura 3, estão apresentados os efeitos citotóxicos de acordo com aqueles descritos para a citotoxina CDT, observados em ensaios realizados em células CHO, utilizando o sobrenadante livre de células do crescimento bacteriano proveniente do caldo TSB.

4.2 Detecção da atividade hemolítica

4.2.1 – Pesquisa de hemolisina em meio sólido

Das 80 amostras de *C. jejuni* examinadas, 69 apresentaram halo de hemólise parcial ao redor das colônias sendo três (3,75%) em hemácias de cavalo, uma (1,25%) em hemácias de carneiro, 22 (27,5%) em hemácias de boi, 27 (33,75%) em hemácias de cobaia e 16 (20%) em hemácias de galinha (Figura 4 e Tabelas 14 e 15 em Anexo), não havendo diferença na hemólise com o cultivo bacteriano em profundidade ou na superfície.

A presença do halo começou a ser evidenciada após 48 hs de incubação devido ao crescimento fastidioso do microrganismo. Os halos de hemólise produzidos pelas amostras de *C. jejuni* foram parciais e menores quando comparados à α -hemolisina produzida pela linhagem padrão de *E. coli* P46.

O meio preparado com hemácias lavadas não alterou o padrão de hemólise observado em nenhuma das culturas utilizadas. Não houve resultado positivo para o teste de atividade hemolítica no sobrenadante das culturas em estudo.

4.2.2 – Frequências de positividade para hemolisina em amostras de *C. jejuni* de diferentes origens, frente a diferentes hemácias:

Das 80 amostras de *C. jejuni* testadas quanto à produção de hemolisina, 39 (48,75%) foram positivas em uma ou mais tipos de hemácias utilizadas no ensaio. No contexto das diferentes origens das amostras estudadas, a positividade para uma ou mais hemácias testadas foi de 15 amostras (60%) de origem humana, 13 amostras (42%) de origem animal, nenhuma amostra positiva (0%) de origem ambiental e 11 amostras (52,5%) de origem alimentar. Este resultado está demonstrado na tabelas 8.

4.2.3 – Influência de agentes quelantes e solução de íons na expressão de hemolisina

Agentes quelantes de ferro (EDDA) e as soluções de íons bivalentes (EDTA, Cloreto de cálcio, Cloreto de magnésio e Cloreto férrico) presentes no meio de cultivo nas concentrações utilizadas aumentam a frequência da atividade hemolítica quando testadas nas hemácias de carneiro e cavalo. Para as outras hemácias este teste não foi realizado.

Os resultados obtidos foram de 20 amostras positivas (25%), 17 (21,25%), seis (7,5%), sete (8,75%) e 12 (15%) em hemácias de carneiro acrescida das soluções CaCl_2 , MgCl_2 , FeCl_3 , EDTA e EDDA, respectivamente, e para as amostras testadas com hemácias de cavalo o número de amostras positivas e o percentual encontrado foi de: 10 amostras (12,5%), cinco (6,25%), zero (0%), cinco (6,25%) e 10 (12,5%), apresentados na figura 5.

4.2.4 – Associação entre produção de citotoxinas e hemolisina

Na tabela 9 está demonstrada a associação entre a produção de citotoxinas e hemolisinas nas diferentes amostras de *C. jejuni* em estudo.

Das 15 amostras de origem humana positivas para hemolisina, apenas duas amostras (13,3%) (Cj 15 e Cj 19) foram negativas para presença de qualquer citotoxinas, cinco amostras (Cj 31, Cj 38, Cj 39, Cj44 e Cj 50) das 13 amostras de origem animal (38,5%) e quatro amostras (Cj 62, Cj 63, Cj 67 e Cj69) das 11 amostras de origem alimentar (36,4%) também tiveram o mesmo comportamento, demonstrando associação entre a produção destas diferentes toxinas.

4.3 Detecção dos genes de *cdtB* pela PCR

Todas as 80 amostras de *C. jejuni* em estudo foram testadas quanto à presença do gene *cdtB*. Na figura 6 está demonstrado o resultado da detecção do gene *cdtB* pela técnica da PCR nas diferentes amostragens em estudo, comparando com o percentual encontrado com a detecção da citotoxina CDT em culturas celulares. O percentual de positividade encontrado na análise da presença do gene *cdtB* foi de 100%, 92%, 87% e 85% nas amostragens ambiental, humana, animal e alimentar respectivamente.

O número de amostras negativas foi bastante pequeno, representado por duas amostras de origem humana (Cj 14 e Cj 19), quatro amostras animais (Cj 35, Cj38, Cj48 e Cj50), nenhuma amostra ambiental e três amostras de alimentos (Cj62, Cj63 e Cj78), valores inferiores quando comparadas aos encontrados através dos testes biológicos.

A figura 7 demonstra o perfil eletroforético de amostras positivas e negativas para o gene *cdtB*, amostras padrão *E. coli* CDT 86-6136 e marcador de peso molecular de 100bp.

TABELA 1 – Estudo comparativo para escolha do melhor meio de cultura a ser utilizado nos ensaios de cultura de célula.

Meios de Cultura	Título ^a	Controle do Meio
Caldo Simples	Negativo	Negativo
Caldo Brucella	Não determinado	Tapete celular descaracterizado
TSB	16 (1/16)	Negativo
BHI	4 (1/4)	Negativo

Tempo total do ensaio: 120 horas

Linhagem celular utilizada: Célula Vero

a – Recíproca da maior diluição do sobrenadante que apresentava atividade biológica.

Tabela 2 – Estudo comparativo dos títulos de citotoxicidade pela citotoxina de distensão citoletal obtidos a partir de células Vero, dos sobrenadantes de sonificados ou não de *C. jejuni*.

		Título ^a (Atividade Citotóxica)				
Amostras		24hs	48hs	72hs	96hs	120hs
Cj 20	Sobrenadante	16	16	32	32	64
	Sonicado	2	2	4	4	8
Cj 36	Sobrenadante	8	8	16	32	64
	Sonicado	4	4	8	16	16
Cj 76	Sobrenadante	4	8	16	32	64
	Sonicado	2	2	4	8	16

a – Recíproca da maior diluição do sobrenadante que apresentava atividade biológica.

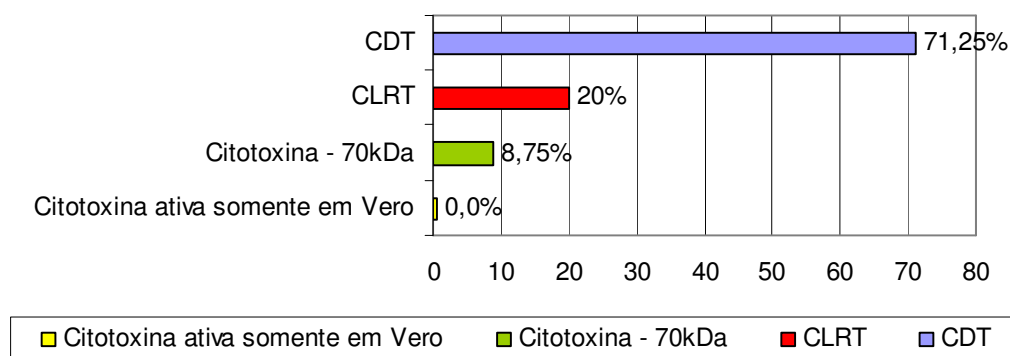


Figura 1 – Frequências das citotoxinas detectadas em amostras de *C. jejuni*.

TABELA 3 – Presença de citotoxinas em amostras de *C. jejuni* isolados de diferentes origens

Toxinas*	Número e porcentagens de amostras positivas	Número e porcentagens de amostras positivas origem de isolamento
CDT	57 (71,25%)	15 AL (18,75%) 03 AM (3,75%) 19 AN (23,75%) 20 HU (25%)
CLRT	16 (20%)	02 AL (2,5%) 11 AN (13,75%) 03 HU (3,75%)
70-kDa	7 (8,75%)	02 AN (2,5%) 05 HU (6,25%)
Citotoxina ativa somente em Vero	0 (0,0%)	-
Total	80 (100%)	80 (100%)

AL = Amostra de origem Alimentar

AM = Amostra de origem Ambiental

AN = Amostra de origem Animal

HU = Amostra de origem Humana

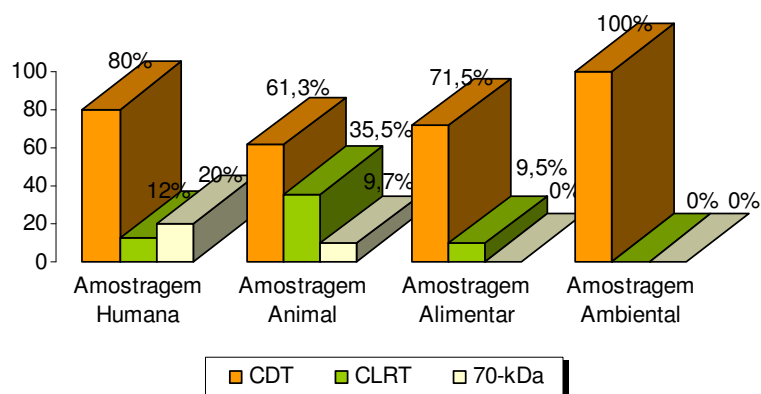


Figura 2 – Frequência das diferentes citotoxinas nas diferentes origens de amostras estudadas.

TABELA 4 – Citotoxinas CDT, CLRT e 70-k-Da em amostra de *C. jejuni* isoladas de origem humana

IDENTIFICAÇÃO	CDT*	CLRT*	70-kDa*	Total
Cj02	+	+	+	01
Cj06, Cj12, Cj14, Cj15,Cj19	-	-	-	05
Cj01, Cj03, Cj04, Cj05, Cj07, Cj08, Cj11, Cj16, Cj17, Cj18, Cj20, Cj24, Cj25	+	-	-	13
Cj09, Cj10, Cj13, Cj22	+	-	+	04
Cj21, Cj23	+	+	-	02
TOTAIS	20	03	05	25
%	80	12	20	100

* Teste em cultivos celulares: CHO, HeLa e Vero

TABELA 5 – Citotoxinas CDT, CLRT e 70-k-Da em amostra de *C. jejuni* isoladas de origem animal

IDENTIFICAÇÃO	CDT*	CLRT*	70-kDa*	Total
Cj37	+	+	+	01
Cj29, Cj31, Cj38, Cj39, Cj42, Cj44, Cj50	-	-	-	07
Cj26, Cj27, Cj28, Cj30, Cj36, Cj40, Cj45, Cj49, Cj51, Cj52, Cj55	+	-	-	11
Cj32, Cj33, Cj34, Cj46, Cj53, Cj54, Cj56	+	+	-	07
Cj35, Cj41, Cj43	-	+	-	03
Cj47, Cj48	-	-	+	02
TOTAIS	19	11	03	31
%	61,3	35,5	9,7	100

* Teste em cultivos celulares: CHO, HeLa e Vero

TABELA 6 – Citotoxinas CDT, CLRT e 70-k-Da em amostra de *C. jejuni* isoladas de origem alimentar

IDENTIFICAÇÃO	CDT*	CLRT*	70-kDa*	Total
Cj62, Cj63, Cj67, Cj69, Cj73, Cj78	-	-	-	06
Cj60, Cj64, Cj65, Cj66, Cj68, Cj70, Cj71, Cj72, Cj74, Cj75, Cj77, Cj79, Cj80	+	-	-	13
Cj61, Cj76	+	+	-	02
TOTAIS	15	02	0	21
%	71,5	9,5	0,0	100

* Teste em cultivos celulares: CHO, HeLa e Vero

TABELA 7 – Produção associada das citotoxinas CDT, CLRT e de 70k-Da em amostras de *C. jejuni* de diferentes origens, detectadas por ensaios em células CHO, HeLa e Vero

Associação entre as citotoxinas	Alimentar (21 amostras)	Ambiental (03 amostras)	Animal (31 amostras)	Humana (25 amostras)	Total
CDT + CLRT	2 (9,5%)	-	7 (22,5%)	2 (8%)	12 (15%)
CDT + 70 k-Da	-	-	-	4 (16%)	4 (0,5%)
CLRT + 70 k-Da	-	-	-	-	0 (0%)
CDT + CLRT + 70 k-Da	-	-	1 (3,2%)	1 (4%)	2 (0,25%)

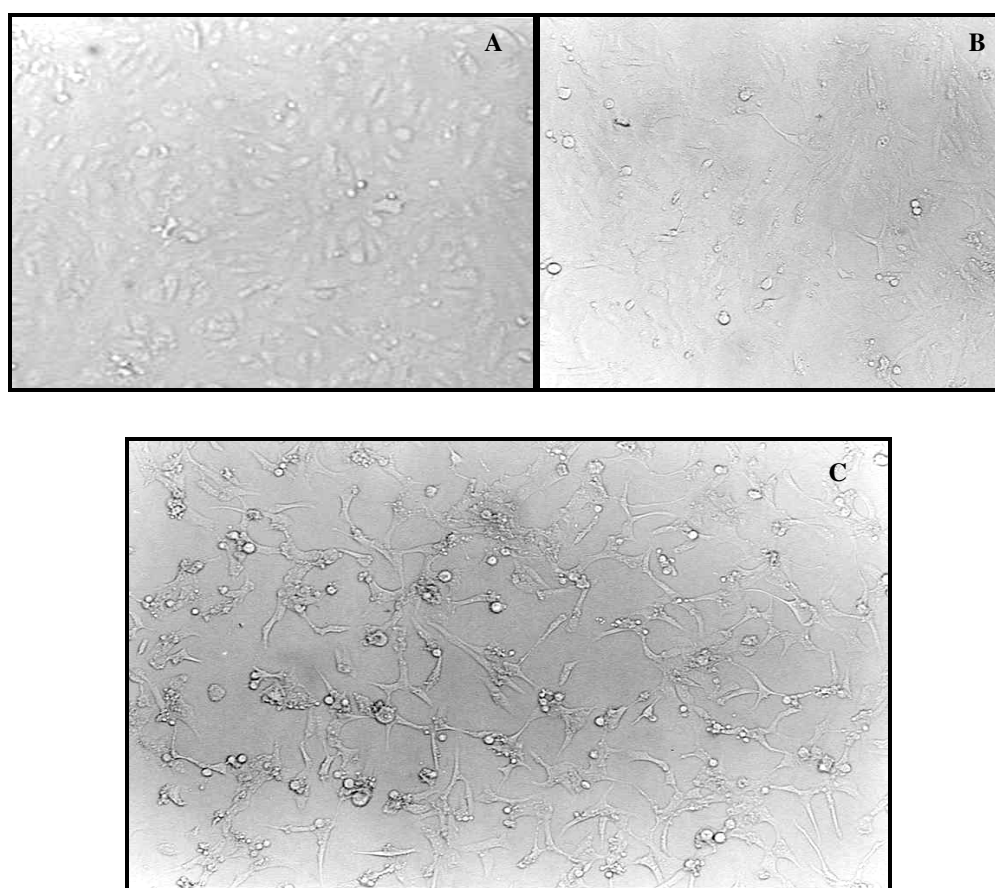


Figura 3 – Efeito citotóxico da toxina CDT da amostra Cj 16 em células CHO.

(A) Controle celular das células CHO, (B) Sobrenadante da amostra Cj 16, na diluição 1/32 após 48 horas de ensaio e (C) Sobrenadante da amostra Cj 16, na diluição 1/64 após 120 horas de ensaio. Magnitude 100X.

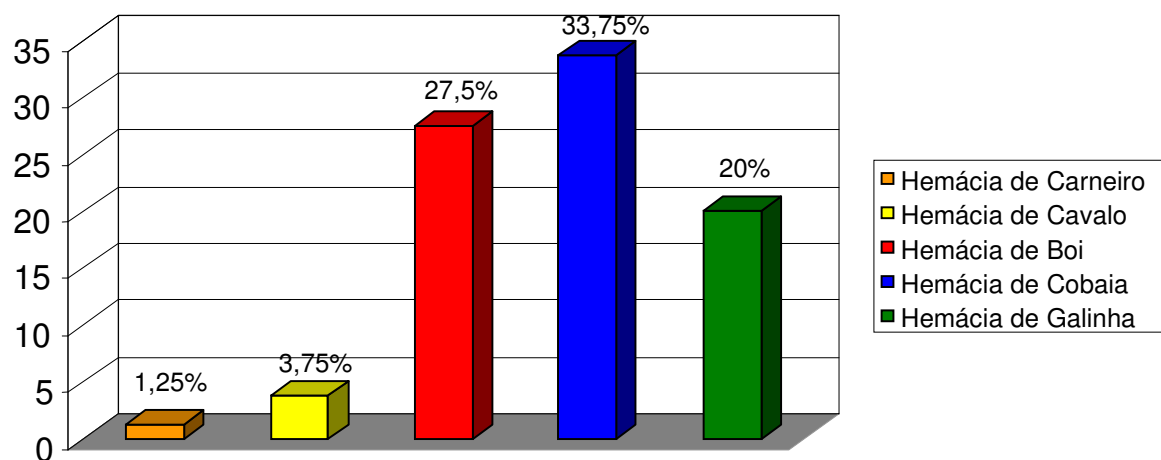


Figura 4: Atividade hemolítica de amostras de *C. jejuni* nas diferentes hemácias testadas.

TABELA 8 – Frequências da presença de hemolisina em amostras de *C. jejuni* isoladas de diferentes origens

Origem das Amostras	No. Total de amostras estudadas	No. de amostras positivas para 1 ou mais hemácias
Alimentar	21 (100%)	11 (52,5%)
Ambiental	3 (100%)	0 (0%)
Animal	31(100%)	13 (42%)
Humana	25 (100%)	15 (60%)
Total	80 (100%)	39 (48,75%)

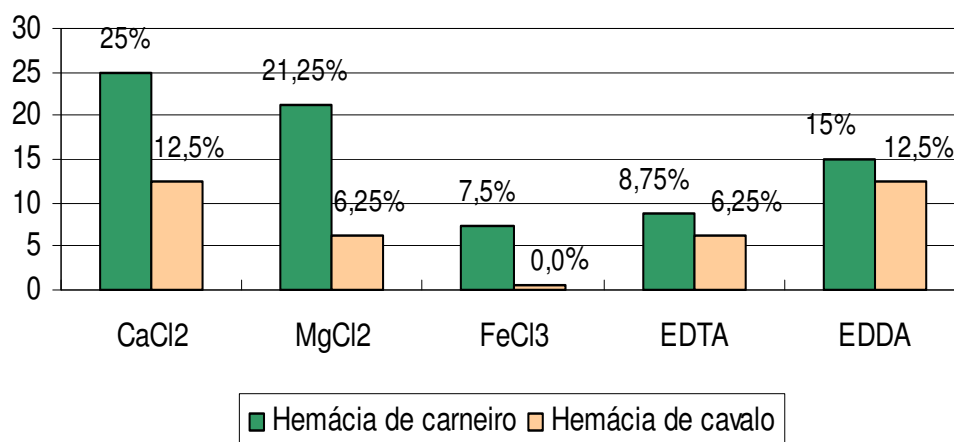


Figura 5: Influência na expressão da atividade hemolítica em amostras de *C. jejuni* após incorporação de quelantes e soluções de íons.

TABELA 9: Associação entre a produção de citotoxinas e hemolisina em amostras de *C. jejuni* isolados de diferentes origens

Origem das amostras	No. de amostras positivas para cada citotoxinas testada	No. de amostras hemolisina positiva, associada à produção de citotoxina
Alimentar	15 CDT	07 CDT (46,7%)
	02 CLRT	02 CLRT (100%)
Ambiental	03 CDT	-
Animal	19 CDT	07 CDT (36,8%)
	11 CLRT	03 CLRT (27,3%)
	02 70-kDa	-
Humana	20 CDT	13 CDT (65%)
	03 CLRT	03 CLRT (100%)
	05 70-kDa	04 70-kDa (80%)

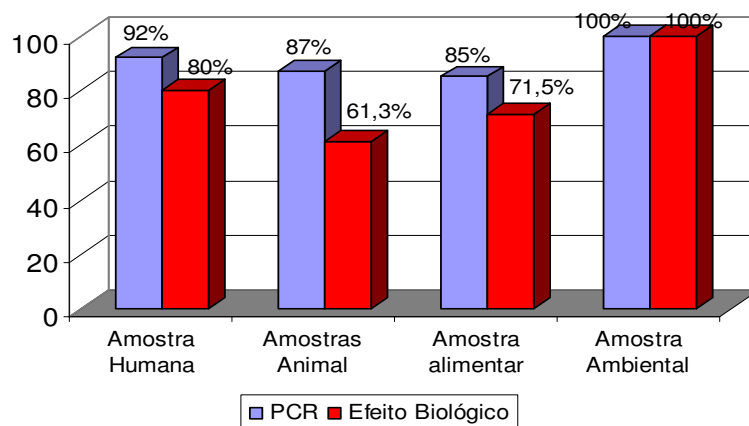


Figura 6 – Detecção da presença do gene *cdtB* através da técnica da PCR em amostras de *C. jejuni* comparado com a detecção da citotoxina CDT em culturas celulares

- 1- Controle positivo - *E.coli* CDT 86-6136;
- 2 - Cj1 +;
- 3 - Cj 16 +;
- 4 - Cj66 +;
- 5 - Padrão de peso molecular;
- 6 - Cj19 -;
- 7 - Controle negativo - *E.coli* K12.

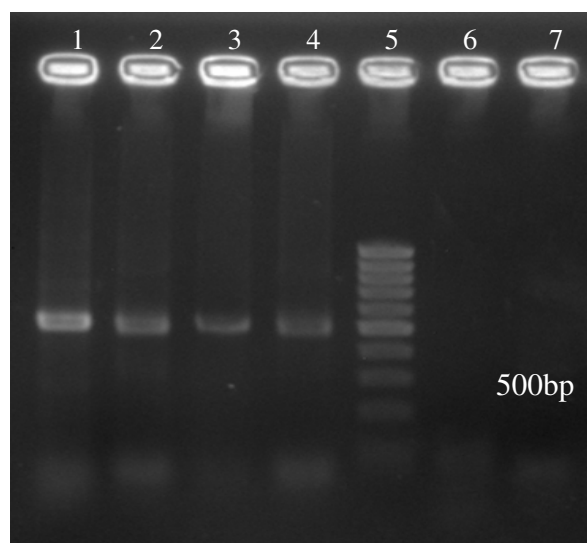


Figura 7 – Perfil eletroforético de amostras positivas e negativas para o gene *cdtB* em amostras de *C. jejuni*, a partir de gel de agarose a 2%.

5. DISCUSSÃO

O gênero *Campylobacter* apesar de já ter sido descrito há mais de quatro décadas, e contar com inúmeros trabalhos publicados relatando sua importância como patógeno humano e animal, ainda não teve o destaque necessário em nosso meio. Este panorama provavelmente decorre do discreto número de grupos de pesquisa envolvidos no estudo deste gênero bacteriano, da pouca solicitação de sua pesquisa nos laboratórios de análises clínicas, além da não obrigatoriedade de notificação dos casos diagnosticados de campilobacterose às instituições estatais de saúde. Entretanto, convém destacar que a ocorrência e relevância de *Campylobacter* no território brasileiro não é fato recente, já tendo sido demonstrado em publicações anteriores como os trabalhos de Ricciardi *et al.* (1979), apontando associação de *Campylobacter jejuni* a casos de diarreia na cidade do Rio de Janeiro.

Dentre as dificuldades que envolvem a pesquisa de *Campylobacter* citam-se, como fator preponderante, as próprias características biológicas deste microrganismo, que o torna particularmente distinto da maioria dos enterotapógenos bacterianos, requerendo condições únicas para seu isolamento e identificação. Por esta razão, admite-se que a pequena casuística de *Campylobacter* em enterites no território nacional esteja relacionada não só à carência de investigação, mas também ao seu cultivo inadequado.

Outro aspecto importante a ser ressaltado no estudo epidemiológico de *Campylobacter* é o de ser uma zoonose, naturalmente transmitida de animais vertebrados para o homem, tendo como principais veículos de transmissão o alimento de origem animal, a água com contaminação fecal recente, ou ainda, mais raramente, o contato direto com os animais portadores ou doentes (Frost, 2001).

Considerando toda a complexidade da necessidade do estudo deste gênero, a patogênese

causada pela bactéria e o ciclo de transmissão deste patógeno, admite-se a importância de se estudar fatores relacionados à virulência deste microrganismo em diferentes origens de isolamento e tentar traçar um paralelo nos dados obtidos.

Nesta investigação o foco de atenção foi voltado para a caracterização das toxinas produzidas por *C. jejuni* oriundos de quadros clínicos, amostras ambientais, isolados de origem animal e isolados de origem alimentar.

Atualmente, as pesquisas tem se voltado para a caracterização das toxinas produzidas por *Campylobacter* spp., acreditando-se que somente a adesão e a invasão não seriam responsáveis pelos efeitos citopáticos observados nas enterites (Van Vliet & Ketley, 2001).

As toxinas bacterianas representam o mais potente fator de virulência bacteriano e, mais recentemente, o estudo de toxinas produzidas por *Campylobacter jejuni* tem sido considerado de importância fundamental para o entendimento da patogênese causada por esta bactéria (Schmitt *et al.*, 1999).

Para avaliação das melhores condições para produção de citotoxinas, utilizamos, neste estudo, diferentes meios de cultivo: Caldo Simples, Caldo Brucella, TSB e BHI.

Um subgrupo de amostras foi utilizado para produção de sobrenadantes de cultura que foram testados em células Vero. Adotou-se como parâmetro inicial para detecção da produção de qualquer citotoxina, a capacidade do sobrenadante induzir alterações morfológicas no cultivo, em até 120 horas de ensaio, quando comparado com a aplicação do meio estéril.

Quanto à padronização dos ensaios, estudos como os de Wassenaar (1997) e Schulze *et al.*, (1998) utilizam o caldo Brucella para o cultivo bacteriano, mas no nosso estudo observamos uma alteração na morfologia da monocamada celular (Tabela 1) quando utilizamos tal meio de cultivo bacteriano estéril.

Em ensaio preliminar, um grupo de 20 sobrenadantes de cultivo bacteriano, que

apresentavam um efeito de alteração da morfologia celular compatível com efeito de alongamento celular provocado pela toxina CDT, apenas seis sobrenadantes provenientes da sonicação demonstraram o mesmo efeito que os sobrenadantes dos cultivos livres de células, e os outros sobrenadantes demonstrando títulos bastante inferiores (Tabela 2). Poucos são os trabalhos que utilizam sobrenadantes oriundos da sonicação para testes biológicos, pois quando comparados com outros métodos de extração de toxinas, o percentual de positividade e o título obtido são sempre inferiores (Wassenaar, 1997). Mooney *et al.*, (2001) relatam a obtenção de títulos de CDT duas vezes maiores quando compara a utilização do sobrenadante versus o sonicado em amostras de *C. upsaliensis*. Porém, Eyigor, em 1999, usa o sobrenadante sonicado do cultivo bacteriano em placas e obtém títulos expressivos na detecção de CDT em carcaças de aves.

Ao analisar a frequência de produção de toxinas por *C. jejuni*, a literatura mostra uma variedade de resultados. Misawa *et al.*, em 1995 comparam frequência e título da produção de toxinas entre amostras de *C. jejuni* isolados de humanos com diarreia e fezes de animais. Já Thornley *et al.*, em 2001, trabalham somente com isolados de amostras humanas. Em 2003, Bang *et al.*, detectam, pela PCR, amostras de *C. jejuni* produtoras de CDT em amostragem animal representada por isolados de gado e porcos. Gilbert & Slavik (2004) pesquisa a variação entre toxicidade associada a *C. jejuni* em amostras de origem humana e de frangos.

Em nosso estudo, foram analisadas 80 amostras de *C. jejuni*, sendo 62 positivas para pelo menos uma das citotoxinas pesquisadas (Tabela 3). Thorney *et al.*, (2001), em sua pesquisa, encontrou 29,7% de amostras não tóxicas dentro de um montante de 93 amostras de origem humana, resultado concordante com o encontrado em nossa pesquisa de 22,5%.

A presença da citotoxina ativa somente em células Vero, que promove arredondamento e morte celular, não foi observada em nenhuma amostra (Figura 1), pois toda vez que, neste

trabalho, uma amostra apresentou efeito positivo para alteração na morfologia celular em Vero, este efeito também foi observado em HeLa e CHO e até em títulos maiores. Há poucas descrições na literatura desta citotoxina que apresenta como resposta básica arredondamento e morte celular, semelhante a citotoxina de 70-KDa. Seu mecanismo de ação ainda é desconhecido e quando detectada os títulos encontrados são muito baixos (Florin & Antillon, 1992; *apud* Wassenaar, 1997).

Sete amostras produziram a toxina 70-kDa, sendo cinco delas de origem humana e duas de origem animal (Tabela 3). A citotoxina de 70-kDa ativa em HeLa e CHO e inativa em Vero, demonstram maior frequência de detecção na amostragem de origem humana e menor na amostragem de origem animal, representada por um percentual de positividade de 20% e 6,5% respectivamente, e ainda nenhuma amostra foi detectada na amostragem de origem alimentar. Florin & Antillon (1992) em trabalho com amostras humanas e animais encontrou um percentual de 17% e 10%, respectivamente, para cada amostragem.

Ainda, 16 amostras produziram a citotoxina CLRT, sendo três amostras de origem humana, 11 de origem animal e duas de origem alimentar (Tabela 3). Os percentuais de positividade encontrados para a citotoxina citoletal de arredondamento (CLTR) foram diferentes entre si nas diversas amostras: 12% para origem humana, 35,5% para origem animal e 9,5% para de origem alimentar (Figura 2), sendo estes dados não concordantes com os encontrados na literatura. Schulze & Borrmann (1998) demonstram percentuais de até 45% para amostras humanas e 30% para amostras animais. CLRT parece estar intimamente relacionada à produção da toxina citoletal distensora (CDT). A correlação entre estas duas citotoxinas já foi descrita por alguns autores (Wassenaar, 1997; Wassenaar *et al.*, 1997) e aproximadamente 75% das amostras produtoras de CLRT são também produtoras de CDT. Em nosso estudo, detectou-se um percentual de apenas 15% de amostras produtoras de ambas citotoxinas CDT e CLRT (Tabela 7)

no total de amostras estudadas, sendo este percentual aumentado para 22,5% quando consideramos somente a amostragem de origem animal.

Quanto à toxina CDT (Figura 3), temos 57 amostras produtoras de CDT, sendo 20 amostras de origem humana, 19 de origem animal, três de origem ambiental e 15 de origem alimentar (Tabela 3). Este resultado representa um percentual de positividade de 71,25% no total de amostras estudadas. Há relatos na literatura (Pickett, 1996; Purdy *et al.*, 2000; Wassenaar, 1997) de percentuais bastante representativos da frequência desta toxina em diversas amostras de *C. jejuni*, como 75% em amostras humanas, 95% num grupo abrangente de amostras humanas e de fezes de animais e 97% em amostras de diferentes grupos de animais.

Nas tabelas 4, 5 e 6 podemos observar a detecção dos efeitos biológicos obtidos na produção das diferentes citotoxinas separados nos distintos grupos de amostragem. Nas tabelas contidas no Anexo (Tabelas 10, 11, 12 e 13), podemos constatar o título de produção de cada citotoxina estudada. Podemos observar uma variedade na expressão dos títulos, mas em menor proporção encontram-se os títulos mais extremos como 1:2 e 1:128, sendo o título mais frequentemente encontrado 1:64. Estes dados encontram-se em concordância com a literatura (Pickett, 1996; Purdy *et al.*, 2000; Wassenaar, 1997). Convém ressaltar que não foi observada uma associação consistente entre a produção das diferentes citotoxinas produzidas, exceto para as citotoxinas CDT e CDLRT representando um percentual de 15% no total de amostras estudadas (Tabela 7).

Todas as amostras foram testadas quanto à presença do gene *cdtB* e como resultado temos que a grande maioria das amostras foram positivas para presença deste gene (Figura 6 e Tabela 16 em Anexo).

Sendo a grande maioria das amostras de *C. jejuni* positivas para presença do gene *cdtB*, no ensaio realizado com a técnica da PCR, 100%, 92%, 87% e 85% nas amostragens ambiental,

humana, animal e alimentar respectivamente, necessitando apenas da utilização do conjunto de iniciadores que amplifica a região relacionada ao fragmento do gene *cdtB*, não observamos a necessidade de verificar a presença do gene *cdtA* e *cdtC*, que também são responsáveis pela produção da toxina CDT, com o uso de outros conjuntos de iniciadores, já que o gene *cdtB* é o mais conservado na estrutura da toxina (Figura 7).

Quando se analisa a presença do gene e a expressão fenotípica com efeito biológico da toxina CDT, apenas 23,5% das amostras que apresentam o gene não expressaram o efeito biológico. Já o oposto não foi recíproco, pois todas as sete amostras negativas na detecção do gene *cdtB*, também foram negativas no ensaio em cultura de células.

A diferença entre os percentuais de positividade encontrados entre o efeito biológico e a detecção molecular da toxina CDT nas diferentes amostras representa um dado importante, mas que não pode ser avaliado isoladamente, pois só representa o percentual da presença do gene que codifica a proteína formadora da toxina e não a sua expressão (Figura 6).

Na literatura, há descrição de percentuais de positividade para detecção do gene *cdt* de 100% (Wassenaar, 1997), 80% (Pickett *et al.*, 1996) e até 70% (Lee *et al.*, 2000), em amostras de isolados clínicos. Bang *et al.*, 2001 relatam em seu trabalho um percentual de 75% de frequência deste gene em amostras de isolados de frango e outras aves domésticas. Não são encontrados relatos na literatura sobre a pesquisa deste gene em amostras de origem ambiental e alimentar. Os percentuais de positividade encontrados neste estudo para detecção do gene *cdtB* estão em concordância como os encontrados na literatura (Figura 6).

As outras citotoxinas não foram pesquisadas através da técnica da PCR, pois não há iniciadores descritos na literatura para detecção de todas citotoxinas já identificadas produzidas por amostras de *C. jejuni* e sim, somente para a detecção dos genes da toxina CDT.

Um aspecto interessante é o fato das amostras de origem animal apresentarem um

percentual de positividade para a presença do gene *cdtB* semelhante às amostras de origem alimentar, já que o modo de transmissão desta bactéria está intimamente ligada à contaminação alimentar. Este dado pode também ser entendido pelo fato do gênero *Campylobacter* ser considerado uma zoonose de interesse médico e sanitário, tendo o animal um papel importante para a transmissão deste patógeno (Schulze *et al.*, 1998).

Quanto à detecção da atividade hemolítica, nos resultados encontrados em nosso estudo (Tabelas 8 e Tabela 14 e 15 em Anexo), podemos observar uma diferenciada susceptibilidade demonstrada de fato pelo percentual de positividade produzido pelas diferentes hemácias testadas. Rowe & Welch (1994) descrevem que as hemolisinas podem variar grandemente quanto a sua ação em diferentes eritócitos.

A utilização de quelantes de ferro no meio de cultura para aumentar a produção de toxinas bacterianas tem sido relatada (Carbonell & Vidotto, 1992; Chart *et al.*, 1998). Observando os resultados dos ensaios realizados para detecção da atividade hemolítica (Figura 4), podemos concluir que, de maneira geral, a oferta dos íons bivalente Cálcio e Magnésio aumentou a positividade da atividade hemolítica dos isolados, quando comparados com os resultados com oferta de quelantes de cátions (Figura 5). Nos ensaios onde houve a disponibilidade de presença do íon Ferro, a atividade hemolítica foi de 0% em hemácia de cavalo, resultado esperado e discordante em hemácia de carneiro, onde se observou positividade ainda maior do que aquele apresentado somente para teste com a hemácia pura. Analisando as diferentes fontes de isolamento das amostras, não houve correlação quanto a origem do isolado e a presença da atividade hemolítica.

Algumas toxinas bacterianas podem necessitar de um rompimento mecânico das células para libera-lás do espaço periplasmático (Rowe & Welch, 1994). O fator Necrosante Citotóxico (CNF), por exemplo, é liberado em baixa quantidade no meio de cultura, necessitando de uma

forma de rompimento celular para a sua solubilização. Em nosso estudo, o rompimento da bactéria por sonicação, mostrou que as citotoxinas em estudo de *C. jejuni* não são intracelulares, sendo secretadas espontaneamente no sobrenadante de cultura. Dado discordante ao encontrado no estudo da hemolisina pois, no ensaio líquido de hemólise, onde o sobrenadante de cultura foi analisado separadamente quanto à atividade hemolítica, os resultados encontrados não confirmam este dado, sugerindo que a hemolisina pode ser parte constituinte da célula bacteriana.

Poucos são os relatos na literatura sobre a produção e detecção de hemolisinas em *C. jejuni*. Picket (1992) testou a habilidade de amostras de *C. jejuni* em adquirir ferro a partir de várias fontes presentes no metabolismo humano quando crescidas em meios sem fontes de ferro e concluiu que a atividade hemolítica não demonstrava ser regulada por íons ferro, uma vez que as amostras foram incapazes de retirar ferro destas substâncias.

Hossain *et al.*, (1993) detectaram atividade hemolítica em amostras oriundas de quadros clínicos de diarreia mostrando que as amostras se comportavam com diferentes espectros de atividade frente a diferentes eritrócitos, demonstrando atividade máxima contra eritrócitos de coelho e atividade mínima contra eritrócitos de galinha. Misawa *et al.*, em 1995 pesquisaram determinados fatores que contribuíam positivamente para a atividade hemolítica, como variação de pH e concentração de CO₂ utilizada na atmosfera de incubação.

Não há publicações recentes a respeito do estudo de atividade hemolítica de *C. jejuni* e a existência da citotoxina hemolítica não é totalmente comprovada. Porém, Van Vliet & Ketley, em 2001, relatam a existência de genes contendo domínios específicos para esta toxina.

Na tabela 9 podemos observar a associação entre a produção de citotoxinas e hemolisinas nas amostras estudadas, onde podemos destacar o alto percentual de produção de ambas toxinas na amostragem humana.

Nas Tabelas 17, 18, 19 e 20 (Tabela apresentadas em anexo) estão demonstrados os

resultado das provas bioquímicas para identificação da espécie *C.jejuni* e classificação em grupos denominados biotipos. Não houve nenhuma correlação entre um biótipo mais freqüente e a produção de uma ou mais citotoxinas neste estudo.

Em síntese, mesmo que se tenha destacado uma série de facetas no desenvolvimento deste trabalho, mais dados devem ser ampliados e aprofundados, à medida que haja uma continuidade nas investigações. Os dados encontrados sugerem que uma caracterização e purificação destas citotoxinas encontradas neste estudo, bem como a hemolisina, seriam de sua importância para um completo panorama de estudo das toxinas produzidas por *C.jejuni*.

O alvo das futuras pesquisas deve procurar elucidar os mecanismos patogênicos envolvidos na doença causada por *C. jejuni* e ainda uma análise cuidadosa de seqüências genômicas e o desenvolvimento de estratégias de seleção de mutantes poderão auxiliar e trazer novas perspectivas para o entendimento da virulência deste importante patógeno.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho chega-se as seguintes conclusões:

a) O caldo TSB, entre os meios de cultura testados, foi o melhor para produção das citotoxinas CDT, CLRT e Citotoxina de 70-kDa em *C. jejuni* detectadas neste estudo;

b) A citotoxina CDT foi, dentre as citotoxinas CDT, CLRT e Citotoxina de 70-kDa, aquela que apresentou uma maior frequência, representado por 71,25% de positividade contra os percentuais de 20% e 8,75% encontrados para as citotoxinas CLRT e 70-kDa, respectivamente;

c) Não houve diferença entre os percentuais de positividade na produção da citotoxinas CDT pelas amostras de *C. jejuni* de origem diferentes;

d) Para a citotoxina CLRT, houve diferença entre os percentuais de positividade encontrados nas amostras de *C. jejuni* de diferentes origens. Na amostragem animal encontrou-se 35,5% de positividade para CLRT contra 12%, 9,5% e 0% nas amostras de origem humana, alimentar e ambiental, respectivamente.

e) Para a citotoxina 70-kDa, também houve diferença entre os percentuais de positividade encontrados nas amostras de *C. jejuni* de diferentes origens, pois o maior percentual de positividade foi encontrado na amostragem humana (20%) contra 9,7%, 0% e 0% nas amostras de origem animal, alimentar e ambiental, respectivamente;

f) Não houve correlação entre a produção das diferentes citotoxinas estudadas; exceto para a produção das citotoxinas CDT e CLRT na amostragem animal (22,5%);

g) Para detecção da atividade hemolítica, as hemácias de cavalo e de carneiro foram menos sensíveis, que as hemácias de boi, cobaia e galinha quanto testadas frente as diferentes amostras de *C. jejuni*;

h) Na presença de agentes quelantes e de soluções de íons bivalentes houve um aumento da expressão de hemolisina testadas em hemácias de cavalo e carneiro;

i) Observou-se uma associação entre a produção de citotoxinas e a detecção da atividade hemolítica em amostras de *C. jejuni* isoladas de diferentes origens;

j) A presença expressiva do gene *cdtB* foi detectada em todas as amostras de *C. jejuni* de origem diferentes;

i) Este trabalho vem colaborar com a demanda de mais estudos sobre a campilobacteriose no Brasil.

7. ANEXO

TABELA 10 – Resultados e Títulos dos efeitos citotóxico das amostras de *C. jejuni* isoladas de origem humana testadas em diferentes linhagens celulares:

AMOSTRAS HUMANAS	Atividade citotóxica nas células indicadas e título obtido					
	CHO Título ^a		HeLa Título ^a		Vero Título ^a	
	48hs	120hs	48hs	120hs	48hs	120hs
Cj 01	A+ 16	A+ 64	A+ 16	A+ 128	A+ 16	A+ 32
Cj 02	AR+ 16	AR+ 64	AR+ 32	AR+ 128	-	-
Cj 03	A+ 8	A+ 32	A+ 64	A+ 128	-	A+ 32
Cj 04	A+ 32	A+ 64	A+ 32	A+ 128	A+ 16	A+ 64
Cj 05	A+ 16	A+ 32	A+ 64	A+ 128	A+ 32	A+ 64
Cj 06	-	-	-	-	-	-
Cj 07	-	A+ 32	A+ 16	A+ 128	A+ 4	A+ 16
Cj 08	A+ 4	AR+ 32	A+ 16	A+ 128	A+ 8	A+ 64
Cj 09	A+ 32	A+ 64	A+ 32	A+ 128	-	-
Cj 10	A+ 32	A+ 128	A+ 32	A+ 128	-	-
Cj 11	A+ 8	A+ 64	A+ 8	A+ 64	-	A+ 32
Cj 12	-	-	-	-	-	-
Cj 13	A+ 4	A+ 64	A+ 8	A+ 68	-	-
Cj 14	-	-	-	-	-	-
Cj 15	-	-	-	-	-	-
Cj 16	A+ 16	A+ 128	A+ 16	A+ 32	A+ 16	A+ 64
Cj 17	A+ 16	A+ 128	-	A+ 16	A+ 16	A+ 32
Cj 18	A+ 8	A+ 64	A+ 8	A+ 64	A+ 16	AR+ 64
Cj 19	-	-	-	-	-	-
Cj 20	A+ 8	A+ 32	-	A+ 32	A+ 16	A+ 64
Cj 21	AR+ 16	AR+ 128	AR+ 4	AR+ 32	AR+ 16	AR+ 64
Cj 22	A+ 4	A+ 64	-	-	-	-
Cj 23	AR+ 8	AR+ 128	AR+ 16	AR+ 32	AR+ 8	R + 32
Cj 24	A+ 16	A+ 128	A+ 8	A+ 32	-	AR+ 16
Cj 25	A+ 16	A+ 32	A+ 32	A+ 64	A+ 4	A+ 16

a – Recíproca da maior diluição do sobrenadante que apresentava atividade biológica.

A - Efeito de Alongamento celular

R - Efeito de Arredondamento celular

AR - Efeito de Alongamento e Arredondamento celular

TABELA 11 – Resultados e Títulos dos efeitos citotóxico das amostras de *C. jejuni* isoladas de origem animal testadas em diferentes linhagens celulares (Mesma legenda utilizada na Tabela 10)

AMOSTRAS ANIMAL	Atividade citotóxica nas células indicadas e título obtido					
	CHO Título ^a		HeLa Título ^a		Vero Título ^a	
	48hs	120hs	48hs	120hs	48hs	120hs
Cj 26	A+ 16	A+ 32	A+ 4	A+ 64	A+ 4	A+ 16
Cj 27	A+ 8	A+ 64	A+ 8	A+ 128	A+ 4	A+ 16
Cj 28	A+ 8	A+ 64	A+ 8	A+ 64	A+ 8	A+ 64
Cj 29	-	-	-	-	-	-
Cj 30	A+ 4	A+ 32	A+ 8	A+ 32	A+ 8	A+ 64
Cj 31	-	-	-	-	-	-
Cj 32	AR+ 8	AR+ 64	AR+ 8	AR+ 64	AR+ 2	AR+ 8
Cj 33	AR+ 16	AR+ 128	AR+ 8	AR+ 128	AR+ 8	AR+ 32
Cj 34	AR+ 8	AR+64	AR+ 8	AR+ 64	AR+ 2	AR+ 16
Cj 35	R+ 16	R+ 128	R+ 8	R+ 128	R+ 4	R+ 32
Cj 36	A+ 8	A+ 128	A+ 16	A+ 64	A+ 8	A+ 64
Cj 37	AR+ 2	AR+ 32	AR+ 8	AR+ 32	AR+ 8	AR+ 32
Cj 38	-	-	-	-	-	-
Cj 39	-	-	-	-	-	-
Cj 40	A+ 4	A+ 64	A+ 8	A+ 64	A+ 8	A+ 64
Cj 41	R+ 4	R+ 32	R+ 4	R+ 32	R+ 8	R+ 32
Cj 42	-	-	-	-	-	-
Cj 43	R+ 8	R+ 64	R+ 16	R+ 14	R+ 8	R+ 64
Cj 44	-	-	-	-	-	-
Cj 45	A+ 8	A+ 32	A+ 8	A+ 64	A+ 8	A+ 32
Cj 46	AR+ 8	AR+ 32	AR+ 16	AR+ 128	AR+ 8	AR+ 64
Cj 47	A+ 16	A+ 64	A+ 8	A+ 64	-	-
Cj 48	A+ 8	A+ 64	A+ 4	A+ 16	-	-
Cj 49	A+ 8	A+ 32	A+ 8	A+ 32	A+ 4	A+ 16
Cj 50	-	-	-	-	-	-
Cj 51	A+ 4	A+ 64	A+ 4	A+ 64	A+ 8	A+ 64
Cj 52	A+ 16	A+ 128	A+ 8	A+ 128	A+ 4	A+ 64
Cj 53	AR+ 4	AR+ 32	AR+ 8	AR+ 32	AR+ 4	AR+ 32
Cj 54	AR+ 4	AR+ 32	AR+ 16	AR+ 64	AR+ 4	AR+ 32
Cj 55	A+ 8	A+ 32	A+ 16	A+ 32	A+ 8	A+ 32
Cj 56	AR+ 4	AR+ 32	AR+ 16	AR+ 32	AR+ 8	AR+ 64

TABELA 12 - Resultados e Títulos dos efeitos citotóxico das amostras de *C. jejuni* isoladas de águas residuais testadas em diferentes linhagens celulares (Mesma legenda da Tabela 10)

AMOSTRAS AMBIENTAL	Atividade citotóxica nas células indicadas e título obtido					
	CHO Título ^a		HeLa Título ^a		Vero Título ^a	
	48hs	120hs	48hs	120hs	48hs	120hs
Cj 57	A+ 8	A+ 32	A+ 8	A+ 32	A+ 8	A+ 16
Cj 58	A+ 8	A+ 32	A+ 4	A+ 32	A+ 4	A+ 16
Cj 59	A+ 4	A+ 16	A+4	A+ 32	A+ 4	A+ 16

TABELA 13 – Resultados e Títulos dos efeitos citotóxico das amostras de *C. jejuni* isoladas de alimentos testadas em diferentes linhagens celulares (Mesma legenda utilizada na Tabela 10)

AMOSTRAS ALIMENTAR	Atividade citotóxica nas células indicadas e título obtido					
	CHO Título ^a		HeLa Título ^a		Vero Título ^a	
	48hs	120hs	48hs	120hs	48hs	120hs
Cj 60	A+8	A+ 64	A+8	A+ 64	A+ 8	A+ 64
Cj 61	AR+8	AR+ 32	AR+8	AR+ 32	AR+ 8	AR+ 64
Cj 62	-	-	-	-	-	-
Cj 63	-	-	-	-	-	-
Cj 64	A+ 8	A+ 32	A+ 8	A+ 32	A+ 8	A+ 32
Cj 65	A+ 4	A+ 32	A+ 4	A+32	A+ 8	A+ 64
Cj 66	A+ 8	A+ 64	A+ 8	A+ 64	A+ 8	A+ 64
Cj 67	-	-	-	-	-	-
Cj 68	A+ 2	A+ 16	A+4	A+ 32	A+4	A+ 32
Cj 69	-	-	-	-	-	-
Cj 70	A+ 8	A+ 32	A+ 8	A+ 32	A+ 8	A+32
Cj 71	A+ 4	A+ 32	A+ 4	A+32	A+ 4	A+ 32
Cj 72	A+ 2	A+ 16	A+2	A+ 16	A+4	A+ 32
Cj 73	-	-	-	-	-	-
Cj 74	A+8	A+ 32	A+ 8	A+ 32	A+ 4	A+ 32
Cj 75	A+8	A+ 32	A+ 16	A+ 64	A+ 4	A+ 32
Cj 76	AR+ 8	AR+ 32	AR+ 8	AR+ 32	AR+ 8	AR+ 64
Cj 77	A+4	A+ 16	A+ 4	A+ 16	A+ 4	A+ 32
Cj 78	-	-	-	-	-	-
Cj 79	A+ 4	A+ 16	A+4	A+ 32	A+ 8	A+32
Cj 80	A+ 4	A+ 32	A+ 4	A+16	A+ 4	A+ 32

TABELA 14 – Positividade de detecção da atividade hemolítica em diferentes hemácias nas amostras de *C. jejuni* de origem humana e animal

Amostras	Hemácia de Cavalo	Hemácia de Carneiro	Hemácia de Boi	Hemácia de Cobaia	Hemácia de Galinha
Cj01			+		
Cj02			+	+	+
Cj07				+	
Cj08			+	+	+
Cj10				+	
Cj13				+	
Cj15				+	
Cj17	+		+	+	+
Cj18				+	
Cj19			+	+	
Cj21				+	
Cj22			+		+
Cj23			+	+	+
Cj24				+	
Cj25			+		
Cj31	+		+	+	+
Cj32			+	+	
Cj38				+	
Cj39				+	+
Cj40			+	+	+
Cj41				+	
Cj44			+	+	+
Cj45	+		+	+	+
Cj49			+	+	+
Cj50			+	+	+
Cj51					+
Cj55			+		
Cj56			+		+

TABELA 15 – Positividade de detecção da atividade hemolítica em diferentes hemácias nas amostras de *C. jejuni* de origem ambiental e alimentar

Amostras	Hemácia de Cavallo	Hemácia de Carneiro	Hemácia de Boi	Hemácia de Cobaia	Hemácia de Galinha
Cj61					+
Cj62			+		
Cj63			+		
Cj66			+		
Cj67				+	
Cj69					+
Cj74				+	
Cj75		+		+	
Cj76			+		
Cj77			+	+	
Cj80				+	

Quadro 5 – Esquema de biotipificação proposto por Lior (1984).

	<i>C. jejuni</i>				<i>C. coli</i>		<i>C. lari</i>	
	I	II	III	IV	I	II	I	II
Hipurato	+	+	+	+	-	-	-	-
DNase	-	+	-	+	-	+	-	+
H ₂ S	-	-	+	+	-	-	+	+

TABELA 16 - Resultado da detecção do gene *cdtB* através da técnica da PCR nas amostras de *C. jejuni*

[illegible]

Nas Tabelas apresentadas abaixo estão demonstrados os resultado das provas bioquímicas para identificação da espécie *C.jejuni* e classificação em grupos denominados biotipos.

Tabela 17- Resultado da identificação bioquímica - Amostras de origem humana

Identificação	Hidrólise do Hipurato de Sódio	Presença de DNase	Identificação bioquímica
Cj01	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj02	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj03	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj04	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj05	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj06	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj07	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj08	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj09	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj10	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj11	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj12	+	+	<i>C.jejuni</i> biotipo II
Cj13	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj14	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj15	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj16	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj17	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj18	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj19	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj20	+	+	<i>C.jejuni</i> biotipo II
Cj21	+	+	<i>C.jejuni</i> biotipo II
Cj22	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj23	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj24	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj25	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I

Tabela 18 - Resultado da identificação bioquímica - Amostras de origem animal

Identificação	Hidrólise do Hipurato de Sódio	Presença de DNase	Identificação bioquímica
Cj26	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj27	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj28	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj29	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj30	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj31	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj32	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj33	+	+	<i>C.jejuni</i> biotipo II
Cj34	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj35	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj36	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo II
Cj37	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj38	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj39	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj40	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj41	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo II
Cj42	+	+	<i>C.jejuni</i> biotipo II
Cj43	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj44	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj45	+	+	<i>C.jejuni</i> biotipo II
Cj46	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj47	+	+	<i>C.jejuni</i> biotipo II
Cj48	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj49	+	+	<i>C.jejuni</i> biotipo II
Cj50	+	+	<i>C.jejuni</i> biotipo II
Cj51	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj52	+	+	<i>C.jejuni</i> biotipo II
Cj53	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj54	+	+	<i>C.jejuni</i> biotipo II
Cj55	+	+	<i>C.jejuni</i> biotipo II
Cj56	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I

Tabela 19 - Resultado da identificação bioquímica - Amostras de origem ambiental

Identificação	Hidrólise do Hipurato de Sódio	Presença de DNase	Identificação bioquímica
Cj57	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj58	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj59	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I

Tabela 20 - Resultado da identificação bioquímica - Amostras de origem alimentar

Identificação	Hidrólise do Hipurato de Sódio	Presença de DNase	Identificação bioquímica
Cj60	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj61	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj62	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj63	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj64	+	+	<i>C.jejuni</i> biotipo II
Cj65	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj66	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj67	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj68	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj69	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj70	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj71	+	+	<i>C.jejuni</i> biotipo II
Cj72	+	+	<i>C.jejuni</i> biotipo II
Cj73	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj74	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj75	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj76	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I
Cj78	+	+	<i>C.jejuni</i> biotipo II
Cj79	+	+	<i>C.jejuni</i> biotipo II
Cj80	+	-	<i>C.jejuni</i> biotipo I

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLOS, B. M., BLASER, M. J. *Campylobacter jejuni* and the expanding spectrum of related infections. **Clin. Infect. Dis.** 20: 1092-1101, 1995.
- ALLOS, B. M., TAYLOR, D. N. *Campylobacter* infections. In: A S Evans & P S Brachman. **Bacterial Infection of Humans: Epidemiology and Control**. Phenum Medical Book Company, 3rd edition, chapter 8, p. 169-190, 1998.
- ALTEKRUSE, S. F., HUNT, J. M., TOLLEFSON, L. K., MADDEN, J. M. Food and animal sources of human *Campylobacter jejuni* infection. **JAVMA**. 204(1): 57-61, 1994.
- BANG, D. D., SCHEUTZ, F., AHRENS, P., PEDERSEN, K., BLOM, J., MADSEN, M. Prevalence of cytolethal distending toxin (cdt) genes and CDT production in *Campylobacter* spp. isolated from Danish broilers. **J. Med. Microbiol.** 50: 1087-1094, 2001.
- BARATÉIA, R. C., SARIDAKIS, H. O., GAZIRI, L. C. J., PELAYO, J. S. Effects of medium composition, calcium, iron and oxygen on haemolysin production by *Plesiomonas shigelloides* isolated from water. **J. Applied Microbiol.** 90: 482-87, 2001.
- BERESWILL, S. & KIST, M. Recent developments in *Campylobacter* pathogenesis. **Current Op. Infect. Dis.** 16: 487-491, 2003.
- BHADKI, S., MACKMAN, N. NICAUD, J. M., HOLLAND, J. B. *Escherichia coli* hemolysin may damage target cell membranes by generating transmembrane pores. **Infect. Immun.** 52: 63-69, 1986.
- BLANCO, M., BLANCO, J. E., RODRÍGUEZ, E., ABALIA, I. ALONSO, M. P., BLANCO, J. Detection of virulence genes in uropathogenic *Escherichia coli* by polymerase chain reaction (PCR): comparison with results obtained using phenotypic methods. **J. Microbiol. Methods.** 31: 37-43, 1997
- BOEHM, D. F., WELCH, R. A., SNYDER, I. S. Calcium is required binding of *Escherichia coli* hemolysin (HlyA) to erythrocyte membranes. **Infect. Immun.** 58 (6): 1951-1958, 1990.

- BRYANT, J. L., STILLS, H. F., LENTSCH, R. H., MIDDLETON, C. C. *Campylobacter jejuni* isolated from patas monkeys with diarrhea. **Lab. Anim. Sci.** 33: 303-05, 1983.
- BUTZLER, J-P., DEKEYSER, P., DETRAIN, M. DEHAEN, F. Related vibrios in stools. **J. Pediat.** 32: 493-95, 1973.
- BUTZLER, J-P. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. **Clin. Microbiol. Infect** 10: 868-876, 2004.
- CANALS I ROSSEL, A. Campylobacteriosis en aves de corral [on-line], 2002. Ciências Veterinárias. Catalunya, Espanha. Disponível em : http://www.colvet.es/infovet.ene02/ciencias_v/articulo1.htm [acesso em 28/10/2005].
- CHART, H., JENKINS, C., SMITH, H. R., HEDGES, D., ROWE, B. Haemolysin production by strain of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. **Microbiology**, 144: 103-107, 1998.
- CARBONELL, G., V. & VIDOTTO, M. C. Virulence factors in *Serretia marcescens*: cell bound hemolysin and aerobactin. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 25:1-8, 1992.
- FERNANDEZ, H. & TRABULSI, L. R. Invasive and enterotoxic properties in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated from humans and animals. **Biol. Res.** 28: 205-210, 1995.
- EYIGOR, A., DAWSON, K. A., LANGLOIS, B. E., PICKETT, C. L. Cytolethal Distending Toxin Genes in *Campylobacter coli* isolates: detection and analisis by PCR. **J.Clin. Microbiol.** 37 (5):1646-1650, 1999.
- FLORIN, I. & ANTILLON, F. Production of enterotoxin and cytotoxin in *Campylobacter jejuni* strains isolated in Costa Rica. **J. Med. Microbiol.** 37: 22-29, 1992.
- FOX, J. G. In vivo models of enteric Campylobacteriosis: natural and experimental infections. In: I Nachamkin, M J Blaser, L S Tompkins. *Campylobacter jejuni: Current Status and Future Trends*. Washington: Americam Society for Microbiology. p.131-38, 1992.
- FROST, J. A. Current epidemiological issue in human campylobacteriosis. **J. Appli. Microbiol.** 90: 85S-95S, 2001.

- GILBERT, C. & SLAVIK, M. Determination of toxicity of *Campylobacter jejuni* isolated from humans and from poultry carcasses acquire at various stage of production. **J. Applied Microbiol.** 97: 347-353, 2004.
- GILLESPIE, I. A., O'BRIEN, S. J., FROST, J. A. ADAK, G. K. HORBY, P., SWAN, A. V. *et al.* A case-case comparison of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* infection: a tool for generating hypotheses. **Emerg. Infect. Dis.** 8(9): 937-42, 2002.
- GORDON, V. M. *et al.* Adenylate cyclase toxins from *Bacillus anthracis* and *Bordetella pertussis*. Different processes for interaction with and entry into target cells. **J. Biol. Chem.** 264:14792-96, 1989.
- HADDEN, R. D. M. & GREGSON, N. A. Guillain-Barré syndrome and *Campylobacter jejuni* infection. **J. Appli. Microbiol.** 90: 145S-154S, 2001.
- HOSSAIN, A. STEWART-TULL, D. E. S. & FREER, J. H. Heat-labile and heat-stable haemolysins of *Campylobacter jejuni*. **FEMS Immun. Med. Microbiol.** 6: 331-340, 1993.
- JONES, K. Campylobacters in water, sewage and the environment, **J. Appli. Microbiol.** 90: 68S-79S, 2001.
- KETLEY, J. M. Virulence of *Campylobacter* species: a molecular genetic approach. **J. Med. Microbiol.** 42 :312-327, 1995.
- KETLEY, J. M. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. **Microbiology.** 143: 5-21, 1997.
- LARA-TEJERO, M. & GALÁN, J. E. CdtA, CdtB, and CdtC from a tripartite complex that is required for cytolethal distending toxin activity. **Infect Immun.** 69(7): 4358-4365, 2001.
- LAURIA-FILGUEIRAS, A. L. **Circulação de espécies termofílicas de *Campylobacter* em primatas não humanos mantidos em cativeiro.** Rio de Janeiro, 2000. [Tese de Doutorado em Biologia Parasitária – Fundação Oswaldo Cruz]
- LEE, A., SMITH, S. C., COLOE, P. J. Detection of a novel *Campylobacter* cytotoxin. **J. Applied Microbiol.** 89: 719-725, 2000.

- LINTON, D. KARLYSHEV, A. V., WREN, B. W. Deciphering *Campylobacter jejuni* cell surface interactions from the genome sequence. **Curr. Opi. in Microbiol.** 4: 35-40, 2001.
- LIOR, H. A new extended biotyping scheme for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and “*Campylobacter laridis*”. **J. Clin. Microbiol.** 20: 636-640, 1984.
- MACKMAN, N. *et al.* Secretion of haemolysin of *Escherichia coli*. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** 125: 159-181, 1986.
- MISAWA, N., OHNISHI, T., ITOH, K., TAKAHASHI, E. Development of a tissue culture assay system for *Campylobacter jejuni* cytotoxin and the influence of culture conditions on cytotoxin production. **J. Med. Microbiol.** 41: 224-230, 1994.
- MISAWA, N., HIRAYAMA, K., ITOH, K., TAKAHASHI, E. Detection of alfa- and beta-hemolytic-like activity from *Campylobacter jejuni*. **J. Clin. Microbiol.** 33(3): 729-731, 1995.
- MISAWA, N., OHNISHI, T., ITOH, K., TAKAHASHI, E. Cytotoxin detection in *Campylobacter jejuni* strains of human and animal origin with three tissue culture assay systems. **J. Med. Microbiol.**, 43 :354-359, 1995.
- MOONEY, A., CLYNE, M., CURRAN, T., DOHERTY, D., KILMARTIN, B. BOURKE, B. *Campylobacter upsaliensis* exerts a cytolethal distending toxin effect on HeLa cells and T lymphocytes. **Microbi.** 147: 735-743, 2001.
- MOORE, J. E., CORCORAN, D., DOOLEY, J. S. G., FANNING, S., LUCEY, B., MATSUDA, M., MACDOWELL, D. A., MÉGRAUD, F., MILLAR, B. C., O'MAHONY, R., O'RIORDAN, L., O'ROURKE, M., RAO, J. R., ROONEY, P. J., SAILS, A., WHYTE, P. *Campylobacter*. **Vet. Res.** 36: 351-382, 2005.
- MORAN, A. P. & PENNER, J. L. Serotyping of *Campylobacter jejuni* based on heat stable antigens: relevance, molecular basis implications in pathogenesis. **J. Applied Microbiol.** 86: 361-77, 1999.

- MOURA, C. **Caracterização de amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerros com e sem diarreia: Pesquisa de fatores de colonização e toxinas.** Campinas, 2005 [Tese de Mestrado em Genética e Biologia Molecular - UNICAMP]
- NACHAMKIN, I. *Campylobacter* and *Arcobacter*. In P. Murray., E. J. Baron., C. F. Tenover., R. H. Tenover. **Manual of Clinical Microbiology**, 6th edition, p. 483-491, 1995.
- NEWELL, D. G. Animal models of *Campylobacter jejuni* colonization and disease and the lessons learned from similar *Helicobacter pylori* models. **J. Appl. Microbiol.** 90: 57S-67S, 2001.
- NICHOLSON, M. A. & PATTON, C. M. Evaluation of disk method for hippurate hydrolysis by *Campylobacter* species. **J. Clin. Microbiol.** 33(5): 1341-43, 1995.
- ON, S. L. W. Identification methods for *Campylobacters*, *Helicobacters*, and related organisms. **Clin. Microbiol. Rev.** 9(3): 405-422, 1996.
- ON, S. L. W. Taxonomy of *Campylobacters*, *Arcobacter*, *Helicobacters*, and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns. **J. Appl. Microbiol.** 90: 1S-15S, 2001.
- OVERELL, J. R. & WILLISON, H. J. Recent developments in Miler Fisher syndrome and related disorders. **Curr. Opin. Neurol.** 18: 562-566, 2005.
- PANCORBO, P. L., PABLO, M. A., ORTEGA, E., GALLEGOS, A. M., ALVAREZ, C., CIENFUEGOS, G.A. Evaluation of cytokine production and phagocytic activity in mice infected with *Campylobacter jejuni*. **Current Microbiol.** 39: 129-133, 1999.
- PATTINSON, M. Practical intervention strategies for *Campylobacter*. **J. Appl. Microbiol.** 90: 121S-125S, 2001.
- PICKETT, C. L., PESCI, E. C., COTTLE, D. L., RUSSEL, G., ERDEM, A. N., ZEYDIN, H. Prevalence of cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter* sp. *cdtB* genes. **Infect. Immun.**, 64 (6): 2070-2078, 1996.

- PICKET. C. L. Campylobacter toxins and their role in pathogenesis. In: Nachamkin, I. & Blaser, M. J. Campylobacter. 2nd. Washington, D. C.: ASM Press p.3-26, 2000.
- PURDY, D., BUSWELL, C. M., HODGSON, A. E., MCALPINE, K., HENDERSON, I., LEACH. S. A. Characterization of cytolethal distending toxin (CDT) mutants of *Campylobacter jejuni*. **J. Med. Microbiol.** 49: 473-479, 2000.
- RICCIARDI, I. D., FERREIRA, M. C. S., OTTO, S. S., OLIVEIRA, N., SABRA, A., FONTES, C. F. Thermophilic *Campylobacter* associated diarrhoea in Rio de Janeiro. **Rev. Bras. de Pés. Méd. e Biol.** 12: 189-191, 1979.
- ROHNER, P., PITTET, D., PEPEY, B., NIJE-KINGE, T., AUCKENTHALER, R. Etiological agents of infectious diarrhea: implications for request for microbial culture. **J. Clin. Microbiol.** 35(6): 1427-1432, 1997.
- ROWE, G. E. & WELCH, R. A. Assays of hemolytic toxins. **Meth. Enzymol.** 235: 657-667, 1994.
- RUSSEL, R. G., KRUGNER, L., TSAI C-C, EKSTROM, R. Prevalence of *Campylobacter* in infant, juvenile and adult laboratory primates. **Lab. Anim. Sci.** 38(6): 711-14, 1988.
- RUSSEL, R. G., SARMIENTO, J. I., FOX, J., PANIGRAHI, P. Evidence of reinfection with multiple strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in *Macaca nemestrina* housed under hyperendemic conditions. **Infect. Immun.** 58(7): 2149-55, 1990.
- RYCKE, J. D., OSWALD, E. Cytolethal distending toxin (CDT): a bacterial weapon to control host cell proliferation? **FEMS Microbiol. Letters.** 203: 141-148, 2001.
- SCHMITT, C. K., MEYSICK, K. C., O'BRIEN, A. D. Bacterial toxins: Friends or Foes. **Emerg. Infect. Dis.** 5(2); 224-234, 1999.
- SCHULZE, F., HANEL, I., BORRMANN, E. Formation of cytotoxins by enteric *Campylobacter* in humans and animals. **Zent. Bakteriell.** 288: 225-236, 1998.
- SKIRROW, M. B. *Campylobacter* enteritis: a new disease. **Br. Med. J.** 2: 9-11, 1977.

- SKIRROW, M. B. Diseases due to *Campylobacter*, *Helicobacter* and related bacteria. **J. Comp. Path.** 111: 113-149, 1994.
- SNELLING, W. J., MATSUDA, M., MOORE, J.E., DOOLEY, J. S. G. Under the Microscope – *Campylobacter jejuni*. **Lett. Appl. Microbiol.** 41: 297-302, 2005.
- STOEBNER, J. A., PAYNE, S. M. Iron-regulated hemolysin production and utilization of Heme and Hemoglobin by *Vibrio cholerae*. **Infect.Immun.** 56 (11): 2891-95, 1988.
- TAY, S. T., DEVI, S., PUTHUCHEARY, S., KAUTNER, I. In vitro demonstration of the invasive ability of *Campylobacters*. **Zbl. Bakt.** 283: 306-313, 1996.
- THORNLEY, J. P., JENKINS, D., NEAL, K., WRIGHT, T., BROUGH, J., SPILLER, R. C. Relationship of *Campylobacter* toxigenicity *In Vitro* to the development of postinfectious irritable bowel syndrome. **J. Infectious Dis.** 184: 606-611, 2001.
- TRESIERRA-AYALA, A., FERNANDEZ, H., ZAMORA, J. Enterotoxigenic capacity of *Campylobacter coli* strains isolated from humans and bovines. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 91(5): 619-620, 1996.
- VAN VLIET, A. H. M. & KETLEY, J. M. Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. **J. Appl. Microbiol.** 90: 45S-56S, 2001.
- VANDAMME, P. & DE LEY, J. Proposal of a new family, *Campylobacteraceae*. **Inter. J. Syst. Bacteriol.** 41: 451-55, 1991.
- VANDAMME, P. Taxonomy of the family Campylobacteriaceae.. In: I Nachamkin & M. J Blaser. *Campylobacter*. Washington, D.C.:ASM Press, 2nd edition; p. 3-26 2000.
- VUGIA, D., CHAVES, S., BLYTHE, D., SMITH, H., MORSE, D., JONES, T., CRONQUIST, A., GOLDMAN, D., GUZEWICH, T., ANGULO, F., GRIFFIN, P., TAUXE, R. Preliminary FoodNet data on the incidence of foodborne illnesses -Selected sites, United States, 2002. **M M W R** 52(15): 340-343, 2003.

VUGIA, D., CRONQUIST, A., HADLER, J., TOBIN-D'ANGELO, M., BLYTHE, D., SMITH, K., THORNTON, K., MORSE, D., CIESLAK, P., JONES, T. VARGHESE, R., GUZEWICH, J., ANGULO, F., TAUXE, R. DUNN, J. Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food - 10 Sites, United States, 2004. **M M.W R** 54(14): 352-356, 2005

WASSENAAR, T. M. Toxin production by *Campylobacter* spp. **Clin. Microbiol. Rev.** 10 (3): 466-476, 1997.

WASSENAAR, T. M., ENGELSKIRCHEN, M., PARK, S., LASTOVICA, A. Differential uptake killing potential of *Campylobacter jejuni* by human peripheral monocytes/macrophages. **Med. Microbiol. Immunol.** 186: 139-144, 1997.

WASSENAAR, T. M. & NEWELL, D. G. Genotyping of *Campylobacter* spp. **Appli. Environ. Microbiol.** 66(1): 1-9, 2000.

WOOLDRIDGE, K. G. & KETLEY, J. M. *Campylobacter*-host cell interactions. **Trends in Microbiol.** 5(3): 96-102, 1997