



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

HERLICE DO NASCIMENTO VERAS

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR E DETECÇÃO DE GENES DE
VIRULÊNCIA DE *Campylobacter jejuni* EM CRIANÇAS COM
DIARREIA MODERADA A SEVERA NA CIDADE DE FORTALEZA –
CE, BRASIL.**

FORTALEZA

2016

HERLICE DO NASCIMENTO VERAS

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR E DETECÇÃO DE GENES DE
VIRULÊNCIA DE *Campylobacter jejuni* EM CRIANÇAS COM
DIARREIA MODERADA A SEVERA NA CIDADE DE FORTALEZA –
CE, BRASIL.**

Dissertação submetida à
Coordenação do Programa de
Pós-Graduação em
Microbiologia Médica da
Universidade Federal do Ceará
como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre em
Microbiologia Médica.

Orientador: Prof. Dr. Aldo Ângelo
Moreira Lima.

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará

Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

V584d Veras, Herlice do Nascimento.

Diagnóstico molecular e detecção de genes de virulência de *Campylobacter jejuni* em crianças com diarreia moderada a severa na cidade de Fortaleza - CE, Brasil / Herlice do Nascimento Veras. – 2016.

129 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2016.

Orientação: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima.

1. *Campylobacter jejuni*. 2. virulência. 3. diarreia. I. Título.

CDD 616.9

HERLICE DO NASCIMENTO VERAS

Diagnóstico molecular e detecção de genes de virulência de *Campylobacter jejuni* em crianças com diarreia moderada a severa na cidade de Fortaleza – CE, Brasil.

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Médica.

Orientador: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima.

Aprovado em: 22/07/2016

Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima
Universidade Federal do Ceará
(Orientador)

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Anastácio Queiroz Sousa
Universidade Federal do Ceará

Dr^a Josiane da Silva Quetz
Pós Doutoranda pela MedImmuneHeadquarters (EUA)

Aos meus pais, Heliomar e Francisca.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todo o amor, toda glória, todas as bênçãos e toda a força e coragem que tem me dado, me ajudando a superar a saudade de casa, a superar os obstáculos que apareceram durante esse caminho, e continuar prosseguindo em busca de meus objetivos.

Agradeço imensamente aos meus pais, Heliomar e Francisca, os pilares da minha vida, e maior fonte de amor e inspiração, por terem apoiado todas as minhas decisões, por terem aberto seus braços e me deixado partir em busca de um sonho. Agradeço por todo carinho, todas as palavras de motivação, todas as orações, enfim, agradeço pela vida maravilhosa que meus pais sempre se esforçaram para proporcionar a mim e ao meu irmão.

Agradeço ao meu irmão, Francisco Lucas, por sempre me apoiar, pelas ajudas (inclusive com adaptação das imagens dessa dissertação), pelos favores, pelo companheirismo. Obrigada por sempre estar ao meu lado.

Agradeço a toda minha família, que de alguma forma sempre me ajudaram em algum momento dessa jornada.

Agradeço ao meu orientador, o Prof. Dr. Aldo Lima, por ter me dado essa oportunidade, por ter passado tantos ensinamentos, por ter me dado à chance de alcançar esse objetivo.

Agradeço às minhas amigas piauienses, Samara Rodrigues, Ana Karolina Santos e Marielle Quaresma, que também saíram do Piauí em busca desses mesmos desejos, e que me ajudaram a superar a saudade de casa, e todas as dificuldades que foram aparecendo, com muita amizade, muito companheirismo, muitas risadas, e muitas histórias para contar.

Agradeço a Sabryna Oliveira por todo apoio inicial na minha vinda a Fortaleza, e por todos os momentos de alegria e descontração vividos nesse período.

Agradeço aos meus amigos de laboratório, Paloma Araujo, Samilly Ribeiro, Mara Prata, Ana Karolina Santos, Pedro Henrique Quintela, Adelvane Rodrigues, Rafaela Pankov, Mariana Bona, Tamara Rodrigues, Thiago de

Freitas, Claudiane Bessa, Márcio Guanabara, Jeanine Pereira, Alejandra Velasco, Marília Maia e Vinícius Alves, que viraram amigos de vida, que sempre me ajudaram no que eu precisasse, que me passaram muitos conhecimentos, ajudando na minha maturação científica, que me ajudaram a fazer de Fortaleza minha segunda casa, e que fizeram que o LDI se tornasse a minha família cearense.

Agradeço ao *TeamCampy*, Tamara Rodrigues e Thiago de Freitas, pela ajuda nos experimentos dessa dissertação, por terem me ajudado a ser mais organizada, pela paciência, e pela amizade.

Agradeço ao professor Dr. Alexandre Havt pelos ensinamentos, por ter me ajudado na integração ao laboratório, sempre me mantendo ativa nas atividades.

Agradeço à Dra. Josiane Quetz, por ter me ajudado na elaboração do projeto, e entrada no mestrado, por ter me ajudado a continuar mantendo os estudos sobre *Campylobacter* spp.

Agradeço às Dras. Ila Lima e Marjorie Guedes pela ajuda no começo das minhas atividades no laboratório, e pelos conhecimentos e conselhos fornecidos.

Agradeço ao José Amadeus, Luciana França, Charliene Melo e Conceição de Maria, por todo apoio, por sempre estarem disponíveis a ajudar nas atividades do laboratório, até nas fora dele, e pela amizade.

Agradeço à coordenação e secretaria da Pós-Graduação da Microbiologia Médica, Dra Sâmia Brilhante, e a Carolinda Soares, pela eficiência, paciência, e por sempre estarem disponíveis no esclarecimento de qualquer dúvida ou questionamento.

Agradeço a toda equipe do INCT, UPC-IBIMED.

Agradeço à pessoa que fez eu me apaixonar pela microbiologia, Dra Anna Carolina Toledo, da Universidade Federal do Piauí, que foi a minha primeira orientadora, me dando a oportunidade de entrar no mundo da ciência, através da iniciação científica, e por ter me estimulado a continuar prosseguindo nesse mundo.

Agradeço à FUNCAP, pelo incentivo financeiro.

Agradeço à todos os pais e responsáveis pelas crianças desse estudo, por terem colaborado para a realização do mesmo, permitindo a doação de amostra clínica, e respondendo aos questionários, contribuindo no avanço dessa pesquisa científica.

Enfim, agradeço a todos que me ajudaram diretamente, ou indiretamente, a continuar prosseguindo nessa jornada da pós-graduação.

A todos vocês, MUITO OBRIGADA!

Don't Stop Believin'
Hold on to that feelin'
(Journey)

RESUMO

Infecções por *Campylobacter* spp. são consideradas uma das causas mais comuns de gastroenterite ocasionada por contaminação de água e alimentos. *Campylobacter jejuni* é a espécie mais bem caracterizada, e a investigação da epidemiologia, e dos genes de virulência, podem elucidar algum aspecto da patogenicidade deste micro-organismo. O objetivo desse estudo foi diagnosticar e identificar a presença de genes de virulência relacionados à *Campylobacter jejuni* em crianças com diarreia moderada a severa na cidade de Fortaleza – CE, Brasil. Este estudo faz parte de um projeto intitulado “Diarrhea Enteric Card (DEC)”, que teve como objetivo desenvolver um ensaio de PCR multiplex para o diagnóstico de bactérias patogênicas. O projeto teve aprovação nos comitês de ética local e nacional no Brasil (HIAS 80/06 e CONEPE 13523/2007, respectivamente). A extração de DNA foi realizada diretamente das amostras fecais oriundas de 436 crianças com diarreia moderada a severa, durante os meses de maio de 2008 a abril de 2009, na cidade de Fortaleza, Ceará, Brasil. O diagnóstico de *C. jejuni* foi realizado através de PCR convencional, utilizando o gene *hipO*. A detecção dos genes de virulência de *C. jejuni* foi realizada através das técnicas de PCR uniplex e multiplex. *C. jejuni* foi diagnóstico em 14% (61/436) das amostras, apresentando associação significativa da presença do patógeno em crianças com idade entre 0-12 meses ($P=0,0001$) e com idade entre 12,1-24 meses ($P=0,0427$). A detecção dos genes de virulência foi realizada em 51 amostras positivas para a *C. jejuni*. A prevalência dos genes associados à virulência de *C. jejuni* foram detectados seguindo a proporção de amostras positivas: *flgE*, (92,2%, 47/51) *eflaA*, (76,5%, 39/51), relacionados à motilidade; *cheW* (90,2%, 46/51); *cheA*, (82,4%, 42/51) *echeR*, (66,6%, 34/51), relacionados à quimiotaxia bacteriana; *cadF*, (100%, 51/51) *ejlpA*, (43,1%, 22/51), relacionados à adesão; *ciaB*, (96,1%, 49/51); *iamA*, (90,2%, 46/51); *pldA*, (45,1, 23/51) *epVir* (0%, 0/51), relacionados a invasão; *cdtABC*, (94,1%, 48/51), relacionados à toxina citolética distensora (CDT); *fur*, (66,6%, 34/51); *cfrA*, (31,4%, 16/51) *eceuE*, (21,7%, 11/51), relacionados ao transporte e regulação de ferro; *racR*, (100%, 51/51), *sodB*, (96,1%, 49/51), *dnaJ*, (88,2%, 45/51) *ekatA*, (66,6%, 34/51), relacionado à sobrevivência da bactéria e ao estresse oxidativo. A distribuição dos perfis de genes de virulência de *C. jejuni* não correspondeu com o parâmetro clínico de dor abdominal, mas houve a associação dos genes *cfrA* e *dnaJ* com a presença de febre ($P=0,0214$), dos genes *jlpA* e *katA* com a presença de vômito ($P=0,0211$), e dos genes *pldA* e *ceuE* com a presença de sangue nas fezes ($P=0,0013$), sugerindo que essas relações poderiam estar associadas a severidade da infecção causada pelo micro-organismo. Novos estudos sobre a expressão de proteínas relacionadas aos genes de virulência devem ser realizados, para que assim haja uma melhor compreensão sobre os mecanismos da patobiologia das infecções causadas por *C. jejuni*.

Palavras-chaves: *Campylobacter jejuni*, virulência, diarreia.

ABSTRACT

Campylobacter spp. infections are considered one of the most common causes of bacterial gastroenteritis caused by contamination of water and food. *Campylobacter jejuni* is the most characterized specie, and the investigation of the epidemiology and virulence genes can elucidate some aspects of the microorganism pathogenicity. The aim of this study was to diagnose and identify the presence of virulence genes related to *Campylobacter jejuni* in children with moderate to severe diarrhea in the city of Fortaleza – CE, Brazil. This work is part of a project entitled “Diarrhea Enteric Card (DEC)”, which goal is to develop PCR-based multiplex diagnostic assays for bacterial enteric pathogens. That project was approved by the local and national ethical committees in Brazil (HIAS 80/06 and CONEPE 13523/2007, respectively). DNA was extracted directly from fecal samples isolated from 436 children with moderate to severe diarrhea from May 2008 to April 2009, in Fortaleza, Ceará, Brazil. The diagnosis of *C. jejuni* was performed by conventional PCR using *hipO* gene. The detection of genes that encode proteins associated with virulence of *C. jejuni* was performed by uniplex and multiplex PCR techniques. *C. jejuni* was diagnosed in 14% (61/436) of the samples, presenting significant association among children aged 0-12 months ($P = 0.0001$) and children aged 12, 1-24 months. 51 positive samples for *C. jejuni* were used for the detection of the virulence genes. The prevalence of the *C. jejuni*'s virulence-associated genes were detected in the following proportions of *C. jejuni*-positive DNA samples: *flgE*, (92.2%, 47/51) and *flaA*, (76.5%, 39/51), related to motility; *cheW*, (90.2%, 46/51); (*cheA*, 82.4%, 42/51) and *cheR*, (66.6%, 34/51), related to bacterial chemotaxis; *cadF*, (100%, 51/51) and *jlpA*, (43.1%, 22/51), related to bacterial adhesion; *ciaB*, (96.1%, 49/51); *iamA*, (90.2%, 46/51); *pIdA*, (45.1%, 23/51) and *pVir*(0%, 0/51), related to invasion; *cdtABC*, (94.1%, 48/51), related to cytolethal distending toxin (CDT); *fur*, (66.6%, 34/51); *cfrA*, (31.4%, 16/51) and *ceuE*, (21.7%, 11/51), related to bacterial iron transport and regulation; *racR*, (100%, 51/51); *sodB*, (96.1%, 49/51); *dnaJ*, (88.2%, 45/51) and *katA*, (66.6%, 34/51), related to oxidative stress. The distribution profiles of *C. jejuni*'s virulence did not correspond to the patient's clinical presentation of abdominal pain. But the presence of *cfrA* and *dnaJ* genes was correlated with fever ($P=0,0214$) and the presence of *jlpA* e *katA* gene were correlated with vomiting ($P=0,0211$) and *pIdA* and *ceuE* genes was correlated with the presence of blood in stool ($P=0,0013$), this data suggests that relationships might be related to the severity of infection by this microorganism. New studies about the expression of proteins associated with the virulence genes must be carried out to better understand the pathobiology mechanisms of *Campylobacter jejuni* infections.

Keywords: *Campylobacter jejuni*, virulence, diarrhea.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1:** *Campylobacter jejuni* visualizada através de Microscopia de Transmissão_____24
- FIGURA 2:** Fontes de transmissão de *C. jejuni* para os seres humanos_____26
- FIGURA 3:** Principais componentes flagelares de *C. jejuni*, com as proteínas associadas_____31
- FIGURA 4:** Diferentes mecanismos de invasão de *C. jejuni* nas células do hospedeiro_____36
- FIGURA 5:** Ação da Toxina Citoletal Distensora (CDT), produzida por *C. jejuni*, na célula do hospedeiro_____39
- FIGURA 6:** Gel de agarose com a amplificação do gene *hipO* (176pb)_____64
- FIGURA 7:** Produto da amplificação das amostras sequenciadas como controle de qualidade para dos genes *cadF*, *jlpA*, *iamA*, *ceuE*, *sodF*, *cfrA*, *fur*, *cheA*, *cheR*, *cheW*, *flgE* e *katA*_____69
- FIGURA 8:** Representação da amplificação dos genes de virulência de *C. jejuni* referentes aos painéis de Multiplex 1, 2 e 3_____70
- FIGURA 9:** Representação da amplificação dos genes de virulência de *C. jejuni* referentes aos painéis de Multiplex 4, 5 e 6_____71
- FIGURA 10:** Representação da amplificação dos genes de virulência de *C. jejuni* referentes às reações de PCR uniplex dos genes *cadF*, *iamA* e *pVir*_____72
- FIGURA 11:**Árvore de classificação e regressão dos genes de virulência de acordo com o parâmetro clínico dor abdominal intensa_____75
- FIGURA 12:**Árvore de classificação e regressão dos genes de virulência de acordo com o parâmetro clínico febre_____76
- FIGURA 13:**Árvore de classificação e regressão dos genes de virulência de acordo com o parâmetro clínico vômito_____77

FIGURA 14:Árvore de classificação e regressão dos genes de virulência de acordo com o parâmetro sangue nas fezes _____77

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1: Número de casos de diagnóstico positivo para *C. jejuni* e precipitação de chuvas (mm) durante período de maio de 2008 a abril de 2009 _____66

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1:** Principais espécies de *Campylobacter* com as manifestações clínicas associadas a infecções em humanos _____45
- TABELA 2:** Genes de virulência para *Campylobacter jejuni*. _____58
- TABELA 3:** Iniciadores utilizados nos protocolos do PCR para o diagnóstico e detecção de genes de virulência para *C. jejuni* com as condições de ciclagem para as reações de PCR uniplex e multiplex. _____59
- TABELA 4:** Caracterização da população positiva para *C. jejuni* de acordo com o gênero e idade. _____65
- TABELA 5:** Fatores determinantes para doenças diarreicas população positivos para *C. jejuni*. _____67
- TABELA 6:** Sintomatologia clínica relatada pelos responsáveis pelas crianças com amostra positiva para *C. jejuni*. _____68
- TABELA 7:** Prevalência dos genes de virulência de *C. jejuni* _____73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A260/280: Razão da leitura espectrofotométrica entre as absorbâncias obtidas a 260nm e 280nm.

AS: Antisense (iniciador de PCR sentido antisense)

ATCC: Coleção de micro-organismos Norte Americano (*American Type Collection Culture*)

BLAST: Ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local (*Basic Local Alignment Search Tool*)

CAC: Centro de Atendimento à Criança

cadF: Proteína de adesão a fibronectina (*Campylobacter adhesion to fibronectin*)

CDC: Centro Norte-americano de Controle de Doenças (*Center for Disease Control and Prevention*) (EUA)

CDT: Toxina citoletal distensora (*Cytolethal distending toxin*)

cdtABC: gene das porções A, B e C da toxina citoletal distensora de *C. jejuni*, relacionados à produção de toxinas.

CE: Ceará

ceuE: gene da enteroquelina (*Probable enterochelin uptake periplasmic-binding protein*)

cfrA: Receptor férrico de *Campylobacter* (*Campylobacter ferric receptor*)

cheA: Proteína quimiotática A (*chemotaxis protein A*)

cheR: Proteína quimiotática R (*chemotaxis protein R*)

cheW: Proteína quimiotática W (*chemotaxis protein W*)

Cia: Antígenos invasivos de *Campylobacter* (*Campylobacter invasive antigens*)

ciaB: Gene do antígeno de invasão B de *C. jejuni* (*invasion antigen B*)

Cj-CDT: Toxina citoletal distensora de *C. jejuni*

COMEPE: Comitê de Ética em Pesquisa da UFC

CONEP: Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

CPS: Cápsula polissacarídica

CVA: *Campy blood ágar*

DEC: *Diarrhea Enteric Card*

DNA: Ácido desoxirribonucleico

***dnaJ*:** Gene da proteína chaperona DnaJ de *C. jejuni* (*chaperone protein gene*)

EFSA: Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (*European Food Safety Authority*)

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EPEC: *Escherichia coli* enteropatogênica

ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigênica

EUA: Estados Unidos da América (*United States of America, USA*)

Fe: Ferro

FeEnt: Enteroquelina férrica

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz

***flaA*:** Gene da flagelina de *C. jejuni* (*flagellin A*)

***flgE*:** Gancho da proteína flagelar (*flagelar hook protein*)

Fn: Fibronectina

***fur*:** Regulador da absorção de ferro (*ferric uptake regular*)

G2: fase do ciclo celular

GEMS: Estudo Multicêntrico Entérico Global (*Global Enteric Multicenter Study*)

GroESL: *Anaplasma phagocytophilum Protein*

HeLa: Linhagem celular

Hep-2: Linhagem celular

HIAS: Hospital infantil Albert Sabin

hipO: Gene da hipurato hidrolase de *C. jejuni* (*hippurate hydrolase*)

HSP90: Proteína de choque térmico 90

iamA: Marcador associado a invasão (*invasion-associated marker*)

IBD: Doença do intestino inflamado

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IBISAB: Instituto de Biomedicina do Semiárido Brasileiro

IC: Índice de confiança

INT-407: Linhagem celular de enterócitos

IPECE: Instituto de Pesquisa e Estratégias Econômicas do Ceará

jlpA: Lipoproteína A (*jejuni lipoprotein A*)

katA: catalase A (*catalase*)

Lon: protease dependente de ATP (*ATP-dependent protease La*)

LOS: Lipo-oligossacarídeo

MAL-ED: *The Etiology, Risk Factors, and Interactions of Enteric Infections and Malnutrition and the Consequences for Child Health*

MS: Ministério da Saúde (Brasil)

NCBI: *National Center for Biotechnology Information* (EUA)

NCTC: *National Collection of Type Cultures*

OMS: Organização Mundial de Saúde (World Health Organization, WHO)

p19: hipotética proteína (*hypothetical protein*)

PBS: Tampão de solução fosfatase (*Phosphate Buffered Solution*)

PCR: Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

***pldA*:** Gene para fosfolipase A de *C. jejuni* (*phospholipase A*)

PQM: Proteína Quimiotática Aceptoras de Metil

PSF: Programa Saúde da Família

***pVir*:** Gene plasmidial da proteína de secreção tipo IV de *C. jejuni* (*plasmidial secretion protein type IV*)

qPCR: Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

***racR*:** proteína reguladora de resposta (*response regulation protein*)

RNA: Ácido ribonucleico

S: Senso (iniciador de PCR sentido senso)

SGB: Síndrome de Guillain-Barré

***sodB*:** proteína superóxido-dismutase (*superoxide dismutase*)

SPSS: *Statistical Package for Social Sciences*

SSGD: Setor de Segurança e Gerenciamento de Dados

SUS: Sistema Único de Saúde

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TSS3: Sistema de secreção do tipo III

TSS4: Sistema de secreção do tipo IV

UFC: Universidade Federal do Ceará

WAZ: Escore-Z Peso-por-idade (*Weight-for-age Z-score*)

WHZ: Escore-Z Peso-por-altura (*Weight-for-height Z-score*)

LISTA DE SÍMBOLOS

µg: Microgramas

µM: Micromolar

Da: Dalton

g: Grama

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

kDa: Kilodalton

M: Molar

Mb: Megabases

mg: Miligramas

mL: Mililitros

mm: Milímetros

nm: Nanômetros

O₂: Oxigênio

°C : Graus Celsius

P: Nível descritivo, probabilidade de se obter uma estatística de teste igual ou mais extrema que aquela observada em uma amostra.

pb: Pares de bases

R\$: Real, moeda brasileira

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. REFERENCIAL TEÓRICO	22
2.1 – Doenças diarreicas	22
2.2 – <i>Campylobacter</i> spp.	24
2.3 – Epidemiologia das campilobacterioses	27
2.4 – Patobiologia das infecções por <i>Campylobacter</i> spp.	29
2.4.1 – Motilidade e Quimiotaxia	29
2.4.2 – Adesão	33
2.4.3 – Invasão	34
2.4.4 – Efeitos citotóxicos	37
2.4.5 – Lipo-oligossacarídeos e cápsula polissacarídica	39
2.4.6 – Sistema de captação de ferro	40
2.4.7 – Resposta ao estresse e sobrevivência bacteriana	41
2.5 – Manifestações clínicas das infecções por <i>Campylobacter</i> spp.	42
2.6 – Diagnóstico laboratorial das espécies de <i>Campylobacter</i>	46
2.7 – Tratamento das campilobacterioses	48
2.8 – Controle e prevenção das campilobacterioses	49
2.9 – Prognóstico das campilobacterioses	51
3. OBJETIVOS	53
3.1 – Objetivo geral	53
3.2 – Objetivos primários	53
3.3 – Objetivos secundários	53
4. MATERIAL E MÉTODOS	54
4.1 – Ética do estudo	54
4.2 – Período do estudo e população participante	56
4.3 – Obtenção e acondicionamento dos dados epidemiológicos	55
4.4 – Coleta das amostras	55
4.5 – Diagnóstico molecular	56
4.6 – Sequenciamento das amostras controles	62
4.7 – Análise da sazonalidade	62
4.8 – Acondicionamento e análise estatística dos dados	63
5. RESULTADOS	64

5.1 – Caracterização da população de estudo	64
5.2 – Sazonalidade de infecções por <i>C. jejuni</i> na população de estudo	65
5.3 – Caracterização dos fatores determinantes para doenças diarreicas	66
5.4 – Dados clínicos da população	67
5.5 – Produto dos genes amplificados nas amostras sequenciadas	69
5.6 – Detecção molecular dos genes de virulência de <i>C. jejuni</i>	69
5.7 – Análise dos genes de virulência pelo programa CART®	74
6. DISCUSSÃO	78
7. CONCLUSÃO	93
REFERÊNCIAS	94
ANEXOS	118
ANEXO A – CONEP 13.523/2007	118
ANEXO B – CEP (HIAS)	119
ANEXO C–TCLE	120
ANEXO D – CEP (CAC)	123
ANEXO E - Checklist de elegibilidade	124
ANEXO F – Questionário (Dados Clínicos)	125
ANEXO G – Artigo publicado	127

1 INTRODUÇÃO

*Campylobacter*sp. é um dos mais importantes patógenos causadores de gastroenterites em seres humanos no mundo. Apesar de ter sido presumidamente descrito pela primeira vez por Theodor Escherich, em 1886, o patógeno só foi reconhecido como um importante causador de doenças gastrointestinais nos últimos 30 anos (HONG et al., 2014; WHO, 2012).

A maioria das infecções em seres humanos é causada por *Campylobacter jejuni*, seguido de *C. coli* e *C. lari*, mas existem cerca de 15 espécies relacionadas com infecções em humanos (MAN, 2011). As principais vias de transmissão da bactéria são através do consumo de água potável contaminada, leite não pasteurizado e alimentos mal processados, principalmente frango de corte (BRONOWSKI et al., 2014; GILLESPIE et al., 2002).

Na última década houve um aumento global da incidência de campilobacterioses. O aumento no número de casos foi identificado na América do Norte, Europa e Austrália. No entanto, os dados epidemiológicos de regiões como África, Ásia, América do Sul e Oriente Médio são insuficientes. Além disso, existem diferenças de prevalência em um mesmo país (KAAKOUSH et al., 2015).

Os mecanismos de patogenicidade do micro-organismo são complexos e ainda pouco compreendidos, mas alguns mecanismos começam a ser elucidados. Primeiramente, a motilidade do patógeno permite a passagem do micro-organismo pelo ambiente estomacal; seguido da invasão de células intestinais, que promove danos na mucosa epitelial do jejuno, íleo e cólon. Como consequência da liberação de citotoxinas, estas, por sua vez, podem causar bloqueio do ciclo celular, levando à morte celular, que pode ser ocasionada em casos de diarreia (GUERRY, 2007; SZYMANSKI e AYNOR, 2012; WASSENAAR e BLASER, 1999).

A análise genômica de *C. jejuni* mostrou que a bactéria possui um genoma relativamente pequeno (~1,6 Mb) e não apresenta fatores de virulência clássicos, como o sistema de secreção tipo 3 (TSS3), um sistema importante na patogênese de bactérias intestinais (PEARSON et al., 2007). Mas já se sabe que *Campylobacter*sp. apresenta vários genes que podem acionar os mecanismos

patogênicos como motilidade, adesão, invasão celular, translocação e produção de citotoxinas (SZYMANSKI e AYNOR, 2012; YOUNG et al., 2007).

Espécies de *Campylobacter*, especialmente *C. jejuni*, colonizam o trato gastrointestinal inferior dos seres humanos e podem se manifestar gerando gastroenterite leve e autolimitada, caracterizada por diarreia aguda, com a presença, ou não, de sangue nas fezes, febre e dores abdominais. Porém, em um pequeno número de pacientes pode causar complicações graves como a síndrome de Guillain-Barré (JANSSEN et al., 2008; MAN et al., 2011).

Algumas espécies de *Campylobacter* são frequentemente isoladas a partir de fezes semanas após o surgimento dos primeiros sintomas (MOORE et al., 2005). No entanto, o diagnóstico deste micro-organismo ainda é um desafio, pois *Campylobacter* sp. é difícil de ser isolado e necessita de condições especiais para o seu crescimento. As técnicas moleculares são uma boa alternativa para a confirmação de casos de campilobacterioses, ainda podendo identificar diferentes espécies do micro-organismo (BESSEDE et al., 2008; PLATTS-MILL et al., 2014).

Pessoas imunocomprometidas, ou com uma doença já pré-existente, são as mais susceptíveis à infecções pela bactéria. Ademais, crianças abaixo de 5 anos de idade são um dos grupos com maior taxa de risco para infecções, principalmente nos países em desenvolvimento (FERNANDEZ et al., 2008; GALLO et al., 2016).

Considerando as consequências das infecções geradas por *Campylobacter* sp., faz-se necessário uma melhor compreensão sobre sua patogenicidade. O estudo da patobiologia deste micro-organismo em crianças com doença diarreica permitiria a investigação de associações entre a patogênese causada por espécies de *Campylobacter*, principalmente *Campylobacter jejuni*, com a progressão da doença.

Portanto, esse estudo visa investigar a prevalência de *Campylobacter jejuni* em crianças com diarreia moderada a severa, na cidade de Fortaleza- CE, utilizando diagnóstico molecular, além de identificar a presença de genes codificadores de proteínas que são relacionadas à patogênese do micro-organismo, associando aos sinais e sintomas apresentados pelas crianças.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Doenças diarreicas

Doença diarreica é um importante problema de saúde pública no mundo, e podem ser classificadas em: Diarreia aguda, que é caracterizada quando há uma frequência de 3 ou mais evacuações por dia, ou superior a 200g de fezes, com duração menor que 7 dias; diarreia prolongada, com duração entre 7 a 13 dias; diarreia persistente, no qual os sintomas duram mais de 14 dias; e diarreia crônica, com sintomas acima de 30 dias. Essa sintomatologia pode ser acompanhada por náuseas, vômitos, febre e dores abdominais (GUERRANT, et al., 2001; 2004; KOSEK et al., 2003; MOORE et al., 2010).

O problema se torna mais grave em países em desenvolvimento, onde se estima a ocorrência anual de 2,5 milhões de morte em crianças menores de cinco anos. Alguns fatores que contribuem para a mortalidade nesses locais são o saneamento básico precário, desnutrição infantil, e a ausência de higiene básica (BHUTTA et al., 2014; KOSEK et al., 2003).

Algumas medidas simples, como a terapia de reidratação oral, reduziu a mortalidade pela metade nos últimos 30 anos, mas essa redução tem sido variável em diferentes regiões do mundo (GALE e WILSON, 2016). Uma consequência para crianças que são acometidas frequentemente por doenças diarreicas é o desenvolvimento de déficits físicos e cognitivos ainda na infância, que podem se estender à vida adulta, predispondo esses indivíduos a doenças crônicas (GUERRANT et al., 2013; 2001; THIELMAN e GUERRANT, et al., 2004).

Medidas preventivas foram tomadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) no último século para controlar diarreias infecciosas, principalmente em crianças. Essas medidas consistiram na implementação da vacina contra rotavírus, investimento em saneamento básico e a terapia de reidratação oral com soro que resultou na redução das taxas de mortalidade de 4,5 milhões de mortes por ano, no final dos anos 90, para 1,5 milhões de mortes ao ano em 2010. Em contrapartida, os números de morbidade das doenças diarreica ainda são elevados (BARTELT et al., 2013).

No Brasil, a prevalência e os casos de mortalidade acerca de doenças diarreicas diferem entre as regiões do país, refletindo a desigualdade

socioeconômica ainda muito presente no Brasil. Na década de 1990 a região Nordeste possuía um dos maiores indicadores de doenças diarreicas do país, principalmente por fatores que incluem a falta de saneamento básico, o baixo poder aquisitivo das famílias nessa região e o baixo nível educacional dos pais (LIMA et al., 1992; MENDES et al., 2013). Nos últimos anos, houve uma melhoria nos índices de mortalidade nessa região e em todo país, devido a estratégias nacionais de saúde pública, como o Programa de Saúde da Família (PSF), programa de capacitação de profissionais na monitorização de doenças diarreicas agudas, vacinação contra rotavírus, incentivo ao aleitamento materno e suplementação de vitamina A (CARMO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2010; RASELLA et al., 2010).

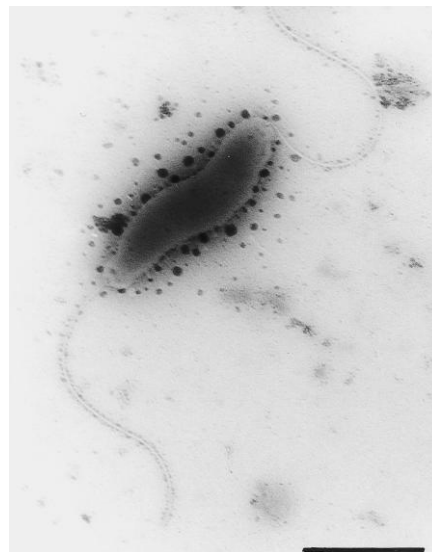
Um exemplo da queda da mortalidade por doenças diarreicas no Nordeste são os indicadores do estado do Ceará, onde a mortalidade diminuiu de 102 mortes a cada 1000 nascimentos, em 1986, para 25 mortes a cada 1000 nascimentos, em 2006 (MACHADO et al., 2011).

Dois importantes estudos multicêntricos realizados em países em desenvolvimento verificaram a etiologia das doenças diarreicas: o primeiro, denominado GEMS (*Global Enterics Multi-Center Study*), foi realizado em países da África e Ásia, que envolveu cerca de 22 mil crianças. Nesse estudo caso-controle quatro patógenos foram os mais prevalentes em casos de diarreia moderada a severa, Rotavírus, *Cryptosporidium* sp., *Shigella* sp. e *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) (KOTLOFF et al., 2013). O segundo, denominado MAL-ED (*The Etiology, Risk Factors, and Interactions of Enteric Infections and Malnutrition and the Consequences for Child Health*), foi realizado em oito países da Ásia, África e América do Sul, no qual, em seu estudo coorte, acompanhou crianças a partir dos 17 dias de vida até os dois anos de idade. Neste estudo avaliou-se a taxa de crescimento infantil, casos de diarreia e estado nutricional dessas crianças. No referido trabalho, patógenos como Norovírus GII, Rotavírus, *Campylobacter* sp., Astrovírus e *Cryptosporidium* sp. foram relacionados à doenças diarreicas no primeiro ano de vida. Já no segundo ano de vida, *Campylobacter* spp. foi o patógenos mais prevalente, seguido de Norovírus GII, Rotavírus, Astrovírus e *Shigella* sp. (PLATTS-MILLS et al., 2015).

2.2 *Campylobacter* spp.

Campylobacter spp. são bactérias Gram-negativas e morfologicamente diversas, no qual podem se apresentar em formato espiral, bastonetes ou curvas. Possuem um único flagelo polar, ou bipolar, com exceção da espécie *Campylobacter gracilis*, que não possui flagelo, e *Campylobacter showae*, que possui múltiplos flagelos (DEBRUYNE et al., 2005; MAN, 2011). São microorganismos não formadores de esporos, que possuem aproximadamente 0,2 a 0,8µm comprimento por 0,5 a 5µm de largura (**Figura 1**) e são quimiorganotróficas, pois obtém energia através de fontes de aminoácidos, ou através do ciclo intermediário do ácido tricarboxílico, sendo incapazes de fermentar ou oxidar os hidratos de carbono (FERNÁNDEZ, 2008; VANDAMME et al., 2005).

FIGURA 1: *Campylobacter jejuni* visualizada através de Microscopia de Transmissão.



Fonte: Wassenaar; Blaser, 1999.

A maioria das espécies de *Campylobacter* crescem em condições microaerófilas, no entanto, algumas espécies (*C. concius*, *C. curvus*, *C. rectus*, *C. mucosalis*, *C. showae*, *C. gracilis*, e *C. hyointestinalis*) requerem condições anaeróbias para o crescimento (KAAKOUSH et al., 2014; MAN, 2011).

Acredita-se que o primeiro achado de *Campylobacter* aconteceu em 1886 por Theodore Escherich, que observou e descreveu a presença de uma bactéria

não cultivável e em formato espiral. Posteriormente, *Campylobacter* foi identificado em 1906 quando dois veterinários britânicos reportaram a presença de um “grande número de um peculiar organismo” no muco intestinal de uma ovelha grávida (KING e ADAMS. 2008; SKIRROW, 2006; VANDAMME, 2000; VANDAMME et al., 2010).

Em 1913, McFadyean e Stockman isolaram o micro-organismo em fetos abortados de bovinos. Em 1927, Smith e Orcutt, nomearam um grupo de bactérias, isoladas de fezes diarreicas de cabras, como *Vibrio jejuni*. Alguns anos depois, em 1944, Doyle isolou uma espécie de vibrião diferente de fezes de porcos que apresentavam diarreia, e o nomeou como *Vibrio coli* (VANDAMME et al., 2010; VANDAMME, 2000).

Devido às características como pequeno número de pares de bases do DNA, ausência de fermentação e necessidade de uma atmosfera microaerófila para crescimento, o gênero *Campylobacter* (do grego *Kampulus*, encurvado e *Bacter*, bactéria) foi proposto pela primeira vez por Sebald e Véron, distinguindo assim do *Vibriosp.* (ON, 2001; SEBALT e VERON, 1963).

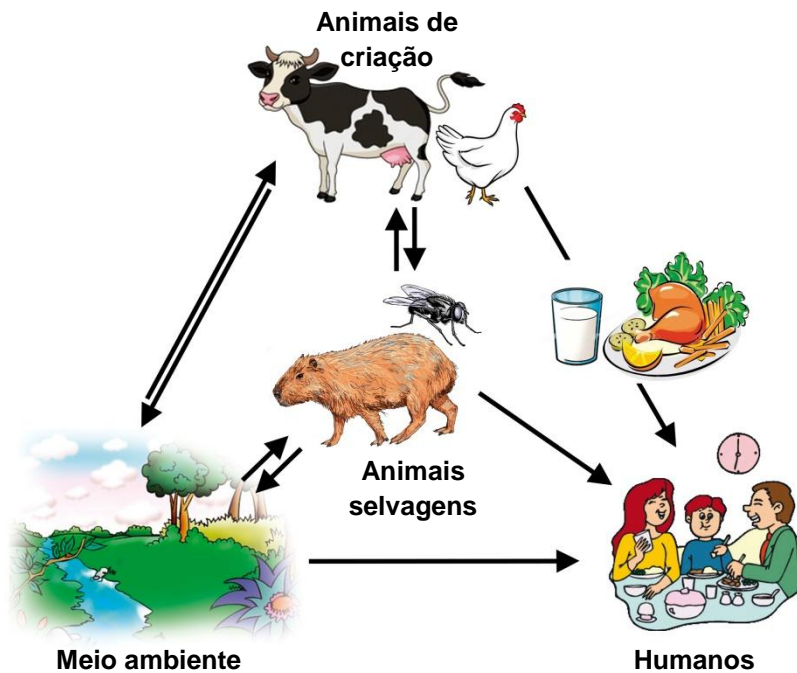
O gênero *Campylobacter* pertence à família Campylobacteraceae, da ordem Campylobacterales, classe Epsilonproteobacteria, do filo Proteobacteria, contendo, até dezembro de 2014, 26 espécies, 2 espécies provisórias e 9 subespécies (FITZGERALD, 2015; KAAKOUSH et al., 2014).

Os membros do gênero naturalmente colonizam o trato gastrointestinal de humanos e outros mamíferos, répteis, pássaros e mariscos. A infecção em humanos tem sido atribuída principalmente às espécies de *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, e *C. upsaliensis*. *C. jejuni* é a espécie mais bem descrita, sendo a maior causadora de gastroenterites em humanos, seguida por *C. coli*, responsável por cerca de 1-25% dos casos (HAMIDIAN et al., 2011; MAN, 2011; TABOADA et al., 2013).

As principais fontes de transmissão de campilobacterioses para os seres humanos são o consumo de aves infectadas, principalmente frangos de corte e água contaminada, mas também pode haver contaminação pelo consumo de leite não pasteurizado ou outros produtos alimentícios contaminados. Além disso, é provável que haja a contaminação ambiental por animais criados em fazendas ou selvagens, através da interação dos seres humanos com esses animais (BRONOWSKI et al., 2014). Outro fator de risco para infecções pela

bactéria está relacionado à viagens para países endêmicos, principalmente países em desenvolvimento, onde a incidência de infecções causadas por *Campylobacter* spp. são observadas em todas as épocas do ano (DAVIS et al., 2016; GRZYBOWSKA-CHLEBOWCZYK et al., 2013). Algumas das principais rotas para infecções em humanos por *C. jejuni* estão ilustradas na **Figura 2**.

FIGURA 2: Fontes de transmissão de *C. jejuni* para os seres humanos.



Fonte: Adaptado de Bronowski et al., 2014.

Várias outras fontes de transmissão podem estar associadas, incluindo insetos, que podem ser possíveis reservatórios para espécies de *Campylobacter*. Por exemplo, moscas podem desempenhar um papel na transmissão do micro-organismo a partir de fontes contaminadas, como frangos e porcos (EVERS et al., 2016; STROTHER et al., 2005).

Apesar de não muito comum, outra via de transmissão de campilobacterioses é através da transmissão de pessoa-a-pessoa, por via oral-fecal ou por fômites. A agência de proteção à saúde do Reino Unido verificou que a transmissão de pessoa-a-pessoa correspondeu a 3% dos casos de campilobacterioses entre os anos de 1992 a 2009 (LITTLE et al, 2010). Em estudos realizados na Nova Zelândia, Austrália e Holanda, casos de transmissão de pessoa-a-pessoa corresponderam a uma média de 4% dos casos das

infecções por *Campylobacter* spp. (GILPIN et al., 2013; MUGHINI-GRAS et al., 2014; VALLY et al., 2014).

2.3 Epidemiologia das campilobacterioses

Em muitos países desenvolvidos, a incidência de infecções provocadas por *Campylobacter*sp. é maior do que infecções causadas por *Salmonella* e *Shigella* (CDC, 2010; EFSA, 2013; WHO, 2013). No estudo MAL-ED, *Campylobacter*sp. foi o patógeno mais prevalente, tanto em infecções sintomáticas como assintomática, principalmente no Brasil, Peru e África do Sul (PLATT-MILLS et al., 2015).

Nos países desenvolvidos, infecções por *Campylobacter*sp. são esporádicas, e a prevalência de infecções assintomáticas é baixa, além de ser notada uma acentuada sazonalização. Com exceção de surtos, que são, por muitas vezes, associados com o consumo de produtos lácteos contaminados, as infecções são normalmente associadas à alimentos contaminados, geralmente com o consumo de carne de aves (NICHOLS et al., 2012; TAYLOR et al., 2013).

Em contraste, nos países em desenvolvimento, infecções por *Campylobacter*sp. muitas vezes são endêmicas, e casos de infecções assintomáticas são comuns, além de uma baixa sazonalidade, sendo muitas vezes ausente (KAAKOUSH et al., 2015; LEE et al., 2013). Casos de diarreia são mais comuns em crianças do que em adultos. Devido à natureza ubíqua do patógeno, fatores de risco são mais presentes, sendo muitas vezes associados à exposição ao ambiente, como o consumo de água contaminada (LENGERH et al., 2013; TANIUCHI et al., 2013).

Em 2011, o Centro de Controle de Doenças e Prevenção (CDC) dos Estados Unidos (EUA) estimou que *Campylobacter*sp. foi responsável por cerca de 0,8 milhões de casos de infecções causadas pelo consumo de alimentos por ano nos EUA, representando 9% de todas as doenças de origem infecciosa causadas por alimentos contaminados. O mesmo estudo também estimou que infecções por espécies de *Campylobacter*resultaram em cerca de 15% de todas

as hospitalizações relacionadas com diarreia de origem alimentar nesse mesmo ano (SCALLAN et al., 2011).

Entre os anos de 1996 a 2000, 19,6% das gastroenterites de origem alimentar foram causadas por *Campylobacter* spp. no Reino Unido (ADAK et al., 2005). Uma mudança particular no perfil de idade de indivíduos susceptíveis foi observada em 2007, onde a maior faixa etária de risco para campilobacterioses foi entre indivíduos com idade ≥ 60 anos, uma mudança marcante na tendência relatada em 1990, quando crianças entre 0-9 anos de idade estavam mais presentes nessa faixa de risco (GILESPIE et al., 2009). Na Austrália, espécies de *Campylobacter* são estimadas como a segunda causa de gastroenterite causada por bactéria, ficando atrás apenas das espécies de *Escherichia coli* não produtoras da toxina Shiga (HALL et al., 2005).

O estudo intitulado GEMS teve como foco crianças que apresentavam diarreia moderada a severa nos continentes da Ásia e África. Nesse estudo *C. jejuni* foi observada como um dos patógenos que causam diarreia em Bangladesh, Paquistão, e na Índia, mas não nos países da África (KOTLOFF et al., 2013).

Estudos sobre a epidemiologia no Brasil são muito escassos. Lima e colaboradores (1993) estimaram uma prevalência de 12% de campilobacterioses em crianças com menos de cinco anos de idade. Outra pesquisa caso-controle realizada na cidade de Fortaleza - CE demonstrou a prevalência de *C. jejuni* e *C. coli* nessa população. *C. jejuni* obteve uma prevalência de 9,6% no grupo com diarreia, enquanto houve uma prevalência de 7,2% de detecção do patógeno no grupo sem diarreia, demonstrando assim a significativa prevalência de *Campylobacter* em casos assintomáticos (QUETZ et al., 2010). No estado de Santa Catarina, observou-se uma prevalência de 6,2% de casos assintomáticos de campilobacterioses em adultos (TOSIN e MACHADO, 1995).

Silva e colaboradores (2016) encontraram uma prevalência de apenas 2% de *Campylobacter* spp. em fezes humanas na região Sul do Brasil. Uma explicação dada por essa baixa prevalência, levando em consideração outros estudos epidemiológicos, foi o armazenamento inadequado das amostras

utilizadas, resultando uma perda de sensibilidade na realização do diagnóstico microbiológico convencional.

Grande parte dos estudos epidemiológicos para o diagnóstico de *Campylobacter* spp. diagnosticam apenas as espécies *C. jejuni* e *C. coli*, comprometendo a prevalência das outras espécies de *Campylobacter* e, por consequência, subestimando os dados de detecção do patógeno (PLATTS-MILLS et al., 2014). Além disso, o uso de diferentes técnicas de diagnóstico, com diferentes sensibilidades e especificidades, acaba por diferenciar o resultado da prevalência do patógeno. A microbiologia convencional, que é o diagnóstico “padrão ouro” para a detecção do micro-organismo é amplamente utilizada, no entanto, devido às características fastidiosas de crescimento do patógeno, esse diagnóstico acaba tendo sua sensibilidade comprometida (BESSEDE et al., 2011; BULLMAN et al., 2012).

2.4 Patobiologia das infecções por *Campylobacter* spp.

Para ajudar na compreensão dos mecanismos da patobiologia do micro-organismo estudos *in vitro*, utilizando células humanas, e *in vivo*, com modelo animal, vêm sendo desenvolvidos. Modelos de cultura de célula já demonstraram que espécies de *Campylobacter* têm seus mecanismos de infecção baseados no ataque e invasão de células epiteliais, gerando toxinas que destroem as células do hospedeiro. Essas espécies também podem comprometer a integridade e fisiologia da barreira intestinal, secretando proteínas efetoras para as células do hospedeiro através de sistemas de secreção especializados. Em adição, esses micro-organismos possuem mecanismos em sua superfície que podem promover a evasão das defesas imunes do hospedeiro (BOURKE et al., 1998; LASTOVICA et al., 2006; LINDBLOM et al., 1995; MAN, 2011).

2.4.1 Motilidade e Quimiotaxia

As espécies de *Campylobacter* possuem uma motilidade diferenciada, principalmente em substâncias viscosas. Isto pode ser atribuído à presença de um ou dois flagelos polares e a forma helicoidal da bactéria. O flagelo fornece a propulsão e/ou o movimento celular giratório, enquanto a forma helicoidal facilita a rotação do tipo “saca-rolha” (FERRERO e LEE, 1988).

Estudos *in vivo* já elucidaram alguns papéis da motilidade e quimiotaxia bacteriana como fatores cruciais para uma bem sucedida infecção provocada por *C. jejuni* (HENDRIXSON E DIRITA, 2004; LERTSEHTAKARN et al., 2011; YOUNG et al., 2007).

C. jejuni possui um eficiente sistema de motilidade que aumenta em meio a viscosidade epitelial, permitindo uma forma eficiente do patógeno de atingir o sítio de colonização favorável no hospedeiro (BACKERT e HOFREUTER, 2013; FERREIRO e LEE, 1988; SZYMANKI et al., 1995). O sistema de motilidade de *C. jejuni* requer um flagelo bipolar e um sistema de quimiossensores que impulsiona o movimento flagelar com base nas condições ambientais (GUERRY, 2007). A motilidade é essencial para a sobrevivência em diferentes condições quimiotáticas encontradas no trato gastrointestinal e para a colonização do intestino delgado (JAGANNATHAN e PENN, 2005).

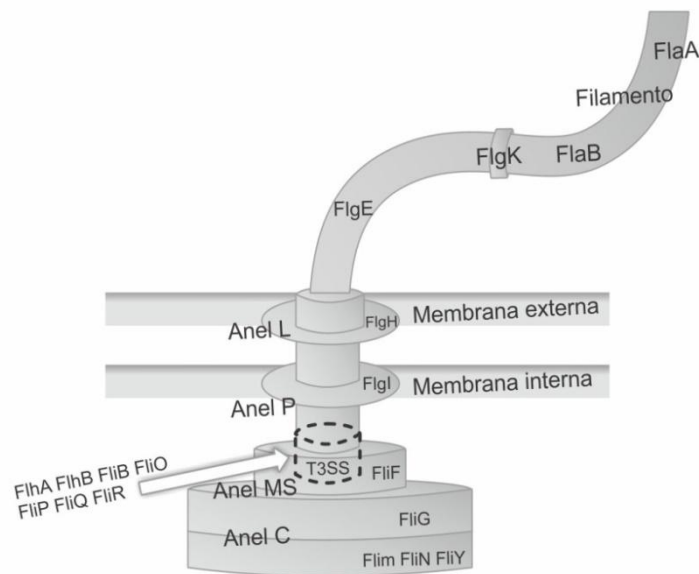
C. jejuni possui flagelo bipolar que é composto pela flagelina O glicosilada, sendo crucial para a aproximação dos locais de ligação nas células epiteliais intestinais. Defeitos na glicosilação da flagelina O levam à perda de motilidade, diminuindo a adesão e a invasão nas células hospedeiras (LERTSEHTAKARN et al., 2011).

Uma peculiaridade em relação às espécies de *Campylobacter* é a falta de um Sistema de Secreção do tipo III (T3SS), comum em enterobactérias como *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), *Salmonellaspp.* e *Shigella spp.* Esses micro-organismos utilizam o T3SS para comprometer a integridade da barreira intestinal das células do hospedeiro através da injeção de proteínas efetoras (BOYLE et al., 2006; SIMONOVIC et al., 2000). Para suprir essa função, o sistema flagelar é proposto como o sistema secretor de proteínas de virulência de *Campylobacter spp.*, de uma forma similar ao T3SS através de um conjunto de proteínas presentes no sistema flagelar (KONKEL et al., 2004; NOVIK et al., 2010).

O flagelo é composto por um corpo basal em formato de gancho e componentes estruturais nos filamentos extracelulares. O corpo basal inclui uma base incorporada no citoplasma e na membrana interna da célula, uma haste

periplasmática com anéis associados à estrutura e um gancho localizado na superfície. O corpo basal é complexo e composto por uma série de diferentes proteínas, como FliF, que é componente do anel MS. Outras proteínas, como FlhA, FlhB, FliO compõem o proposto T3SS do sistema flagelar; FlgE e FlgK compõem as menores porções do gancho. Já o filamento extracelular é composto de múltiplos da proteína flagelina, incluindo a proteína FlaA, codificada pelo gene *flaA* (*flagellin A*) (BOLTON, 2015; GUERRY, 2007; LERTSETHTAKARN et al., 2011). Variantes que apresentam mutação no gene *flaA* demonstraram uma diminuição na internalização da bactéria *in vitro*. (CARRILLO et al., 2004). A estrutura do flagelo de *C. jejuni*, com as proteínas que o compõe, pode ser observada na **Figura 3**.

FIGURA 3: Principais componentes flagelares de *C. jejuni*, com as proteínas associadas.



Fonte: Adaptado de Bolton, 2015.

Proteínas FliG, Flim, FliN e FliY compõem o anel C, que é a base do flagelo. As proteínas FliF compõem o anel MS, que se liga ao conjunto de haste da membrana. O Sistema de Secreção Tipo 3 (T3SS) é composto pelas proteínas FlhA, FlhB, FliB, FliO, FliP, FliQ e FliR. A proteína FlgI compõe o anel P, localizado na membrana interna. A proteína FlgH compõe o anel L, localizado na membrana externa. A menor parte do gancho é composta pelas proteínas FlgE e FlgK. O filamento extracelular do gancho é composto pelas proteínas FlaA e FlaB.

A quimiotaxia é a forma mais comum de bactérias flageladas direcionarem sua locomoção para os locais onde as condições de sobrevivência são mais

favoráveis, como locais com maiores concentrações de fontes de energia e baixas quantidades de substâncias bacteriotóxicas. Os pré-requisitos gerais para a quimiotaxia são quimiorreceptores, um sistema de transdução de sinais para o aparato flagelar da bactéria. O micro-organismo é capaz de chegar a condições mais favoráveis por detecção de quimioatrativos, como a mucina, principal constituinte do muco, ou substâncias metabólicas como o L-glutamato, através de várias proteínas quimiotáticas (ZAUTNER et al., 2012).

A quimiotaxia tem sido amplamente estudada em *E. coli*, e as evidências sugerem que *C. jejuni* possui mecanismos parecidos com os utilizados pela *E. coli* (HAMER et al., 2010). O sistema de quimiotaxia utiliza componentes dependentes das proteínas histidina quinase, utilizando seis proteínas quimiotáticas para a transdução de sinais, as Che A, B, R, W, Y e Z, codificadas pelos genes *che A, B, R, W, Y e Z* (HARTLEY-TASSELL et al., 2010; KANUNGPEAN et al., 2011)

CheW é uma proteína de ligação que tem como função ligar as Proteínas Quimiotáticas Aceptoras de Metil (PQMs) a CheA, esta última, quando ativada, transfere um grupo fosforil a CheY ou CheB. Em algumas cepas CheW pode ser substituído por CheV, um homólogo da proteína CheW, mas com um domínio adicional no receptor. A proteína CheY fosforilada se liga ao FliM, componente do motor flagelar, provocando uma modificação na rotação do flagelo, que deixa de ser no sentido anti-horário e passa para o sentido horário, efetuando uma mudança na motilidade da bactéria, alterando a direção de locomoção. CheY é depois fosforilada por CheZ causando reversão e suavizando a locomoção da bactéria. Todo processo é regulado por CheR, que transfere grupos metil as PQMs, melhorando a capacidade de ativação de CheA. A fosforilação de CheB reverte esse processo, removendo os grupos metil das PQMs, reduzindo a habilidade de CheR de ativar CheA, retornando o sistema para os níveis de pré estimulação (HAMER et al., 2010; LERTSEHTAKARN et al., 2011).

2.4.2 Adesão

A adesão às células epiteliais é um importante passo na patogenicidade de muitas bactérias. A adesão bacteriana envolve a interação de proteínas

especializadas que podem se ligar aos receptores na superfície celular do hospedeiro (PIZARRO-CERDA e COSSART, 2006). O desenvolvimento de doenças envolve a adaptação da bactéria ao ambiente intestinal do hospedeiro, podendo sobreviver e aderir ao epitélio intestinal. A adesão desempenha um importante papel na colonização do epitélio intestinal de frangos por *C. jejuni*, e pode ser um fator importante na infecção em seres humanos (AGUILAR et al., 2014; ZIPRIN et al., 1999)

Já foi demonstrado que a severidade dos sintomas clínicos em indivíduos infectados foi equivalente ao do nível de adesão de *C. jejuni* em células HeLa (FAUCHERE et al., 1986). A compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na interação entre os receptores celulares e as adesinas de *C. jejuni* pode permitir o desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas, baseadas na inibição da ligação bacteriana à células hospedeiras (RUBINCHIK et al., 2012).

A adesão de *Campylobacter* spp. não é mediada por fimbria ou *pili*, como em outras bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli* e *Salmonella* (NOUGAYREDE et al., 2003; VAN DER VELDEN et al., 1998). Estruturas celulares bacterianas provavelmente contribuem para a interação entre *Campylobacter* e o hospedeiro. Algumas dessas moléculas podem desempenhar o papel de verdadeiras adesinas que interagem diretamente com os receptores das células epiteliais, mas o conhecimento sobre isso ainda é incompleto, e muitos dados ainda são contraditórios (JIN et al., 2003; KONKEL et al., 1997; KONKEL et al., 2010; MONTEVILLE et al., 2003; RUBINCHIK e al., 2012).

Receptores celulares do hospedeiro foram identificados apenas em algumas proteínas da membrana externa, dentre elas a CadF (*Campylobacteradhesion to fibronectin*), específicas para a fibronectina (Fn), uma glicoproteína encontrada na matriz extracelular com massa molecular de 250kDa (PANKOV e YAMADA, 2002; KONKEL et al.; 1997; 2010); e JlpA (*jejuni lipoprotein A*), específica para a proteína de choque térmico 90 (HSP90), proteína chaperona essencial para a sobrevivência celular (JIN et al., 2003).

A proteína de membrana CadF é codificada pelo gene cromossomal *cadF*, que é altamente conservado. A proteína CadF é necessária para a

adesão e posterior invasão de *C. jejuni* *in vitro*. Estudos já demonstraram que há uma significativa redução da internalização de *C. jejuni* em células epiteliais humanas INT 407, quando estes são infectados com cepas mutantes para o gene *cadF* (KONKEL et al., 1999). A função da proteína CadF é semelhante à da proteína de membrana OmpA da *E. coli*, formando canais de membrana celular do hospedeiro. Mas o mecanismo de ação para isso ainda não foi estabelecido (MAMELLI et al., 2006). A proteína JlaA, codificada pelo gene *jlpA*, é uma proteína de 43kDa (JIN et al., 2001). Estudo realizado por Jin e colaboradores (2001) mostrou que cepas mutantes para o gene *jlpA* tiveram redução de aproximadamente 19% na adesão da bactéria em células epiteliais humanas HEP-2 em relação a cepas selvagens de *C. jejuni*.

2.4.3 Invasão

A invasão da mucosa parece ser um dos primeiros mecanismos pelo qual *C. jejuni* causa lesão intestinal. A capacidade invasiva de *C. jejuni* é dependente de células epiteliais do cólon intestinal, que pode está relacionado com o aumento da permeabilidade intestinal, ou com a morte celular. Em muitos casos, a morte celular (como resultado da inflamação intestinal ou exposição a drogas) pode resultar na perda da função da barreira intestinal (ABREU et al., 2000; BELTINGER et al., 2008; CHIN et al., 2002; 2003; KALISCHUK et al., 2007).

Para a invasão celular, a primeira barreira que *C. jejuni* encontra é a camada de muco das células epiteliais no hospedeiro. Mas a bactéria pode efetivamente penetrar essa barreira, sem entrar em contato com as criptas intestinais, podendo ser encontrada livremente na camada mucosa (FERRERO e LEE, 1988). A mucina é um forte quimioatrativo para *C. jejuni*, pois em vez de ser transportada para fora do intestino pela camada de muco, a bactéria se move livremente em paralelo ao fluxo na mucosa. Essa mobilidade pode ser atribuída ao formato espiral da bactéria e a presença de enzimas que degradam a mucina. O TSS3 flagelar de *C. jejuni* é um importante aparato para a mobilidade da bactéria, auxiliando na invasão das células do hospedeiro (POLY e GUERRY, 2008; VAN PUTTEN et al., 2009).

A invasão do epitélio por cepas de *C. jejuni* pode estar associada com o aumento da permeabilidade intestinal (BELTINGER et al., 2008; MACCALLUM et al., 2005). No entanto, ainda é necessário determinar, de maneira conclusiva, se a disfunção da barreira é uma consequência de danos no epitélio que estão associados com o aumento da morte celular, ou é atribuído à perda da função das junções firmes, que causam aumento da permeabilidade intestinal, como já tem sido observado para este patógeno (CHEN et al., 2006; LAM-ROSTESKI et al., 2008).

Estudos realizados por Kalischuk e colaboradores (2009) e Lamb-Rosteski e colaboradores (2008) demonstraram que a ruptura do epitélio intestinal, induzida por *C. jejuni*, provoca a translocação de bactérias não invasivas através do epitélio intestinal. Estes dois estudos utilizaram diferentes cepas de *C. jejuni* para a avaliação da translocação da bactéria e dois mecanismos diferentes de translocação bacteriana foram observados. A cepa de *C. jejuni* RM1221 induziu a translocação de bactérias não invasivas, através do epitélio, pela via paracelular (LAMB-ROSTESKI et al, 2008), enquanto a cepa de *C. jejuni* 81-176 induziu a translocação através de mecanismos transcelulares (KALISCHUK et al., 2009).

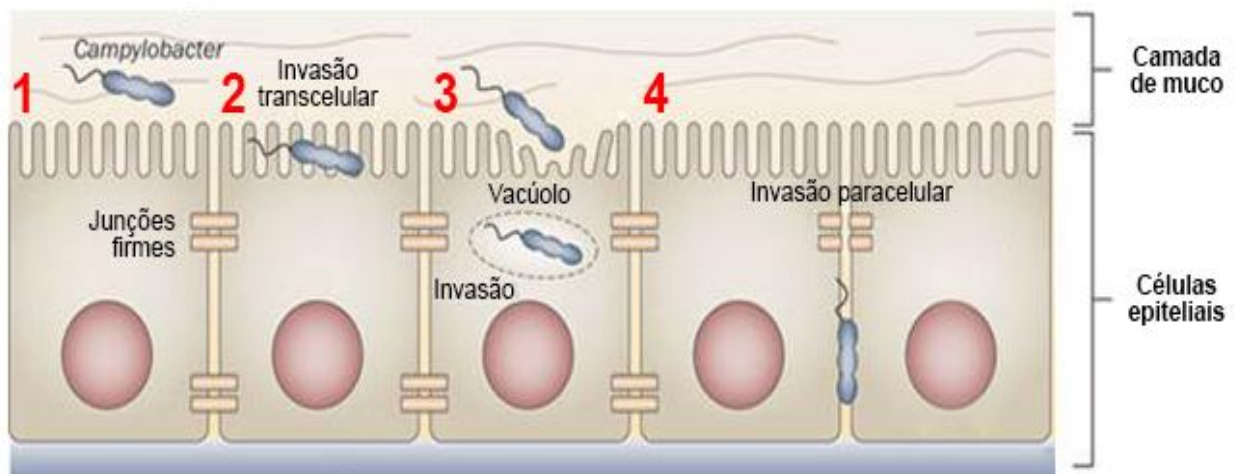
A cepa *C. jejuni* RM1221, isolada a partir de amostras de frangos, causou aumento da permeabilidade intestinal, o que pode ter sido provocada pela ruptura das junções firmes e claudinas-4 (LAMB-ROSTESKI et al, 2008). Alguns estudos já demonstraram que *C. jejuni* tem como um de seus alvos as junções firmes no epitélio intestinal, isso facilita tanto a translocação de *C. jejuni* como de outras bactérias intestinais residentes através da barreira intestinal, pela via paracelular (CHEN et al., 2006; MACCALLUM et al., 2005)

Outro mecanismo de invasão de *C. jejuni* é o encapsulamento da bactéria dentro de um vacúolo, evitando assim a ação de células de defesa do hospedeiro e de agentes antimicrobianos, prolongando a sobrevivência intracelular do micro-organismo. Essa é umas das principais estratégias utilizadas pela bactéria para persistir na colonização do trato gastrointestinal do hospedeiro (WATSON e GALAN, 2008). Alguns dos prováveis mecanismos de

colonização e invasão de *C. jejuni* no epitélio intestinal do hospedeiro podem ser visualizados na **Figura 4**.

FIGURA4: Diferentes mecanismos de invasão de *C. jejuni* nas células do hospedeiro.

Fonte: Adaptado de Man, 2011.



1: *C. jejuni* pode se movimentar livremente na camada de muco; 2: invasão por via transcelular; 3: Formação de um vacúolo para evitar as defesas do hospedeiro e ação de drogas antimicrobianas; 4: Invasão celular por via paracelular, através da ruptura das junções firmes.

Para a efetiva invasão da bactéria, algumas proteínas são necessárias, como a CiaB (*Campylobacter invasion antigen B*), proteína com 73kDa, codificada pelo gene *ciaB* (KONKEL et al., 1999). Estudos de Konkel e colaboradores (1999) demonstram que cepas mutantes, que não apresentaram *ciaB*, tiveram redução significativa da adesão e invasão de *C. jejuni* em células INT 047.

O mecanismo de secreção de CiaB e o seu papel na invasão são comparados com o modelo de T3SS clássico de várias bactérias, nos quais proteínas efetoras são injetadas diretamente nas células do hospedeiro. Mas como *C. jejuni* não possui o T3SS, o sistema flagelar de *C. jejuni* pode estar envolvido nessa função (KONKEL et al., 1999; RIVERA-AMILL et al., 2011). Outro mecanismo que pode estar relacionado é a utilização de proteínas da membrana externa (OMVs), presente em bactérias Gram-negativas. OMVs desempenham um papel importante na liberação de fatores de virulência da

bactéria e modulação da resposta imune do hospedeiro (ELMI et al., 2012; KULP e KUEHN, 2010).

Estudos realizados por Bacon e colaboradores (2002) identificaram a presença de um sistema de secreção tipo IV em um grande plasmídeo encontrado em cepas de *C. jejuni* 81-176. O sistema de secreção do tipo IV já tem sido descrito em algumas bactérias e está envolvido na exportação de DNA bacteriano, na conjugação bacteriana e na secreção de proteínas (CHRISTIE e VOGEL, 2000). Este plasmídeo, chamado de pVir, com 37kb, possui quatro genes codificantes do sistema de secreção do tipo IV. Mutações específicas de dois desses genes plasmidiais, *pVir* e *virB11*, resultaram na diminuição significativa da adesão e invasão da bactéria em células epiteliais intestinais *in vitro*. A detecção do gene plasmidial *pVir* foi relacionada à infecções mais graves de *C. jejuni*, com a presença de disenteria (BACON et al., 2002; DASTI et al., 2010; LOUWEN et al., 2006; TRACZ et al., 2005).

Apesar de muitos isolados de *C. jejuni* não possuírem o gene estrutural para fosfolipase A (*pldA*), pesquisas realizadas por Ziprin e colaboradores (2001) demonstraram que cepas mutantes para o gene *pldA* tiveram prejuízo na capacidade de colonização do ceco de frangos, sugerindo que o gene pode possuir papel na colonização e adesão no epitélio intestinal de aves. Talvez isso tenha ocorrido pelo fato de que o gene mantém a integridade funcional de adesinas na superfície celular. Além disso, foi demonstrado que o gene *pldA* de *C. coli* tem atividade hemolítica em eritrócitos em, como já demonstrado em outras bactérias (DEKKER, 2000; GRANT et al., 1997).

Um marcador genético cromossomal de *C. jejuni*, o IAM (*invasion-associated marker*) foi identificado por Carvalho e colaboradores (2001). Esse marcador genético é regulado pelo gene *iamA*, que foi associado com a adesão e invasão do micro-organismo em de células HEp-2 *in vitro*.

2.4.4 Efeitos citotóxicos

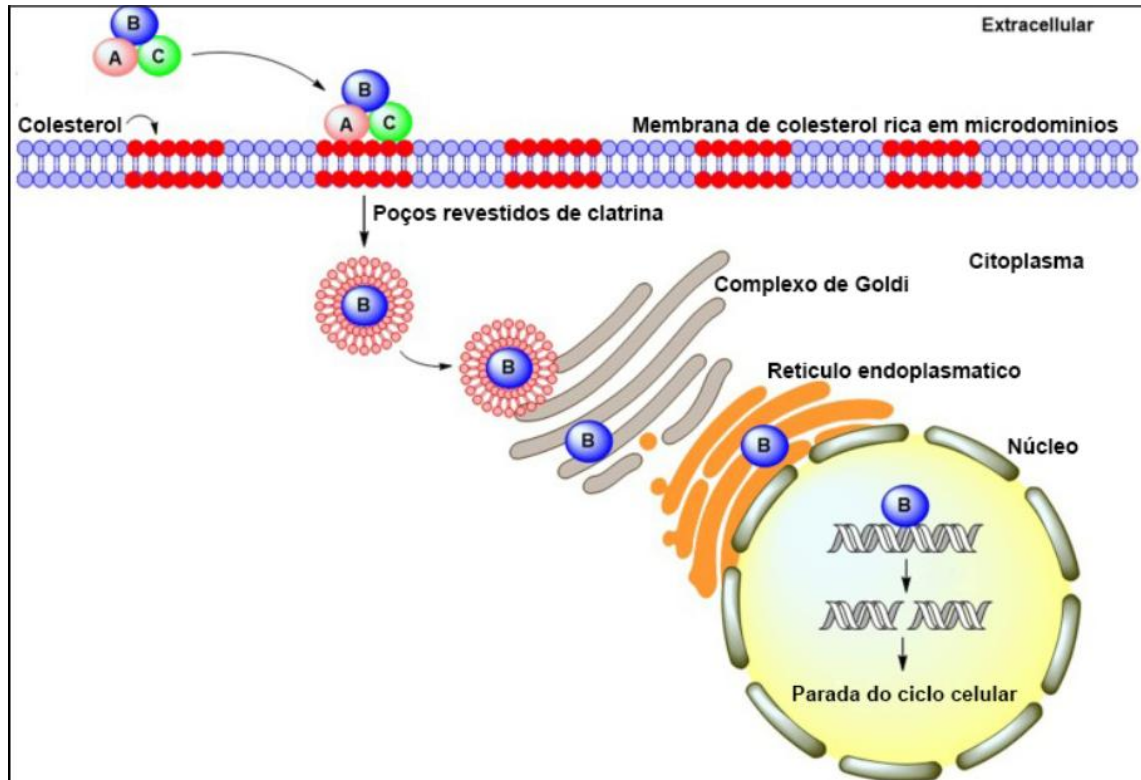
Os danos celulares causados por *C. jejuni* podem ser, em grande parte, atribuídos à efeitos citotóxicos que podem atingir as células do hospedeiro (RUSSELL et al., 1993; WASSENAAR e MARTIN, 1999). Guerrant e

colaboradores (1987) postularam que *C. jejuni* produzia uma citotoxina que poderia ser similar à produzida por *Shigella* spp., *Escherichia coli* enterohemorrágica O157 (EHEC O157) e *Clostridium difficile*, onde essa citotoxina estaria associada ao processo inflamatório provocado por *C. jejuni* no epitélio intestinal. O fato foi comprovado com a análise da sequência do genoma da bactéria, onde, de acordo com os resultados, uma das toxinas produzida por *C. jejuni* é a Toxina Citoletal Distensora (CDT), uma toxina similar a DNase produzida por várias espécies de bactérias (PARKHILL et al., 2000). Sua função está relacionada com a parada do ciclo celular das células do hospedeiro, causando a morte, por apoptose de linfócitos, monócitos e células endoteliais (PICKETT et al., 1994; WHITEHOUSE et al., 1998).

A interação entre a CDT de *C. jejuni* (Cj-CDT) com microdomínios ricos em colesterol da membrana e o papel do colesterol na intoxicação das células do hospedeiro por Cj-CDT foram relatados por Lin e colaboradores (2011). No entanto, a base molecular da associação Cj-CDT com a membrana celular e a entrada de subunidades da toxina em células ainda permanecem incertos (LAI et al., 2016).

A CDT é uma toxina tripartite composta de três subunidades codificadas pelos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*. Todos os três produtos dos genes são necessários para o funcionamento da toxina (LARA-TEJERO e GALAN, 2000; 2001). Os produtos dos genes *cdtA* e *cdtC* são duas subunidades heterodiméricas responsáveis pela ligação da toxina à membrana celular e para a entrada do produto do gene *cdtB*, que é a subunidade enzimaticamente ativa da toxina. Esta proteína entra no núcleo da célula hospedeira e age como a enzima desoxirribonuclease, bloqueando a quinase CDC2, que é essencial na transição para a fase G2 da mitose. A partir daí, ocorre a fragmentação progressiva do núcleo e distensão celular e, em última instância, a morte celular (LARA-TEJERO e GALAN, 2000; PICKETT e WHITEHOUSE, 1999). As ações da CDT na célula do hospedeiro podem ser observadas na **Figura 5**.

FIGURA 5 -Ação da Toxina Citoletal Distensora (CDT) produzida por *C. jejuni* na célula do hospedeiro.



Fonte: Adaptado de Lai et al., 2016.

As subunidades CdtA e CdtC se ligam ao colesterol da membrana celular rica em microdomínios e facilita a entrada da subunidade CdtB na célula, através de poços revestidos de clatrina, por endocitose. Na sequência, CdtB se transloca para o citosol e, pelo transporte retrógrado do complexo de Golgi ao retículo endoplasmático, a subunidade se desloca em direção ao núcleo. A subunidade CdtB se transloca ao núcleo através de sinais de localização nuclear presentes na sua sequência de aminoácidos. Por último, CdtB induz a quebra da dupla fita de DNA que conduzem à parada do ciclo celular.

2.4.5 Lipo-oligosacarídeos e Cápsula Polissacarídica

Uma das prováveis vias utilizadas por *C. jejuni* para evitar a resposta imune do hospedeiro é através dos lipo-oligosacarídeos (LOS) de membrana. Estruturas do LOS de *C. jejuni* assemelham-se à gangliosídeos neuronais humanos, e este mimetismo molecular pode levar ao desenvolvimento de doenças autoimunes, incluindo a Síndrome de Guillain-Barré (SGB), e síndrome de Miller-Fisher, uma variante da SGB (HUGHES, 2004; KUWABARA e YUKI, 2013; YU et al., 2006).

A cápsula polissacarídica (CPS) de *C. jejuni* pode ser outro mecanismo importante de escape da resposta imune do hospedeiro. CPS tem importância na resistência, aderência e invasão de células epiteliais. Um esquema de sorotipagem realizado por Penner (1989) para cepas de *C. jejuni*, identificou a existência de 47 sorotipos diferentes de *C. jejuni*, que é agora conhecido com base na diferença da estrutura capsular, indicando a extensa variação na sua estrutura. Essa variação tem, provavelmente, um papel chave na evasão da resposta imune do hospedeiro (KARLYSHEV et al., 2000; MAUE et al., 2013; PRESTON e PENNER, 1989).

2.4.6 Sistema de captação de ferro

O ferro (Fe) é essencial para muitos processos biológicos, incluindo a síntese de DNA, respiração e para o ciclo do ácido tricarboxílico. Mas, apesar de ser essencial à vida, em níveis elevados o Fe podem ser tóxicos para o organismo. A maioria das bactérias, incluindo *C. jejuni*, desenvolveu um sofisticado mecanismo de eliminação de ferro do organismo. Esse mecanismo envolve a produção de moléculas de baixo peso molecular (500 a 1000 Da), chamadas sideróforos, que se ligam aos íons ferro com elevada afinidade. Essas moléculas conseguem secretar o ferro circulante através de receptores localizados na membrana externa da bactéria (ANDREWS et al., 2003; VAN VLIET et al., 1998).

Proteínas como a Fur (*ferric uptake regulator*), regulada pelo gene *fur*, são responsáveis pela regulação dos níveis de ferro, e pela ação dos sideróforos. A proteína Fur desempenha um papel importante na modulação da virulência bacteriana, resistência e no metabolismo bacteriano (BUTCHER et al., 2012; 2010; LEE e HELMANN et al., 2007).

Em *C. jejuni*, Fur regula a expressão de alguns sistemas propostos de absorção de ferro, incluindo Ceu, CfrA e p19. Mutações nos genes *fur*, no *cfrA* (*Receptor férrico de Campylobacter*), gene responsável pelo receptor da membrana externa enteroquelina férrica (FeEnt), um sideróforo de alta afinidade responsável pela aquisição de ferro para a bactéria; e no gene *ceuE* (*enterochelin uptake substrate-binding protein*), responsável por codificar a

enteroquelina; comprometeram a capacidade da bactéria de colonizar o intestino de frangos de corte (BUTCHER et al., 2012). Além disso, a falta da regulação de Fe na bactéria gerou um alto índice de mortalidade do micro-organismo. A aquisição de ferro é um aspecto crucial para a ação e sobrevivência bacteriana, então esse sistema é um importante fator de virulência para o micro-organismo (HOLMES et al., 2005; VAN VLIET et al., 1998).

2.4.7 Resposta ao estresse e sobrevivência bacteriana

Por serem bactérias microaerófilas, *Campylobacter* spp. lidam com metabólitos tóxicos de oxigênio produzidos durante o metabolismo normal, durante a transmissão, ou quando ocorre o contato com as defesas imunes do hospedeiro. *C. jejuni* e *C. coli* compartilham o mesmo sistema de defesa ao estresse oxidativo (STORZ e IMLAY, 1999).

O principal componente da dismutase de *C. jejuni* de defesa ao estresse é a proteína superóxido-dismutase (SodB), codificada pelo gene *sodB*. Superóxido-dismutase é a maior defesa contra danos causados por oxigênio (O_2) em bactérias. SodB converte a molécula de O_2 para uma molécula de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e uma molécula de oxigênio (OH et al., 2015). Pesci e colaboradores (1994) demonstraram que mutantes de *C. jejuni* para *sodB* tiveram uma significativa diminuição na sobrevivência intracelular em células INT-407.

A catalase remove H_2O_2 de células quebrando a molécula em água e oxigênio. *C. jejuni* contem apenas uma catalase, a proteína KatA, codificada pelo gene *katA*. Cepas de *C. jejuni* mutante para *katA* apresentaram deficiência no crescimento intracelular em macrófagos, mas não em células epiteliais. Isso pode significar que a bactéria não resistiu ao excesso de oxigênio dentro dos macrófagos (ATAACK e KELLY et al., 2009; DAY et al., 2000).

Para o crescimento de espécies de *Campylobacter* termotolerantes é necessário uma temperatura entre 37°C e 42°C, sendo incapazes de crescer a temperaturas menores que 30°C. Mas a bactéria possui mecanismos de sobrevivência à exposição a temperaturas mais elevadas durante o intervalo de crescimento, e essa resposta ao choque térmico imediatamente após a

exposição da bactéria a altas temperaturas foi descrita por Konkel e colaboradores (1998).

A resposta do micro-organismo ao choque térmico aumenta a capacidade de sobrevivência da bactéria. Para isso existem aproximadamente 24 proteínas sintetizadas por *C. jejuni* que auxiliam na resistência ao choque térmico, onde esse mecanismo acaba por aumentar a sobrevivência da bactéria (KONKEL et al., 1998). Mihaljevic e colaboradores (2007) observaram que a sobrevivência da bactéria aumenta, mas a capacidade de invadir células eucarióticas foi reduzida após o choque térmico.

Algumas proteínas responsáveis pela resposta ao choque térmico, como a GroESL, DnaJ e Lon já foram relatadas (BRAS et al., 1999). Cepas mutantes para o gene *dnaJ* que codifica a proteína chaperona DnaJ, apresentaram reduzida taxa de crescimento em temperaturas a 46°C. Além disso, *C. jejuni* não pôde ser isolada do ceco de frangos infectados. Isso sugere que *dnaJ* pode ter um papel tanto na termotolerância, como no crescimento da bactéria no intestino de frangos (KONKEL et al 1998; ZIPRIN et al., 2001).

O sistema RacRS tem sido relatado como sendo importante na capacidade de colonização em células epiteliais de frangos, e para a termotolerância da bactéria (APEL et al., 2012). Esse sistema de proteínas regula genes importantes para a colonização *in vivo* da bactéria, como o *racR* (*DNA-binding response regulator*), de um modo dependente de temperatura (VAN DER STEL et al., 2015). Cepas mutantes para o gene *racR* apresentaram reduzida taxa de crescimento da bactéria em temperaturas a 42°C *in vivo*, e a colonização *in vitro* em células epiteliais Caco-2 (BRAS et al., 1999).

2.5 Manifestações Clínicas das infecções por *Campylobacter* spp.

Para causar infecção, são necessários apenas uma média de 500 a 800 micro-organismo. Infecções causadas por *Campylobacter* spp., principalmente *C. jejuni* e *C. coli*, geralmente causam gastroenterites agudas que são caracterizadas por inflamação, dor abdominal, febre e episódios de diarreia, muitas vezes com fezes sanguinolentas. O período de incubação para o

desenvolvimento de uma diarreia aguda é de aproximadamente 2 a 5 dias (MAN, 2011; YOUNG et al., 2007).

Com um tratamento adequado a infecção dura em média uma semana, mas os sintomas podem persistir por até duas semanas. Infecções por *C. jejuni* e *C. coli* podem ocorrer em todas as faixas etárias, mas crianças entre 1 a 4 anos de idade, e jovens adultos entre 15 a 24 anos são as faixas mais afetadas (BLACK et al., 1988; MAN, 2011; NIELSEN et al., 2013).

Infecções assintomáticas são bastante comuns, e isso acaba dificultando os estudos epidemiológicos, principalmente em países em desenvolvimento (LEE et al., 2013). Estudos coorte multicêntricos em países em desenvolvimento, como o GEMS e MAL-ED, tiveram grande importância na elucidação de dados epidemiológicos de infecções assintomáticas nessas regiões, como já descrito (PLATTS-MILLS et al., 2015; KOTLOFF et al., 2013).

Infecções assintomáticas causadas por *Campylobacter* spp. são comuns em crianças acima de 5 anos e estão associadas com a excreção prolongada em um percentual significativo de casos (FERNÁNDEZ et al., 2008). Nos países em desenvolvimento, infecções assintomáticas são mais comuns entre crianças desnutridas, principalmente para *C. jejuni*. Neste contexto, infecções pelo micro-organismo podem também ser oportunistas, tendo relação com a imunossupressão induzida pela desnutrição (FERNÁNDEZ et al., 2008; LEE et al., 2013; QUETZ et al., 2010).

Estudo coorte realizado no Peru, por Lee e colaboradores (2013), demonstrou que crianças com infecções assintomáticas e sintomáticas por espécies de *Campylobacter* tiveram uma redução de crescimento nos três primeiros meses de idade. Estudo caso-controle realizado no Brasil, por Quetz e colaboradores (2010), também demonstrou uma significativa redução nos escores de crescimento das crianças, com diagnóstico molecular positivo para *Campylobacter* sp., nos primeiros meses de idade.

Infecções entéricas frequentes, especialmente nos primeiros 3 anos de vida de uma criança, com ou sem diarreia evidente, podem predispor o indivíduo à desnutrição, com a diminuição do crescimento através de vários mecanismos,

onde também pode haver diminuição do desenvolvimento cognitivo da criança, afetando sua produtividade na vida adulta. Além disso, crianças desnutridas tem maior frequência de doenças diarreicas, com maior duração dos episódios. Finalmente, infecções entéricas podem predispor à obesidade e suas comorbidades, como diabetes, hipertensão, doenças cardiovasculares e síndromes metabólicas. Essas consequências fazem parte de um ciclo vicioso de diarreia-desnutrição (GUERRANT et al., 2013).

Gastroenterites são as mais importantes condições clínicas resultante de infecções por *Campylobacter* spp., mas estes micro-organismos também têm sido associados à outras condições sérias relacionadas ao trato gastrointestinal, incluindo Doenças do Intestino Inflamado (IBD). IBD são condições inflamatórias crônicas do trato gastrointestinal, que incluem a doença de Crohn, caracterizada por lesões transmuralis que podem ocorrer em qualquer local ao longo do trato gastrointestinal, e colite ulcerativa, caracterizada por uma contínua inflamação da submucosa, restrita ao cólon (KAAKOUSH et al., 2012; MAHENDRAN et al., 2011; MAN et al., 2011).

Além disso, infecções causadas por espécies de *Campylobacter* também causam uma variedade de manifestações clínicas em outros locais do corpo humano, que podem ser infecções locais isoladas (endocardites e miocardites), manifestações sistêmicas após um episódio de enterite (septicemias) ou desordens imunológicas pós-infecção, que incluem a Síndrome de Guillain-Barré (SGB) e a Síndrome de Miller Fisher (BECKER et al., 2007; KAAKOUSH et al., 2014; KOGA et al., 2005; KUWABARA e YUKI, 2013; NIELSEN et al., 2010).

A SGB é uma condição neurológica caracterizada por uma fraqueza progressiva e simétrica nos membros superiores e inferiores, com ou sem hiporreflexia, que pode também afetar os nervos respiratórios e cranianos. A SGB é uma condição que acontece pós-infecção, e uma importante causa dessa síndrome são infecções causadas por *C. jejuni* (BAKER et al., 2012; KUWABARA e YUKI, 2013). O mecanismo subjacente dos danos neuronais associados com a SGB está relacionado a uma reação cruzada entre anticorpos produzidos em resposta ao LOS de *C. jejuni* e gangliosídeos humanos, tais como o gangliosídeo GM1 (FREDDO et al.; 1986; VAN DOORN et al., 2008).

A síndrome de Miller Fisher é uma condição definida por um início agudo de oftalmoplegia, arreflexia e ataxia, que surgem a partir do desenvolvimento de anticorpos anti-GQ1b pela exposição ao LOS de certas bactérias, dentre eles *C. jejuni*, um dos mais frequentemente identificados (CHIBA et al., 1992; HEIKEMA et al., 2013; KOGA et al., 2005). Algumas das principais manifestações clínicas provocadas por espécies de *Campylobacter* em humanos estão representadas na **Tabela 1**.

TABELA 1 - Principais espécies de *Campylobacter* com as manifestações clínicas associadas a infecções em humanos.

Espécies de <i>Campylobacter</i>	Manifestações Clínicas
<i>C. coli</i>	Gastroenterite acompanhado de sangue nas fezes, meningite, colecistite aguda
<i>C. concisus</i>	Gastroenterite, IBD, esofagite, sangue nas fezes, abscessos cerebrais
<i>C. curvus</i>	Gastroenterite, colite ulcerativa, esofagite, abscessos bronquiais
<i>C. fetus</i>*	Septicemia, gastroenterite, abscessos cerebrais, endocardites, aneurisma, peritonites
<i>C. gracilis</i>	Periodontite, IBD, infecções de cabeça e pescoço, e abscessos cerebrais
<i>C. hominis</i>	IBD
<i>C. hyointestinalis</i>	Gastroenterite
<i>C. jejuni</i>	Gastroenterite, IBD, doença

celíaca, SGB, Síndrome de Miller Fisher. Artrite reativa, miocardite, meningite, colecistite aguda, infecções do trato urinário, febre aguda associado com leucopenia e trombocitopenia

<i>C. lari</i>	Gastroenterite
<i>C. upsaliensis</i>	Gastroenterite, abscessos cerebrais.

Fonte: Adaptação de Kaakoush et al, 2014; Man, 2011.

IBD: Doenças do Intestino Inflamado; SGB: Síndrome de Guillain-Barré. *Incluindo *C. fetus subesp. fetus*, *C. fetus subesp. venerealis*, e *C. fetus subesp. testudinum*.

2.6 Diagnóstico laboratorial das espécies de *Campylobacter*

O diagnóstico laboratorial das infecções por *Campylobacter* spp. requer o uso de métodos dependentes ou independentes de cultura. Nos métodos dependentes de cultura, colônias isoladas podem ser submetidas a uma série de testes bioquímicos para a identificação de traços fenotípicos. A temperatura tempo de incubação e condições atmosféricas adequadas favorece o crescimento de espécies de *Campylobacter* durante os procedimentos de isolamento (IWAMOTO et al., 2012). Dentre os métodos independentes de cultura, testes imunoenzimáticos e moleculares são destacados, e cada vez mais utilizados, aumentando a sensibilidade e especificidade de detecção, tendo um impacto sobre a vigilância na saúde pública, uma vez que a análise de isolados é necessária para controle de distribuição de diferentes espécies (PLATTS-MILLS et al., 2014).

A microbiologia convencional ainda é utilizada como “padrão ouro” para o diagnóstico de *Campylobacter* spp., mesmo com a baixa sensibilidade dessa metodologia. Espécies de *Campylobacter* são bactérias com uma exigência especial de cultivo, como um ambiente microaerófilo. E durante o processamento das amostras, as bactérias podem ter um contato muito longo com uma atmosfera normal (BESSÈDE et al., 2011). Além disso, meios seletivos

são geralmente utilizados e os antibióticos incorporados podem inibir o crescimento de certas espécies de *Campylobacter* (FITZGERALD, 2015). A demonstração da baixa sensibilidade do diagnóstico microbiológico convencional sugere que as diretrizes para testes de diagnóstico de *Campylobacter* spp. precisam ser modificadas em um futuro próximo (BESSEDE et al., 2011; ENDTZ et al., 2000; SINGH et al., 2011).

Vários testes têm sido desenvolvidos à base de antígenos para a detecção de *Campylobacter*. Na Europa, tais testes revelaram ter uma excelente sensibilidade, que chega a ser maior que 89%, em comparação com os resultados em cultura (DEDISTE et al., 2003).

Testes imunoenzimáticos têm mostrado resultados excelentes, mas já foi documentado um excesso de resultados positivos para *Campylobacter*, em comparação com a cultura seletiva, sugerindo que outras espécies, que não possuem relevância clínica, podem estar sendo detectadas pelos métodos imunológicos, com reação cruzada, fazendo com que ocorram resultados falso-positivos (FITZGERALD et al., 2016; PLATTS-MILLS et al., 2014).

Testes bioquímicos podem ser utilizados para diferenciar espécies de *Campylobacter*. No entanto, a capacidade de diferenciar *C. jejuni* e *C. coli* seria o mais relevante no contexto clínico. O único teste bioquímico que distingue as duas espécies é o teste da hidrólise do hipurato, onde isolados de *C. jejuni* têm a capacidade de hidrolisar o hipurato, enquanto que isolados de *C. coli* não tem essa capacidade (SENOK e BOTTA, 2009).

Diagnósticos moleculares como a Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) já vêm sendo bastante empregados para a detecção de grande diversidade de espécies de *Campylobacter* em pacientes com gastroenterite, principalmente pela excelente sensibilidade e especificidade da técnica (BESSEDE et al., 2011; PLATTS-MILLS et al., 2014). A PCR pode ser uma ferramenta potencial para a detecção de *C. jejuni* e/ou *C. coli* a partir de amostras de fezes congeladas (QUETZ et al., 2010). Essa metodologia não é utilizada em grande escala para o diagnóstico clínico por ser uma técnica de custos elevados (BESSEDE et al., 2011; FITZGERALD et al., 2016; ON, 2013).

Para conferir a eficiência em diagnosticar espécies de *Campylobacter*, diferentes testes de diagnóstico foram utilizados para a identificação do patógeno, em uma população entre 0-36 meses na cidade de Fortaleza - CE. Dentre eles as técnicas moleculares empregadas, que no caso foram qPCR e PCR convencional, mostraram ter uma ótima sensibilidade e especificidade, em comparação ao ensaio imunoenzimático utilizado, ELISA, e principalmente em relação à microbiologia convencional. Esses valores foram confirmados quando observados os valores preditivos positivos, onde o valor dos diagnósticos moleculares foi elevado (VERAS et al., 2016). Bessède e colaboradores (2008) também confirmaram a melhor eficiência dos testes moleculares em relação à microbiologia convencional, testes imunoenzimáticos rápidos em cartão, e o ELISA, sendo que a qPCR foi a técnica mais eficiente para o diagnóstico do micro-organismo.

A escolha dos métodos de diagnóstico das infecções provocadas por *Campylobacter* spp. ainda é uma questão de debate, principalmente devido à baixa sensibilidade da microbiologia convencional, aliada às detecções cruzadas com testes imunoenzimáticos e os altos custos da biologia molecular (BESSÈDE et al., 2011; DEDISTE et al., 2003; ON, 2013; PLATTS-MILLS et al., 2014)

2.7 Tratamento das campilobacterioses

A maioria das infecções causadas por *Campylobacter* não requerem intervenção terapêutica que não a de suporte, como a manutenção da hidratação e o equilíbrio de eletrólitos. No entanto, os antimicrobianos são empregados em pacientes imunodeprimidos, pacientes com sintomatologia severa ou persistente e aqueles com infecções extras intestinais (CODY et al., 2010; SMITH e FRATAMICO, 2010).

A ciprofloxacina, uma fluoroquinolona, é utilizada para tratamento empírico de gastroenterites, particularmente em casos relacionados a infecções adquiridas em viagens. Os principais alvos das quinolonas nas bactérias são a DNA girase e a topoisomerase IV, enzimas essenciais para a replicação, transcrição, recombinação e reparo do DNA bacteriano (DRYDEN et al.; 1996). No entanto, nos casos de campilobacterioses, os macrolídeos constituem o

principal tratamento de escolha. Os macrolídeos ligam-se aos nucleotídeos da subunidade ribossomal 50S, bloqueando a fase de translocação na síntese de proteínas, evitando assim a liberação do RNAt (RNA transportador) depois da formação da ligação peptídica, resultando na interrupção do alongamento da cadeia peptídica (LUANGTONGKUM et al., 2009).

A razão para o crescimento da utilização de macrolídeos como tratamento de escolha para infecções por *Campylobacter* são as altas taxas de resistência da bactéria à ciprofloxacina, devido, principalmente, ao uso desses antimicrobianos na indústria alimentícia, em aves utilizadas para consumo humano, e em menor escala, ao uso indiscriminado de ciprofloxacina para o tratamento de infecções em humanos (GRAHAM et al., 2007).

Os macrolídeos também são utilizados na produção de alimentos de origem animal, tanto para a promoção do crescimento, como para razões terapêuticas, resultando no aumento dos níveis de resistência da bactéria a esses medicamentos, que já estão sendo relatados em alguns países (GARIN et al., 2012; SIERRA-ARGUELLO et al., 2016). Por consequência, a ciprofloxacina volta a ser recomendada para o tratamento de infecções em humanos nesses casos de resistência do micro-organismo aos macrolídeos (WIECZOREK e OSEK, 2013).

2.8 Controle e prevenção das campilobacterioses

O controle de infecções por *Campylobacter* spp. nos países em desenvolvimento ainda é um desafio, pois a contaminação de água e alimentos é bastante comum. Um exemplo disso são as intervenções específicas, como um controle na criação de frangos de corte, que ainda são mínimas para demonstrar um impacto significativo na saúde pública (EFSA, 2011; OBERHELMAN et al., 2006).

Estima-se que aproximadamente 50 a 80% de todos os casos de campilobacterioses em humanos estão relacionadas ao consumo de carne de frangos mal processadas (EFSA, 2011). Os custos anuais em todo o mundo das infecções pelo micro-organismo são extremamente elevados. Por conta disso muitos países têm desenvolvido estratégias para controlar a disseminação de

espécies de *Campylobacter* na indústria avícola. Estas estratégias incluem a redução à exposição ambiental, redução ou eliminação do patógeno em frangos contaminados, e aumentada resistência dos frangos às infecções por *Campylobacter* spp. Para isso, a adição de antimicrobianos na alimentação desses animais é bastante empregada, aumentando a resistência da bactéria aos mesmos (NEWELL et al., 2011; WAGENAAR et al., 2013).

Com o desafio de desenvolver uma vacina para *C. jejuni*, alguns estudos já têm demonstrado alguma evolução. Estudos no final de 1980 mostraram uma proteção homóloga usando a cepa de *C. jejuni* 81-176. No entanto esta cepa contém mímicos de gangliosídeos GM2 e GM3, implicados na patogênese da SGB (BLACK et al, 1988). Para evitar este problema, uma cepa de *C. jejuni* sem mímicos de gangliosídeos foi descrita, a GC 8421, mas já foi demonstrado a falta de proteção homóloga em humanos (KIRKPATRICK et al., 2013). Em paralelo, o desenvolvimento de uma vacina capsular conjugada, a qual, em princípio, poderia ser mais imunogênica e evitar o subsequente risco de SGB, já conferiu proteção em primatas não humanos (MAUE et al., 2014; MONTEIRO et al., 2009; POLY et al., 2011).

As estratégias para o desenvolvimento de vacinas contra *C. jejuni* ainda são limitadas por conta do incompleto entendimento da patogênese do micro-organismo, dos epítomos de proteção, diversidade antigênica, bem como a associação com síndromes pós-infecciosas, como a artrite reativa, a SGB e Síndrome de Miller Fisher (RIDDLE e GUERRY, 2016; TRIBBLE et al., 2010).

Como medidas de prevenção contra infecções por *Campylobacter* spp., o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) recomenda o cozimento completo de produtos avícolas, além da lavagem das mãos antes e depois do preparo dos alimentos, e cuidado com a contaminação cruzada na cozinha usando tábuas de corte separadas para alimentos de origem animal e vegetal. Outras recomendações são a de não consumir leite não pasteurizado e água não tratada (CDC, 2014).

2.9 Prognóstico das campilobacterioses

Infecções por *Campylobacter* spp. geralmente causam uma doença autolimitada, com duração entre 5 a 7 dias. A sintomatologia da infecção começa, aproximadamente, entre 2 a 5 dias após a ingestão do micro-organismo, quando podem haver manifestações clínicas como diarreia com cólicas, dores abdominais aguda, acompanhadas ou não por febre, e em alguns casos, náuseas e vômitos. Em recém-nascidos e crianças, diarreia sanguinolenta, acompanhada de febre, pode ser a única manifestação apresentada pela infecção (BLASER, 1997; LEHOURS et al., 2012; SKIRROW e BLASER, 2000).

Casos de mortalidade são raros, mas pode acontecer complicações pós-infecção como a SGB, na IBD, e Síndrome de Miller Fisher, manifestações raras em pessoas saudáveis, sendo mais comuns em pessoas imunocomprometidas. A SGB, provocada principalmente por *C. jejuni*, causa paralisia em cerca de 30% dos pacientes afetados (KUWABARA e YUKI, 2013; YUKI, 2012).

Outras sintomatologias como septicemia, abscessos e meningites podem ocorrer em pessoas com doenças já pré-existentes, desnutridas, além das imunocomprometidas (FERNÁNDEZ et al., 2008). Já foi demonstrado que há associação de infecções por *Campylobacter* spp. com crianças desnutridas, além disso, casos assintomáticos são comuns nessas crianças, onde já foi observada uma excreção prolongada da bactéria em suas fezes (FIGUEROA et al., 1989; LEE et al., 2013).

Infecções por *Campylobacter* spp. na infância pode afetar o desenvolvimento físico das crianças, afetando tanto o ganho de peso, como o crescimento. No Peru, crianças que apresentaram casos sintomáticos e assintomáticos de infecções pela bactéria tiveram uma redução no crescimento e apresentaram perda de peso nos três primeiros meses de vida. Além disso, casos mais severos da infecção foram associados com maiores déficits tanto no ganho de peso, como no crescimento linear (LEE et al., 2013). Resultados parecidos foram observados no estudo caso-controle, realizado por Quetz e colaboradores (2010), na cidade de Fortaleza - CE, com redução nos escores-Z

peso-por-idade (WAZ) e peso-por-altura (WHZ), em crianças com e sem episódios diarreicos, infectadas por *C. jejuni*.

Como infecções recorrentes na infância pelo micro-organismo podem acarretar déficits no desenvolvimento físico e cognitivo das crianças, isso pode fazer com que as mesmas tenham algum tipo de prejuízo no desenvolvimento na vida adulta (FERNANDEZ et al., 2008; LEE et al., 2013). Casos como esses reforçam ainda mais que estratégias para o controle de infecções por espécies de *Campylobacter* sejam cada vez mais empregadas. Além disso, o desenvolvimento de métodos de diagnóstico rápidos para uma detecção precoce da bactéria ganha uma maior importância, além do desenvolvimento de vacinas para o controle de infecções por este patógeno (BESSÈDE et al., 2008; YOUNG et al., 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Diagnosticar e identificar a presença de genes de virulência relacionados à *Campylobacter jejuni* em crianças com diarreia moderada a severa na cidade de Fortaleza – CE, Brasil.

3.2 Objetivos primários

- Diagnosticar a presença de *Campylobacter jejuni*, através de PCR convencional, em amostras oriundas de crianças com diarreia moderada a severa na cidade de Fortaleza – CE, Brasil.
- Caracterizar o perfil de genes de virulência que codificam proteínas associadas à motilidade, quimiotaxia, adesão, invasão, produção de toxinas, captação de ferro, e resposta ao estresse oxidativo, nas amostras de crianças diagnosticadas com *Campylobacter jejuni*.

3.3 Objetivos secundários

- Avaliar a sazonalidade das infecções por *Campylobacter jejuni* isoladas de crianças com diarreia moderada a severa.
- Identificar a presença de alguns fatores determinantes para doenças diarreicas, como idade, escolaridade materna, água encanada e renda mensal familiar, nas famílias das crianças com campilobacterioses.
- Associar a presença de sinais e sintomas como febre, dor abdominal, vômito e a presença de sangue nas fezes com os genes de virulência detectados nas crianças com diarreia moderada a severa diagnosticadas com *C. jejuni*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Ética do estudo

Esse estudo faz parte de um projeto intitulado “Avaliação de um teste prático para diagnóstico etiológico de diarreias (DEC) em uma unidade hospitalar de Fortaleza”, aprovado pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP, 13.523/2007 – ANEXO A) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Albert Sabin (HIAS, 80/06 - ANEXO B).

Foi lido e assinado pelos responsáveis pelas crianças e adolescentes um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE, ANEXO C). As crianças recrutadas necessitaram de algum cuidado médico devido à doença diarreica. Todos foram pacientes das salas de emergência de dois centros de atendimentos pediátrico na cidade de Fortaleza, Ceará, Brasil, o Hospital Albert Sabin (HIAS) e o Centro de Assistência à Criança Lúcia de Fátima R. G. Sá (CAC).

O CAC é uma unidade de atendimento de média complexidade, enquanto o HIAS é de alta complexidade, ambos são conveniados ao Sistema Único de Saúde (SUS). As aprovações dos comitês de ética das duas unidades encontram-se nos anexos B e D.

4.2 Período do estudo e população participante

O estudo foi realizado entre maio de 2008 e abril de 2009, onde houve a avaliação da presença de patógenos entéricos nas crianças recrutadas. A ocorrência de diarreia foi definida como a presença de três ou mais evacuações líquidas, por no mínimo 24 horas (OMS, 2013b).

Foram recrutadas 436 crianças para o estudo residentes na zona urbana da cidade de Fortaleza, capital do estado do Ceará, Brasil. Todas foram atendidas na rede pública de saúde em dois ambulatórios de atendimento infantil, no caso, o CAC (localizado na Rua Guilherme Perdigão, 299 - Parangaba), e o HIAS (localizado na Rua Tertuliano Sáles, 544 - Vila União).

Após a obtenção do TCLE assinado pelos pais ou responsáveis, as crianças tiveram a entrada estabelecida no estudo a partir do preenchimento do critério de inclusão: crianças em atendimento ambulatorial de urgência médica por conta de doença diarreica presente. Os critérios de exclusão foram: uso prévio de antibióticos, crianças em amamentação, e a não concordância em assinar o TCLE.

4.3 Obtenção e acondicionamento dos dados epidemiológicos

Uma equipe de profissionais de saúde, que incluiu enfermeiros e técnicos em enfermagem, foram os responsáveis pelas atividades de campo do presente estudo, como o recrutamento dos participantes, a aplicação de formulários (para documentação das informações obtidas) e coletas das amostras fecais, de acordo com os procedimentos operacionais padronizados pelo Instituto de Biomedicina do Semiárido Brasileiro (IBISAB), na Universidade Federal do Ceará (UFC) Os detalhes estão descritos no **Item 4.4**.

Após a obtenção do TCLE assinado pelos pais e responsáveis, à aplicação dos questionários foi realizado. Os questionários apresentavam dados sobre critérios de inclusão (ANEXO E) e informações básicas como sexo e data de nascimento das crianças, endereço de residência, data da coleta das fezes e questões sobre o estado clínico da criança, relacionados às manifestações clínicas das doenças apresentada, que são: febre, vômito, dor abdominal e sangue nas fezes (ANEXO F). Os questionários foram encaminhados ao gerenciamento de segurança e confiabilidade pelo Setor de Segurança e Gerenciamento de Dados (SSGD), no IBISAB/UFC.

4.4 Coleta das amostras

Foram coletadas amostras de todas as crianças do estudo. Todas as amostras foram obtidas em frascos coletores estéreis ou swabs estéreis, sendo levadas ao Laboratório de Microbiologia do IBISAB/UFC em até no máximo quatro horas após a coleta, em condições refrigeradas. As amostras foram testadas para a presença de enteropatógenos por coprocultura e técnicas de microbiologia clássica (QUETZ et al., 2012), além disso, alíquotas das amostras foram armazenadas sem diluição a -80 °C para a extração do DNA bacteriano.

4.5 Extração de DNA fecal e da cepa controle

A extração do DNA das fezes foi realizada utilizando o *kit QIAamp DNA Stool Mini kit* (Qiagen, Valencia, Califórnia, EUA), em alíquotas de 200 mg, de acordo com as instruções do fabricante. Foi utilizada uma incubação das amostras em um tampão de lise a 95°C ao invés de 70°C, opção escolhida por aperfeiçoar a extração de DNA genômico dos enteropatógenos.

Para as amostras coletadas em swab anal foi utilizado o mesmo kit para a extração das alíquotas de fezes, mas com uma diferença na etapa inicial. As amostras tiveram uma etapa inicial de eluição, com incubação breve, seguida de homogeneização vigorosa, sendo utilizada metade do volume do tampão de lise requerido para as amostras de fezes (QUETZ, 2013).

Após a extração, houve a avaliação da quantidade e qualidade de todas as alíquotas de DNA extraído através de leitura em espectrofotômetro Nanodrop (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, EUA) nos comprimentos de onda 260 e 280 nm.

Os DNAs obtidos foram mantidos a -20°C até a realização do diagnóstico molecular por PCR, e a identificação dos genes de virulência. É importante ressaltar que houve uma nova avaliação da qualidade e quantidade do DNA genômico das amostras utilizadas nesse presente estudo, para comprovar a qualidade do material devido ao tempo de armazenamento das amostras. Essa avaliação foi realizada utilizando o gene *rss*, de acordo com Quetz et al., 2012.

O DNA utilizado como controle positivo das reações foi extraído da cepa de *C. jejuni* ATCC 33291 (cedida pela Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil). Para a extração do DNA as cepas liofilizadas foram levadas à ressuspensão em tampão fosfato 1X (PBS 1X), conforme instruções dos fornecedores, sendo levadas para o cultivo em ágar CVA para *Campylobacter* com suplementos de crescimento *Campylobacter Growth Supplement* (Oxoid, Hampshire, Reino Unido, SR0232), e a seletividade do meio foi obtida através da adição, conforme instruções do fabricante, de *Campylobacter Selective Supplement Blaser-Wang* (Oxoid, SR0098), que contém vancomicina, polimixina B, trimetoprima, anfotericina B e cefalotina.

A incubação ocorreu na temperatura de 42°C ± 1°C por até 72 horas em atmosfera de microaerofilia. Para a extração do DNA bacteriano foi utilizada a técnica de fervura em água, onde são coletadas duas a três colônias da

bactéria que são suspensas em água deionizada estéril e fervidas por 10 min, sendo logo após submetidas a centrifugação (956 x g, 10 minutos) em temperatura de 4°C. O sobrenadante é retirado e mantido a -20°C até a realização dos ensaios de PCR.

4.6 Diagnóstico molecular

O diagnóstico molecular foi realizado através da técnica de PCR, sendo utilizado o gene cromossomal *hipO* (gene para hipuricase de *C. jejuni*) para o diagnóstico de *C. jejuni* como já anteriormente descrito por Quetz e colaboradores (2010; 2012). Os iniciadores utilizados estão listados na **Tabela 3**. Logo após o diagnóstico, iniciadores para a detecção de 21 genes de virulência para *C. jejuni* foram utilizados. Os genes utilizados e suas respectivas funções podem ser observados na **Tabela 2**.

Os genes de virulência foram divididos em painéis de acordo com as temperaturas de anelamento, sendo realizada a técnica de PCR multiplex e uniplex para a detecção. Todos os iniciadores foram sintetizados pela Invitrogen (São Paulo, Brasil), aliquotados e armazenados de acordo com as instruções do fabricante. Os iniciadores utilizados para a pesquisa dos genes de virulência, assim como suas determinadas temperaturas de ciclagem, estão na **Tabela 3**.

TABELA 2: Genes de virulência para *Campylobacter jejuni*.

Gene de virulência	Função
<i>flaA</i>	Motilidade
<i>flgE</i>	
<i>cheA</i>	Quimiotaxia
<i>cheR</i>	
<i>cheW</i>	
<i>cadF</i>	Adesão
<i>jlpA</i>	
<i>pVir</i>	Invasão
<i>iamA</i>	
<i>ciaB</i>	
<i>pldA</i>	
<i>cdtA</i>	Toxina Citoletal Distensora
<i>cdtB</i>	
<i>cdtC</i>	
<i>fur</i>	Sistema de captação de ferro
<i>cfrA</i>	
<i>ceuE</i>	
<i>racR</i>	Resposta ao estresse e sobrevivência bacteriana
<i>dnaJ</i>	
<i>katA</i>	
<i>sodB</i>	

TABELA 3: Iniciadores utilizados nos protocolos do PCR para o diagnóstico e detecção de genes de virulência para *C. jejuni* com as condições de ciclagem para as reações de PCR uniplex e multiplex.

Genes alvo	Sequencia dos iniciadores (5'- 3')	Acesso ao GenBank, NCBI	Amplicons (pb)	Condições dos ciclos	Referencia
Gene de diagnóstico para <i>C. jejuni</i>					
<i>hipO</i> – gene para hipuricase de <i>C. jejuni</i>	S: ATGATGGCTTCTTCGGATAG AS: GCTCCTATGCTTACAACCTGC	FJ655194.1	176	35 ciclos: 20" a 95°C, 20" a 51° C, 45" a 72 °C	Quetz et al., 2010
Genes de virulência para <i>C. jejuni</i>					
PAINEL MULTIPLEX 1					
<i>cdtA</i> – <i>Cytolethal Distending Toxin</i> (CDT), porção A	S: TTGGCGATGCTAGAGTTTGG AS: ACCGCTGTATTGCTCATAGGG	AY445094.1	175		
<i>cdtB</i> – <i>Cytolethal Distending Toxin</i> (CDT), porção B	S: CTCGCGTTGATGTAGGAGCTA AS: GCAGCTAAAAGCGGTGGAGTA	AF053962.1	418	35 ciclos: 30" a 95°C, 30" a 56 °C, 45" a 72 °C	Quetz et al., 2010
<i>cdtC</i> – <i>Cytolethal Distending Toxin</i> (CDT), porção C	S: AGCCTTTGCAACTCCTACTGG AS: GCTCCAAAGTTCCATCTTC	GQ491062.1	270		
PAINEL MULTIPLEX 2					
<i>ciaB</i> – <i>Campylobacter</i> invasion antigen B	S: TCATGCGGTGGCATTAGAATGGG AS: AGGTCTAACTTCATCAACCCTTTGCCA	AF114831.1	658	35 ciclos: 30" a 95°C, 30" a 64 °C, 45" a 72 °C	Konkel et al, 1999

<i>dnaJ</i> – proteína chaperona DnaJ	S: AGGCTTTGGCTCATCACGTCG AS: GGTCGCTTCACCGCGTATGG	AF053962.1	574		Konkel et al, 1998
<i>racR</i> – DNA-binding response regulator	S: TGGGGCTTCAAATCGGTGCTGA AS: GCGACCGATGATAACATCAAGGCT	GQ491062.1	326		Hamidian et al, 2011
PAINEL MULTIPLEX 3					
<i>flaA</i> – flagelina	S: AGCTGCTTCGCAACTTTCTACGGT AS: TGCACTCTCGGCTGCAAAGTCT	AF369585.1	325	35 ciclos: 30" a 95°C, 30" a 59 °C,	Fitzerald et al, 2001
<i>pldA</i> – fosfolipase A	S: AAGAGTGAGGCGAAATTCCA AS: GCAAGATGGCAGGATTATCA	CP000025.1	385	45" a 72 °C	Fouts et al, 2005
PAINEL MULTIPLEX 4					
<i>fur</i> - ferric uptake regulator	S: ACTCAAAAAGGGGAGTGATATGCT AS: GCAATCAAGGCTTGCTGTCT	X78965.1	399		Koolman, 2015
<i>sodB</i> – proteína superóxido dismutase	S: AAGTACAGGCTGTGGCTGTGG AS: AGGGCGTGCATTACGATGAT	KF864551.1	292	35 ciclos: 45" a 94°C, 45" a 60 °C,	Desenhado pelo grupo
<i>cfrA</i> - Campylobacter ferric receptor	S: GCTTAACGGGTGGTTATGCAG AS: CGGCTGTGTAGATTGCCCTA	KP288672.1	158	1" a 72 °C	Desenhado pelo grupo
<i>jlpA</i> - jejuni lipoprotein A	S: CACAGGGAATCGACAGCATAGA AS: ACGCTCCGCCCATTAACATA	AF295104.1	111		Desenhado pelo grupo
PAINEL MULTIPLEX 5					

<i>ceuE</i> - enterochelin uptake substrate-binding protein	F: GCAGGCGTTCCTGCTAAAAA R: GCGAGATTGAGGACCAAAGG	AL111168.1	396		
<i>flgE</i> - flagellar hook protein	S: CTCCTGTTCTGCTTCACC AS: TGACGGCCTTGTAAGCTCAA	AY277720.1	270	35 ciclos: 45" a 94°C, 45" a 60 °C, 1" a 72 °C	Desenhados pelo grupo
<i>cheW</i> -proteína quimiotática W	S: CAGCATTTCTCCAACCTCCA AS: ATGCCGCTCATTGATCTAGC	EU189137.1	118		
PAINEL MULTIPLEX 6					
<i>katA</i> – catalase A	S: GCTGCTTGGGATTTTTGGAG AS: GCACGATTTACGGGCAAAG	X85130.1	593		
<i>cheA</i> - proteína quimiotática A	S: TCCATTCCTACACCACGACCT AS: CAGCAACTCGTGCAGCAAAT	EU189136.1	271	35 ciclos: 45" a 94°C, 45" a 60 °C, 1" a 72 °C	Desenhados pelo grupo
<i>cheR</i> - proteína quimiotática R	S: CACTCTCGCTCAATCGCTGT AS: GGCATTATTGGCTGCACAGA	KC692482.1	131		
REAÇÕES UNIPLEX					
<i>pVir</i> – plasmídeo associado à disenteria	S: GAACAGGAAGTGGAAAACTAGC AS: TTCCGCATTGGGCTATATG	AF226280.2	708	35 ciclos: 30" a 95°C, 30" a 55 °C, 1' a 72 °C	Bacon et al., 2002
<i>cadF</i> - Campylobacter adhesion to fibronectin	S: TTGAAGGTAATTTAGATATG AS: CTAATACCTAAAGTTGAAAC	KC330891.1	400	40 ciclos: 30" a 94°C, 30" a 43 °C, 30" a 72 °C	Konkel et al., 1999
<i>iamA</i> - invasion-associated marker	S: GCTGCTTACCAACTCGCACA AS: CCAAAGCCATGACACGTGGA	KM092517.1	235	35 ciclos: 45" a 94°C, 45" a 60 °C, 1" a 72 °C	Desenhado pelo grupo

Adaptado de: Quetz et al, 2012.

Todos os ciclos dos painéis Multiplex tiveram uma etapa inicial de desnaturação de 15' a 95°C, e uma etapa final de extensão de 10' a 72°C. Para todos os PCRs Uniplex houve uma etapa inicial de desnaturação de 5' a 95°C e uma etapa final de extensão de 10' a 72°C. S= iniciador senso; AS= iniciador anti-senso.

Para a técnica de PCR uniplex foi utilizado um volume de 20µL para cada reação, contendo 10µL de *GoTaq Green Master Mix* (Promega, Fitchburg, WI, EUA), 2 µL (2mM) dos iniciadores senso e antisenso, 2 µL de DNA molde, sendo o volume completado com água livre de nuclease. Para a reação de PCR multiplex foi utilizado um volume de 25 µL, sendo 12,5 µL de solução Multiplex *Qiagen Master Mix*, 3 µL de solução "Q" potenciadora (Qiagen), 0,5 µL (5mM) dos iniciadores senso e antisenso, o volume foi completado com água livre de nuclease. Ambos os PCRs foram realizados no termociclador *MyCycler™* (BIO-RAD, San Diego, CA, EUA).

Para a visualização dos produtos das reações amplificadas foi realizado a corrida em eletroforese com géis de agarose a 2% ou 3% (para reações de PCR uniplex e multiplex, respectivamente), corados com brometo de etídio a 1,0 µg/mL. Os géis foram visualizados no Sistema *ChemiDoc XRS* de transluminação UV (Bio-Rad, San Diego, CA, EUA).

4.7 Sequenciamento das amostras controle

Os genes *cadF*, *jlpA*, *iamA*, *ceuE*, *sodB*, *cfrA*, *fur*, *cheA*, *cheR*, *cheW*, *flgE* e *katA* não possuíam uma cepa padrão para controle positivo nesse trabalho. Para comprovar que o produto encontrado dos genes se referiam aos mesmos, amostras positivas para todos os genes foram submetidas ao sequenciamento através da empresa *GenOne Biotechnologies* (Rio de Janeiro, RJ). O sequenciamento foi realizado na plataforma ABI3730XL, baseada no método de sequenciamento de Sanger.

4.8 Análise da sazonalidade

A análise de sazonalidade das infecções causadas por *C. jejuni* foram avaliadas a partir de um comparativo entre os dados pluviométricos do período, fornecidos pelo site da Funceme (<http://www.funceme.br/index.php/areas/23->

[monitoramento/meteorol%C3%B3gico/409-precipitacao-por-radar](#)), com os diagnósticos positivos para o micro-organismo.

4.9 Acondicionamento e análise estatística dos dados

Todos os dados gerados foram armazenados em planilhas Excel, MICROSOFT® (New York, NY, EUA). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *Statistical Package for Social Sciences* versão 20.0 (SPSS Inc.™, Chicago, IL, EUA). A análise das associações foi realizada em tabelas de contingência, utilizando o teste exato de Fisher e Qui Quadrado no programa *GraphPad Prism* version 5.0 (*GraphPad*™ Software, San Diego, CA). Foi utilizado o programa CART® (*Classification and Regression Trees*) version 8.0 (*Salford Systems*, San Diego, CA) que possibilitou a classificação dos dados baseados em árvores de decisão. O nível de significância aceitável foi de $P < 0,05$.

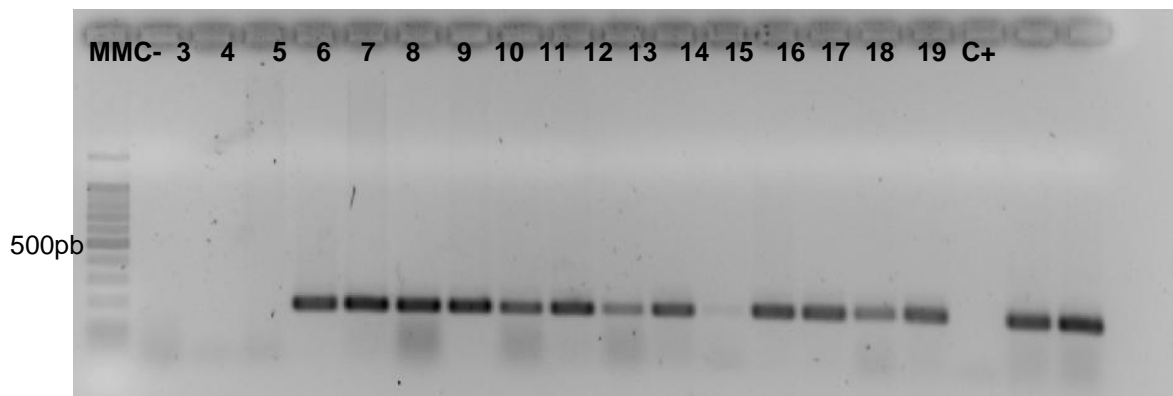
5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da população de estudo

O projeto DEC, do qual este estudo faz parte, recrutou 436 crianças que necessitaram de intervenção médica nos centros de saúde CROA e HIAS na cidade de Fortaleza - CE por apresentarem doença diarreica moderada a severa.

Para o diagnóstico molecular de *C. jejuni* foi utilizado o gene *hipO*. A detecção aconteceu em, aproximadamente, 14% (61/436) das crianças do projeto DEC (**Figura 6**).

FIGURA 6: Gel de agarose representativo a amplificação do gene *hipO* (176pb).



Coluna MM: Marcador molecular de 100pb; coluna C-: controle negativo para o gene *hipO*; colunas 3, 4, e 18: amostras negativas para o gene *hipO*; colunas 5 a 17, e 19, amostras amplificadas para o gene *hipO*, mostrando a positividade pelo tamanho das bandas apresentadas com 176 pb; coluna C+: controle positivo para o gene *hipO* utilizando o DNA da cepa de *C. jejuni* ATCC 33291.

De acordo com o sexo, 62,3% (38/61) corresponderam a gênero masculino. Em relação à idade, o maior número de casos de diarreia moderada a severa ocorreu entre as crianças com idade entre 0 - 12 meses, correspondendo a 49,18% (30/61) dos casos positivos para *C. jejuni*, apresentando significância estatística com o diagnóstico positivo para o micro-organismo, com um $P=0,0001$, risco relativo de 5.059, e IC 95% = 2.544 a 10.060. Significância estatística também ocorreu no diagnóstico em crianças com idade entre 12,1 - 24 meses, com $P=0,0427$, risco relativo de 1.695, e IC 95% = 1.038 a 2.768 (**Tabela 4**).

TABELA 4: Caracterização da população positiva para *C. jejuni* de acordo com o gênero e idade.

Parâmetros	N (%)	Valor de P
Gênero		
Masculino	38 (62,3%)	-
Feminino	23 (37,7%)	-
Total	61 (100%)	-
Idade		
0– 12 meses	30 (49,18%)	0,0001*
12,1 – 24 meses	19 (31,15%)	0,0427*
24,1 – 36 meses	5 (8,2%)	0,7911
> 60 meses	7 (11,47%)	1,000
Total	61 (100%)	-

*Significância estatística

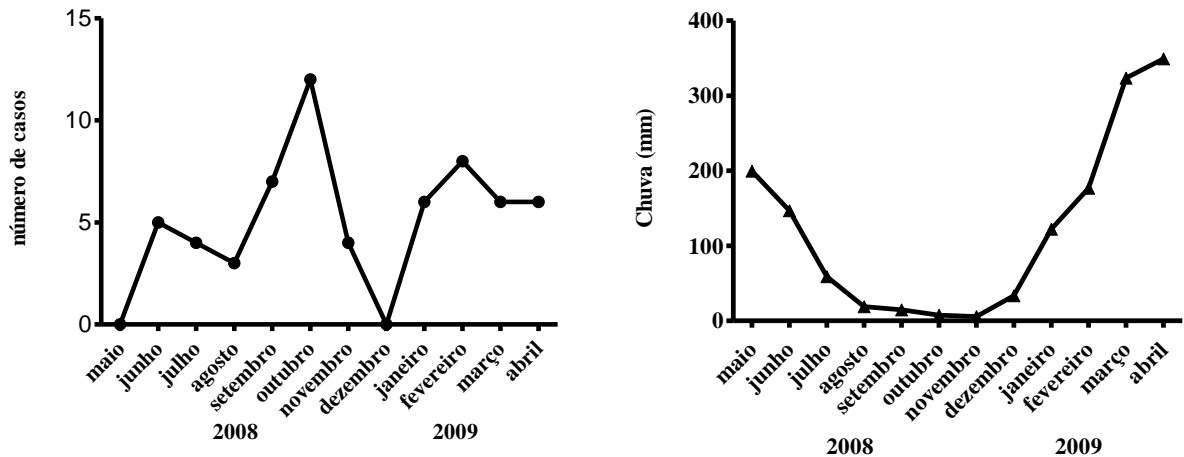
5.2 Sazonalidade de infecções por *C. jejuni* na população do estudo

Durante a realização do estudo, entre os anos de 2008 e 2009, não houve uma sazonalidade das infecções por *C. jejuni* com o período seco e chuvoso na cidade de Fortaleza – CE, apresentando $P=0,8835$.

O maior número de casos de infecções pela bactéria (12/61) ocorreu no mês de outubro de 2008, mês que faz parte do período seco na região, com pouca ou nenhuma precipitação de chuvas. O segundo maior número de casos ocorreu no mês de fevereiro de 2009 (8/61), mês correspondente ao período chuvoso na cidade de Fortaleza, apresentando uma precipitação de 176,8 mm de acordo com os dados da Funceme (2009). Os meses com maior precipitação de chuvas no período de realização do estudo, no caso março e abril de 2009 com precipitação de 323,7 e 349,4, respectivamente, também apresentaram casos de diagnóstico positivo para o micro-organismo (Funceme, 2009) (**Gráfico 1**).

GRÁFICO1: Número de casos de diagnóstico positivo para *C. jejuni* e precipitação de chuvas (mm) durante período de maio de 2008 a abril de 2009.

AB



1.A: Número de casos positivos para infecções por *C. jejuni* durante os período de maio de 2008 a abril de 2009. **1.B:** Precipitação de chuvas na cidade de Fortaleza – CE durante o período de maio de 2008 a abril de 2009.

5.3 Caracterizaçãodos fatores determinantes para doenças diarreicas

O estudo DEC levantou alguns fatores determinantes para doenças diarreicas na população de estudo, que foram, basicamente, renda mensal familiar, presença de água encanada na residência e escolaridade materna.

Tendo como base a média do salário mínimo no Brasil entre o período de 2008 e 2009 (R\$ 440,00), 60,65% (37/61) das famílias apresentaram uma renda mensal <1 salário mínimo. Apenas uma família apresentou renda mensal superior a 2 salário mínimos.

Água encanada foi presente em 83,61% (51/61) dos domicílios das família. Apenas 1 responsável não ofereceu essa informação.

Em relação à escolaridade materna, 45,9% (28/61) das mães apresentarampossuir entre 5 a 8 anos de estudo, correspondendo até o 8º ano do ensino fundamental. 37,8% (23/61) possuíam o ensino médio completo ou incompleto, e a menor proporção foram de mães que apresentaram o ensino fundamental incompleto, correspondendo a 16,39% (10/61). Os dados

relacionados à caracterização socioeconômica da população podem ser observados na **Tabela 5**.

TABELA 5: Fatores determinantes para doenças diarreicas população positivos para *C. jejuni*.

Parâmetros	N (%)	Valor de P
Renda mensal(salário mínimo R\$ 440,00)		
< 1 salário	37 (60,65%)	0,0970
1 salário	0 (0%)	-
1 - 2 salários	19 (31,15%)	0,0916
> 2 salários	1 (1,64%)	-
Não informado	4 (6,56%)	-
Total	61 (100%)	-
Água encanada		
Sim	51 (83,61%)	-
Não	9 (14,75%)	-
Não informado	1 (1,64%)	-
Total	61 (100%)	0,1444
Escolaridade materna		
< 4 anos	10 (16,39%)	0,1111
4 – 8 anos	30 (49,18%)	0,2647
> 8 anos	21 (34,4%)	0,1311
Total	61 (100%)	-

*Significância estatística, $P < 0,05$

5.4 Dados clínicos da população

De acordo com a duração dos episódios de diarreia, 90,16% (55/61) das crianças com campilobacteriose apresentaram diarreia aguda, com duração menor que sete dias. Diarreia prolongada, com duração entre 8 a 14 dias, foi observada em 6,57% (4/61) das crianças, e diarreia persistente, com duração acima de 14 dias, foi observada em 1 paciente. Não houve o relato da duração dos episódios diarreicos em apenas 1 paciente.

Em relação aos dados clínicos das crianças com diagnóstico positivo para *C. jejuni*, o sintoma mais relatado foi febre, correspondendo a 77,05% (47/61) dos casos, seguido de dor abdominal relatada em 63,93% (39/61) dos casos. Nenhum dos sintomas clínicos reportados teve significância estatística para os casos positivos para *C. jejuni*. Mas a presença de dor abdominal intensa apresentou tendência a ter significância estatística com os diagnósticos positivos para *C. jejuni*, apresentando $P = 0,0531$, com risco relativo de 1.629, e IC 95% = 0.9945 a 2.669. Todos os sinais e sintomas analisados estão apresentados na **Tabela 6**.

TABELA 6: Sintomatologia clínica relatada pelos responsáveis pelas crianças com amostra positiva para *C. jejuni*.

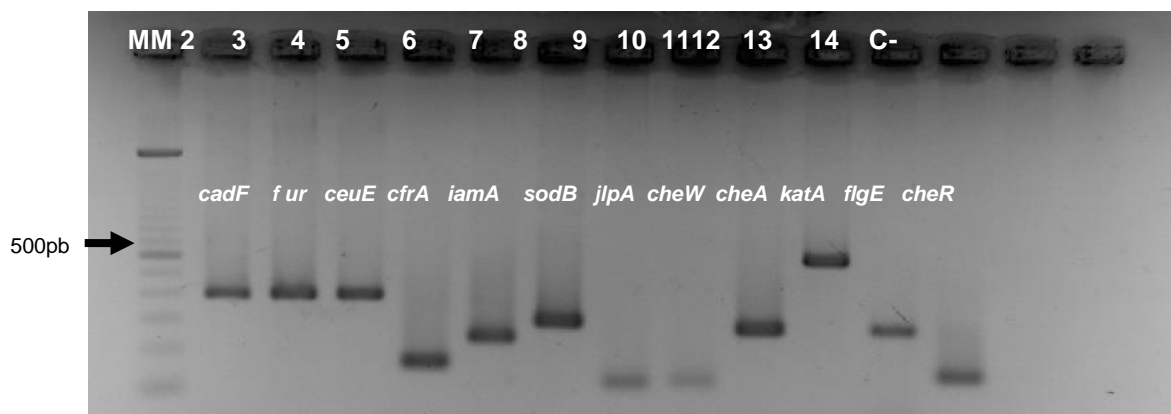
Dados Clínicos	N (%)	Valor de P
Febre		
Sim	47 (77,05%)	0,6586
Não	14 (22,95%)	
Total	61 (100%)	
Dor abdominal		
Sim, dor moderada	5 (8,2%)	0,0531
Sim, dor intensa	39 (63,93%)	
Não	16 (26,23%)	
Não soube responder	1 (1,64%)	
Total	61 (100%)	
Sangue nas fezes		
Sim	18 (29,51%)	1,000
Não	43 (70,49%)	
Total	61 (100%)	
Vômito		
Sim	38 (62,29%)	0,1046
Não	23 (37,71%)	
Total	61 (100%)	

*Significância estatística, $P < 0,05$

5.5 Produtos dos genes amplificados nas amostras sequenciadas

Para o sequenciamento, foram amplificadas seis amostras para a confirmação da presença dos genes de virulência *cadF*, *jlpA*, *iamA*, *ceuE*, *sodF*, *cfrA*, *fur*, *cheA*, *cheR*, *cheW*, *flgE* e *katA*, como controle positivos para as reações. Os produtos amplificados para a realização do sequenciamento podem ser observados na **Figura 7**.

FIGURA 7: Produto da amplificação das amostras sequenciadas como controle de qualidade para dos genes *cadF*, *jlpA*, *iamA*, *ceuE*, *sodF*, *cfrA*, *fur*, *cheA*, *cheR*, *cheW*, *flgE* e *katA*.



Coluna MM: marcador molecular de 100pb; coluna 2: amplificação do gene *cadF* (400pb); coluna 3: amplificação do gene *fur* (399pb); coluna 4: amplificação do gene *ceuE* (396pb); coluna 5: amplificação do gene *cfrA* (158pb); coluna 6: amplificação do gene *iamA* (235pb); coluna 7: amplificação do gene *sodB* (292pb); coluna 8: amplificação do gene *jlpA* (111pb); coluna 9: amplificação do gene *cheW* (118pb); coluna 10: amplificação do gene *cheA* (271pb); coluna 11: amplificação do gene *katA* (593pb); coluna 12: amplificação do gene *flgE* (270pb); coluna 13: amplificação do gene *cheR* (131pb); coluna C-: controle negativo.

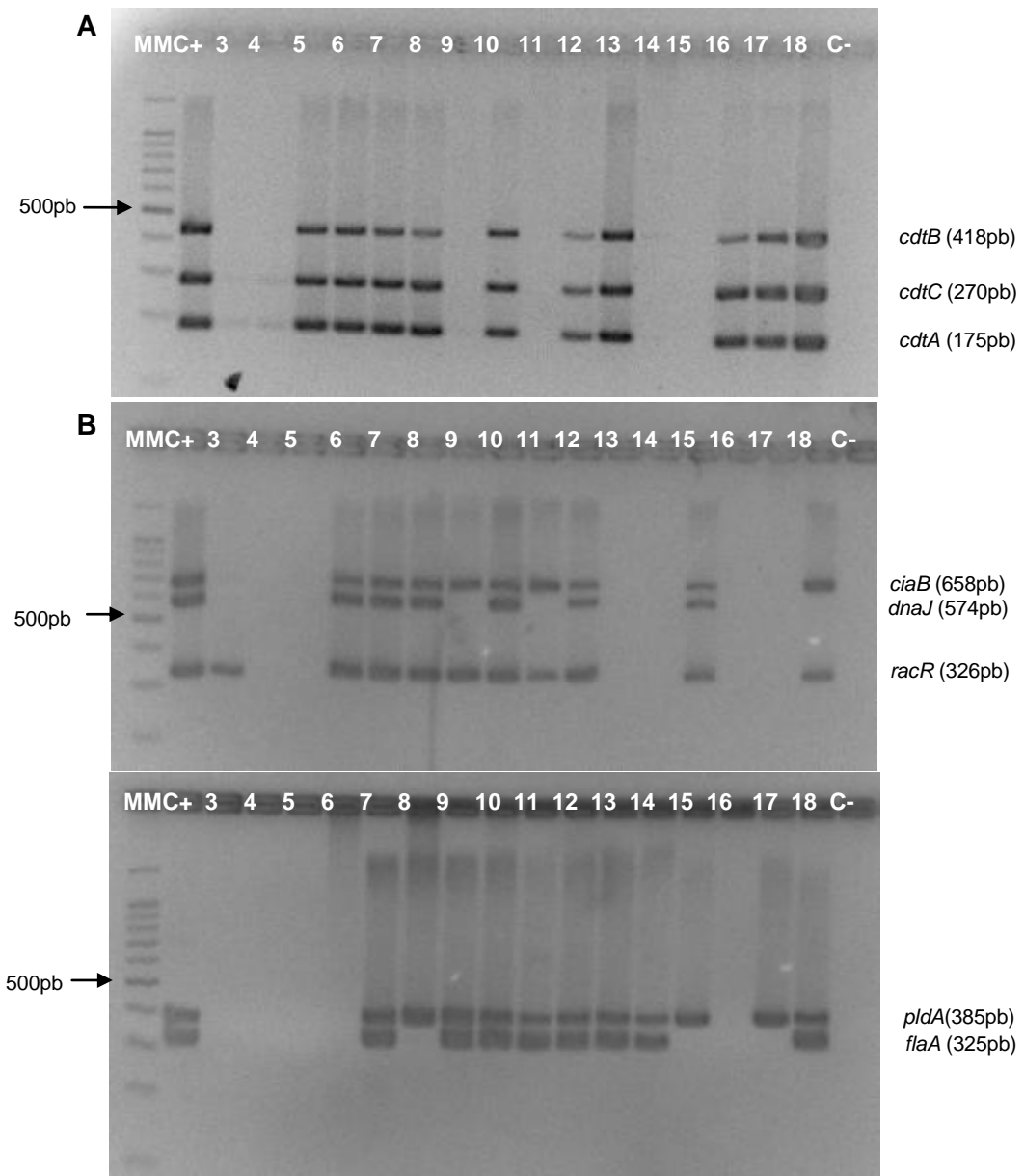
5.6 Detecção molecular dos genes de virulência de *C. jejuni*

Dentre as 61 amostras positivas para *C. jejuni* no diagnóstico molecular com o gene *hipO*, devido à problemas técnicos, apenas 51 amostras foram utilizadas para a realização da detecção molecular dos genes de virulência para a bactéria em questão, nesse estudo.

Foram pesquisados, ao todo, 21 genes de virulência referentes à motilidade (*flaA* e *flgE*), quimiotaxia (*cheA*, *cheR* e *cheW*), adesão (*cadF* e *jlpA*), invasão (*ciaB*, *pldA*, *iamA* e *pVir*), toxina citoletal distensora- CDTs (*cdtABC*), transporte e regulação de ferro (*ceuE*, *fur*, e *cfrA*) e relacionados à sobrevivência

da bactéria ao estresse oxidativo (*racR*, *dnaJ*, *katA* e *sodB*) de *C. jejuni*, divididos em painéis de PCR Multiplex e detecções simples com PCR Uniplex (Figuras 8, 9 e 10).

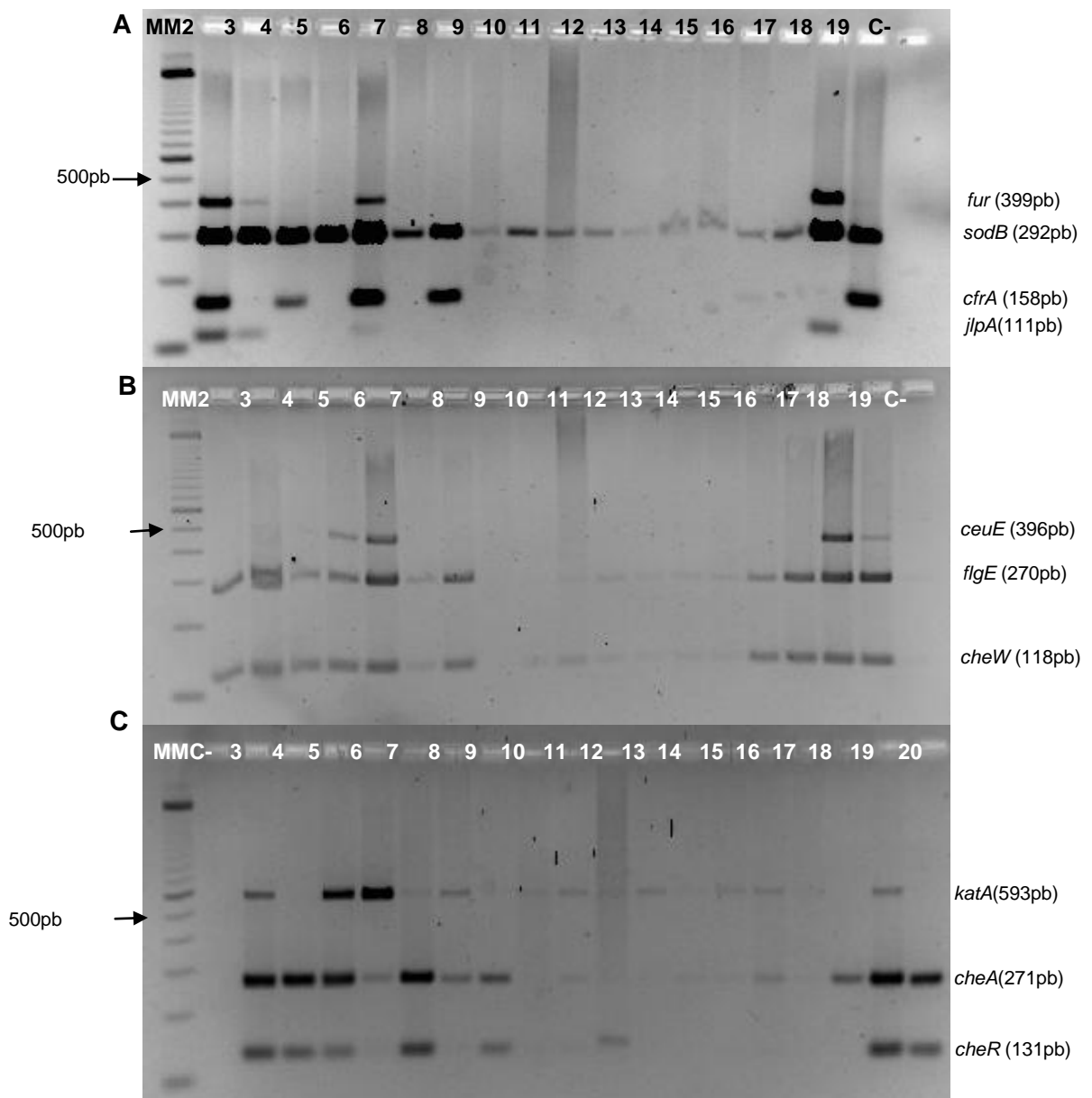
FIGURA 8: Representação da amplificação dos genes de virulência de *C. jejuni* referentes aos painéis de Multiplex 1, 2 e 3.



8.A: Multiplex 1: coluna MM: marcador molecular de 100pb; coluna C+: controle positivo utilizando o DNA da cepa de *C. jejuni* ATCC 33291; colunas 3 a 8, 10, 12, 13, 16 a 18: amostras representativas da amplificação do painel multiplex 1, correspondendo aos genes *cdtABC*, com seus respectivos produtos; colunas 9, 11, 14 e 15: amostras negativas para os genes *cdtABC*; coluna C-: controle negativo utilizando água livre de nucleases. **8.B: Multiplex 2:** Coluna MM: marcador molecular de 100pb; coluna C+: controle positivo utilizando o DNA da cepa de *C. jejuni* ATCC 33291; colunas 3, 6 a 12, 15 e 18: amostras representativas da amplificação do painel

multiplex 2, correspondendo aos genes *ciaB*, *dnaJ* e *pldA*, com seus respectivos produtos; colunas 4, 5, 13, 14, 16 e 17: amostras negativas para os genes *ciaB*, *dnaJ* e *pldA*; coluna C-: controle negativo utilizando água livre de nucleases. **8.C: Multiplex 3:** Coluna MM: marcador molecular de 100pb; coluna C+: controle positivo utilizando o DNA da cepa de *C. jejuni* ATCC 33291; colunas 7 a 15, 17 e 18: amostras representativas da amplificação do painel multiplex 3, correspondendo aos genes *pldA* e *flaA*, com seus respectivos produtos; colunas 3 a 6, e 16: amostras negativas para os genes *pldA* e *flaA*; coluna C-: controle negativo utilizando água livre de nucleases.

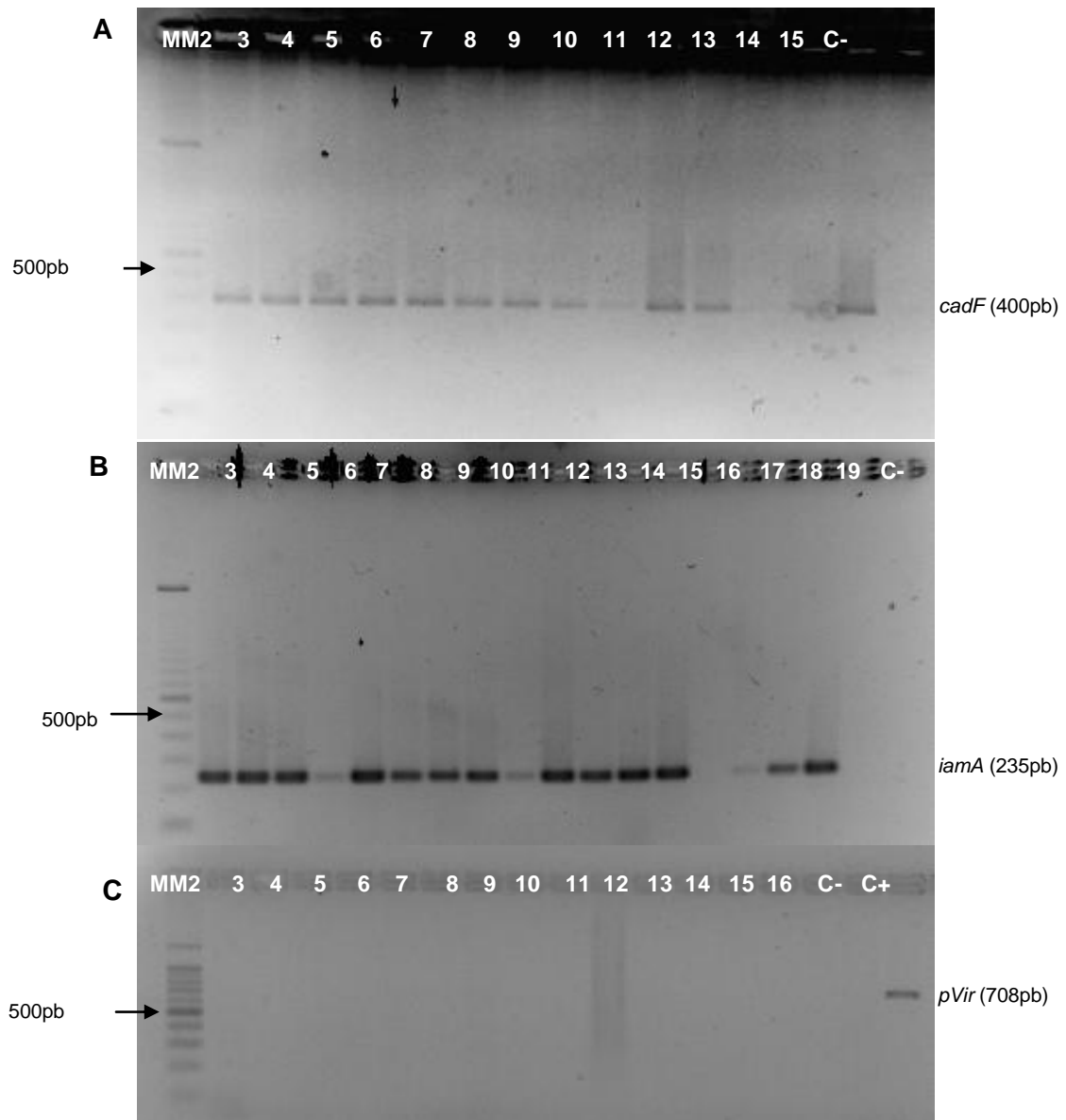
FIGURA 9: Representação da amplificação dos genes de virulência de *C. jejuni* referentes aos painéis de Multiplex 4, 5 e 6.



9.A: Multiplex 4: Coluna MM: marcador molecular de 100pb; colunas 2 a 19: amostras representativas da amplificação do painel multiplex 4, correspondendo aos genes *fur*, *sodB*, *cfrA* e *jlpA*, com seus respectivos produtos; coluna C-: controle negativo utilizando água livre de nucleases. **9.B: Multiplex 5:** Coluna MM: marcador molecular de 100pb; colunas 2 a 8, 10 a 19: amostras representativas da amplificação do painel multiplex 5, correspondendo aos genes *ceuE*, *flgE* e *cheW*, com seus respectivos produtos; coluna 9: amostra negativa para os genes

ceuE, *flgE* e *cheW*; coluna C-: controle negativo utilizando água livre de nucleases. **9.C:** **Multiplex 6:** Coluna MM: marcador molecular de 100pb; coluna C-: controle negativo utilizando água livre de nucleases; colunas 3 a 20, amostras representativas da amplificação do painel multiplex 3, correspondendo aos genes *katA*, *cheA* e *cheR*, com seus respectivos produtos.

FIGURA 10: Representação da amplificação dos genes de virulência de *C. jejuni* referentes às reações de PCR uniplex dos genes *cadF*, *iamA* e *pVir*.



10.A: Coluna MM: marcador molecular de 100pb; colunas 2 a 15: amostras representativas da amplificação do gene *cadF*, com seu respectivo produto; coluna C-: controle negativo utilizando água livre de nucleases. **10.B:** Coluna MM: marcador molecular de 100pb; colunas 2 a 14, 16 a 18: amostras representativas da amplificação do gene *iamA*, com seu respectivo produto; colunas 15 e 19: amostras negativas para o gene *iamA*; coluna C-: controle negativo utilizando água livre de nucleases. **10.C:** Coluna MM: marcador molecular de 100pb; coluna C+: controle positivo utilizando o DNA da cepa de *C. jejuni* ATCC 33291; coluna C-: controle negativo utilizando água livre de nucleases.

Os genes mais detectados nas amostras foram o *cadF* e *racR*, com 100% (51/51) de positividade nas amostras, seguidos dos genes *ciaB* e *sodB* com uma detecção em 96,1% (49/51) das amostras. O gene *pVir* foi o único com 0% (0/51) de positividade em todas as reações. A prevalência dos genes de virulência pode ser observada na **Tabela 7**.

TABELA 7: Prevalência dos genes de virulência de *C. jejuni*.

Gene	Nº de amostras positivas	Porcentagem (%)
<i>racR</i>	51/51	100%
<i>cadF</i>	51/51	100%
<i>ciaB</i>	49/51	96,1%
<i>sodB</i>	49/51	96,1%
<i>cdtABC</i>	48/51	94,1%
<i>flgE</i>	47/51	92,2%
<i>cheW</i>	46/51	90,2%
<i>iamA</i>	46/51	90,2%
<i>dnaJ</i>	45/51	88,2%
<i>cheA</i>	42/51	82,4%
<i>flaA</i>	19/51	76,1%
<i>fur</i>	34/51	66,6%
<i>katA</i>	34/51	66,6%
<i>cheR</i>	34/51	66,6%
<i>pldA</i>	23/51	45,1%
<i>jlpA</i>	22/51	43,1%
<i>cfrA</i>	16/51	31,4%
<i>ceuE</i>	11/51	21,7%
<i>pVir</i>	0/51	0%

A distribuição da presença simultânea dos genes de virulência, de acordo com sua função ficou a seguinte: genes relacionados à motilidade bacteriana (*flaA* e *flgE*) foram presentes 70,59% (36/51) das amostras; os relacionados à quimiotaxia (*cheA*, *cheR* e *cheW*) foram presentes em 64,7% (33/51); os

relacionados à adesão (*cadF* e *jlpA*) foram presentes em 43,14% (22/51); relacionados à invasão (*ciaB*, *pldA* e *iamA*) foram presentes em 35,3% (18/51); os relacionados à toxina citoletal distensora- CDTs (*cdtABC*) foram presentes em 94,1% (48/51); em relação ao transporte e regulação de ferro (*ceuE*, *fur*, e *cfrA*), os genes foram presentes em 7,81% (4/51); e os relacionados à sobrevivência da bactéria ao estresse oxidativo (*racR*, *dnaJ*, *katA* e *sodB*) os genes foram presentes em 52,94% (27/51) das amostras positivas.

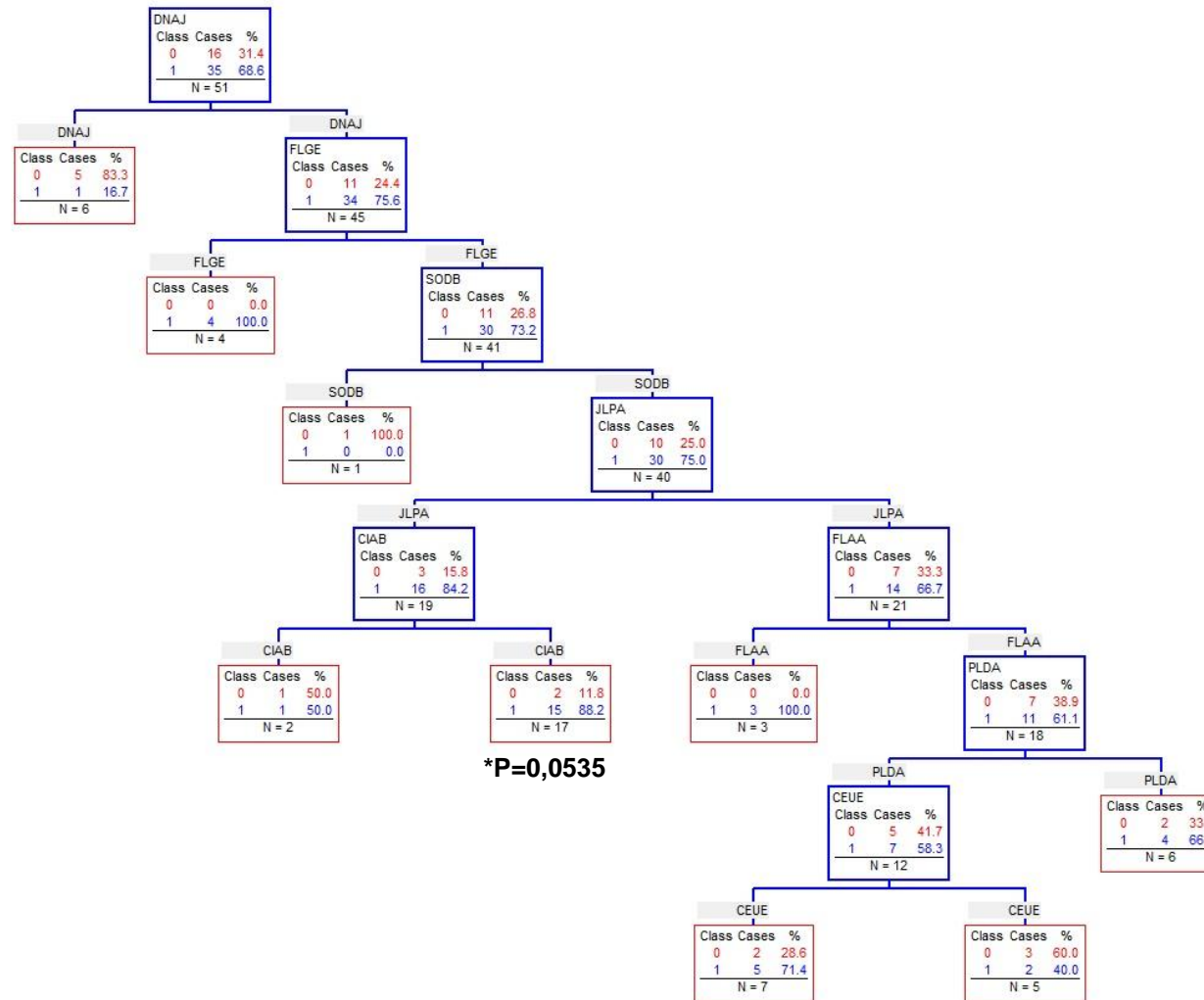
Todas as amostras positivas para *C. jejuni* tiveram no mínimo a detecção de 10 genes de virulência, mas o perfil de detecção foi bastante heterogêneo, não sendo possível definir um perfil de detecção de um grupo específico de genes, nesse caso.

5.7 Análise dos genes de virulência pelo programa CART®

Para a análise foi utilizado o programa CART® que possibilita o agrupamento de diferentes genes de virulência relacionado à patogênese do micro-organismo com os sinais e sintomas clínicos analisados nesse estudo. Os resultados do CART são expressos através de números binários, onde o número 0 se refere aos casos negativos, e o número 1 se refere aos casos positivos. O cálculo estatístico é realizado utilizando os “nós” terminais, representados na cor vermelha na árvore.

De acordo com os resultados obtidos pelas associações dos genes com os fenótipos clínicos foi observado que a presença dos genes *dnaJ*, *flgE*, *sodB*, *ciaB* e a ausência de *jlpA* apresentam tendência a significância estatística com o parâmetro clínico de dor abdominal intensa”, apresentando $P= 0,0535$, com risco relativo de 1.5, e IC 95% entre 1.078 e 2.088. Os resultados podem ser observados na **Figura 11**.

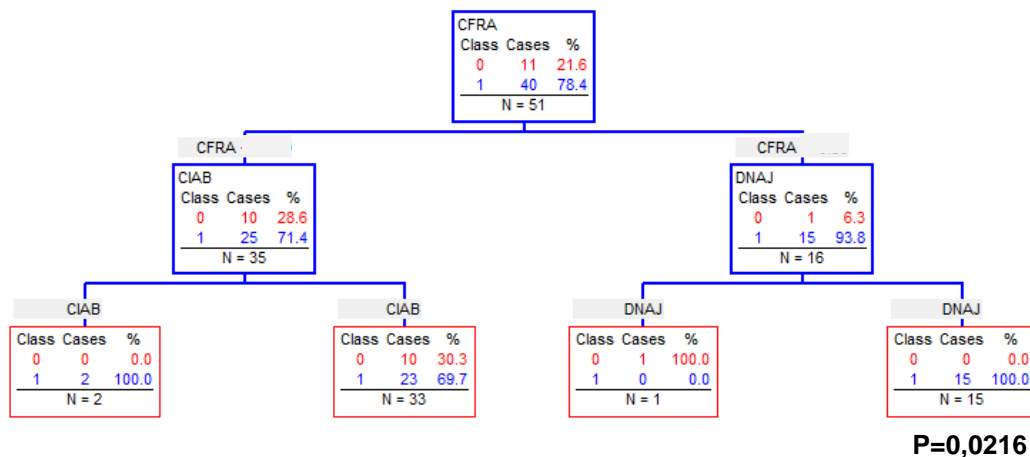
FIGURA 11: Árvore de classificação e regressão dos genes de virulência de acordo com o parâmetro clínico dor abdominal intensa.



Nós azuis = nós iniciais da árvore; Nós vermelhos = nós terminais da árvore.

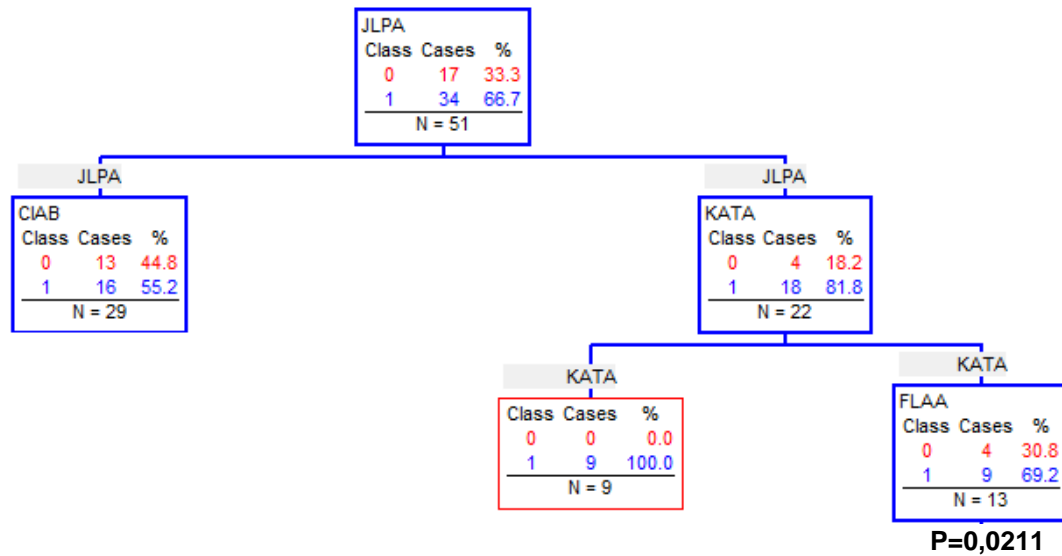
Além disso, foi identificado que a associação entre os genes *cfrAe dnaJ* apresentaram associação com o parâmetro clínico “febre” com $P = 0,0216$, com risco relativo de 1.440, e IC 95% entre 1.159 a 1.789 (**Figura 12**). A presença do gene *jlpA* com a ausência do gene *katA* foi associado com o parâmetro clínico vômito, tendo apresentado significância estatística com $P=0,0211$, risco relativo de 1.680, e IC entre 1.309 a 2.156 (**Figura 13**). E por fim, foi observado a associação entre os genes *pldA* e *ceuE* com o parâmetro clínico “sangue nas fezes”, apresentando $P=0,0013$, com risco relativo de 4.6, e IC entre 2.658 a 7.961 (**Figura 14**).

FIGURA 12: Árvore de classificação e regressão dos genes de virulência de acordo com o parâmetro clínico febre.



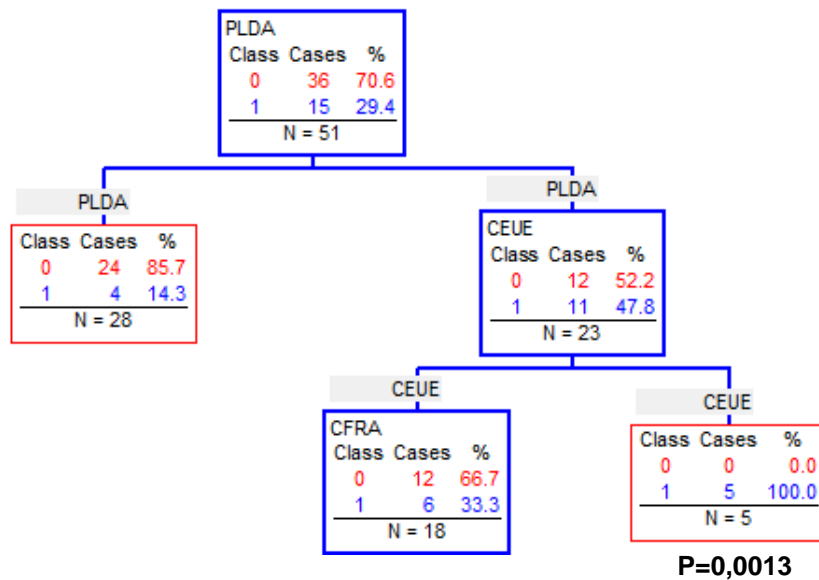
Nós azuis = nós iniciais da árvore; Nós vermelhos = nós terminais da árvore.

FIGURA 13: Árvore de classificação e regressão dos genes de virulência de acordo com o parâmetro clínico vômito.



Nós azuis = nós iniciais da árvore; Nós vermelhos = nós terminais da árvore.

FIGURA 14: Árvore de classificação e regressão dos genes de virulência de acordo com o parâmetro clínico sangue nas fezes.



Nós azuis = nós iniciais da árvore; Nós vermelhos = nós terminais da árvore.

6 DISCUSSÃO

Doenças diarreicas continuam sendo um importante problema de saúde pública no mundo, e apesar de medidas preventivas terem sido tomadas nos últimos anos, especialmente no Brasil, e, por consequência, ter havido a diminuição da mortalidade, os casos de morbidade ainda continuam elevados (BARTELT et al., 2013).

Campylobacter sp. é um dos principais patógenos associados à doenças diarreicas, principalmente em crianças menores de cinco anos de idade (LEE et al., 2013). Apesar disso, estudos epidemiológicos acerca desta bactéria ainda são escassos, e os dados são contraditórios e muitas vezes inexistentes em países em desenvolvimento (KAAKOUSH et al., 2015).

Na cidade de Fortaleza - CE, os índices de infecções diarreicas ainda são muito elevados, além disso, há a existência de vários fatores determinantes que podem contribuir para o acometimento dessas infecções, como o desmame precoce, baixa escolaridade materna e falta de saneamento básico (FAÇANHA e PINHEIRO, 2001; MOORE et al., 2010).

O DEC foi um estudo descritivo transversal realizado na cidade de Fortaleza – CE, Brasil, no período de maio de 2008 a abril de 2009. O projeto teve, ao todo, 436 crianças que necessitaram de atendimento médico por conta de infecção diarreica moderada a severa.

O projeto DEC teve como objetivo desenvolver um ensaio de PCR multiplex para a detecção de quatro bactérias que estão, comumente, relacionadas a infecções entéricas, que são *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* não O157:H7, *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. Os resultados do estudo, baseados no diagnóstico por microbiologia convencional, foram de 60 (13,76%) amostras positivas para *Shigella* spp., 22 (5,04%) amostras positivas para de *Campylobacter* spp., 21 (4,82%) amostras positivas para *E. coli* não-O157:H7 e 8 (1,83%) amostras positivas para de *Salmonella* spp. (QUETZ et al., 2012).

Para o presente estudo, um novo diagnóstico foi realizado por PCR convencional onde foram diagnosticadas 61 amostras positivas para *C. jejuni*, equivalente a 14% da população de estudo. Em contrapartida, um estudo caso-controle realizado na cidade de Fortaleza, encontrou uma prevalência de 9,6% de *Campylobacter* spp. no grupo com diarreia, e 7,2% no grupo sem diarreia,

utilizando PCR convencional como diagnóstico (QUETZ et al., 2010). A prevalência de *Campylobacter* spp. na cidade de João Pessoa – PB, foi de 2,4% em estudo caso-controle com crianças com diarreia, sendo utilizado a microbiologia convencional como diagnóstico (MORENO et al., 2010).

Na cidade de São Paulo - SP, houve uma prevalência de 7% do micro-organismo em crianças com idade entre 12-59 meses que apresentaram quadro diarreico (SOBEL et al., 2004). Em Santa Catarina a prevalência do patógeno foi de 6,2% em pesquisa realizada com portadores assintomáticos (TOSIN e MACHADO, 1995). Já em outro estudo realizado na região Sul do Brasil foi encontrado uma prevalência de 2% de campilobacterioses por coprocultura em pessoas com diarreia (SILVA et al., 2016). Todos os estudos anteriormente mencionados, utilizaram a microbiologia convencional como diagnóstico para *Campylobacter* sp. Sendo o patógeno bastante fastigioso, a baixa detecção do patógeno provavelmente se deve a essas condições especiais de cultivo que o mesmo exige.

Os dados encontrados nesse estudo em questão foram elevados se for levado em consideração os dados encontrados nos estudos nacionais. Explicações para isso podem estar na metodologia empregada para diagnóstico, que no caso foi PCR convencional, além da população investigada, que foram apenas de crianças com diarreia moderada a severa.

A diferença de sensibilidade e especificidade entre diferentes técnicas de diagnóstico para o micro-organismo já foram relatadas em diferentes estudos. Um exemplo foi o trabalho realizado por Bessedè e colaboradores (2011), onde foram utilizadas amostras de pacientes com doença gastrointestinal que precisaram ser hospitalizados. Para o diagnóstico foram utilizadas técnicas moleculares, como PCR convencional, além de imunoenzimáticos e a cultura convencional. O trabalho relatou a dificuldade em realizar a cultura microbiológica para o diagnóstico de espécies de *Campylobacter*, além de relatar a boa sensibilidade e especificidade nas técnicas moleculares e imunoenzimáticas para o diagnóstico do micro-organismo. Mas o estudo considerou como diagnóstico positivo as amostras que foram simultaneamente positivas para pelo menos uma técnica molecular e uma imunoenzimática utilizada, além do diagnóstico positivo da microbiologia convencional.

Estudo realizado por Platts-Mills e colaboradores (2014), com amostras de crianças participantes do projeto MAL-ED, também relatou a dificuldade no cultivo de *Campylobacter* spp. Nesse trabalho foi relatado um excesso de diagnóstico positivo pelo ELISA, que pôde ser provocado por reação cruzada com antígenos de outras espécies de *Campylobacter* que não possuem interesse clínico. Além disso, foi relatado que o diagnóstico por PCR é uma boa alternativa na clínica, mas principalmente em estudo epidemiológicos. Isso se deu pelo fato da técnica apresentar uma ótima especificidade e sensibilidade, além de poder realizar o diagnóstico do patógeno em nível de espécie.

Nosso grupo publicou um trabalho utilizando amostras do projeto DEC, com crianças com faixa etária entre 0-36 meses, onde foi utilizado quatro diferentes técnicas de diagnóstico para espécies de *Campylobacter*. Os resultados mostraram que o cultivo microbiológico é a técnica de diagnóstico com maior especificidade e valor preditivo positivo, quando comparada com as demais técnicas utilizadas, mas a mesma apresentou uma baixa sensibilidade. Esse estudo utilizou como padrão outro o diagnóstico positivo empregado por Bessedè e colaboradores (2011), mas foi demonstrando que o emprego apenas da PCR em tempo real, ou da PCR convencional aliada a um diagnóstico imunoenzimático podem ser boas alternativas para o diagnóstico do micro-organismo. Mas que o padrão ouro para o diagnóstico continua sendo o cultivo microbiológico, por apresentar uma especificidade de 100% (VERAS et al., 2016).

Em relação à análise de coinfeções, fazendo um comparativo com os resultados do projeto DEC de detecção de outros patógenos (*Shigella* spp., *Salmonella* spp. e *E. coli* não O157:O7), 84% das amostras positivas para *C. jejuni* através do diagnóstico por PCR apresentaram apenas a presença do patógeno, quando comparado os resultados com o diagnóstico através da microbiologia convencional para os demais patógenos. Além disso, os resultados que apresentaram coinfeção não tiveram relação com o estado clínico dos pacientes.

Coinfeções entre espécies de *Campylobacter* são esporádicas, sendo diagnosticada, na maioria das vezes, apenas uma espécie do micro-organismo (RICHARDSON et al., 2011). Estudo caso-controlado realizado na cidade de Fortaleza-CE houve a detecção de coinfeção em 2,4% dos casos entre *C.*

jejuni e *C. coli* (QUETZ et al., 2010). Uma baixa presença de coinfeção entre *C. jejuni* e *C. coli* também foi encontrada em estudo realizado por Bhadra e colaboradores (1992) na Índia, com uma frequência de 1,8% dos casos.

Apesar do baixo número de casos de coinfeções envolvendo *C. jejuni*, no projeto DEC, a aplicação do diagnóstico molecular para a detecção das demais espécies de interesse do projeto DEC poderia aumentar o número de casos de coinfeção, pois esse tipo de diagnóstico possui uma melhor sensibilidade quando comparado à microbiologia convencional (PLATTS-MILLS et al., 2014).

Em relação à sazonalidade, no período de realização desse estudo não foi observado uma sazonalidade das infecções por *C. jejuni* na cidade de Fortaleza – CE, onde foi observada a presença de diagnósticos positivos tanto na estação chuvosa, entre os meses de janeiro e julho, como na estação seca, entre os meses de agosto e dezembro. Infecções por espécies de *Campylobacter* apresentam um perfil de sazonalidade em países desenvolvidos, com um clima temperado, onde os picos de infecções ocorrem, principalmente, no verão (FRIEDRICH et al., 2016; KAASOUSH et al., 2015; MCCARTHY et al., 2012).

Em países em desenvolvimento com um clima tropical, no caso do Brasil, as infecções pelo micro-organismo são muitas vezes endêmicas, podendo ocorrer em todas as estações do ano, onde, por consequência, não se observa um perfil de sazonalidade. (EKDAHL et al., 2004; KAASOUSH et al., 2015; RAO et al., 2001). Essas informações acabam corroborando com os achados do presente estudo.

O grupo mais acometido por *C. jejuni*, em relação à idade, foram crianças com idade entre 0-12 meses, onde houve correlação estatística com os casos positivos para infecções pelo micro-organismo, sendo encontrado um $P=0,0001$. A faixa etária de crianças com idade entre 12,1-24 meses foi a segunda mais acometida, sendo também observada uma correlação estatística com os casos positivos para *C. jejuni*, apresentando um $P=0,0427$. Crianças com até 24 meses, que apresentaram quadro diarreico, tiveram significativa prevalência do patógeno no estudo MAL-ED (PLATTS-MILLS et al., 2015). Essa mesma faixa etária também foi a mais acometida em um estudo caso-controle realizado na Amazônia peruana com crianças diagnosticadas com *Campylobacter* spp. (LEE

et al., 2013). Esses estudos demonstram que provavelmente *Campylobacter* sp. é um importante patógeno envolvido em doenças diarreicas em crianças com menos de 24 meses de idade. Episódios graves de diarreia antes dos dois anos de idade podem afetar o desenvolvimento físico e cognitivo das crianças, e predispor-las a doenças crônicas na vida adulta (GUERRANT et al., 2013).

De acordo com a renda mensal, crianças deste estudo cujas famílias apresentaram uma renda mensal <1 salário mínimo foram as mais acometidas por *Campylobacter jejuni*, sendo equivalentes a 60,65% dos casos. Famílias que vivem com uma renda mensal baixa geralmente são mais predispostas à fatores que geram riscos de doenças diarreicas, como a falta de saneamento básico. Um exemplo desse caso foi um estudo realizado na Indonésia, onde infecções entéricas observadas na população mais carente da cidade de Jackarta foram associadas à falta de higiene, e a falta de qualidade dos alimentos consumidos (SIMA e ELIMELECH, 2013).

Outro exemplo ocorreu em um trabalho realizado na cidade de Ibanda, na Nigéria, onde a prevalência de diarreia na população carente dessa cidade foi maior em famílias que não tinham hábitos de higiene adequados, onde foi observado ainda o aumentado risco de infecções em crianças menores de 5 anos, além da facilidade da disseminação de micro-organismos através de insetos vetores, como moscas (OLORUNTOBA et al., 2014).

Em relação às infecções por *Campylobacter* spp., no Equador, casos de infecções provocadas por este micro-organismo foram prevalentes em famílias que possuíam uma baixa renda familiar (VASCO et al., 2014). Em Karachi, no Paquistão, famílias residentes em 24 comunidades carentes do país tiveram alto índice de infecções provocadas por *Campylobacter* spp. e *Shigella* spp. (SOOFI et al., 2011).

De acordo com a escolaridade materna, as crianças cujas mães possuíam de quatro a oito anos de estudo tiveram maior prevalência de casos de campilobacterioses. A escolaridade materna pode influenciar nos casos de morbidade e mortalidade de infecções entéricas, onde estudos já demonstraram que mães com mais anos de escolaridade têm um maior cuidado com os filhos quando os mesmos possuem algum quadro de doença diarreica (ARMAR-KLEMESU et al., 2000; KATAHOIRE et al., 2004).

Trabalho realizado por Moore e colaboradores (2010), na cidade de Fortaleza observou que a baixa escolaridade materna foi um dos fatores determinantes para casos de diarreia aguda prolongada (entre 8 a 14 dias), e diarreia persistente (acima de 14 dias) nessa população. No Paquistão, campanhas de educação materna, como o simples incentivo de lavagem de mãos, reduziram a incidência de doenças diarreicas infantis (LUDY et al., 2005). Já estudos realizados por Dargent-Molina e colaboradores (1994), demonstrou que a influência da educação materna nos casos de diarreia também dependem da situação socioeconômica das comunidades que as famílias vivem, onde a influência educacional acabou sendo maior em comunidades mais favorecidas do que em comunidades mais carentes.

Outro fator importante como o preparo e manejo adequado de alimentos pelas mães para seus filhos possam evitar infecções, principalmente por *Campylobacter* spp., que tem como uma das principais vias de transmissão alimentos mal processados. Infecções entéricas causadas por manejo inadequado de alimentos fornecidos para crianças foram associadas com mães com baixa escolaridade em Bangladesh (CHOWDHURY et al., 2016).

Apesar de todos esses dados descritos, nossos resultados não indicaram significância estatística relacionada à renda mensal, presença de água encanada e escolaridade materna. Mas vale ressaltar que mais de 80% das famílias acometidas por *Campylobacter jejuni* tinham rede de água encanada em suas residências.

O aleitamento materno também é uma fonte de proteção contra doenças diarreicas e a correlação entre diarreia aguda prolongada com desmame precoce em crianças já foi demonstrado na cidade de Fortaleza (MOORE et al., 2010). No presente projeto, o aleitamento materno foi um dos critérios de exclusão do estudo, o que impossibilitou a avaliação da influência dessa variável na população com campilobacteriose.

Infecções causadas por *Campylobacter jejuni* geralmente provocam episódios de diarreia aguda, sendo, muitas vezes, uma infecção autolimitada (MAN, 2011). O mesmo se relaciona aos dados apresentados nesse trabalho, já que 90,16% da duração dos episódios diarreicos, aqui descritos, foram classificados como agudos. Mas vale salientar que 6,56% apresentaram diarreia prolongada, o que poderia predispor essas crianças a um quadro de

desnutrição. Mas os episódios de diarreia persistente, que também foram observados, desempenham um papel fundamental no ciclo vicioso de diarreia-desnutrição na infância, onde casos de subnutrição podem ser um fator de risco, ou podem ser decorrentes da ocorrência de frequentes episódios de doenças diarreicas (GUERRANT et al., 2013; MOORE et al., 2010; MOORE, 2011).

Foram avaliados quatro sinais e sintomas clínicos nesse estudo que foram febre, dor abdominal (intensa e moderada), vômito e a presença de sangue nas fezes. Dentre os sintomas relatados, a presença de dor abdominal intensa, que teve presença em 63,93% (39/61) dos casos, obteve tendência a ser estatístico com o diagnóstico para *C. jejuni*, apresentando $P=0,0531$, com risco relativo de 1.629, e IC 95% = 0.9945 a 2.669.

A avaliação do grau de severidade de doenças diarreicas a partir de parâmetros clínicos avaliados pode ser definida com o uso de escores de gravidade. Estudo realizado por Lee e colaboradores (2014) definiu escores de gravidade de doenças diarreicas a partir da avaliação de sinais e sintomas associados a essas infecções. Os escores de gravidade foram definidos a partir de estudos coorte que apresentaram uma alta incidência de diarreia em comunidades. Esses escores podem determinar a gravidade das infecções diarreicas, prevendo assim a perda de peso, bem como a diminuição do crescimento linear nas crianças acometidas, a partir de janelas de tempo.

Esses escores de gravidade foram aplicados em outro estudo de Lee e colaboradores (2016) a partir do estudo coorte do projeto MAL-ED. Houve a avaliação a partir de parâmetros como anorexia, disenteria, febre, vômito, dentre outros, a partir do acompanhamento da presença e da duração da sintomatologia em crianças acometidas por diarreia na comunidade.

Os escores de severidade utilizados nesses estudos foram realizados em diarreia de comunidade, tendo um acompanhamento da duração da sintomatologia, podendo assim ser mensurado o grau de severidade das doenças diarreicas. Essa avaliação não pôde ser aplicada no estudo DEC por se tratar de um estudo transversal e não de acompanhamento, onde, por consequência, não houve a avaliação da duração dos sintomas clínicos apresentados pelas crianças. Além disso, a população participante do estudo apresentava doenças diarreicas moderada a severa, precisando de intervenção hospitalar, não se tratando de diarreia de comunidade. Mas os sinais e

sintomas clínicos avaliados nesse estudo corroboram com o último relatório internacional para o tratamento de diarreia infantil, não incluindo apenas a análise da desidratação (LO VECCHIO et al., 2016).

Para tentar elucidar alguns aspectos da patogenicidade das infecções causadas por *C. jejuni* nessa população com diarreia moderada a severa, foi realizada a pesquisa de genes de virulência. A patobiologia das infecções ocasionadas por espécies de *Campylobacter* é complexa e ainda pouco entendida, por isso, a pesquisa dos genes de virulência pode tentar elucidar algum aspecto dessa patogenicidade (MAN, 2011).

Os genes de virulência estudados estão associados à virulência da bactéria, pois tais genes codificam proteínas envolvidas na motilidade, quimiotaxia, adesão, invasão, produção da toxina citotética distensora- CDTs, resposta ao estresse oxidativo e regulação na captação de ferro.

Os genes relacionados à motilidade da bactéria, o *flgE* e *flaA*, são codificantes das proteínas FlgE, que faz parte da porção menor do gancho flagelar, e a proteína FlaA, que forma a maior porção do filamento final do flagelo (BOLTON, 2015). A prevalência de ambos os genes foi de 100%, em um trabalho utilizando isolados de fezes de animais e humanos (KOOLMAN et al., 2015). Estudo realizado por Muller e colaboradores (2006), também encontrou uma prevalência de 100% de ambos os genes em isolados da bactéria. A detecção do gene *flaA* é bastante variada em estudos sobre a virulência de *Campylobacter jejuni*, variando de 100% a 42% (DATTA et al., 2003; KRUTKIEWICZ e KLIMUSZKO, 2010; LAPRADE et al., 2016). No estudo realizado por Zeng e colaboradores (2015) houve uma frequência de 73,58% do gene *flaA*, prevalência similar ao encontrado nesse estudo. Apesar de nesse estudo o gene *flgE* não ter tido uma prevalência de 100%, a detecção do gene nas amostras clínicas avaliadas também foi bastante elevada.

O estudo da quimiotaxia de espécies de *Campylobacter* está sendo relacionado como um importante mecanismo de virulência aliado a motilidade da bactéria (DASTI et al., 2010). Os genes quimiotáticos estudados (*cheA*, *cheR* e *cheW*) tiveram diferentes prevalências nas amostras analisadas (82,4%, 66,6% e 90,2%, respectivamente). O único estudo encontrado que avaliou a presença desses genes foi o de Koolman e colaboradores (2015), onde os genes *cheA*, *cheR* e *cheW* tiveram prevalência de 91,66%, 66,6% e 95,83%,

respectivamente, prevalências parecidas, e até mesmo similar, no caso do *cheR*, com os resultados encontrados nesse estudo.

O gene *cadF*, que tem função na adesão da bactéria, teve uma prevalência de 100% nesse estudo. Essa prevalência é bastante similar a outros trabalhos (BISWAS et al., 2011; GHORBANALIZADGAN et al., 2014; GHUNAIM et al., 2015; KOOLMAN et al., 2015). Uma explicação para isso é que o gene é bastante conservado, principalmente em espécies como *C. jejuni* e *C. coli*. Em alguns estudos *cadF* é utilizado como gene diagnóstico para essas espécies (AMRI et al., 2007; PLATTS-MILLS et al., 2014; WIECZOREK et al., 2013). Outro gene de adesão bacteriana utilizado nesse estudo, o *jlpA*, tem uma prevalência variada em estudo de virulência da bactéria, variando de 96,15% a 54,16% (KOOLMAN et al., 2015, BISWAS et al., 2011). Nesse estudo a prevalência do gene também foi diferente dos demais, com 43,1% de detecção nas amostras.

A invasão de *C. jejuni* é um dos fatores de virulência mais estudados. Já foram descritos diversos mecanismos de invasão da bactéria, como a invasão por via paracelular, transcelular e a formação de um vacúolo no interior da célula do hospedeiro (BACKERT e HOFREUTER, 2013). Os genes *pVir*, *ciaB*, *pldA* e *iamA* estão envolvidos na invasão da bactéria.

O *pVir* é um gene plasmidial e um dos reguladores do sistema de secreção tipo IV de *C. jejuni* (BACON et al., 2002). Não houve positividade para este gene nas amostras coletadas das crianças desse estudo, apesar de a presença de sangue nas fezes ter sido relatado em 29,51% dos casos positivos para *C. jejuni*, pois a presença do gene já foi associada com casos de disenteria em pacientes infectados por *C. jejuni* (LOUWEN et al., 2006; TRACZ et al., 2005).

Os genes *ciaB* e *pldA* são bastante citados, apresentando diferentes prevalências dependendo da fonte de estudo. No caso do estudo realizado por Zeng e colaboradores (2015), em amostras positivas para *C. jejuni* de aves domésticas, as prevalências dos genes foram de 39,62% e 9,43%, respectivamente. Em amostras de água positivas para a bactéria, Laprade e colaboradores (2016) encontraram uma prevalência de 72% do gene *pldA* e 81% do gene *ciaB*. Já um estudo realizado no Iran, por Ghorbanalizadgan e colaboradores (2014), com crianças hospitalizadas que apresentaram diarreia

aguda, os genes *ciaB* e *pldA* apresentaram prevalência de 100% e 58,3%, respectivamente, nas amostras de fezes positivas para *C. jejuni*. Este estudo apresentou resultados muito similares aos encontrados com nosso estudo.

O gene *iamA* ainda não tem seus mecanismos de ação totalmente esclarecidos, mas já se sabe que o mesmo é um importante marcador de invasão em *C. jejuni* e *C. coli* (CARVALHO et al., 2001). O gene mostrou uma alta prevalência nesse estudo (90,2%), prevalência semelhante foi encontrada por Koolman e colaboradores (2015), que foi de 91,66%. Em isolados humanos, Rizal e colaboradores (2010) encontraram uma prevalência de 77,7% do gene *iamA*.

Carvalho e colaboradores (2001) observaram uma prevalência do gene em 85% dos pacientes sintomáticos para infecções por *Campylobacter* spp., e uma prevalência de 20% para pacientes assintomáticos. Resultados do estudo realizado por Rozynek e colaboradores (2005) mostraram uma prevalência de 20% do gene em amostras humanas. Baseado nesse resultado o trabalho sugeriu que o gene não é um forte marcador de invasão da bactéria, pois os resultados de prevalência do mesmo variam de acordo com a amostra clínica utilizada e com a espécie de *Campylobacter*.

Em relação à prevalência encontrada no presente estudo, o gene *iamA* pode ser um bom indicativo para invasão de *C. jejuni* em amostras clínicas de fezes de pessoas acometidas com diarreia moderada a severa, tendo em vista a alta prevalência encontrada, que foi de 90,2%. Para definir isso, estudos mais detalhado acerca da função desse gene devem ser realizados.

A toxina citoletal distensora (CTD) é a única toxina conhecida, até agora, que *C. jejuni* produz. A toxina é subdividida em 3 cadeia proteicas que são regulados pelos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* (LAI et al., 2016). No presente estudo houve a detecção concomitante dos 3 genes de virulência em 94,1% das amostras positivas para o micro-organismo. A presença concomitante dos genes também foi encontrada por Ghorbanalizadgan e colaboradores (2014), que obtiveram uma prevalência de 58,3% em amostras de crianças com idade menor que cinco anos, com sintomas de diarreia aguda. Além disso, a severidade da doença foi associada com a presença destes genes.

A detecção concomitante dos três genes foi encontrada também em amostras de pacientes com diarreia na Tailândia, com prevalência de 97,7%,

onde a presença da toxina também foi associada à severidade do quadro clínico dos pacientes acometidos por *C. jejuni* (TALUKDER et al., 2008). Para a atividade da toxina é necessário a ação ativa das três proteínas do complexo CdtS que formam uma holotoxina tripartite responsável pela toxicidade celular (LARA-TEJERO et al., 2001), provavelmente esta seja a explicação da severidade da doença sendo associada a presença dos genes *cdtABC* encontrada em pacientes com quadro de doença diarreica aguda (GHORBANALIZADGAN et al., 2014; TALUKDER et al., 2008), apesar de que essa presença não foi associada à severidade dos casos nas crianças desse estudo, mesmo apresentando diarreia moderada a severa.

Os genes relacionados ao transporte e regulação de ferro da bactéria (*ceuE*, *cfrA* e *fur*) não tiveram uma alta prevalência comparado aos demais detectados nesse estudo. *C. jejuni* possui um sofisticado mecanismo de eliminação e captação de ferro do organismo. Este mecanismo envolve a ação dos sideróforos que se ligam aos íons ferro com grande afinidade, regulando a entrada e saída do íon no micro-organismo (ANDREWS et al., 2003).

O gene *fur* codifica um dos responsáveis pela regulação da ação dos sideróforos e, nesse estudo, o mesmo apresentou prevalência de 66,6. O único trabalho encontrado que detectou o gene *fur* foi o de Koolman e colaboradores (2015), encontrando uma alta prevalência de 91,66%.

O gene *ceuE* é responsável por regular a enteroquelina, um sideróforo de alta afinidade ao íon ferro (GONZALEZ et al., 1997). Nesse estudo o gene apresentou uma baixa prevalência, sendo detectado em 21,7% das amostras. A detecção do gene foi de 83,33% no estudo realizado por Koolman e colaboradores (2015). Já em estudo realizado por Zeng e colaboradores (2015), em amostras de animais, a prevalência do gene foi de 65,2%, mas no estudo de Bang e colaboradores (2003), também utilizando amostras de animais, a prevalência do gene foi de 100%. Em amostras de fezes diarreicas de humanos a prevalência do gene foi de 81,8% (RIPABELLI et al., 2010). Esses estudos mostram que a prevalência do gene *ceuE* é bem diversificada, dependendo o tipo amostral utilizado. Mas estudos que investigaram a prevalência do gene em amostras de humanos com episódios de diarreia são raros, e nenhuma associação com sintomatologia clínica foi encontrada.

O gene *cfrA* apresentou nesse estudo uma prevalência de 31,4%. Esse gene também regula um sideróforo que possui alta afinidade com o íon ferro, o FeEnt. O gene também é essencial para a colonização da bactéria no intestino (CARSWELL et al., 2008).

A resistência da bactéria ao excesso de oxigênio também é um importante fator de virulência. Nesse estudo foi levantado a prevalência de quatro genes responsáveis pela regulação dessa função, o *racR*, *dnaJ*, *katA* e *sodB*.

O gene *racR* é um importante gene tanto para a termo tolerância do micro-organismo como para a colonização no epitélio intestinal, fazendo parte do sistema de proteínas RacRS (BRAS et al., 1999). O gene teve prevalência em 100% das amostras utilizadas nesse trabalho. Além desse estudo, *racR* apresentou alta positividade em amostras humanas, sendo detectado em 94,23% no estudo realizado por Biswas e colaboradores (2011), e de 98,2% em trabalho realizado por Datta e colaboradores (2003). Ambos os trabalhos tiveram prevalência parecidas com esse estudo, além disso, ambos também utilizaram amostras de fezes humanas com diarreia em seus estudos.

O gene *dnaJ* codifica uma proteína chaperona, a DnaJ, estando relacionada tanto à resistência da bactéria a altas temperaturas, como ao crescimento da bactéria no hospedeiro (ZIPRIN et al., 2001). Nesse estudo o gene teve prevalência de 88,2% nas amostras. Uma alta prevalência também foi encontrada em estudos de Biswas e colaboradores (2011), com 94,23%, e em trabalho realizado por Laprade e colaboradores (2016), com uma prevalência de 88% do gene. Prevalências parecidas com a encontrada nesse estudo. Koolman e colaboradores (2015) encontraram uma prevalência de 100% do gene *dnaJ* em *C. jejuni* e *C. coli*. Os resultados obtidos por Datta e colaboradores (2003), também apresentaram uma alta prevalência do gene, com uma presença de 98,2%.

Codificantes das proteínas superóxido dismutase, e catalase, os genes *sodB* e *katA* constituem um dos principais sistemas de defesa da bactéria contra o estresse oxidativo (ATACK e KELLY et al., 2009; OH et al., 2015). O gene *sodB* foi um dos mais prevalentes nesse estudo, sendo identificado em 96,1% das amostras. Prevalências de 100% a 94,23% (BISWAS et al., 2011; HANNING et al., 2010; KOOLMAN et al., 2015) foram encontradas, mostrando que há uma

alta identificação do gene em todos os estudos encontrados, corroborando com os achados desse estudo.

Estudo realizado por Koolman e colaboradores (2015), foi o único encontrado que investigou a prevalência do gene *katA* em isolados de amostras fecais humanas, apresentando prevalência de 50%. No nosso estudo, a prevalência do gene foi superior, sendo detectado em 66,6% das amostras clínicas avaliadas.

Para a associação dos genes de virulência utilizados nesse estudo e os sinais e sintomas clínicos apresentados pelas crianças foi utilizado o programa CART®, que tem sua função baseada na formação de árvores de classificação e regressão para associar diferentes variáveis. O princípio básico do programa é a formação de árvores onde as diferentes associações formam ramos com nós iniciais e terminais. A tarefa realizada no programa foi encontrar a melhor divisão de nós para se escolher um melhor ponto de corte dentro dos nós resultantes (ZHOU e MCARDLE, 2015).

De acordo com os resultados obtidos no programa, a associação entre os genes *dnaJ*, *flgE*, *sodB*, *ciaB* e ausência de *jlpA* possuem uma tendência estatística com os casos de dor abdominal intensa relatado nesse estudo, apresentando $P=0,0535$. Esse valor de P foi semelhante com o valor de P encontrado quando houve a associação entre os casos de dor abdominal intensa com o diagnóstico positivo para *C. jejuni* ($P=0,0531$).

Não foi encontrado nenhum trabalho que possa explicar a influência desses determinados genes na sintomatologia clínica apresentada por pacientes acometidos por infecções provocadas pelo patógeno. Os genes de virulência apresentados têm suas funções baseadas basicamente na colonização (*dnaJ* e *flgE*), invasão (*ciaB*) e sobrevivência bacteriana (*dnaJ* e *sodB*) no hospedeiro, onde a ligação dessas diferentes funções pode ter alguma influência na apresentação clínica de dor abdominal intensa nos pacientes com campilobacterioses.

A associação dos genes *cfrA* e *dnaJ* apresentaram significância estatística com os casos de febre reportados. O gene *cfrA* está relacionado à regulação dos níveis de ferro no micro-organismo, enquanto o gene *dnaJ* está relacionado à colonização e sobrevivência bacteriana (CARSWELL et al., 2008; ZIPRIN et al., 2001). De acordo com as pesquisas realizadas, esse foi o primeiro estudo

que relacionou a associação desses genes com essa sintomatologia clínica apresentada pelas crianças.

Em relação à presença do sintoma de vômito relatados, foi observado que a presença do gene *jlpA*, que tem sua função relacionada com a adesão bacteriana (JIN et al., 2011) e a ausência do gene *katA*, que está relacionado com a sobrevivência do patógeno ao estresse oxidativo (ATACK e KELLY, 2009) está relacionado com essa sintomatologia apresentada pelas crianças. Não foi encontrado estudo relacionando a presença e ausência desses respectivos genes com a sintomatologia apresentada, podendo, assim, este ser o primeiro estudo a apresentar essa associação.

Os genes *pldA* e *ceuE*, apresentaram significância estatística com o parâmetro clínico sangue nas fezes. O gene *pldA* está relacionado com a fosfolipase A, uma fosfolipase que cliva a membrana fosfolipídica causando a lise celular. Essa lise foi observada em estudo feito por Grant e colaboradores (1997), onde o micro-organismo conseguiu lisar eritrócitos em cultura de células. Mas em comparação com outras bactérias, espécies de *Campylobacter* que não possui um sistema hemolítico tão eficiente. Para realizar a hemólise, a bactéria precisa da aquisição de ferro a partir de células do hospedeiro (HOSSAIN et al., 1993; SIMON et al., 1995).

A aquisição de ferro é fundamental para a colonização bem sucedida de muitos micro-organismos enteropatogênicos, incluindo espécies de *Campylobacter*, que realizam essa função através de sideróforos, e têm sua função regulada por alguns genes, como o *ceuE*, gene responsável pela regulação da função da enteroquelina (GONZALEZ et al., 1997).

Essa associação entre proteínas que causam a lise celular, e a aquisição de ferro para a potencialização dessa função, pode estar relacionado com a associação entre os genes *pldA* e *ceuE* com o parâmetro sangue nas fezes analisado nesse estudo. No estudo coorte realizado pelo estudo MAL-ED, houve associação entre crianças que apresentaram diarreia sanguinolenta, com casos de *Campylobacter* spp. (PLATTS-MILLS et al., 2015). Esse dado reforça os achados desse resultado encontrado no presente estudo.

Nosso estudo mostrou a presença de alguns fatores determinantes para infecções por *Campylobacter jejuni*, além da associação de alguns genes de virulência com o estado clínico de crianças que apresentaram diarreia moderada

a severa. Mas algumas limitações podem ser apontadas, como o fato de o projeto DEC ter sido um estudo transversal, onde as análises de alguns parâmetros clínicos foram limitadas quando comparado com estudos caso-controle ou coortes. O estudo de escores clínicos ficou limitado para mensurar a gravidade das infecções. Por isso, para um melhor entendimento das infecções causadas por *Campylobacter jejuni* estudos mais detalhados acerca de fatores que causam essa infecção, como um maior número de sinais e sintomas clínicos, estudo nutricional, dados antropométricos e fatores socioeconômicos, devem ser realizados. Ademais, a investigação da expressão das proteínas associadas aos genes de virulência estudados e do genoma dos isolados bacterianos seriam importantes para determinar os mecanismos pelos quais esses genes estariam envolvidos na patogênese.

7 CONCLUSÃO

A realização desse estudo descritivo transversal mostrou que na cidade de Fortaleza - CE, Brasil há grande presença de *C. jejuni* população infantil diagnosticadas com diarreia moderada a severa. Os resultados foram mais expressivos em crianças com menos de dois anos de idade, onde a baixa renda mensal e a baixa escolaridade materna podem ser fatores determinantes para a infecção pela bactéria nessa população.

Além disso, o estudo dos genes de virulência nessa população identificou uma alta e heterogênea prevalência dos mesmos. Onde a associação dos mesmos com parâmetros clínicos de febre, vômito e de sangue nas fezes foram correlacionados aos casos de *C. jejuni* nesse estudo a partir da associação com alguns genes de virulência.

Esses resultados sugerem que a presença desses determinados genes possa estar relacionada com a severidade de infecções por *Campylobacter jejuni* em crianças que apresentaram quadro de diarreia moderada a severa. Para demonstrar isso, estudos mais amplos sobre a presença da bactéria, patobiologia e fatores determinantes devem ser realizados. Além disso, o estudo da expressão dessas proteínas, reguladas pelos genes que foram abordados nesse estudo, devem ser realizados, para o melhor entendimento dos mecanismos de patogenicidade do micro-organismo.

REFERENCIAS

- ABREU, M. T.; PALLADINO, A. A.; ARNOLD, E. T.; KWON, R. S.; MCROBERTS, J. A. Modulation of barrier function during Fas-mediated apoptosis in human intestinal epithelial cells. **Gastroenterology**, v.119, p. 1524–1536, 2000.
- ADAK, G. K.; MEAKINS, S. M.; YIP, H.; LOPMAN, B. A.; O'BRIEN, S. J. Disease risks from foods, England and Wales, 1996–2000. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 11, p. 365–372, 2005.
- AGUILAR, C.; JIMÉNEZ-MARÍN, A.; MARTINS, R. P.; GARRIDO, J. J. Interaction between *Campylobacter* and intestinal epithelial cells leads to a different proinflammatory response in human and porcine host. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 162, p. 14–23, 2014.
- ANDREWS, S. C.; ROBINSON, A. K., RODRIGUEZ-QUINONES, F. Bacterial iron homeostasis. **FEMS Microbiol.Rev.**, v. 27, p. 215–237, 2003.
- APEL, D.; ELLERMEIER, J.; PRYJMA, M.; DIRITA, V. J.; GAYNOR, E. C. Characterization of *Campylobacter jejuni* RacRS reveals roles in the heat shock response, motility, and maintenance of cell length homogeneity. **J Bacteriol.**, v. 194, p. 2342–2354, 2012.
- ARMAR-KLEMESU, M.; RUEL, M. T.; MAXWELL, M. T.; LEVIN, C. E.; MORRIS, S. S. Poor maternal schooling is the main constraint to good child care practices in Accra. **J Nutr.**, v. 130, p. 1597–607, 2000.
- ASAKURA, M.; SAMOSORNSUK, W.; HINENOYA, A.; MISAWA, N.; NISHIMURA, K.; MATSUHISA, A.; YAMASAKI, S. Development of a cytolethal distending toxin (cdt) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the detection and identification of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter fetus*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 52, p. 260-266. 2008.
- ASKOURA, M.; SARVAN, S.; COUTURE, J. F.; STINTZI, A. The *Campylobacter jejuni* Ferric Uptake Regulator Promotes Acid Survival and Cross-Protection against Oxidative Stress. **Infect Immun.**, v. 22, n. 84, e.5, p. 1287-300, 2016.
- ATAK, J. M.; KELLY, D. J. Oxidative stress in *Campylobacter jejuni*: responses, resistance and regulation. **Future Microbiol.**, v. 4, n. 6, p. 677-90, 2009.
- BACKERT, S.; HOFREUTER, D. Molecular methods to investigate adhesion, transmigration, invasion and intracellular survival of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 95, p. 8–23, 2013.
- BACON, D. J.; ALM, R. A.; HU, L.; EWING, C.P.; BATCHELOR, R.A.; TRUST, T. J.; GUERRY, P. DNA sequence and mutational analysis of the *pVir* plasmid of *Campylobacter jejuni* 81-176. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 6242– 6250, 2002.
- BAKER, M. G.; KVALSVIG, A.; ZHANG, J.; LAKE, R.; SEARS, A.; WILSON, N. Declining Guillain-Barre syndrome after campylobacteriosis control, New Zealand, 1988–2010. **Emerg Infect Dis.**, v. 18, p. 226–233, 2012.

BANG, D. D.; MOLLER, N. E.; SCHEUTZ, F.; PEDERSEN, K.; HANDBERG, K.; MADSEN, M. PCR detection of seven virulence and toxin genes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from Danish pigs and cattle and cytolethal distending toxin production of the isolates. **J Appl Microbiol.**, v. 94, p. 1003–1014, 2003.

BANG, D. D.; NIELSEN, E. M.; SCHEUTZ, F.; PEDERSEN, K.; HANDBERG, K.; MADSEN, M. PCR detection of seven virulence and toxin genes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from Danish pigs and cattle and cytolethal distending toxin production of the isolates. **J Appl Microbiol.**, v. 94, n. 6, p. 1003-1014, 2003.

BARTELT, L. A.; LIMA, A. A.; KOSEK, M.; PEÑATARO, Y. P.; LEE, G.; GUERRANT, R. L. “Barriers” to Child Development and Human Potential: The Case for Including the “Neglected Enteric Protozoa” (NEP) and Other Enteropathy-Associated Pathogens in the NTDs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 4, 2013.

BECKER, S.; EJLERTSEN, T.; KRISTENSEN, B.; NORGAARD, M.; NIELSEN, H. Is the incidence of perimyocarditis increased following *Campylobacter jejuni* infection?. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v. 26, p. 927–929, 2007.

BELTINGER, J.; DEL BUONO, J.; SKELLY, M.; THORNLEY, J.; SPILLER, R. C.; STACK, W. A.; HAWKEY, C. J. Disruption of colonic barrier function and induction of mediator release by strains of *Campylobacter jejuni* that invade epithelial cells. **World J Gastroenterol.**, v. 14, p. 7345–7352, 2008.

BESSÈDE, E.; DELCAMP, A.; SIFRÉ, E.; BUISSONNIÈRE, A.; MÉGRAUD, F. New methods for detection of campylobacters in stool samples in comparison to culture. **J. Clin. Microbiol.**, v. 49, n. 3, p. 941-944, 2011.

BHADRA, R. K.; DUTTA, P.; BHATTACHARYA, S. K.; DUTTA, S. K.; PAL, S. C.; BALAKRISHNAN, N. G. *Campylobacter* species as a cause of diarrhea in children in Calcutta. **J Infect.**, v. 24, p. 55–62, 1992.

BHUTTA, Z. A.; SOMMERFELD, J.; LASSI, Z. S.; SALAM, R. A.; DAS, J. K. Global burden, distribution, and interventions for infectious diseases of poverty. **Infect Dis Poverty.**, v. 3, n. 21, 2014.

BISWAS, D.; HANNON, S. J.; TOWNSEND, H. G.; POTTER, A.; ALLAN, B. J. Genes coding for virulence determinants of *Campylobacter jejuni* in human clinical and cattle isolates from Alberta, Canada, and their potential role in colonization of poultry. **Int Microbiol.**, v. 14, n. 1, p. 25-32, 2011.

BLACK, R. E., LEVINE, M. M., CLEMENTS, M. L., HUGHES, T. P., BLASER, M. J. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. **J. Infect. Dis.** 157, 472–479, 1988.

BLASER MJ. Epidemiologic and clinical features of *Campylobacter jejuni* infections. **J Infect Dis.**, v. 176, p.103–5, 1997.

BLASER, M. J.; HOVERSON, D.; ELY, I. G.; DUNCAN, D. J.; WANG, W. L.; BROWN, W. R. Studies of *Campylobacter jejuni* in patients with inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 86, p. 33–38, 1984.

BOLTON, D. J. *Campylobacter* virulence and survival factors. **Food Microbiol.**, v. 48, p. 99-108, 2015.

BOURKE, B.; CHAN, V. L.; SHERMAN, P. *Campylobacter upsaliensis*: waiting in the wings. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.11, p. 440–449, 1998.

BOYLE, E. C.; BROWN, N. F.; FINLAY, B. B. *Salmonella* enterica serovar Typhimurium effectors SopB, SopE, SopE2 and SipA disrupt tight junction structure and function. **Cell Microbiol.**, v. 8, p. 1946–1957, 2006.

BRÁS, A. M.; CHATTERJEE, S.; WREN, B. W.; NEWELL, D. G.; KETLEY, J. M.A novel *Campylobacter jejuni* two-component regulatory system important for temperature-dependent growth and colonization. **J Bacteriol.**, v. 181, v. 10, 3298-302, 1999.

BRÁS, A. M.; CHATTERJEE, S.; WREN, B. W.; NEWELL, D. G.; KETLEY, J. M.A novel *Campylobacter jejuni* two component regulatory system important for temperature dependent growth and colonization. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 3298–3302, 1999.

BRONOWSKI, C.; JAMESC. E., WINSTANLEY, C. Role of environmental survival in transmission of *Campylobacter jejuni*. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 356, p. 8–19, 2014.

BULLMAN, S.; O'LEARY, J.; CORCORAN, D.; SLEATOR, R. D.; LUCEY, B. Molecular- based detection of non-culturable and emerging campylobacteria in patients presenting with gastroenteritis. **Epidemiol. Infect.**, v. 140, p. 684–688., 2012.

BUTCHER, J.; FLINT, A.; STAHL, M.; STINTZI, A. *Campylobacter* Fur and PerR regulons Iron Uptake and Homeostasis in Microorganisms. **Caister Academic**, Norfolk, UK, p. 168–202, 2010.

BUTCHER, J.; SARVAN, S.; BRUNZELLE, J. S.; COUTURE, J. F.; STINTZI, A. Structure and regulon of *Campylobacter jejuni* ferric uptake regulator Fur define apo-Fur regulation. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 109, n. 25, p. 10047-52, 2012.

BUTZLER, J. P.; DEKEYSER, P.; DETRAIN, M.; DEHAEN, F. Related vibrio in stools. **Journal of Paediatrics**, v. 82, p. 493-495, 1973.

CARMO, G. M.; YEN, C.; CORTES, J.; SIQUEIRA, A. A.; OLIVEIRA, W. K.; CORTEZ-ESCALANTE, J. J.; LOPMAN, B.; FLANNERY, B.; OLIVEIRA, L. H.; CARMO, E. H.; PATEL, M. Decline in diarrhea mortality and admissions after routine childhood rotavirus immunization in Brazil: a time-series analysis. **PLoS Med.**, v. 8, 2011.

CARRILLO, C. D.; TABOADA, E.; NASH, J. H. E.; LANTHIER, P.; KELLY, J.; LAU, P.C.; VERHULP, R.; MYKYTCZUK, O.; SY, J.; FINDLAY, W. A.; AMOAKO, K.; GOMIS, S.; WILLSON, P.; AUSTIN, J. W.; POTTER, A.; BABIUK, L.; ALLAN,

B.; SZYMANSKI, C. M. Genome-wide expression analyses of *Campylobacter jejuni* NCTC11168 reveals coordinate regulation of motility and virulence by *flhA*. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 20317-20338, 2004.

CARSWELL, C. L.; RIGDEN, M. D.; BAENZIGER, J. E. Expression, purification, and structural characterization of CfrA, a putative iron transporter from *Campylobacter jejuni*. **J Bacteriol.**, v. 190, n. 16, p. 5650-62, 2008.

CARVALHO, A. C. T.; RUIZ-PALACIOS, G. M.; RAMOS-CERVANTES, P.; CERVANTES, L. E.; JIANG, X.; PICKERING, L. K. Molecular characterization of invasive and noninvasive *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates. **J Clin Microbiol.**, v. 39, p. 1353–1359, 2001.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Campylobacter**. 2014. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/foodsafety/diseases/campylobacter/index.html>>. Acesso em: 10 Abril de 2016.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food-10 states, 2009. **Morb.Mortal.Wkly. Rep.**, v. 59, n. 14, p. 418-422, 2010.

CHEN, M. L.; GE, Z.; FOX, J. G.; SCHAUER, D. B. Disruption of tight junctions and induction of proinflammatory cytokine responses in colonic epithelial cells by *Campylobacter jejuni*. **Infect Immun.**, v. 74, p. 6581–6589, 2006.

CHIBA, A.; KUSUNOKI, S.; SHIMIZU, T.; KANAZAWA, I. Serum IgG antibody to ganglioside GQ1bis a possible marker of Miller Fisher syndrome. **Ann Neurol.**, v. 31, p. 677–679, 1992.

CHIN, A. C.; TEOH, D. A.; SCOTT, K. G.; MEDDINGS, J. B.; MACNAUGHTON, W. K.; BURET, A. G. Strain-dependent induction of enterocyte apoptosis by *Giardia lamblia* disrupts epithelial barrier function in a caspase-3-dependent manner. **Infect Immun.**; v. 70, p. 3673–3680, 2002.

CHIN, A. C.; VERGNOLLE, N.; MACNAUGHTON, W. K.; WALLACE, J. L.; HOLLENBERG, M. D.; BURET, A. G. Proteinase-activated receptor 1 activation induces epithelial apoptosis and increases intestinal permeability. **Proc Natl Acad Sci.**; v. 100, p. 11104–11109, 2003.

CHOWDHURY, M. R.; KHAN, M.; RAFIQU, I. M.; PERERA, N. K.; SHUMACK, M. K.; KADER, M. Low maternal education and socio-economic status were associated with household food insecurity in children under five with diarrhoea in Bangladesh. **Acta Paediatr.**, v. 105, n. 5, p. 555-61, 2016.

CHRISTIE P. J.; J. P. VOGEL. Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. **Trends Microbiol.**, v. 8, p. 354–360, 2000.

DARGENT-MOLINA, P.; JAMES, A. S.; STROGATZ, D. S.; SAVITZ, D. A. Association between maternal education and infant diarrhea in different

household and community environments of Cebu, Philippines. **Soc Sci Med.**, v. 38, n. 2, p. 343-50, 1994.

DASTI, J. I.; TAREEN, M.; LUGERT, R.; FAUTNER, A. E.; GROB, U. *Campylobacter jejuni*: A brief review on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 300, p. 205-211, 2010.

DATTA, S.; NIWA, H.; ITOH, K. Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler and bovine faeces. **J Med Microbiol.**, v. 52, n. 4, p. 345-8, 2003.

DAVIS, K. R.; DUNN, A. C.; BURNETT, C.; MCCULLOUGH, L.; DIMOND, M.; WAGNER, J.; SMITH, L.; CARTER, A.; WILLARDSON, S.; NAKASHIMA, A. K. *Campylobacter jejuni* Infections Associated with Raw Milk Consumption - Utah, 2014. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep.**, v. 65, n. 12, 2016.

DAY, W. A. J.; SAJECKI, J. L.; PITTS, T. M.; JOENS, L. A. Role of catalase in *Campylobacter jejuni* intracellular survival. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 6337-6345, 2000.

DEDISTE, A.; VANDENBERG, O.; VLAES, L.; EBRAERT, A.; DOUAT, N.; BAHWERE, P.; BUTZLER, J. P. Evaluation of the ProSpect Microplate Assay for detection of *Campylobacter*: a routine laboratory perspective. **Clin.Microbiol.Infect.**, v. 9, n. 11, p. 11085-1090, 2003.

DEKKER, N. Outer-membrane phospholipase A: known structure, unknown biological function. **Mol. Microbiol.**, v. 35, p. 711-717, 2000.

DRYDEN, M. S.; GABB, R. J.; WRIGHT, S. K. Empirical treatment of severe acute community-acquired gastroenteritis with ciprofloxacin. **Clin Infect Dis.**, v. 22, p. 1019-1025, 1996.

EFSA: European Food Safety Authority. Scientific opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. **EFSA J.**, v. 9, n. 2105, 2011.

ELMI, A.; WATSON, E.; SANDU, P.; GUNDOGDU, O.; MILLS, D. C.; INGLIS, N. F.; MANSON, E.; IMRIE, L.; BAJAJ-ELLIOTT, M.; WREN, B. W.; SMITH, D. G.; DORRELL, N. *Campylobacter jejuni* outer membrane vesicles play an important role in bacterial interactions with human intestinal epithelial cells. **Infect Immun.**, v. 80, n. 12, p. 4089-4098, 2012.

ENDTZ, H.P.; ANG, C.W.; VAN DEN BRAAK, N.; LUIJENDIJK, A.; JACOBS, B.C.; DE MAN, P.; VAN DUIN, J.M.; VAN BELKUM, A.; VERBRUGH, H.A. Evaluation of a new commercial immunoassay for rapid detection of *Campylobacter jejuni* in stool samples. **Eur. J. Clin. Microbiol.Infects.Dis.** v. 19, p. 794-797, 2000.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY - EFSA. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. **EFSA J.**, v. 11, n. 4, p. 1-244, 2013.

EKDAHL, K.; ANDERSSON, Y. Regional risks and seasonality in travel-associated campylobacteriosis. **BMC Infect Dis.**, v. 29, n. 4, e. 54, 2004.

EVERS, E. G.; BLAAK, H.; HAMIDJAJA, R. A.; DE JONGE, R.; SCHETS, F. M. A QMRA for the Transmission of ESBL-Producing *Escherichia coli* and *Campylobacter* from Poultry Farms to Humans Through Flies. **Risk Anal.**, v. 36, n. 2, p. 215-27, 2016.

FAÇANHA, M. C.; PINHEIRO, A. C. Acute diarrhea treated by health care services in Fortaleza, Ceará State, Brazil, from 1996 to 2001. **Cad. Saude Publica**, v. 21, n. 1, p. 49-54, 2005.

FAUCHERE, J. L.; ROSENAU, A.; VERON, M.; MOYEN, E. N.; RICHARD, S.; PFISTER, A. Association with HeLa cells of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from human feces. **Infect Immun.**, v. 54, p. 283–287, 1986.

FERNÁNDEZ, H. Família Campylobacteraceae. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 5 ed, p. 357-362. São Paulo: Atheneu, 2008.

FERNÁNDEZ, H.; VERA, F.; VILLANUEVA, M. P.; GARCIA, A. Occurrence of *Campylobacter* species in healthy well-nourished and malnourished children. **Braz J Microbiol.**, v. 39, p. 56–58, 2008.

FERRERO, R. L.; LEE, A. Motility of *Campylobacter jejuni* in a viscous environment: comparison with conventional rod-shaped bacteria. **J. Gen. Microbiol.**, v. 134, p. 53–59, 1988.

FIGUEROA, G.; GALENO, H.; TRONCOSO, M.; TOLEDO, S.; SOTO, V. Prospective study of *Campylobacter jejuni* infection in Chilean infants evaluated by culture and serology. **Infect Immun.**, v. 27, p. 1040–1044, 1989.

FITZGERALD, C. *Campylobacter*. **Clin Lab Med.**, v. 35, p. 289–298, 2015.

FITZGERALD, C.; PATRICK, M.; GONZALEZ, A.; AKIN, J.; POLAGE, C. R.; WYMORE, K.; GILLIM-ROSS, L.; XAVIER, K.; SADLOWSKI, J.; MONAHAN, J.; HURD, S.; DAHLBERG, S.; JERRIS, R.; WATSON, R.; SANTOVENIA, M.; MITCHELL, D.; HARRISON, C.; TOBIN-D'ANGELO, M.; DEMARTINO, M.; PENTELLA, M.; RAZEQ, J.; LEONARD, C.; JUNG, C.; ACHONG-BOWE, R.; EVANS, Y.; JAIN, D.; JUNI, B.; LEANO, F.; ROBINSON, T.; SMITH, K.; GITTELMAN, R. M.; GARRIGAN, C.; NACHAMKIN, I. Campylobacter diagnostics study working group. Multicenter evaluation of clinical diagnostic methods for detection and isolation of *Campylobacter* spp. from stool. **J Clin Microbiol**, v. 54, e.5, p. 1209-1215, 2016.

FOUTS, D.E.; MONGODIN, E.F.; MANDRELL, R.E.; MILLER, W.G.; RASKO, D.A.; RAVEL, J. Major structural differences and novel potential virulence mechanisms from the genomes of multiple *Campylobacter* species. **PLoS Biol.**, v. 3, n. 1, p. 72-85, 2005.

FREDDO L, YU RK, LATOV N, DONOFRIO PD, HAYS AP, GREENBERG HS, ALBERS JW, ALLESSI AG, KEREN D. Gangliosides GM1 and GD1b are

antigens for IgM M-protein in a patient with motor neuron disease. **Neurology**, v. 36, p. 454–458, 1986.

FRIEDMAN, C. R.; HOEKSTRA, R. M.; SAMUEL, M.; MARCUS, R.; BENDER, J.; SHIFERAW, B.; REDDY, S.; AHUJA, S. D.; HELFRICK, D. L.; HARDNETT, F.; CARTER, M.; ANDERSON, B.; TAUXE, R. V. Emerging Infections Program FoodNet Working Group. Risk factors for sporadic *Campylobacter* infection in the United States: a case-control study in FoodNet sites. **Clin Infect Dis.**, v. 38, n. 3, p. 285–296, 2004.

FRIEDRICH, A.; MARSHALL, J. C.; BIGGS, P. J.; MIDWINTER, A. C.; FRENCH, N. P. Seasonality of *Campylobacter jejuni* isolates associated with human campylobacteriosis in the Manawatu region, New Zealand. **Epidemiol Infect.**, v. 144, n.4, 820-828, 2016.

FUNCEME, Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos. **Rede cearense de radares**, 2009. Disponível em <<http://www.funceme.br/index.php/areas/23-monitoramento/meteorol%C3%B3gico/409-precipitacao-por-radar>>. Acessado em 30 de junho de 2016.

GALE, A. R.; WILSON, M. Diarrhea: Initial Evaluation and Treatment in the Emergency Department. **Emerg Med Clin North Am.**, v. 34, n. 2, p.293-308, 2016.

GALLO, M. T.; DI DOMENICO, E. G.; TOMA, L.; MARCHESI, F.; PELAGALLI, L.; MANGHISI, N.; ASCENZIONI, F.; PRIGNANO, G.; MENGARELLI, A.; ENSOLI, F. *Campylobacter jejuni* Fatal Sepsis in a Patient with Non-Hodgkin's Lymphoma: Case Report and Literature Review of a Difficult Diagnosis. **Int J Mol Sci.**, v. 12, n. 17, e.4, 2016.

GARIN, B.; GOUALI, M.; WOUAFO, M.; PERCHEC, A. M.; PHAM, M. T.; RAVAONINDRINA, N.; URBES, F.; GAY, M.; DIAWARA, A.; LECLERCQ, A.; ROCOURT, J.; POUILLOT, R. Prevalence, quantification and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. on chicken neck-skins at points of slaughter in 5 major cities located on 4 continents. **Int J Food Microbiol.**, v. 157, p. 102–107, 2012.

GHORBANALIZADGAN, M.; BAKHSHI, B.; KAZEMNEJAD, L. A.; NAJAR-PEERAYEH, S.; NIKMANESH, B. A molecular survey of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* virulence and diversity. **Iran Biomed J.**, v. 18, n. 3, p. 158-64, 2014.

GHUNAIM, H.; BEHNKE, J. M.; AIGHA, I.; SHARMA, A.; DOIPHODE, S. H.; DESHMUKH, A.; ABU-MADI, M. M. Analysis of resistance to antimicrobials and presence of virulence/stress response genes in *Campylobacter* isolates from patients with severe diarrhoea. **PLoS One.**, v. 10, n. 3, 2015.

GILLESPIE, I. A., O'BRIEN, S. J. & BOLTON, F. J. Age patterns of persons with campylobacteriosis, England and Wales, 1990–2007. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 15, p. 2046–2048, 2009.

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

GILLESPIE, I. A.; O'BRIEN, S. J.; FROST, J. A.; TAM, C.; TOMPKINS, D.; NEAL, K. R.; SYED, Q.; FARTHING, M. J. Investigating vomiting and/or bloody diarrhoea in *Campylobacter jejuni* infection. **J Med Microbiol.**, v. 55, n. 6, p. 741-6, 2006.

GILPIN, B. J.; WALSH, G.; ON, S. L.; SMITH, D.; MARSHALL, J. C.; FRENCH, N. P. Application of molecular epidemiology to understanding campylobacteriosis in the Canterbury region of New Zealand. **Epidemiol Infect.**, v. 141, p. 1253–1266, 2013.

GÖLZ, G.; ROSNER, B.; HOFREUTER, D.; JOSENHANS, C.; KREIENBROCK, L.; LÖWENSTEIN, A.; SCHIELKE, A.; STARK, K.; SUERBAUM, S.; WIELER, L. H.; ALTER, T. Relevance of *Campylobacter* to public health—The need for a OneHealth approach. **Int J Med Microbiol.**, v. 304, n. 7, p. 817-23, 2014.

GONZALEZ, I.; GRANT, K. A.; RICHARDSON, P. T.; PARK, S. F.; COLLINS, M. D. Specific identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using a PCR test based on the *ceuE* gene encoding a putative virulence determinant. **J Clin Microbiol.**, v. 35, n. 3, p. 759-63, 1997.

GRAHAM, J. P.; BOLAND, J. J.; SILBERGELD, E. Growth promoting antibiotics in food animal production: an economic analysis. **Public Health Rep.**, v. 122, p. 79–87, 2007

GRANT, K. A.; BELANDIA, I. U.; DEKKER, N.; RICHARDSON, P. T.; PARK, S. F. Molecular characterization of *pldA*, the structural gene for phospholipase A from *Campylobacter coli*, and its contribution to cell-associated hemolysis. **Infect. Immun.**, v. 65, n. 4, p. 1172-1180, 1997.

GRZYBOWSKA-CHLEBOWCZYK, U.; KALITA, B.; FLAK-WANCERZ, A.; JASIELSKA, M.; WIĘCEK, S.; WOJCIESZYN, M.; HOROWSKA-ZIAJA, S.; CHLEBOWCZYK, W.; WOŚ, H. Clinical course of *Campylobacter* infections in children. **Pediatrics Polska**, v. 88, p. 329-334, 2013.

GUERRANT, R. L.; DEBOER, M. D.; MOORE, S. R.; SCHARF, R. J.; LIMA, A. A. The impoverished gut—a triple burden of diarrhoea, stunting and chronic disease. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol.**, v. 10, n. 4, p. 220–229, 2013.

GUERRANT, R. L.; VAN GILDER, T.; STEINER, T. S.; THIELMAN, N. M.; SLUTSKER, L.; TAUXE, R. V.; HENNESSY, T.; GRIFFIN, P. M.; DUPONT, H.; SACK, R. B.; TARR, P.; NEILL, M.; NACHAMKIN, I.; RELLER, L. B.; OSTERHOLM, M. T.; BENNISH, M. L.; PICKERING, L. K; Infectious Diseases Society of America. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. **Clin Infect Dis.**, v. 32, p. 331–350, 2001.

GUERRANT, R. L.; WANKE, C. A.; PENNIE, R. A.; BARRETT, L. J.; LIMA, A. A.; O'BRIEN, A. D. Production of a Unique Cytotoxin by *Campylobacter jejuni*. **Infection and Immunity**, v. 55, n. 10, p. 2526-2530, 1987.

GUERRY, P. *Campylobacter* flagella: not just for motility. **Trends Microbiol.**, v. 15, p. 456-461, 2007.

GUERRY, P.; ALM, R. A.; POWER, M. E.; TRUST, T. J. Molecular and structural analysis of *Campylobacter* flagellin. In: Nachamkin, I., Blaser, M. J., Tompkins, L. S. (Eds.), ***Campylobacter jejuni: Current Status and Future Trends***, 1992.

GÜRTLER, M.; ALTER, T.; KASIMIR, S.; FEHLHABER, K. The importance of *Campylobacter coli* in human campylobacteriosis: prevalence and genetic characterization. **Epidemiol. Infect.**, v. 133, p. 1081–1087, 2005.

HALL, G.; KIRK, M. D.; BECKER, N.; GREGORY, J. E.; UNICOMB, L.; MILLARD, G.; STAFFORD, R.; LALOR, K.; OZFOODNET WORKING GROUP. Estimating foodborne gastroenteritis, Australia. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 11, p. 1257–1264, 2005.

HAMER, R., CHEN, P. Y., ARMITAGE, J. P., REINERT, G., DEANE, C. M. Deciphering chemotaxis pathways using cross species comparisons. **BMC Syst. Biol.**, v. 4, n. 3., 2010.

HAMIDIAN, M.; SANAEI, M.; BOLFION, M.; DABIRI, H.; ZALI, M. R.; WALTHER-RASMUSSEN, J. Prevalence of putative virulence markers in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from hospitalized children, raw chicken, and raw beef in Tehran, Iran. **Can. J. Microbiol.**, v. 57, p. 143–148, 2011.

HANNING, I.; BISWAS, D.; HERRERA, P.; ROESLER, M.; RICKE, S. C. Prevalence and characterization of *Campylobacter jejuni* isolated from pasture flock poultry. **J Food Sci.**, v. 75, n. 7, p. 496-502, 2010.

HARTLEY-TASSELL, L. E.; SHEWELL, L. K.; DAY, C. J.; WILSON, J. C.; SANDHU, R.; KETLEY, J. M.; KOROLIK, V. Identification and characterization of the aspartate chemosensory receptor of *Campylobacter jejuni*. **Mol. Microbiol.**, v. 75, p. 710-730, 2010.

HEIKEMA, A. P.; JACOBS, B. C.; HORST-KREFT, D.; HUIZINGA, R.; KUIJF, M. L.; ENDTZ, H. P.; SAMSOM, J. N.; VAN WAMEL, W. J. Siglec-7 specifically recognizes *Campylobacter jejuni* strains associated with oculomotor weakness in Guillain-Barre syndrome and Miller Fisher syndrome. **Clin Microbiol Infect.**, v. 19, p. 106–E112, 2013.

HENDRIXSON, D. R.; DIRITA, V. J. Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in commensal colonization of the chick gastrointestinal tract. **Mol. Microbiol.**, v. 52, p. 471–484, 2004.

HOLMES, K.; MULHOLLAND, F.; PEARSON, B. M.; PIN, C.; MCNICHOLL-KENNEDY, J.; KETLEY, J. M.; WELLS, J. M. *Campylobacter jejuni* gene expression in response to iron limitation and the role of Fur. **Microbiology**, v. 151, p. 243-57, 2005.

HOSSAIN, A.; STUART-TULL, D. E. S.; FREER, J. H. Heat-labile and heat-stable haemolysins of *Campylobacter jejuni*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 6, p. 331–340, 1993.

HOY, B.; LOWER, M.; WEYDIG, C.; CARRA, G.; TEGTMEYER, N.; GEPPERT, T. *Helicobacter pylori* HtrA is a new secreted virulence factor that cleaves E-cadherin to disrupt intercellular adhesion. **EMBO Rep.**, v. 11, p. 798–804, 2010.

HUGHES, R. *Campylobacter jejuni* in Guillain–Barre syndrome. **Lancet Neurol.**, v. 3, p. 644, 2004.

INSTITUTO DE PESQUISA E ESTRATÉGIA ECONÔMICA DO CEARÁ (IPECE). Informe 47: Perfil Municipal de Fortaleza. Tema XI: **Perfil do analfabetismo nos bairros**. 2012b. Disponível em: <http://www.ipece.ce.gov.br/publicacoes/ipece-informe/lpece_Informe_47_03_dezembro_2012.pdf>. Acesso em: 08 de maio de 2016.

IWAMOTO, M.; HUANG, J. Y.; CRONQUIST, A. B.; MEDUS, C.; HURD, S.; ZANSKY, S.; DUNN, J.; WORON, A. M.; OOSMANALLY, N.; GRIFFIN, P. M.; BESSER, J.; HENAO, O. L. Bacterial enteric infections detected by culture-independent diagnostic tests. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep.**, v. 64, e. 9, p. 252–257.

JAGANNATHAN, A.; PENN, C. Motility in *Campylobacter*. **Molecular and Cellular Biology**, p. 331–347, 2005.

JANSSEN, R.; KROGFELT, K. A.; CAWTHRAW, S. A.; VAN PELT, W.; WAGENAAR, J. A.; OWEN, R. J. Host-pathogen interactions in *Campylobacter* infections: the host perspective. **Clin Microbiol Rev.**, v. 21, p. 505–518, 2008.

JIN, S.; JOE, A.; LYNETT, J.; HANI, E. K.; SHERMAN, P.; CHAN, V. L. JlpA, a novel surface-exposed lipoprotein specific to *Campylobacter jejuni*, mediates adherence to host epithelial cells. **Mol. Microbiol.**, v. 39, p. 1225–1236, 2001.

JIN, S.; SONG, Y. C.; EMILI, A.; SHERMAN, P. M.; CHAN, V. L. JlpA of *Campylobacter jejuni* interacts with surface-exposed heat shock protein 90 alpha and triggers signalling pathways leading to the activation of NF-kappa B and p38 MAP kinase in epithelial cells. **Cell Microbiol.**, v. 5, p. 165–174, 2003.

KAAKOUSH, N. O.; CASTAÑO-RODRÍGUEZ, N.; MITCHELL, H. M.; MAN, S. M. Global Epidemiology of *Campylobacter* Infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 687–720, 2014.

KAAKOUSH, N. O.; DAY, A. S.; HUINAO, K. D.; LEACH, S. T.; LEMBERG, D. A.; DOWD, S. E.; MITCHELL, H. M. Microbial dysbiosis in pediatric patients with Crohn's disease. **J Clin Microbiol.**, v. 50, p. 3258–3266, 2012.

KALISCHUK, L. D.; INGLIS, G. D.; BURET, A. G. *Campylobacter jejuni* induces transcellular translocation of commensal bacteria via lipid rafts. **Gut Pathog.**, v. 1, n. 2, 2009.

KALISCHUK, L. D.; INGLIS, G. D.; BURET, A. G. Strain-dependent induction of epithelial cell oncosis by *Campylobacter jejuni* is correlated with invasion ability and is independent of cytolethal distending toxin. **Microbiology**, v. 153, p. 2952–2963, 2007.

KANUNGPEAN, D.; KAKUDA, T.; TAKAI, S. Participation of CheR and CheB in chemosensory response of *Campylobacter jejuni*. **Microbiology**, v. 157, p. 1279-1289, 2011.

KARIM, Q. N.; LOGAN, R. P.; PUELS, J.; KARNHOLZ, A.; WORKU, M. L. Measurement of motility of *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, and *Escherichia coli* by real time computer tracking using the Hobson BacTracker. **J. Clin. Pathol.**, v. 51, p. 623–628, 1998.

KARLYSHEV, A. V.; LINTON, D.; GREGSON, N. A.; LASTOVICA, A. J.; WREN, B. W. Genetic and biochemical evidence of a *Campylobacter jejuni* capsular polysaccharide that accounts for Penner serotype specificity. **Mol. Microbiol.**, v. 35, p. 529–541, 2000.

KATAHOIRE, A.; FLEMMING, S.; SABROE, S.; WHYTE, S. R. The importance of maternal schooling for child morbidity and mortality and maternal health behavior in southeastern Uganda. **J Health Popul Dev Countries**, 2004.

KING, S.; ADAMS, M. C. Incidence of *Campylobacter* in processed poultry: is it a concern for human health? **J. Food Saf**, v. 28, p. 376–388, 2008.

KIRKPATRICK, B. D.; LYON, C. E.; PORTER, C. K.; MAUE, A. C.; GUERRY, P.; PIERCE, K. K.; CARMOLLI, M. P.; RIDDLE, M. S.; LARSSON, C. J.; HAWK, D.; DILL, E. A.; FINGAR, A.; POLY, F.; FIMLAID, K. A.; HOQ, F.; TRIBBLE, D. R. Lack of homologous protection against *Campylobacter jejuni* CG8421 in a human challenge model. **Clin Infect Dis.**, v. 57, p. 1106–1113, 2013.

KLEMM, P.; SCHEMBRI, M. A. Bacterial adhesins: function and structure. **Int J Med Microbiol.** ; v. 290, p. 27–35, 2000.

KOGA, M.; GILBERT, M.; LI, J.; KOIKE, S.; TAKAHASHI, M.; FURUKAWA, K.; HIRATA, K.; YUKI, N. Antecedent infections in Fisher syndrome: a common pathogenesis of molecular mimicry. **Neurology**, v. 64, p. 1605–1611, 2005.

KONKEL, M. E.; GARVIS, S. G.; TIPTON, S. L.; ANDERSON, D. E. J.; CIEPLAK, W. J. Identification and molecular cloning of a gene encoding a fibronectin-binding protein (CadF) from *Campylobacter jejuni*. **Mol Microbiol.**, v. 24, p. 953–963, 1997.

KONKEL, M. E.; GRAY, S. A.; KIM, B. J.; GARVIS, S. G.; YOON, J. Identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* based on the *cadF* virulence gene and its product. **J Clin Microbiol.**, v. 37, n. 3, p. 510-7, 1999.

KONKEL, M. E.; KIM, B. J.; KLENA, J. D.; YOUNG, C. R.; ZIPRIN, R. Characterization of thermal stress response of *Campylobacter jejuni*. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 362–366, 1998.

KONKEL, M. E.; KIM, B. J.; RIVERA-AMILL, V., GARVIS, S. G. Bacterial secreted proteins are required for the internalization of *Campylobacter jejuni* into cultured mammalian cells. **Mol. Microbiol.**, v. 32, p. 691-701, 1999.

KONKEL, M. E.; KLENA, J. D.; RIVERA-AMILL, V.; MONTEVILLE, M. R.; BISWAS, D.; RAPHAEL, B.; MICKELSON, J. Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is dependent on a functional flagellar export apparatus. **J Bacteriol.**, v. 186, p. 3296–3303, 2004.

KONKEL, M. E.; LARSON, C. L.; FLANAGAN, R. C. *Campylobacter jejuni* FlpA binds fibronectin and is required for maximal host cell adherence. **J Bacteriol.**, v. 192, p. 68–76, 2010.

KOOLMAN L, WHYTE P, BURGESS C, BOLTON D. Distribution of virulence-associated genes in a selection of *Campylobacter* isolates. **Foodborne Pathog Dis.**, v. 12, n. 5, p. 424-32, 2015.

KOSEK, M.; BERN, C.; GUERRANT, R. L. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. **Bull World Health Organ.**, v. 81, n. 3, p. 197-204, 2003.

KOTLOFF, K.L.; NATARO, J.P.; BLACKWELDER, W.C.; NASRIN, D.; FARAG, T.H.; PANCHALINGAM, S.; WU, Y.; SOW, S.O.; SUR, D.; BREIMAN, R.F.; FARUQUE, A.S.; ZAIDI, A.K.; SAHA, D.; ALONSO, P.L.; TAMBOURA, B.; SANOGO, D.; ONWUCHEKWA, U.; MANNA, B.; RAMAMURTHY, T.; KANUNGO, S.; OCHIENG, J.B.; OMORE, R.; OUNDO, J.O.; HOSSAIN, A.; DAS, S.K.; AHMED, S.; QURESHI, S.; QUADRI, F.; ADEGBOLA, R.A.; ANTONIO, M.; HOSSAIN, M.J.; AKINSOLA, A.; MANDOMANDO, I.; NHAMPOSSA, T.; ACÁCIO, S.; BISWAS, K.; O'REILLY, C.E.; MINTZ, ED, BERKELEY LY, MUHSEN K, SOMMERFELT H, ROBINS-BROWNE RM, LEVINE, M.M. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. **Lancet**, v.382, n. 9888, p. 209-222, 2013.

KRUTKIEWICZ, A.; KLIMUSZKO, D. Genotyping and PCR detection of potential virulence genes in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from different sources in Poland. **Folia Microbiol (Praha)**, v. 55, n. 2, p. 167-75, 2010.

KULP, A.; KUEHN, M. J. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. **Annu.Rev. Microbiol.**, v. 64, p.163–184, 2010.

KUWABARA S, YUKI N. Axonal Guillain-Barre syndrome: concepts and controversies. **Lancet Neurol.**, v. 12, p. 1180–1188, 2013.

LAI, C. K.; CHEN, Y. A.; LIN, C. J.; LIN, H.; KAO, M. C.; HUANG, M. Z.; LIN, Y. H.; CHIANG-NI, C.; CHEN, C. J.; LO, U. G.; LIN, L. C.; LIN, H.; HSIEH, J. T., LAI, C. H. Molecular mechanisms and potential clinical applications of *Campylobacter jejuni* Cytolethal Distending Toxin. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, p. 1-9. 2016.

LAMB-ROSTESKI, J. M.; KALISCHUK, L. D.; INGLIS, G. D.; BURET, A. G. Epidermal growth factor inhibits *Campylobacter jejuni* induced claudin-4 disruption, loss of epithelial barrier function, and *Escherichia coli* translocation. **Infect Immun.**, v. 76, p. 3390–3398, 2008.

LAPIERRE, L.; GATICA, M. L.; RIQUELME, V.; VERGARA, C.; YAÑEZ, J. M.; SAN MARTÍN, B.; SÁENZ, L.; VIDAL, M.; MARTÍNEZ, M. C.; ARAYA, P.; FLORES, R.; DUERY, O.; VIDAL, R. Characterization of Antimicrobial Susceptibility and Its Association with Virulence Genes Related to Adherence, Invasion, and Cytotoxicity in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Isolates from Animals, Meat, and Humans. **Microb Drug Resist.**, 2016.

LARA-TEJERO, M.; GALAN, J. E. A bacterial toxin that controls cell cycle progression as a deoxyribonuclease I-like protein. **Science**, v. 290, p. 354–357, 2000.

LARA-TEJERO, M.; GALAN, J. E. CdtA, CdtB, and CdtC form a tripartite complex that is required for cytolethal distending toxin activity. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 4358–4365, 2001.

LASTOVICA, A. Emerging *Campylobacter* spp.: the tip of the iceberg. **Clin. Microbiol. Newsletter.**, v. 28, p. 49–56, 2006.

LEE, G.; PAN, W.; PEÑATARO Y. P.; PAREDES, O. M.; TILLEY, D.; GREGORY, M.; OBERHELMAN, R.; BURGA R, C. C. B.; KOSEK, M. Symptomatic and asymptomatic *Campylobacter* infections associated with reduced growth in Peruvian children. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 7, n.1, 2013.

LEE, G.; PEÑATARO, Y. P.; PAREDES, O. M.; CAULFIELD, L. E.; SACK, D. A.; FISCHER-WALKER, C.; BLACK, R. E.; KOSEK, M. An instrument for the assessment of diarrhoeal severity based on a longitudinal community-based study. **BMJ Open.**, v.6, n. 4, e004816, 2014.

LEE, G. O.; RICHARD, S. A.; KANG, G.; HOUP, E. R.; SEIDMAN, J. C.; PENDERGAST, L. L.; BHUTTA, Z. A.; AHMED, T.; MDUMA, E. R.; LIMA, A. A.; BESSONG, P.; JENNIFER, M. S.; HOSSAIN, M. I.; CHANDYO, R. K.; NYATHI, E.; LIMA, I. F.; PASCAL, J.; SOOFI, S.; LADAPORN, B.; GUERRANT, R. L.; CAULFIELD, L. E.; BLACK, R. E.; KOSEK, M. N.; MAL-ED NETWORK INVESTIGATORS. A Comparison of Diarrheal Severity Scores in the MAL-ED Multisite Community Based Cohort Study. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.**, v. 63, n. 5, p. 466-473, 2016.

LEE, J. W.; HELMANN, J. D. Functional specialization within the Fur family of metalloregulators. **Biometals**, v. 20, p. 485–499, 2007.

LEHOURS, P.; ALADJIDI, N.; SARLANGUE, J.; MÉGRAUD, F. *Campylobacter* infections in children. **Arch. Pediatr.**, v. 19, n. 6, p. 629-634, 2012.

LENGERH, A.; MOGES, F.; UNAKAL, C.; ANAGAW, B. Prevalence, associated risk factors and antimicrobial susceptibility pattern of *Campylobacter* species among under five diarrheic children at Gondar University Hospital, Northwest Ethiopia. **BMC Pediatr.**, v. 13, n. 82, 2013.

LERTSEHTAKARN, P.; OTTEMANN, K. M.; HENDRIXSON, D. R. Motility and chemotaxis in *Campylobacter* and *Helicobacter*. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 65, p. 389-410, 2011.

LIMA, A.A.; FANG, G.; SCHORLING, J.B.; DE ALBUQUERQUE, L.; MCAULIFFE, J.F.; MOTA, S.; LEITE, R.; GUERRANT, R. L. Persistent diarrhea in northeast Brazil: etiologies and interactions with malnutrition. **Acta Paediatr. Suppl.**, v. 381, p. 39-44, 1992.

LIMA, N. V.; FIGUEIREDO, A. C. T. A.; PRADO, A. D.; DIAS, A.; FILGUEIRAS, A. L. L.; HOFER, E. *Campylobacter* e outros enteropatógenos em processos diarreicos infantis no Recife, Pernambuco. **Rev. Bras. Anal.Clin.**, v. 25, p. 71–74, 1993.

LIN, C. D.; LAI, C. K.; LIN, Y. H.; HSIEH, J. T.; SING, Y. T.; CHANG, Y. C.; CHEN, K. C.; WANG, W. C.; SU, H. L.; LAI, C. H. Cholesterol depletion reduces entry of *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin and attenuates intoxication of host cells. **Infect. Immun.**, v. 79, p. 3563–357, 2011.

LINDBLOM, G. B.; SJOGREN, E.; HANSSON-WESTERBERG, J.; KAIJSER, B. *Campylobacter upsaliensis*, *C. sputorum* and *C. concisus* as common causes of diarrhoea in Swedish children. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 27, p. 187–188, 1995.

LITTLE, C. L.; GORMLEY, F. J.; RAWAL, N.; RICHARDSON, J. F. A recipe for disaster: outbreaks of campylobacteriosis associated with poultry liver pate in England and Wales. **Epidemiol Infect.**, v. 138, p. 1691–1694, 2010.

LOUWEN, R. P.; VAN BELKUM, A.; WAGENAAR, J. A.; DOORDUYN, Y.; ACHTERBERG, R.; ENDTZ, H. P. Lack of association between the presence of the *pVir* plasmid and bloody diarrhea in *Campylobacter jejuni* enteritis. **J Clin Microbiol.**, v. 44, n. 5, p. 1867-8, 2006.

LO VECCHIO A.; VANDENPLAS, Y.; BENNINGA, M.; BROEKAERT, I.; FALCONER, J.; GOTTRAND, F.; LIFSCHITZ, C.; LIONETTI, P.; OREL, R.; PAPADOPOULOU, A.; RIBES-KONINCKX, C.; SALVATORE, S.; SHAMIR, R.; SCHÄPPI, M.; STAIANO, A.; SZAJEWSKA, H.; THAPAR, N.; WILSCHANSKI, M.; GUARINO, A. An international consensus report on a new algorithm for the management of infant diarrhoea. **Acta Paediatr.**, v. 105, n. 8, e384-9, 2016.

LUANGTONGKUM, T.; JEON, B.; HAN, J.; PLUMMER, P.; LOGUE, C. M.; ZHANG, Q. Antibiotic resistance in *Campylobacter*: emergence, transmission and persistence. **Future Microbiol.**, v. 4, p. 189–200, 2009

LUBY, S. P.; AGBOATWALLA, M.; FEIKIN, D. R.; PAINTER, J.; BILLHIMER, W.; ALTAF, A.; HOEKSTRA, R. M. Effect of handwashing on child health: a randomised controlled trial. **Lancet**, v. 366, p. 225–233, 2005.

MACCALLUM, A.; HARDY, S. P.; EVEREST, P. H. *Campylobacter jejuni* inhibits the absorptive transport functions of Caco-2 cells and disrupts cellular tight junctions. **Microbiology**, v. 151, p.2451–2458, 2005.

MCCARTHY, N. D.; GILLESPIE, I. A.; LAWSON, A. J.; RICHARDSON, J.; NEAL, K. R.; HAWTIN, P. R.; MAIDEN, M. C.; O'BRIEN, S. J. Molecular epidemiology of human *Campylobacter jejuni* shows association between seasonal and international patterns of disease. **Epidemiol Infect.**, v. 140, n. 12, p. 2247-55, 2012.

MACHADO, M. M.; LINDSAY, A. C.; MOTA, G. M.; ARRUDA, C. A.; AMARAL, J. J.; FORSBERG, B. C. A community perspective on changes in health related to diarrhea in northeastern Brazil. **Food Nutr Bull.**, v. 32, n. 2, p. 103-11, 2011.

MAHENDRAN, V.; RIORDAN, S. M.; GRIMM, M. C.; TRAN, T. A. T.; MAJOR, J.; KAAKOUSH, N. O.; MITCHELL, H.; ZHANG, L. Prevalence of *Campylobacter* species in adult Crohn's disease and the preferential colonization sites of *Campylobacter* species in the human intestine. **PLoS One**, v. 6, n. 25417, 2011.

MAMELLI, L.; PAGES, J. M.; KONKEL, M. E.; BOLLA, J. M. Expression and purification of native and truncated forms of CadF, an outer membrane protein of *Campylobacter*. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 39, p. 135–140, 2006.

MAN, S. M. The clinical importance of emerging *Campylobacter* species. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 8, p. 669–685. 2011

MAN, S. M.; KAAKOUSH, N. O.; MITCHELL, H. M. The role of bacteria and pattern-recognition receptors in Crohn's disease. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol.**, v. 8, p. 152–168, 2011.

MAUE, A. C.; MOHAWK, K. L.; GILES, D. K.; POLY, F.; EWING, C. P.; JIAO, Y.; LEE, G.; MA, Z.; MONTEIRO, M. A.; HILL, C. L.; FERDERBER, J. S.; PORTER, C. K.; TRENT, M. S.; GUERRY, P. The polysaccharide capsule of *Campylobacter jejuni* modulates the host immune response. **Infect. Immun.**, v. 81, n. 3, p. 665-672, 2013.

MAUE, A. C.; POLY, F.; GUERRY, P. A capsule conjugate vaccine approach to prevent diarrheal disease caused by *Campylobacter jejuni*. **Hum Vaccin Immunother.**, v. 10, 2014.

MCEWEN, S. A.; FEDORKA-CRAY, P. J. Antimicrobial use and resistance in animals. **Clin Infect Dis.**, v. 3493, p. 106, 2002.

MENDES, P. S.; RIBEIRO, H. D. A. C.; MENDES, C. M. Temporal trends of overall mortality and hospital morbidity due to diarrheal disease in Brazilian children younger than 5 years from 2000 to 2010. **J Pediatr.**, v. 89, n. 3, p. 315-25, 2013.

MIHALJEVIC, R. R.; SIKIC, M.; KLANCNIK, A.; BRUMINI, G.; MOZINA, S. S.; ABRAM, M. Environmental stress factors affecting survival and virulence of *Campylobacter jejuni*. **Microb. Pathog.**, v. 43, p. 120-125, 2007.

M'IKANATHA, N. M.; DETTINGER, L. A.; PERRY, A.; ROGERS, P.; REYNOLDS, S. M.; NACHAMKIN, I. Culturing stool specimens for *Campylobacter* spp., Pennsylvania, USA. **Emerg Infect Dis.**, v. 18, n. 3, p. 484–7, 2012.

MONTEIRO, M. A.; BAQAR, S.; HALL, E. R.; CHEN, Y. H.; PORTER, C. K.; BENTZEL, D. E.; APPLEBEE, L.; GUERRY, P. Capsule polysaccharide conjugate vaccine against diarrheal disease caused by *Campylobacter jejuni*. **Infect Immun.**, v. 77, p. 1128–1136, 2009.

MONTEVILLE, M. R.; YOON, J. E.; KONKEL, M. E. Maximal adherence and invasion of INT 407 cells by *Campylobacter jejuni* requires the CadF outer-

membrane protein and microfilament reorganization. **Microbiology**, v. 149, p. 153–65, 2003.

MOORE, S. R. Update on prolonged and persistent diarrhea in children. **Curr Opin Gastroenterol.**, v. 27, n. 1, p. 19-23, 2011.

MOORE, S. R.; LIMA, N. L.; SOARES, A. M.; ORIÁ, R. B.; PINKERTON, R. C.; BARRETT, L. J.; GUERRANT, R. L.; LIMA, A. A. Prolonged episodes of acute diarrhea reduce growth and increase risk of persistent diarrhea in children. **Gastroenterology**, v. 139, n. 4, p. 1156-64, 2010.

MORENO, A. C.; FILHO, A. F.; GOMES, T. D. O. A.; RAMOS, S. T.; MONTEMOR, L. P.; TAVARES, V. C.; FILHO, L. D. O. S. S.; IRINO, K.; MARTINEZ, M. B. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v. 66, n. 1, p. 50-7, 2010.

MOROOKA, T.; UMEDA, A.; AMAKO, K. Motility as an intestinal colonization factor for *Campylobacter jejuni*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 131, p. 1973–1980, 1985.

MUGHINI-GRAS, L.; SMID, J. H.; WAGENAAR, J. A.; DE BOER, A.; HAVELAAR, A. H.; FRIESEMA, I. H.; FRENCH, N. P.; GRAZIANI, C.; BUSANI, L.; VAN PELT, W. Campylobacteriosis in returning travellers and potential secondary transmission of exotic strains. **Epidemiol Infect.**, v. 142, p. 1277–1288, 2014.

MÜLLER, J.; SCHULZE, F.; MÜLLER, W.; HÄNEL, I. PCR detection of virulence-associated genes in *Campylobacter jejuni* strains with differential ability to invade Caco-2 cells and to colonize the chick gut. **Vet Microbiol.**, v. 113, p. 1-2, 123-129, 2006.

MURRAY, C. J.; VOS, T.; LOZANO, R.; NAGHAVI, M.; FLAXMAN, A. D.; MICHAUD, C.; EZZATI, M.; SHIBUYA, K.; SALOMON, J. A.; ABDALLA, S.; ABOYANS, V.; et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study. **Lancet**, p. 2197–2223, 2010.

NACHAMKIN, I.; YANG, X. H.; STERN, N. J. Role of *Campylobacter jejuni* flagella as colonization factors for three-day-old chicks: analysis with flagellar mutants. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, p. 1269–1273, 1993.

NEWELL, D. G.; ELVERS, K. T.; DOPFER, D.; HANSSON, I.; JONES, P.; JAMES, S.; GITTINS, J.; STERN, N. J.; DAVIES, R.; CONNERTON, I.; PEARSON, D.; SALVAT, G.; ALLEN, V. M. Biosecurity-based interventions and strategies to reduce *Campylobacter* spp. on poultry farms. **Appl Environ Microbiol.**, v. 77, p. 8605–8614, 2011.

NICHOLS, G. L.; RICHARDSON, J. F.; SHEPPARD, S. K.; LANE, C.; SARRAN C. *Campylobacter* epidemiology: a descriptive study reviewing 1 million cases in England and Wales between 1989 and 2011. **BMJ Open**, v. 2, n. 4, 2012.

NIELSEN, H. L.; EJLERTSEN, T.; ENGBERG, J.; NIELSEN, H. High incidence of *Campylobacter concisus* in gastroenteritis in North Jutland, Denmark: a population-based study. **Clin Microbiol Infect.**, v. 19, p. 445–450, 2013.

NIELSEN, H.; HANSEN, K. K.; GRADEL, K. O.; KRISTENSEN, B.; EJLERTSEN, T.; OSTERGAARD, C.; SCHONHEYDER, H. C. Bacteraemia as a result of *Campylobacter* species: a population-based study of epidemiology and clinical risk factors. **Clin Microbiol Infect.**, v. 16, p. 57–61, 2010.

NOUGAYRÈDE, J. P.; FERNANDES, P. J.; DONNENBERG, M. S. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. **Cell Microbiol.**; v. 5, p. 359–372, 2003.

NOVIK, V.; HOFREUTER, D.; GALAN, J. E. Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in its interaction with epithelial cells. **Infect Immun.**, v. 78, p. 3540–3553, 2010.

OBERHELMAN, R. A.; GILMAN, R. H.; SHEEN, P.; CORDOVA, J.; ZIMIC, M.; CABRERA, L.; MEZA, R.; PEREZ, J. An intervention-control study of corralling of free-ranging chickens to control *Campylobacter* infections among children in a Peruvian periurban shantytown. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 74, p. 1054–1059, 2006.

OH, E.; MCMULLEN, L.; JEON, B. Impact of oxidative stress defense on bacterial survival and morphological change in *Campylobacter jejuni* under aerobic conditions. **Front Microbiol.**, v. 6, n. 29, 2015.

OLIVEIRA, T. C.; LATORRE, M. R. Trends in hospital admission and infant mortality from diarrhea: Brazil, 1995-2005. **Rev Saúde Pública**, v. 44, p. 102-11, 2010.

OLORUNTOBA, E. O.; FOLARIN, T. B.; AYEDE, A. I. Hygiene and sanitation risk factors of diarrhoeal disease among under-five children in Ibadan, Nigeria. **Afr Health Sci.**, v. 14, n. 4, p. 1001-11, 2014.

ON, S. L. W. Isolation, identification and subtyping of *Campylobacter*: Where to from here? **J. Microbiol. Meth.**, v. 95, n. 1, p. 3-7, 2013.

ON, S.L.W. Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns. **J. Appl. Microbiol.**, v.90, p. 1–15, 2001.

PANKOV, R.; YAMADA, K. M. Fibronectin at a glance. **J Cell Sci.**, v. 115, p. 3861–3863, 2002.

PARKHILL, J.; WREN, B. W.; MUNGALL, K.; KETLEY, J. M.; CHURCHER, C.; BASHAM, D.; CHILLINGWORTH, T.; DAVIES, R. M.; FELTWELL, T.; HOLROYD, S.; JAGELS, K.; KARLYSHEV, A. V.; MOULE, S.; PALLEN, M. J.; PENN, C. W.; QUAIL, M. A.; RAJANDREAM, M. A.; RUTHERFORD, K. M.; VAN VLIET, A. H.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B. G. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. **Nature**, v. 403, p. 665–668.

PEARSON, B. M.; GASKIN, D. J.; SEGERS, R. P.; WELLS, J. M.; NUIJTEN, P. J.; VAN VLIET, A. H. The complete genome sequence of *Campylobacter jejuni* strain 81116 (NCTC11828). **J Bacteriol.**, v. 189, p. 8402-3, 2007.

PESCI, E. C.; COTTLE, D. L.; PICKETT, C.L. Genetic, enzymatic, and pathogenic studies of the iron superoxide dismutase of *Campylobacter jejuni*. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 2687-2694, 1994.

PICKETT, C. L.; WHITEHOUSE, C. A. The cytolethal distending toxin family. **Trends Microbiol.**, v. 7, p. 292-297, 1999.

PICKETT, C. L.; COTTLE, D. L.; PESCI, E. C.; BIKAH, G. Cloning, sequencing, and expression of the *Escherichia coli* cytolethal distending toxin genes. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 1046-1051, 1994.

PIZARRO-CERDA, J.; COSSART, P. Bacterial adhesion and entry into host cells. **Cell.**, v. 124, p. 715-727, 2006.

PLATTS-MILLS, J.A.; BABJI, S.; BODHIDATTA, L.; GRATZ, J.; HAQUE, R.; HAVT, A.; MCCORMICK, B.J.; MCGRATH, M.; OLORTEGUI, M.P.; SAMIE, A.; SHAKOOR, S.; MONDAL, D.; LIMA, I.F.; HARIRAJU, D.; RAYAMAJHI, B.B.; QURESHI, S.; KABIR, F.; YORI, P.P.; MUFAMADI, B.; AMOUR, C.; CARREON, J.D.; RICHARD, S.A.; LANG, D.; BESSONG, P.; MDUMA, E.; AHMED, T.; LIMA, A.A.; MASON, C.J.; ZAIDI, A.K.; BHUTTA, Z.A.; KOSEK, M.; GUERRANT, R.L.; GOTTLIEB, M.; MILLER, M.; KANG, G.; HOUP, E.R.; MAL-ED Network Investigators. Pathogen-specific burdens of community diarrhea in developing countries: a multisite birth cohort study (MAL-ED). **Lancet Glob Health**, v. 3, n. 9, p. 564-575, 2015.

PLATTS-MILLS, J.A.; LIU, J.; GRATZ, J.; MDUMA, E.; AMOUR, C.; SWAI, N.; TANIUCHI, M.; BEGUM, S.; PEÑATARO YORI, P.; TILLEY, D.H.; LEE, G.; SHEN, Z.; WHARY, M.T.; FOX, J.G.; KOSEK, M.; HAQUE, R.; HOUP, E.R. *Campylobacter* detection and significance in stool by culture, enzyme immunoassay, or PCR in developing country settings. **J. Clin. Microbiol.**, v. 52, n. 4, 2014.

POLY, F., GUERRY, P. Pathogenesis of *Campylobacter*. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 24, p. 27-31, 2008.

POLY, F.; READ, T. D.; CHEN, Y. H.; MONTEIRO, M. A.; SERICHANTALERGS, O.; POOTONG, P.; BODHIDATTA, L.; MASON, C. J.; ROCKABRAND, D.; BAQAR, S.; PORTER, C. K.; TRIBBLE, D.; DARSLEY, M.; GUERRY, P. Characterization of two *Campylobacter jejuni* strains for use in volunteer experimental-infection studies. **Infect Immun.**, v. 76, p. 5655-5667, 2008.

PRESTON, M. A.; PENNER, J. L. Characterization of cross-reacting serotypes of *Campylobacter jejuni*. **Can J Microbiol.**, v. 35, n. 2, p. 265-73, 1986.

QUETZ, J. da S. **Diagnóstico microbiológico, imunoenzimático e molecular e perfil de genes associados à virulência de *Campylobacter***. 166 f. Tese (Doutorado) - Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

QUETZ, J. S.; LIMA, I. F.; HAVT, A.; CARVALHO, E. B.; LIMA, N. L.; SOARES, A. M.; MOTA, R. M. S.; GUERRANT, R. L.; LIMA, A. A. M. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in children from communities in Northeastern Brazil: molecular detection and relation to nutritional status. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v. 67, p. 220-227, 2010.

QUETZ, J. S.; LIMA, I. F.; HAVT, A.; PRATA, M. M.; CAVALCANTE, P. A.; MEDEIROS, P. H.; CID, D. A.; MORAES, M. L.; REY, L. C.; SOARES, A. M.; MOTA, R. M.; WEIGL, B. H.; GUERRANT, R. L.; LIMA, A. A. *Campylobacter jejuni* infection and virulence-associated genes in children with moderate to severe diarrhoea admitted to emergency rooms in northeastern Brazil. **J Med Microbiol.**, v. 61, n. 4, p. 507-13, 2012.

RAO, M. R.; NAFICY, A. B.; SAVARINO, S. J.; ABU-ELYAZEED, R.; WIERZBA, T. F.; PERUSKI, L. F.; ABDEL-MESSIH, I.; FRENCK, R.; CLEMENS, J. D. Pathogenicity and convalescent excretion of *Campylobacter* in rural Egyptian children. **Am J Epidemiol.**, v. 154, p. 166–173, 2001.

RASELLA, D.; AQUINO, R.; BARRETO M. L. Reducing childhood mortality from diarrhea and lower respiratory tract infections in Brazil. **Pediatrics**, v. 126, p. 534-40, 2010.

REED, R. P.; FRIEDLAND, I. R.; WEGERHOFF, F. O.; KHOOSAL, M. *Campylobacter* bacteremia in children. **Pediatr Infect Dis J.**, v. 15, p. 345–348, 1996.

RICHARDSON, J. F.; FROST, J. A.; KRAMER, J. M.; THWAITES, R. T.; BOLTON, F. J.; WAREING, D. R.; GORDON, J. A. Coinfection with *Campylobacter* species: an epidemiological problem? **J Appl Microbiol.**, v. 91, n. 2, p. 206-211, 2001.

RIDDLE, M. S.; GUERRY, P. Status of vaccine research and development for *Campylobacter jejuni*. **Vaccine**, 2016.

RIPABELLI, G.; TAMBURRO, M.; MINELLI, F.; LEONE, A.; SAMMARCO, M. L. Prevalence of virulence-associated genes and cytolethal distending toxin production in *Campylobacter* spp. isolated in Italy. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis.**, v. 33, n. 4, p. 355-64, 2010.

RIVERA-AMILL, V.; KIM, B. J.; SESHU, J.; KONKEL, M. E. Secretion of the virulence-associated *Campylobacter* invasion antigens from *Campylobacter jejuni* requires a stimulatory signal. **J. Infect. Dis.**, v. 183, p. 1607–1616, 2001.

RIZAL, A.; KUMAR, A.; VIDYARTHI, A. S. Prevalence of Pathogenic Genes in *Campylobacter jejuni* Isolated from Poultry and Human. **Internet Journal of Food Safety**, v. 12, p. 29-34, 2010.

ROZYNEK, E.; DZIERZANOWSKA-FANGRAT, K.; JOZWIAK, P.; POPOWSKI, J.; KORSK, D.; DZIERZANOWSKA, D. Prevalence of potential virulence markers in Polish *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates obtained from hospitalized children and from chicken carcasses. **J Med Microbiol.**, v. 54, n. 7, p. 615-9, 2005.

RUBINCHIK, S.; SEDDON, A.; KARLYSHEV, A. V. Molecular mechanisms and biological role of *Campylobacter jejuni* attachment to host cells. **European Journal of Microbiology and Immunology**, v. 2, n. 1, p. 32–40, 2012.

RUSSELL, R. G.; O'DONNOGHUE, M.; BLAKE, D. C.; ZULTY, J.; DETOLLA, L. J. Early colonic damage and invasion of *Campylobacter jejuni* in experimentally challenged infant Macaca mulatta. **J Infect Dis.**, v. 168, p. 210–215, 1993.

SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R. M.; ANGULO, F. J.; TAUXE, R. V.; WIDDOWSON, M. A.; ROY, S. L.; JONES, J. L.; GRIFFIN, P. M. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 17, p. 7–15, 2011.

SEBALD, M.; VERON, M. Base DNA content and classification of vibrios. **Ann Inst Pasteur**, v. 105, p. 897–910, 1963.

SELIWIORSTOW, T.; BARÉ, J.; BERKVEN, D.; VAN DAMME, I.; UYTENDAELE, M.; DE ZUTTER, L. Identification of risk factors for *Campylobacter* contamination levels on broiler carcasses during the slaughter process. **Int J Food Microbiol**, v.2, n. 226, p.26-32, 2016.

SEKOK. A. C.; BOTTA, G.A. *Campylobacter* enteritis in the Arabian Gulf. **J. Infect. Dev. Ctries.**, v. 3, n. 2, p. 74-82, 2009.

SHIGEMATSU, M.; UMEDA, A.; FUJIMOTO, S.; AMAKO, K. Spirochaete-like swimming mode of *Campylobacter jejuni* in a viscous environment. **J Med Microbiol.**, v. 47, p. 521–526, 1998.

SHOSHANI, L.; CONTRERAS, R. G. Biogenesis of epithelial polarity and tight junctions. In: Tight Junctions. **Boca Raton, FL: CRC**, 2ed, p. 165–169, 2001.

SIERRA-ARGUELLO, Y. M.; PERDONCINI, G.; MORGAN, R. B.; SALLE CT, MORAES, H. L.; GOMES, M. J.; NASCIMENTO, V. P. Fluoroquinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* isolated from broiler slaughterhouses in southern Brazil. **Avian Pathol.**, v. 45, n. 1, p. 66-72, 2016.

SILVA, D. T.; TEJADA, T. S.; BLUM-MENEZES, D.; DIAS, P. A.; TIMM, C. D. *Campylobacter* species isolated from poultry and humans, and their analysis using PFGE in southern Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 217, p. 189–194, 2016.

SIMA, L. C.; NG, R.; ELIMELECH, M. Modeling risk categories to predict the longitudinal prevalence of childhood diarrhea in Indonesia. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 89, n. 5, p. 884-91, 2013.

SIMONOVIC, I.; ROSENBERG, J.; KOUTSOURIS, A.; HECHT, G. Enteropathogenic *Escherichia coli* dephosphorylates and dissociates occludin from intestinal epithelial tight junctions. **Cell Microbiol.**, v. 2, p. 305–315, 2000.

SINGH, H.; RATHORE, R.; SINGH, S.; CHEEMA, P.S. Comparative analysis of cultural isolation and PCR based assay for detection of *Campylobacter jejuni* in food and faecal samples. **Braz. J. Microbiol.**, v. 42, p. 181-186, 2011.

SKIRROW, M. B. John Mc Fadyean and the centenary of the first isolation of *Campylobacter* species. **Clin. Infect. Dis.**, v.43, p. 1213–1217, 2006.

SKIRROW, M. B.; BLASER, M. J. Clinical aspects of *Campylobacter* infection. 2nd edition. Washington, DC: **ASM Press**; 2000.

SMITH, J. L.; FRATAMICO, P. M. Fluoroquinolone resistance in *Campylobacter*. **J Food Prot.**, v. 73, p. 1141–1152, 2010.

SOBEL, J.; GOMES, T. A.; RAMOS, R. T.; HOEKSTRA, M.; RODRIGUE, D.; RASSI, V.; GRIFFIN, P. M. Pathogen-specific risk factors and protective factors for acute diarrheal illness in children aged 12-59 months in São Paulo, Brazil. **Clin Infect Dis.**, v. 38, n. 11, p. 1545-51, 2004.

SOOFI, S. B.; HABIB, M. A.; VON SEIDLEIN, L.; KHAN, M. J.; MUHAMMAD, S.; BHUTTO, N.; KHAN, M. I.; RASOOL, S.; ZAFAR, A.; CLEMENS, J. D.; NIZAMI, Q.; BHUTTA, Z. A. A comparison of disease caused by *Shigella* and *Campylobacter* species: 24 months community based surveillance in 4 slums of Karachi, Pakistan. **J Infect Public Health**, v. 4, n. 1, p. 12-21, 2011.

STORZ, G.; IMLAY, J. A. Oxidative stress. **Current Opinions in Microbiology**, v. 2, p. 188-194, 1999.

STROTHER, K. O.; STEELMAN, C. D.; GBUR, E. E. Reservoir competence of lesser mealworm (Coleoptera: Tenebrionidae) for *Campylobacter jejuni* (Campylobacterales: Campylobacteraceae). **J Med Entomol.**, v. 42, p. 42–47, 2005.

SUN, Z.; WANG, X.; WALLEN, R.; DENG, X. D. U.; HALLBERG, E. X.; ANDERSSON, R. The influence of apoptosis on intestinal barrier integrity in rats. **Scand J Gastroenterol.**, v. 33, p. 415–422, 1998.

SZYMANSKI, C. M.; GAYNOR, E. C. How a sugary bug gets through the day: recent developments in understanding fundamental processes impacting *Campylobacter jejuni* pathogenesis. **Gut Microbes**, v. 3, p. 135–144, 2012.

SZYMANSKI, C. M.; KING, M.; HAARDT, M.; ARMSTRONG, G.D. *Campylobacter jejuni* motility and invasion of Caco-2 cells. **Infect. Immun.** 63, 4295–4300, 1995.

TABOADA, E. N.; CLARK, C. G.; SPROSTON, E. L.; CARRILLO, C. D. Current methods for molecular typing of *Campylobacter* species. **Journal of Microbiological Methods**. v. 95, p. 24–31, 2013.

TALUKDER, K. A.; ASLAM, M.; ISLAM, Z.; AZMI, I. J.; DUTTA, D. K.; HOSSAIN, S.; NUR-E-KAMAL, A.; NAIR, G. B.; CRAVIOTO, A.; SACK, D. A.; ENDTZ, H. P. Prevalence of virulence genes and cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* isolates from diarrheal patients in Bangladesh. **J Clin Microbiol.**, v. 46, n. 4, p. 1485-8, 2008.

TAYLOR, E. V.; HERMAN, K. M.; AILES, E. C.; FITZGERALD, C.; YODER, J. S.; MAHON, B. E.; TAUXE, R. V. Common source outbreaks of *Campylobacter* infection in the USA, 1997-2008. **Epidemiol Infect.**, v. 141, n. 5, p. 987-96, 2013.

THIELMAN, N. M.; GUERRANT, R. L. Acute infectious diarrhea. **N Engl J Med.**, v. 350, p. 38–47, 2004.

TOSIN, I., MACHADO, R. A. Ocorrência de *Campylobacter* spp. entre manipuladores de alimentos em cozinhas hospitalares de localidade urbana da Região Sul do Brasil. **Rev. Saúde Públ.**, v. 29, p. 472–477, 1995.

TRACZ DM, KEELAN M, AHMED-BENTLEY J, GIBREEL A, KOWALEWSKA-GROCHOWSKA K, TAYLOR DE. *pVir* and bloody diarrhea in *Campylobacter jejuni* enteritis. **Emerg Infect Dis.**, v. 11, n. 6, p. 838-43, 2005.

TRACZ, D. M.; KEELAN, M.; AHMED-BENTLEY, J.; GIBREEL, A.; KOWALEWSKA-GROCHOWSKA, K.; TAYLOR, D. E. *pVir* and bloody diarrhea in *Campylobacter jejuni* enteritis. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 11, p. 838–843, 2005.

TRIBBLE, D. R.; BAQAR, S.; SCOTT, D. A.; OPLINGER, M. L.; TRESPALACIOS, F.; ROLLINS, D.; WALKER, R. I.; CLEMENTS, J. D.; WALZ, S.; GIBBS, P.; BURG, E. F. R. D.; MORAN, A. P.; APPLEBEE L.; BOURGEOIS, A. L. Assessment of the duration of protection in *Campylobacter jejuni* experimental infection in humans. **Infect Immun.**, v. 78, p. 1750–1759, 2010.

VALLY, H.; GLASS, K.; FORD, L.; HALL, G.; KIRK, M. D.; SHADBOLT, C.; VEITCH, M.; FULLERTON, K. E.; MUSTO, J.; BECKER, N. Proportion of illness acquired by foodborne transmission for nine enteric pathogens in Australia: an expert elicitation. **Foodborne Pathog Dis.**, v. 11, p. 727–733, 2014.

VAN DER STEL, A. X.; VAN MOURIK, A.; HEIJMEN-VAN DIJK, L.; PARKER, C. T.; KELLY, D. J.; VAN DE LEST, C. H.; VAN PUTTEN, J. P.; WÖSTEN, M. M. The *Campylobacter jejuni* RacRS system regulates fumarate utilization in a low oxygen environment. **Environ Microbiol.**, v. 17, n. 4, p. 1049-64, 2015.

VAN DER VELDEN, A. W.; BAUMLER, A. J.; TSOLIS, R. M.; HEFFRON, F. Multiple fimbrial adhesins are required for full virulence of *Salmonella typhimurium* in mice. **Infect Immun.**, v. 66, p. 2803–2808, 1998.

VAN DOORN, P. A.; RUTS, L.; JACOBS, B. C. Clinical features, pathogenesis, and treatment of Guillain-Barre syndrome. **Lancet Neurol.**, v. 7, p. 939–950, 2008.

VAN PUTTEN, J. P.; VAN ALPHEN, L. B.; WÖSTEN, M. M.; DE ZOETE M. R. Molecular Mechanisms of *Campylobacter* Infection. **Curr Top Microbiol Immunol.**, v. 337, p. 197-229, 2009.

VAN VLIET, A. H.; BAILLON, M. L.; PENN, C. W.; KETLEY, J. M. *Campylobacter jejuni* contains two fur homologs: Characterization of iron-responsive regulation of peroxide stress defence genes by the PerR repressor. **J Bacteriol.**, v. 181, p. 6371–6376, 1999.

VAN VLIET, A. H.; WOOLDRIDGE, K. G.; KETLEY, J. M. Iron responsive gene regulation in a *Campylobacter jejuni* Fur mutant. **J Bacteriol.**, v. 180, p. 5291–5298, 1998.

VANDAMME, P. "Taxonomy of the family Campylobacteraceae,". In: *Campylobacter*, edsl. Namchamkin and M. J. Blaser. P. 3-27. Washington, DC: **ASM**, 2000.

VANDAMME, P.; DEBRUYNE, L.; DEBRANDT, E.; FALSEN, E. Reclassification of *Bacteroides ureolyticus* as *Campylobacter ureolyticus* comb. nov., and emended description of the genus *Campylobacter*. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 60, n.9, p. 2016-2022, 2010.

VANDAMME, P.; DEWHIRST, F. E.; PASTER, B. J.; ON, S. L. W. Campylobacteraceae. In Garrity GM, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT (ed), **Bergey's manual of systematic bacteriology**, v. 2, p. 1147–1160, Springer Science, New York, NY, 2005.

VASCO, G.; TRUEBA, G.; ATHERTON, R.; CALVOPIÑA, M.; CEVALLOS, W.; ANDRADE, T.; EGUIGUREN, M.; EISENBERG, J. N. Identifying Etiological Agents Causing Diarrhea in Low Income Ecuadorian Communities. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 91, n. 3, p. 563-9, 2014.

VERAS, H. N.; QUETZ, J. S.; LIMA, I. F. N.; RODRIGUES, T. S.; HAVT, A.; REY, L. C.; MOTA, R. M. S.; SOARES, A. M.; SINGHAL, M.; WEIGL, B; GUERRANT, R.; LIMA, A. A. M. Combination of different methods for detection of *Campylobacter*spp. in young children with moderate to severe diarrhea. **Journal of Microbiological Methods**, v. 128, p. 7-9, 2016.

WAGENAAR; J. A.; FRENCH, N. P.; HAVELAAR, A. H. Preventing *Campylobacter* at the source: why is it so difficult? **Clin Infect Dis.**, v. 57, p. 1600–1606, 2013.

WASSENAAR, T. M.; BLASER, M. J. Pathophysiology of *Campylobacter jejuni* infections of humans. **Microbes and Infection**, v. 1, p. 1023–1033, 1999.

WATSON, R. O.; GALAN, J. E. *Campylobacter jejuni* survives within epithelial cells by avoiding delivery to lysosomes. **PLoS Pathog.**, v.4, n. 14, 2008.

WHITEHOUSE, C. A.; BALBO, P. B.; PESCI, E. C.; COTTLE, D. L.; MIRABITO, P. M.; PICKETT, C. L. *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin causes a G2-phase cell cycle block. **Infect Immun.**, v. 66, p. 1934–1940, 1998.

WHITESELL, L.; LINDQUIST, S. L. HSP90 and the chaperoning of cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 5, p. 761–772, 2005.

WHO, World Health Organization. **Health topics**. Diarrhoea. Geneva, 2013. Disponível em: < <http://www.who.int/topics/diarrhoea/en/> > Acesso em: 30 de abril de 2016.

WHO, World Health Organization. The global view of campylobacteriosis: report of an expert consultation. **Food Safety**. 69p, Netherlands. 2012.

WIECZOREK, K.; DENIS, E.; LYNCH, O.; OSEK, J. Molecular characterization and antibiotic resistance profiling of *Campylobacter* isolated from cattle in Polish slaughterhouses. **Food Microbiol.**, v. 34, n. 1, p. 130- 6, 2013.

- WIECZOREK, K.; OSEK, J. Antimicrobial resistance mechanisms among *Campylobacter*. **Biomed Res Int.**, 2013.
- YOUNG, K. T.; DAVIS, L. M.; DIRITA, V. J. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 5, p. 665–679, 2007.
- YU, R. K., USUKI, S., ARIGA, T. Ganglioside molecular mimicry and its pathological roles in Guillain–Barre syndrome and related diseases. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 6517–6527, 2006.
- YUKI, N.; HARTUNG, H. P. Guillain-Barre syndrome. **N Engl J Med.**, v. 366, n. 24, p. 2294–304, 2012.
- ZAUTNER, A. E.; TAREEN, A. M.; GROB, U.; LUGERT, R. Chemotaxis in *Campylobacter jejuni*. **Eur J Microbiol Immunol.**, v. 2, p. 24–31, 2012,
- ZENG, D.; ZHANG, X.; XUE, F.; WANG, Y.; JIANG, L.; JIANG, Y. Phenotypic Characters and Molecular Epidemiology of *Campylobacter Jejuni* in East China. **J Food Sci.**, v. 81, n. 1, p. 106-13, 2015.
- ZIPRIN, R. L.; YOUNG, C. R.; BYRD, J. A.; STANKER, L. H.; HUME, M. E.; GRAY, S. A. et al. Role of *Campylobacter jejuni* potential virulence genes in cecal colonization. **Avian Dis.**, v. 45, p. 549–557, 2001.
- ZIPRIN, R. L.; YOUNG, C. R.; STANKER, L. H.; HUME, M. E.; KONKEL, M. E. The absence of cecal colonization of chicks by a mutant of *Campylobacter jejuni* not expressing bacterial fibronectin-binding protein. **Avian Dis.**, v. 43, p. 586–589, 1999.
- ZHOU, Y.; MCARDLE, J. J. Rationale and Applications of Survival Tree and Survival Ensemble Methods. **Phycometrika**, v. 80, p. 811–833, 2015.

ANEXOS

ANEXO A- CONEP 13.523/2007 (Parecer 366/07)



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 366/2007

Registro CONEP: 13523 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Registro no CEP: 80/06 Processo nº 25000.184266/2006-21
Projeto de Pesquisa: "Avaliação de um teste prático para diagnóstico das diarreias (DEC) em uma unidade Hospitalar de Fortaleza - Brasil". Versão 01 de 19/10/2006.
Termo de Consentimento Livre Esclarecido, versão sem data.
Pesquisador Responsável: Dr. Aldo A. Moreira Lima
Instituição: Hospital Infantil Albert Sabin /CE
Área Temática Especial: Cooperação Estrangeira/ Novos Testes Diagnósticos
Patrocinador: National Institute of Allergy and Infectious Disease – NIAID

Sumário Geral do Protocolo

Os objetivos do estudo são avaliar a sensibilidade e especificidade do teste DEC utilizando amostras colhidas de crianças com sintomas de doença diarreica em unidades clínicas situadas em um país em desenvolvimento (Fortaleza-Brasil) e avaliar o efeito do teste de lactoferrina em combinação com a coprocultura para detecção de casos, quando comparado com a cultura isolada de espécimes clínicos.

Este estudo envolverá crianças que se apresentem aos serviços de pediatria ambulatorial no Nordeste do Brasil. Será realizado na Unidade de Pesquisa Clínica da Universidade Federal do Ceará, com amostras coletadas no Serviço de Emergências Clínicas do Hospital Infantil Albert Sabin. Os critérios de inclusão requerem que os indivíduos apresentem 3 ou mais fezes líquidas nas últimas 24 horas, e os pais autorizem se for menor de 18 anos; como fatores de exclusão, que tenham utilizado antibiótico nos últimos 30 dias e os pais não autorizarem, ou já terem sido previamente recrutados no estudo.

Quando comparecer no serviço e concordar em participar do estudo, após assinatura do TCLE, o clínico do estudo preencherá um formulário sucinto de informações clínicas; o clínico ou enfermeiro coletará uma amostra de fezes em copo padrão, se houver omissão disponível. Se não, o clínico coletará um swab retal, e as amostras serão transportadas para o laboratório para processamento. Seis swabs e três criotubos serão preparados, sendo o primeiro para coprocultura e provas imunológicas (destino do único coletado, se não houver fezes), o segundo será inoculado em caldo MacConkey e incubado overnight, sendo o resultado da cultura preservado sob congelamento e posteriormente enviado para Seattle, assim como, 3 criotubos preenchidos com amostras fecais, etiquetados e congelados para futuras pesquisas com o DEC cu outros métodos diagnósticos; qualquer amostra restante será utilizada para os testes de lactoferrina.

Pelo cálculo amostral apresentado, e justificando a baixa prevalência dos patógenos pesquisados, e calculado um número de 1166 indivíduos. Os dados serão enviados pela equipe do laboratório da UFC ao PATH. Na página 12 consta que o estudo é financiado pelo NIAID e NIH com projeto número UO1AI61187 "A multiples, point of care test for enteric pathogens".

Cont. Parecer CONEP 366/2007.

O projeto é multicêntrico envolvendo a Universidade da Virgínia, Universidade Federal de Fortaleza e o Hospital Albert Sabin na mesma cidade. O país de origem é EUA, e não consta neste projeto que participará do estudo. Em projeto anexo descrevendo todo o desenvolvimento de testes diagnósticos pelo PATH, é citado que material armazenado de indivíduos de lá será utilizado, mas sem detalhes (ao redor de 500 amostras, na área de Seattle). Não fica muito claro neste projeto de onde virá este material (coletados nas clínicas de Seattle). Não tem aprovação ética do país de origem. Participam pesquisadores americanos, Matthew Steele, Bernard Weigl, Richard Guernant e mais dois co investigadores e no Brasil o investigador principal é o Prof Aldo Moreira Lima e o coordenador de campo Luis Carlos Rey, entretanto ninguém é indicado como pesquisador responsável. Há uma carta do Prof Aldo Moreira Lima destacando as vantagens para o país, dessa participação no desenvolvimento deste teste, pois ajudaria no tratamento de inúmeras crianças em nosso país.

Considerações

Ao se proceder à análise do projeto de pesquisa em questão, em resposta ao Parecer CONEP nº 067/2007, cabem as seguintes considerações:

- O pesquisador respondeu adequadamente as questões colocadas, justificando o embasamento teórico que fez do problema que anteriormente se baseava em ataques terroristas. Justificou que a verba destinava-se para algo ligado a este fato;
- Justificou a não realização no país de origem, pela etiologia diferente das diarreias, alegando que nos EUA a maioria é de origem viral e não bacteriana como no local onde será realizada a pesquisa e para qual se destina o teste em desenvolvimento;
- Forneceu maiores informações sobre a coleta de material e sobre o envio deste para o exterior, respondendo satisfatoriamente às questões colocadas.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

Brasília, 24 de abril de 2007.

Gyselle Saddi Tannous
Coordenadora Interina da CONEP/CNS/MS

ANEXO B - CEP (HIAS)**HOSPITAL INFANTIL ALBERT SABIN
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HIAS

O protocolo "Avaliação de um teste prático para diagnóstico etiológico das diarreias (DEC) em uma unidade hospitalar de Fortaleza, Brasil", versão 3.0, tradução do protocolo em inglês "Brazil DEC evaluation protocol v.3.0" foi recebido pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Infantil Albert Sabin (CEP-HIAS), e foi considerado conforme o projeto DEC anteriormente submetido e já aprovado por este Comitê (Registro CONEP 13526). O CEP-HIAS considera assim o protocolo acima aprovado para sua implementação.

Fortaleza, 22 de janeiro de 2008.

Regina L. Ribeiro Moreno

Coordenadora do CEP-HIAS

Coord^a do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital Infantil Albert Sabin

ANEXO C – TCLE

Protocolo de Avaliação do DEC – Brasil, versão em português 5.0 de 25.08.2008
Avaliação de um cartão para diagnóstico entérico para manejo de diarreia (DEC) em Unidades Hospitalares de Fortaleza, Brasil

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ e HOSPITAL INFANTIL ALBERT SABIN, Fortaleza, CE, BRASIL
e
PATH, Seattle WA, EUA

TÍTULO DO ESTUDO: Avaliação de um Cartão para Diagnóstico Entérico para Manejo de Diarreia (DEC) em Unidades Hospitalares de Fortaleza, Brasil

TERMO DE CONSENTIMENTO PARA OS PAIS

PESQUISADORES:

Aldo Lima Ph.D.	Universidade Federal do Ceará. (Fone: 55-85-3366-8437)
Richard Guerrant M.D., Ph.D.	Universidade da Virginia, Virginia, EUA
Matthew Steele Ph.D., M.P.H.	PATH, Seattle, Washington. EUA
Bernhard Weigl Ph.D.	PATH, Seattle, Washington. EUA

INTRODUÇÃO

Convidamos você a permitir que seu (a) filho (a) possa participar de uma pesquisa médica. A participação dela é voluntária. Este formulário dá um resumo da informação que os pesquisadores discutirão com você. Se sua criança participar deste trabalho de pesquisa, você ficará com uma cópia deste formulário. Certifique-se de ter feito todas as perguntas que você tenha sobre esta pesquisa.

Seu filho poderá participar deste estudo porque ele está com diarreia.

PORQUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO REALIZADO?

Este estudo está sendo feito para desenvolver um teste que ajude os médicos a conhecer a causa da diarreia. Se o novo teste funcionar, ele dirá aos médicos o que está causando a diarreia em menos de meia hora. Hoje, leva de 3 a 5 dias para saber o que causa a diarreia na criança.

Nós estamos coletando amostras de fezes das crianças da Emergência com diarreia. Gostaríamos de coletar uma pequena amostra de fezes de seu filho. Estamos planejando coletar amostras de fezes de mais de 1000 crianças que vêm a este Hospital.

Os pesquisadores e médicos do hospital estão trabalhando com pesquisadores dos Estados Unidos (EUA). Os pesquisadores americanos são do PATH, uma organização sem fins lucrativos de Seattle, estado de Washington, e a Universidade de Virginia.

QUEM ESTÁ PARTICIPANDO DO ESTUDO?

Se você permitir deixar seu filho participar, um profissional vai examinar seu filho, fará perguntas sobre a saúde dele e sobre a diarreia. Você será interrogado sobre trabalho e tempo de estudo. O exame é uma parte de rotina no atendimento de seu filho mas as perguntas que faremos em geral não são feitas pelo médico. Se seu filho preencher os critérios de inclusão, uma amostra de fezes dele será coletada.

A pequena amostra de fezes será coletada da fralda de seu filho (se ele for menor de dois anos). Para as crianças maiores, a amostra será coletada com um recipiente. Se a criança não puder nos dar uma amostra de fezes dessa maneira, coletaremos uma pequena amostra com um swab retal. Poderemos lhe pedir de coletar uma amostra em casa e trazer para o hospital.

Utilizaremos a amostra de fezes para fazer os exames padrões para saber o que está causando a diarreia na sua criança. Uma parte da amostra será utilizada para o novo teste. Como nós não sabemos se o novo teste é correto, os resultados não podem ainda ser usados para os cuidados do seu filho ou para o tratamento.

Com sua permissão, alguma quantidade da amostra será congelada e encaminhada para PATH nos Estados Unidos. A amostra será utilizada para confirmar o estudo em testes futuros e não poderá retornar uma vez que for despachada. As amostras enviadas aos Estados Unidos não terão nomes ou outra informação que possa identificar seu filho.

QUAIS SÃO OS RISCOS DE PARTICIPAR DESTA PESQUISA?

Não há riscos conhecidos para sua criança participar deste estudo. A coleta de amostra de fezes de seu filho em um recipiente ou da fralda não causa qualquer dano. A coleta de amostra por um swab colocado no reto pode causar um desconforto passageiro. A coleta de amostra retal é uma prática rotineira em crianças com diarreia grave na Emergência para fazer exames de diagnóstico. Não é uma prática de rotina em crianças com diarreia leve.

EXISTEM BENEFÍCIOS PARA PARTICIPAR NESTA PESQUISA?

Participando este estudo, seu filho receberá o tratamento normal dos pacientes com diarreia na Emergência. Também testaremos as fezes para compreender o que está causando a diarreia. Este teste geralmente não é feito nas diarreias comuns. A informação será utilizada para ajudar no tratamento da sua criança se seu filho tiver um caso grave de diarreia que necessite ficar hospitalizado no Albert Sabin.

Regina Lúcia R. Moreno
 Coord. Comitê de Ética em Pesquisa
 Hospital Infantil Albert Sabin

Protocolo de Avaliação do DEC – Brasil, versão em português 5.0 de 25.08.2008
Avaliação de um cartão para diagnóstico entérico para manejo de diarreia (DEC) em Unidades Hospitalares de Fortaleza, Brasil

O que nós vamos aprender com este estudo pode ajudar a desenvolver um novo teste para saber rapidamente a causa da diarreia. Isto vai ajudar as crianças com diarreia no futuro.

COMO FICA A CONFIDENCIALIDADE?

A informação que nós coletarmos e as amostras de fezes serão etiquetadas com um número da pesquisa. Nenhum nome será utilizado para os questionários ou as amostras de fezes. Somente os pesquisadores brasileiros saberão qual o código que vincula o nome da criança ao questionário da pesquisa e amostra de fezes. Os pesquisadores dos Estados Unidos não terão o vínculo de acesso ao nome da criança.

Os dados da pesquisa serão mantidos durante 5 anos depois do fim do estudo. O vínculo entre o número do estudo e o prontuário clínico da criança será destruído quando os resultados do laboratório forem colocados no prontuário. As amostras de fezes da pesquisa enviadas aos Estados Unidos serão mantidas oito anos e utilizadas em pesquisas futuras sobre diarreia.

Nenhum nome será utilizado em publicações ou apresentação dos resultados da pesquisa.

MEU/MINHA FILHO(A) OU EU SEREMOS PAGOS PARA PARTICIPAR DO ESTUDO?

Não há pagamento para você ou seu/sua filho(a) para participar do estudo.

QUAIS SÃO OS DIREITOS DO MEU/MINHA FILHO(A) COMO PARTICIPANTE DA PESQUISA?

Participar da pesquisa é um gesto voluntário. Você pode decidir não querer que seu/sua filho(a) participe do estudo. Você pode mudar de opinião em qualquer momento e se retirar do estudo. Sua decisão de sair do estudo não vai afetar o atendimento médico do seu filho no Hospital Infantil Albert Sabin de modo algum.

A QUEM DEVO CHAMAR SE TIVER PERGUNTAS OU PROBLEMAS?

Se você tiver qualquer dúvida sobre o estudo por favor ligue para o Dr. Aldo Lima, telefone 33668445 na Universidade Federal do Ceará.

Se você tiver dúvidas sobre os direitos de seu filho como participante da pesquisa, por favor chame Dr. Regina Lúcia Moreno, da Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital Infantil Albert Sabin. Dra. Regina Lúcia pode ser encontrada no telefone local 31014193.

PERGUNTAS PARA CONFIRMAÇÃO DA COMPREENSÃO DO PROTOCOLO DA PESQUISA

Antes de assinar este termo de consentimento, o pesquisador lhe fará uma série de perguntas para ter certeza de que você entendeu a pesquisa e os direitos de seu/sua filho(a).

- | | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. Vai haver coleta de uma amostra de fezes neste estudo? | SIM / NÃO |
| 2. Seu/sua filho(a) receberá atendimento e tratamento da diarreia se você não quiser participar da pesquisa? | SIM / NÃO |
| 3. Existe alguma penalidade para seu/sua filho(a) se você disser NÃO para participar da pesquisa? | SIM / NÃO |
| 4. Seu/sua filho(a) será pago para participar da pesquisa? | SIM / NÃO |
| 5. Amostras de fezes serão enviadas aos Estados Unidos para continuar com os estudos sobre diarreia? | SIM / NÃO |

DECLARAÇÃO DOS PAIS

A pesquisa foi bem explicada para mim. Eu tive oportunidade de fazer perguntas. Eu sei a quem ligar para qualquer dúvida futura que eu possa ter. Eu concordo que meu filho participe da pesquisa. Uma cópia deste termo de consentimento me foi dada.

ASSINATURA DOS PAIS

Se você concorda em permitir que seu filho tome parte na pesquisa, por favor assine este formulário. Por favor, marque abaixo se aceita fazer doação de uma amostra de fezes para pesquisa posterior.

- Sim, amostra restante de fezes podem ser enviadas ao PATH nos Estados Unidos. A amostra será codificada e os pesquisadores do PATH não terão acesso ao nome da criança. Eu entendo que as amostras ficarão armazenadas durante 8 anos para confirmar a pesquisa diagnóstica.
- Não, o restante das amostras de fezes de meu filho não serão enviadas aos Estados Unidos para pesquisas futuras sobre diarreia.

Impressão do polegar do
parente (se necessário)

Nome do Pai ou Responsável Legal

Assinatura do Pai ou Responsável Legal



Regina Lúcia R. Moreno
Coord. Comissão de Ética em Pesquisa
Hospital Infantil Albert Sabin

Protocolo de Avaliação do DEC – Brasil, versão em português 5.0 de 25.08.2008
Avaliação de um cartão para diagnóstico entérico para manejo de diarreia (DEC) em Unidades Hospitalares de Fortaleza, Brasil

Eu estive presente enquanto a pesquisa foi explicada aos pais.
Minha assinatura como testemunha certifica que o participante ou seu responsável legal assinou esta folha de consentimento informado na minha presença como ato consciente de sua vontade.

Nome da testemunha

Data

Assinatura da testemunha

Carolina Costa R. Menezes
Coord. Clínica de Citar em Pesquisa
Hospital Infantil Albert Sabin

ANEXO D - CEP (CAC)



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
 Rua Tertuliano Sales 544 – Vila União Fortaleza – Ceará
 Fone/Fax: (85) 3101.4212 – 3101.4283
 E-mail: cep@hias.ce.gov.br



Referência: Protocolo CEP-HIAS N° 80/06

Título: Avaliação de um Cartão de Diagnóstico Entérico para o Manejo de Diarréia em uma Unidade Hospitalar de Fortaleza, Brasil, versão 5.0.

Coordenadores locais do estudo: Dr. Aldo A. M. Lima
 Dr. Luis Carlos Rey

Levamos ao conhecimento dos responsáveis pelo projeto “Avaliação de um Cartão de Diagnóstico Entérico para o Manejo de Diarréia em uma Unidade Hospitalar de Fortaleza, Brasil”, que o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Infantil Albert Sabin (CEP-HIAS), analisou e aprovou a emenda ao protocolo versão 4.0, onde se prevê que o Centro de Assistência à Criança Dra. Lúcia de Fátima R. G. Sá torne-se um novo local de recrutamento de crianças com diarréia e coleta de amostras de fezes para o estudo. Esta emenda, agora aprovada, transforma a versão 4.0, datada de 25 de agosto de 2008, na nova versão 5.0 do mesmo protocolo.

Fortaleza, 30 de outubro de 2008.


 Regina Lúcia Ribeiro Moreno
 Coordenadora do CEP-HIAS

Regina Lúcia R. Moreno
 Coord. Comitê de Ética em Pesquisa
 Hospital Infantil Albert Sabin

Secretaria Municipal de Saúde
 Hospital Nossa Senhora da Conceição
 Conjunto Ceará – IV Etapa
 Regional VI
 Fortaleza – CE

À Comissão de Ética em Pesquisas do Hospital Infantil Albert Sabin,


Eu abaixo assinado, Diretora Clínica do Hospital Distrital N. Senhora da Conceição, estou ciente da pesquisa intitulada “**Avaliação de um Cartão para Diagnóstico Entérico para Manejo de Diarréia (Dec) em Unidades Hospitalares de Fortaleza, Brasil**”, e aprovo sua realização nesta Unidade Hospitalar, desde que dentro das Normas Exigidas pela Comissão de Ética do HIAS.

Fortaleza, 03 de setembro de 2008.




 Dra. Dr. Antônio de Pádua Siqueira
 Diretor Geral

Dr. Antônio de Pádua Siqueira Martins
 CREMEC: 4916-CPF 355.365.783-91
 Diretor Executivo do H.N.S.C.

ANEXO E - Checklist de Elegibilidade

	<p><i>Avaliação de um cartão para diagnóstico entérico para manejo de diarreia (DEC) em uma Unidade Hospitalar de Fortaleza, Brasil</i></p>	<p>HIAS-UFC</p>
<p>Checklist de Elegibilidade Para o Recrutamento de Participantes</p>		
<p>1. O paciente não apresentou 3 ou mais fezes líquidas nas últimas 24 horas?</p>		
<p>SE SIM, NÃO INCLUIR NO ESTUDO</p>	<p>SIM ___ NÃO ___</p>	
<p>2. A criança é amamentada exclusivamente ao seio?</p>		
<p>SE SIM, NÃO INCLUIR NO ESTUDO</p>	<p>SIM ___ NÃO ___</p>	
<p>3. A criança tomou antibiótico nos últimos 30 dias?</p>		
<p>SE SIM, NÃO INCLUIR NO ESTUDO</p>	<p>SIM ___ NÃO ___</p>	
<p>4. A criança estava internada por 12 h ou mais antes de vir ao HIAS?</p>		
<p>SE SIM, NÃO INCLUIR NO ESTUDO</p>	<p>SIM ___ NÃO ___</p>	
<p>5. A criança já participou deste mesmo estudo antes?</p>		
<p>SE SIM, NÃO INCLUIR NO ESTUDO</p>	<p>SIM ___ NÃO ___</p>	

ANEXO F – Questionário (Dados epidemiológicos e clínicos)

	Avaliação de um cartão para diagnóstico entérico para manejo de diarreia (DEC) em uma Unidade Hospitalar de Fortaleza, Brasil	HIAS-UFC
Formulário de Avaliação Clínica (CRF)		
		
1. Data de aplicação do questionário ____/____/____		
2. Seu filho é menino (1) ou menina (2)?	Sexo ____	
3. Qual o dia do aniversário de seu filho?	Data de nascimento ____/____/____	
4. Qual a idade de seu filho(a)	__ anos __ meses	
5. Quantas pessoas moram na casa da criança (inclusive)?	__ pessoas	
6. Quantos cômodos tem a casa onde mora a criança?	_____	
7. Quantos cômodos a casa tem para dormir?	_____	
8. Quantas pessoas fumam na casa?	_____	
9. Você prepara o alimento da criança?	Sim ____ Não ____	
10. Você lava as mãos antes de preparar o alimento da criança?	Sim ____ Não ____	
11. A casa tem água da Cagece?	Sim ____ Não ____	
12. A água de beber da casa é proveniente de :	_____	
1= CAGECE, 2= poço profundo, 3= cacimba, 4= carroça, 5= lagoa/riacho/rio, 6= outras fontes _____		
13. Se não possui água encanada, o que você faz antes de cozinhar ou beber a água: ____		
1= ferve 2= usa filtro 3= usa solução de cloro 4= outro _____		
14. A casa tem sanitário com descarga?	Sim ____ Não ____	
15. O sanitário fica dentro da casa?	Sim ____ Não ____	
16. Existe água corrente e sabão para lavar as mãos perto do sanitário	Sim ____ Não ____	
17. O sanitário está ligado na rede de esgoto da cidade?	Sim ____ Não ____	
18. Crianças menores de 5 anos defecam no chão da casa/quintal?	_____	
(1= sempre, 2= frequentemente, 3= poucas vezes, 4= não ou raramente, 9=		
NS)		
19. Animais costumam ficar dentro da casa?	Sim ____ Não ____	
20. <u>Se sim</u> , que animais ficam dentro de casa	_____	

1= cão, 2= gato, 3= galinha, 4=outro _____

21. Quantos anos de estudos a mãe da criança completou? ___série ___grau, ___anos
(99= NS)
22. Quantos anos de educação escolar o pai completou? ___série ___grau, ___anos
23. No último mês, qual foi a renda total da família? ___ ___ ___ reais/mês NS ___
24. Quantas vezes seu filho(a) evacuou ontem? _____/dia
25. Há quanto tempo seu filho(a) está com diarreia? ___ dias ___ meses ___ NS
26. Teve sangue vivo nas fezes de seu filho durante algum episódio de diarreia? ___ Não
___ Somente raios de sangue
___ Sim
___ Sim, alguém viu sangue
___ Não sabe
27. Seu filho teve dor de barriga forte desde o início da doença?
___ Sim, mas não foi a causa da consulta
___ Sim, a dor é muito forte (choro constante, flexão do tronco)
___ Não
___ NS
28. A criança vomitou desde o início da doença? ___ Sim ___ Não ___ NS
29. Quantos dias a criança teve vômitos nesta doença? _____dias
30. Seu filho teve febre durante esta doença? ___ Sim ___ Não ___ NS
31. Se sim, qual a mais alta temperatura que ele teve? ___ ___, ___ graus C
___ Não foi medida

Entrevistador _____ Data da entrevista ___ ___/___ ___/___

ANEXO G – Artigo publicado

Journal of Microbiological Methods 128 (2016) 7–9



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Microbiological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jmicmeth

Note

Combination of different methods for detection of *Campylobacter* spp. in young children with moderate to severe diarrhea

Herlice do Nascimento Veras^{a,*}, Josiane da Silva Quetz^a, Ila Fernanda Nunes Lima^a, Tamara Silva Rodrigues^a, Alexandre Havt^a, Luís Carlos Rey^a, Rosa Maria Salani Mota^b, Alberto Melo Soares^a, Mitra Singhal^c, Bernhard Weigl^c, Richard Guerrant^d, Aldo Angelo Moreira Lima^a

^a Institute of Biomedicine for Brazilian Semi-Arid & Clinical Research Unit/Center for Global Health, Federal University of Ceara, Fortaleza, CE 60430-270, Brazil

^b Science Center/Unit of Statistics, Federal University of Ceara, Fortaleza, CE 60455-760, Brazil

^c Program for Appropriate Technology in Health (PATH), Seattle, WA 98107, USA

^d Center for Global Health, University of Virginia, Charlottesville, VA 22908, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 December 2015

Received in revised form 22 June 2016

Accepted 23 June 2016

Available online 24 June 2016

Keywords:

Childhood diarrhea

Campylobacter spp.

Disease

ABSTRACT

Campylobacter spp. were detected – using culture, ELISA, PCR, and qPCR – among children (0–36 months) with moderate to severe diarrhea in Northeastern Brazil. Our data showed that either the qPCR alone or PCR along with ELISA might be an alternative to culture to diagnose *Campylobacter* due to their enhanced sensitivity.

© 2016 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Campylobacter spp. are important etiological agents of gastroenteritis, especially in children living in developing countries (Fernández, 2011). Food-borne campylobacteriosis is reported as zoonotic infection, and the poultry's farm-to-fork chain is the main source of infection (Wassenaar, 2011).

Previous reports have shown an association between *Campylobacter* spp. diagnosis/detection and malnutrition or worse developmental scores in children living in Chile (Fernández et al., 2008) and Northeastern Brazil (Quetz et al., 2010). In a multisite cohort study, called MAL-ED, *Campylobacter* spp. were the most frequently detected pathogens and had the highest impact in cases of diarrhea in Brazil, Peru and South Africa in the first year of life (Platts-Mills et al., 2014, 2015).

Campylobacter diagnosis is hampered by the fastidious characteristics of this microorganism, and by its ability to reach a viable-non-cultivable state (Jackson et al., 2009). Molecular and immunoenzymatic methods, which have greater sensitivity, are challenging the conventional diagnosis by culture (Bessède et al., 2011; Lehours et al., 2012).

In the present work, we aimed to investigate the best alternative methods (PCR, qPCR and ELISA) to detect *Campylobacter* spp. compared

with gold standard test, culture, regarding their agreement, specificity and sensitivity in stools samples.

2. Materials and methods

This study was part of a project entitled: Diarrhea Enteric Card. It was approved by local and national Ethical Committee in Brazil (HIAS 80/06 and CONEPE 13523/2007, respectively). Children (0–36 months age/58.66% male and 41.34% female) from urban area of Fortaleza received medical care because of a diarrheal event in the emergency rooms of two pediatric hospitals in Fortaleza, Ceara, Brazil: Albert Sabin Pediatric Hospital (HIAS) and Center for Child Assistance Lucia de Fatima R.G. Sa (CROA). Exclusion criteria consisted of prior administration of antibiotics or breastfeeding.

Stool samples were collected from May 2008 to April 2009. 153 of them were tested for *Campylobacter* spp. using microbiologic diagnosis, Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) and molecular tests (PCR and qPCR). Besides *Campylobacter* species, other bacterial pathogens, such as *Escherichia coli* non-O157:H7, *Salmonella* and *Shigella*, were investigated simultaneously. For the purpose of microbiological analysis, the samples were processed within a 4 h period. For the isolation of *Campylobacter* spp., fecal samples were cultivated in Columbia agar supplemented with 5% sheep blood and *Campylobacter* Growth Supplement (Oxoid, Hampshire, UK, SR0232). The selectivity of the medium was obtained by adding *Campylobacter* Selective Supplement Blaser-Wang (Oxoid, SR0098) containing vancomycin, polymyxin B,

* Corresponding author at: Rua Coronel Nunes de Melo, 1315, Rodolfo Teófilo, Fortaleza, CE CEP: 60.430-270, Brazil.

E-mail address: herlicenv@hotmail.com (H. do Nascimento Veras).

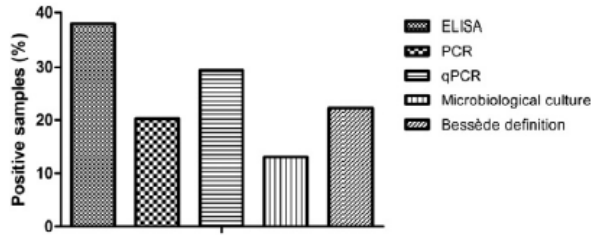


Fig. 1. Positive percentage found with different methods for detection of *Campylobacter* spp.

Table 1
Positive distribution profile of *Campylobacter* cases detected through the use of different methods.

Number of cases	Results			
	Culture	ELISA	qPCR	PCR
Positive microbiological diagnosis (n = 20)				
13	+	+	+	+
4	+	+	+	–
1	+	+	–	+
1	+	+	+	NR
1	+	+	–	NR
Others positive diagnosis (n = 42)				
12	–	+	+	+
1	–	+	–	+
1	–	+	+	–
1	–	–	–	+
3	–	–	+	+
24	–	+	–	–

Abbreviations: NR – no results.

trimethoprim, amphotericin B, and cephalothin. Incubation occurred at 42 °C ± 1 °C for 72 h in a microaerophilic atmosphere. The suggestive phenotypic identification of *Campylobacter* spp. was determined by their morphological characteristics: growth of non-hemolytic, translucent or colorless colonies. The activity of cytochrome oxidase was tested, using the reagent *N*, *N*-dimethyl-*p*-phenylenediamine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). It was also performed the investigation of Gram-negative bacilli in the form of “gulls wings” by optical microscopy after smear slide and gram stain with carbol fuchsin (Quetz et al., 2012).

The remaining fecal material was diluted for the ELISA and directly used for the DNA extraction (Quetz et al., 2012). *Campylobacter ProSpect Microplate Assay* from REMEL™ (Lenexa, KS, USA) was the chosen enzyme immunoassay for the qualitative detection of *Campylobacter* specific antigen in fecal specimens performed according the manufacturer guidelines.

We performed genomic DNA extraction using *QIAamp DNA stool Mini kit* (QIAGEN, Valencia, USA). The DNA for positive controls amplifications were extracted from *Campylobacter jejuni* ATCC 33291, and

Campylobacter coli INCQS 00263 (kindly provided by Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil).

The gene used for the molecular diagnosis of *Campylobacter* spp., in both techniques, was the *gyrA* (DNA gyrase subunit A). SYBER Green-based Real-Time PCR (qPCR) was assayed at PATH (USA) facilities, using the following primers, synthesized by Micronics (Redmonds, USA): 5'-GAGTGTATTATAGTTCGTGCTTTG-3' (Forward), and 3'-CTATAACAGCACCCACTATACGG-5' (Reverse). After a fast step of initial denaturation (50 °C, 2 min.; 90 °C, 10 min.), 40 cycles of amplification (95 °C, 15 s.; 60 °C, 1 min.; 72 °C, 45 s.) took place. Results were expressed as positive (≤35 cycles), marginal (between 35 and 40 cycles) or negative (>40 cycles) amplification.

The PCR was performed using GoTaq Green Master Mix 2× (Promega), and the primer design was the same mentioned above for the qPCR. After a step of initial denaturation (95 °C, 5 min.), 40 cycles of amplification (95 °C, 20 s.; 55 °C, 20 s.; 72 °C, 45 s.) took place. PCR were performed in duplicate and the results were coincident. Each reaction product was run on 2% agarose gel in Tris/Acetate EDTA buffer. The reaction was flushed with Blue Green loading dye (LGC Biotechnology, São Paulo, Brazil), and photographed using a ChemiDoc XRS UV transilluminator (Bio-Rad).

Data were entered twice by two independent persons, validated using Excel software (Microsoft Corp., Cupertino, USA) and analyzed using SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) version 20.0 (SPSS Inc.™, Chicago, IL, USA). The graphics were performed using the GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad™ Software, San Diego, CA). Significance level was set at P < 0.05.

3. Results and discussion

The microbiological diagnosis showed 13.07% (20/153) positive samples for *Campylobacter* spp. On the other hand, the ELISA was able to detect 37.9% (58/153) positive samples, and just one sample was not definitively diagnosed. Among the positive samples diagnosed by culture, all of them were also positive for the ELISA. Regarding the molecular methods, 29.4% (45/153) of samples were positively diagnosed by qPCR, while only 20.3% (31/150 - loss of 3 samples) positive samples were detected by PCR.

Bessède et al. (2011) considered stool samples as positive for *Campylobacter* spp. when either culture was positive, or in the case of negative culture, but both the molecular and the immunoenzymatic methods were positive. Based on this definition, 22.2% (34/153) of the samples were positive for *Campylobacter* spp. The variation between the positive percentages found for each diagnostic test can be observed in Fig. 1.

According to the results of all techniques, 13 samples were positive for all methods of diagnosis, and 12 samples were positive for all methods except for conventional microbiology. Among the positive results for culture, 4 were not positive for PCR, and 2 were not positive for qPCR. The different combinations are presented in Table 1.

The culture was not able to detect *Campylobacter* species in 14 samples, which can be explained by the low sensitivity of the method as

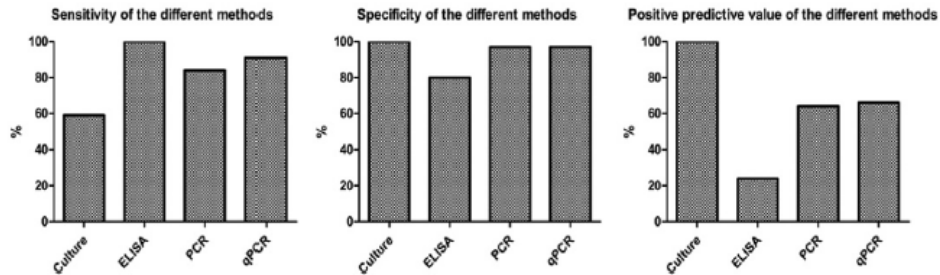


Fig. 2. Simple measures of sensitivity, specificity and predictive positive values (PPV), of culture, ELISA, qPCR and PCR.

shown in Fig. 2. However, these samples were positive for the ELISA and some of the molecular methods used. One possible explanation for the lack of diagnosis by culture is the limitation of this test due to the fastidious characteristic of *Campylobacter* spp., which reduces substantially the sensitivity of the test (Jackson et al., 2009). Errors in measuring the sensitivity and specificity of a particular test will arise especially if the gold standard test itself does not have 100% sensitivity and 100% specificity, which is not a rare case among the infectious diseases (Banoo et al., 2006).

Seeking to avoid the underestimation of positive cases as a result of low sensitivity of culture, in a multisite birth cohort study (MAL-ED), the diagnosis of *Campylobacter* spp. was performed by ELISA, achieving a high detection index. Bessède et al. (2011) have reported the high sensitivity of immunoassays compared to other methods, including molecular methods and conventional culture. Similarly, we found 100% sensitivity for ELISA, which was higher than the sensitivity found for the other methods. However, its specificity and positive predictive value (PPV) were significantly reduced, 80% and 24%, respectively. The 6% prevalence value of *Campylobacter* spp. described by Quetz et al. (2012) was used to calculate the PPVs (Fig. 2).

Bessède et al. (2011) have also mentioned that the molecular methods are not used as an alternative to the microbiological culture due to their limited specificity. Conversely, in this study, both the PCR and the qPCR showed a great specificity (97%). However, the qPCR had a higher sensitivity (91%) when compared to the PCR (84%). The combination of elevated sensitivity and specificity of qPCR suggests that, after culture, it can be considered as the best method to diagnose *Campylobacter* species. On the other hand, the lower sensitivity of PCR may be overcome by combining this method with ELISA, which have shown 100% sensitivity, but lack of specificity.

In conclusion, cases of infection with *Campylobacter* spp. were underestimated using microbiological culture as the gold standard test for diagnosis. Besides culture, either qPCR alone or PCR along with ELISA might be good alternatives for the diagnosis of this pathogen. However, the culture is still the only method capable to give 100% specificity and PPV.

Acknowledgements

This work was funded by Program for Appropriate Technology in Health – PATH/USA (NIH1213-02-07494-Sub). The author Herlice do N. Veras had scholarship from the Cearense Foundation for the Support of Scientific and Technological Development – FUNCAP. The authors Josiane da S. Quetz, Ila Lima and Tamara S. Rodrigues had scholarships from the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development – CNPq (Grants 140242/2009-0 and 152098/2008-9, respectively). We would like to thank Fabiana Nascimento from Department of Ethics of IBISAB for her invaluable help on this study. We are indebted to all children and their guardians who participated in this study.

References

- Banoo, S., Bell, D., Bossuyt, P., et al., 2006. Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases: general principles. *Nat. Rev. Microbiol.* 4 (12), 20–532.
- Bessède, E., Delcamp, A., Sifré, E., et al., 2011. New methods for detection of *campylobacters* in stool samples in comparison to culture. *J. Clin. Microbiol.* 49, 941–944.
- Fernández, H., 2011. *Campylobacter e Campylobacteriosis: una Mirada desde América del Sur*. *Rev. Peru Med Exp Salud Publica.* 28, 121–127.
- Fernández, H., Vera, F., Villanueva, M.P., et al., 2008. Occurrence of *Campylobacter* species in healthy well-nourished and malnourished children. *Braz. J. Microbiol.* 39, 53–58.
- Jackson, D.N., Davis, B., Tirado, S.M., et al., 2009. Survival mechanisms and culturability of *Campylobacter jejuni* under stress conditions. *Antonie Van Leeuwenhoek* 96, 377–394.
- Lehours, P., Aladjidi, N., Sarlangue, J., et al., 2012. *Campylobacter* infections in children. *Arch. Pediatr.* 19, 629–634.
- Platts-Mills, J.A., Liu, J., Gratz, J., et al., 2014. Detection of *Campylobacter* in stool and determination of significance by culture, enzyme immunoassay, and PCR in developing country. *J. Clin. Microbiol.* 52, 1074–1080.
- Platts-Mills, J.A., Babji, S., Bodhidatta, L., et al., 2015. Pathogen-specific burdens of community diarrhoea in developing countries: a multisite birth cohort study (MAL-ED). *Lancet Glob Health.* 3, 564–575.
- Quetz, J.S., Lima, I.F., Havt, A., et al., 2010. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in children from communities in Northeastern Brazil: molecular detection and relation to nutritional status. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 67, 220–227.
- Quetz, J.S., Lima, I.F., Havt, A., et al., 2012. *Campylobacter jejuni* infection and its virulence associated genes among children with moderate to severe diarrhea attended at emergency rooms in Northeastern Brazil. *J. Med. Microbiol.* 61, 507–513.
- Wassenaar, T.M., 2011. Following an imaginary *Campylobacter* population from farm to fork and beyond: a bacterial perspective. *Lett. Appl. Microbiol.* 53, 253–263.