



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

JOSIANE DA SILVA QUETZ

STUDO SOBRE *Campylobacter jejuni* E *Campylobacter coli* EM CRIANÇAS DA ÁREA
URBANA DE FORTALEZA, CEARÁ / BRASIL: IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA,
INFLAMAÇÃO INTESTINAL E IMPACTO NO ESTADO NUTRICIONAL

FORTALEZA

2009

JOSIANE DA SILVA QUETZ

ESTUDO SOBRE *Campylobacter jejuni* E *Campylobacter coli* EM CRIANÇAS DA ÁREA
URBANA DE FORTALEZA, CEARÁ / BRASIL: IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA,
INFLAMAÇÃO INTESTINAL E IMPACTO NO ESTADO NUTRICIONAL.

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima.

FORTALEZA

2009

Q55e

Quetz, Josiane da Silva

Estudo sobre *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* em crianças da área urbana de Fortaleza, Ceará / Brasil: identificação genética, inflamação intestinal e impacto no estado nutricional / Josiane da Silva Quetz. – Fortaleza, 2009.

141 f. : il. ; 30cm.

Orientador: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará,
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, 2009.

1. Diarréia Infantil 2. *Campylobacter jejuni* 3. *Campylobacter coli* 4. Desnutrição I. Lima, Aldo Ângelo Moreira (orient.) II. Título.

CDD: 618.923427

JOSIANE DA SILVA QUETZ

ESTUDO SOBRE *Campylobacter jejuni* E *Campylobacter coli* EM CRIANÇAS DA ÁREA
URBANA DE FORTALEZA, CEARÁ / BRASIL: IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA,
INFLAMAÇÃO INTESTINAL E IMPACTO NO ESTADO NUTRICIONAL

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia.

Aprovada em: 12 / 01 / 2009.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima (Orientador)

Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof^ª. Dr^ª. Cristiane Cunha Frota

Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá

Universidade Federal do Ceará – UFC

À minha mãe.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por toda a saúde para caminhar com meus propósitos e por todas as oportunidades.

Agradeço à minha amada mãe, exemplo de vida, amor e luta. Por seu carinho inesgotável e sua determinação em proporcionar aos filhos a melhor educação possível.

Agradeço ao meu querido tio e padrinho Renato Silva, que foi o meu pedagogo, o que me levou pela mão à escola técnica no Campus da UFMG, quando eu tinha apenas 15 anos. Tio, a partir da sua convicção em me guiar, em me ajudar a cruzar toda Belo Horizonte, várias portas se abriram para mim. Você me proporcionou a primeira chave e eu tenho muito orgulho por você ter escolhido guiar muitos outros pela busca de novas portas. O que você fez não tem como agradecer, foi o ponto de mutação, o caminho sem volta. Devo-lhe toda a gratidão e reconhecimento. Muito obrigada!

Agradeço ao meu amado irmão Leandro por seu carinho.

Agradeço ao meu marido por infundável paciência, ouvidos e ajuda.

Agradeço à minha filha Cecília, por existir, por entender e por me abraçar com o rosto mais lindo e feliz do mundo todos os dias quando volto para casa. Esse abraço diário recarrega instantaneamente as baterias internas.

Agradeço a todos os pais pelo consentimento e às crianças pela participação.

Agradeço ao pessoal do campo, Sayonara e sua equipe, que com seu trabalho tornou possível a realização dessa e de outras pesquisas. O mesmo agradecimento se estende ao pessoal do SSGD, sem vocês não seria possível a realização dessa pesquisa. Júnior, muito obrigada pela ajuda!

Agradeço à Dra. Ila Fernanda, por sua inestimável ajuda e sua amizade. Pela convivência em bancada e fora dela.

Agradeço ao Dr. Alexandre Havt, pela ajuda, pelas aulas, pelos géis, pela convivência. Alex, gracias!

Agradeço à Eunice Bobo de Carvalho pela convivência e ajuda.

Agradeço ao Dr. Reinaldo Oriá pela acolhida em seu laboratório, ajuda e principalmente compreensão.

Agradeço a todos os colegas da UPC/IBIMED que são responsáveis pelo ambiente de trabalho pacífico e agradável.

Agradeço à Maria do Carmo Pinho, por disponibilizar o LDI 1 sempre que foi necessário, pela convivência agradável e pela disponibilidade em repassar conhecimentos.

Agradeço à Dra. Rosa Mota por dispensar seu tempo e *expertise* em Estatística à realização dessa pesquisa.

Sumeet Singh Mitter, muito obrigada por toda a ajuda com PDFs, abstracts e revisões.

Por fim, agradeço muitíssimo ao Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima, pela orientação, convivência e pela oportunidade de fazer parte de sua equipe.

“Enquanto não alcançares a verdade, não poderás corrigí-la. Porém, se a não corrigires, não a alcançarás. Entretanto, não te resignes.”

(José Saramago)

RESUMO

Campylobacter jejuni e *Campylobacter coli* são importantes agentes etiológicos de doença diarréica na população mundial. A infecção por *Campylobacter* sp. é usualmente identificada por cultivo microbiológico que leva aproximadamente 72 horas para identificação do gênero. Nosso objetivo principal foi pesquisar a prevalência de *C. jejuni* e *C. coli* em população infantil, com idade entre 2-36 meses, da área urbana de Fortaleza/CE, Brasil, em estudo do tipo epidemiológico observacional caso-controle, utilizando, como ferramenta de detecção, a reação em cadeia da polimerase (PCR). Outros objetivos consistiram em: investigar o impacto nutricional da infecção (casos) ou da colonização (controles) por *Campylobacter* sp.; determinar a presença de três genes de virulência para a toxina citoletal distensora (CDT) de *C. jejuni* e avaliar a ocorrência de inflamação intestinal nas infecções causadas por *Campylobacter* sp. A população estudada consistiu de 83 casos e 83 controles, sendo os casos, crianças com histórico de diarreia nos 14 dias progressos à seleção para o estudo. Foram avaliados parâmetros sócio-econômicos através de questionário epidemiológico. Medidas antropométricas foram coletadas para determinação de escores-z no intuito de avaliar o perfil nutricional das crianças. A detecção de *Campylobacter* nas amostras congeladas foi realizada por ensaio imuno-enzimático (ELISA) e PCR. Pela PCR também investigamos a presença dos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* da CDT de *C. jejuni*. A avaliação da inflamação intestinal foi realizada pela pesquisa de lactoferrina fecal (LFF), através de ELISA semiquantitativa. Foi detectado, por PCR, *C. jejuni* em 9,6% dos casos (8/83) e 7,2% dos controles (6/83). *C. coli* foi detectado em 6,0% dos casos (5/83) e 1,2% dos controles (1/83). Os genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* foram encontrados em 50% das amostras *hipO*⁺ (7/14). Houve diferença significativa ($p < 0,05$) dos escores WAZ e WHZ entre casos e controles portadores de *C. jejuni*, sendo que casos portadores apresentaram média inferior de WAZ e WHZ, quando comparados com os controles portadores. No grupo Casos, os portadores de *C. jejuni* apresentavam valor médio de WHZ inferior ao valor médio apresentado pelos casos não-portadores. Mais de 80,0% das crianças estudadas apresentaram inflamação intestinal caracterizada por elevados níveis de LFF, independente da presença de diarreia e *Campylobacter* sp. Em conclusão, nossos achados corroboram dados da literatura científica relacionados à prevalência de *C. jejuni* e *C. coli* na população infantil, existência de portadores assintomáticos e associação entre a detecção do microorganismo e desnutrição. Além disso, nossos dados apontam para ocorrência de variabilidade genética dentre as cepas de *C. jejuni* detectadas na população estudada em relação à presença ou ausência dos genes de CDT.

Palavras-chave: Diarreia Infantil. *Campylobacter jejuni*. *Campylobacter coli*. Desnutrição. Inflamação intestinal. Toxina citoletal distensora.

ABSTRACT

Campylobacter jejuni and *Campylobacter coli* are important etiologic agents of worldwide diarrheal disease. *Campylobacter sp.* infection is usually identified by a 72 hour microbiological culture that identifies the genus of the responsible organism. Our main goal was to investigate the prevalence of *C. jejuni* and *C. coli* in children, aged 2-36 months, from urban Fortaleza, CE, Brazil, in an observational epidemiological case-control study using, as a tool of detection, the polymerase chain reaction (PCR). Our other goals were to investigate the nutritional impact of infection (cases) or colonization (controls) for *Campylobacter sp.*, to determine the presence of three virulence genes of *C. jejuni* cytolethal distending toxin (CDT), and to evaluate the occurrence of inflammation in intestinal infections caused by *Campylobacter sp.* The study population consisted of 83 cases and 83 controls, where the cases consisted of children with a history of diarrhea in the 14 days prior to selection for the study. We assessed socioeconomic parameters through an epidemiological questionnaire. Anthropometric measurements were collected to determine z-score parameters for assessing the nutritional status of the children. Detection of *Campylobacter* from frozen samples was performed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and PCR. Also, using PCR technology, we investigated the presence of *C. jejuni* genes *cdtA*, *cdtB* and *cdtC*. Intestinal inflammation was assessed by semi-quantitative ELISA detection of fecal lactoferrin (LFF). PCR technology detected *C. jejuni* in 9.6% of the cases (8/83) and 7.2% of the controls (6/83), while *C. coli* was detected in 6.0% of the cases (5/83) and 1.2% of the controls (1/83). CDT genes were found in 50% of *hipO*⁺ samples (7/14). There was a significant difference ($p < 0.05$) in the weight for age z-scores (WAZ) and the weight for height z-scores (WHZ) between case and control carriers of *C. jejuni*, where case carriers showed lower average WAZ and WHZ than control carriers. Moreover, in the case group, carriers of *C. jejuni* showed a lower WHZ average than that of non-carrier cases of *C. jejuni*. More than 80.0% of the children studied had intestinal inflammation characterized by high levels of LFF regardless of the presence of diarrhea and *Campylobacter sp.* In conclusion, our findings corroborate data in the scientific literature related to the prevalence of *C. jejuni* and *C. coli* in pediatric populations, the existence of asymptomatic carriers and an association between the detection of the microorganism and malnutrition. In addition, our data suggest a genetic variability among the strains of *C. jejuni* detected in the study population, related to presence or absence of CDT genes.

Keywords: Childhood diarrhea. *Campylobacter jejuni*. *Campylobacter coli*. Malnutrition. Intestinal inflammation. Cytolethal distending toxin.

LISTA DE FIGURAS

1: <i>C. jejuni</i> NCTC 11168	27
2: Vias de transmissão de <i>C. jejuni</i>	33
3: Alteração celular causada pela toxina citoletal distensora (CDT) de <i>C. jejuni</i> em células HeLa	37
4: Delimitação e localização relativa das comunidades Parque Universitário e Gonçalves Dias em Fortaleza, CE	49
5: Fluxograma representativo das etapas do presente estudo relacionadas à seleção, triagem e coleta de dados e amostras	54
6: Foto da coloração de Gram de <i>C. coli</i> INCQS 00263 cultivado no Laboratório de Doenças Infecciosas, UPC-IBIMED/UFC	80
7: Resultados de ELISA ProSpect® <i>Campylobacter</i> Microplate Assay para os grupos Caso e Controle	82
8: Resultados da detecção de <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> por PCR	84
9: Foto do resultado da PCR para <i>C. jejuni</i> , gene <i>hipO</i> , 176pb	85
10: Foto do resultado da PCR para <i>C. coli</i> , gene <i>ask</i> , 502pb	86
11: Foto do resultado da PCR para <i>H. pylori</i> , gene <i>16S rRNA</i> , 139pb	87
12: Foto do resultado da PCR para <i>cdtA</i> para CDT de <i>C. jejuni</i> , 178pb	89
13: Foto do resultado da PCR para <i>cdtB</i> para CDT de <i>C. jejuni</i> , 418pb	89
14: Foto do resultado da PCR para <i>cdtC</i> para CDT de <i>C. jejuni</i> , 270pb	90
15: Representação da correlação entre as médias de WAZ e médias de WHZ para casos e controles <i>hipO</i> ⁺	91
16: Gráficos das equações obtidas pela leitura da absorbância (450nm) dos padrões do Kit IBD® Scan, TECHLAB	93
17: Resultados de ELISA IBD® Scan para avaliação da inflamação intestinal (LFF) nos grupos Caso e Controle	94
18: Resultados de ELISA IBD® Scan para avaliação da inflamação intestinal (LFF) entre os portadores de <i>C. jejuni</i> ou <i>C. coli</i> nos grupos Caso e Controle ..	95

LISTA DE QUADROS

1: Principais espécies de <i>Campylobacter</i> encontradas em associação com processos infecciosos do ser humano	26
2: Tipos de toxinas produzidas pelo gênero <i>Campylobacter</i>	35
3: Genes de virulência do gênero <i>Campylobacter</i>	36
4: Função dos reagentes do Kit <i>QIAamp Stool Mini Kit</i> , QIAGEN® para extração de DNA fecal	57
5: Interpretação dos resultados do ensaio <i>ProSpect Campylobacter Microplate Assay</i> , REMEL	59
6: Interpretação dos resultados semi-quantitativos de ELISA para LFF, Kit IBD® Scan, TECHLAB	61
7: Resumo das PCR realizadas no presente estudo	62
8: Iniciadores utilizados no presente estudo	64
9: Programação dos ciclos para amplificação na PCR para detecção do gene <i>hipO</i> de <i>C. jejuni</i>	67
10: Representação das amostras utilizadas nas amplificações de <i>cdtA</i> , <i>cdtB</i> e <i>cdtC</i>	73
11: Programação dos ciclos para amplificação (PCR) para detecção dos genes <i>cdtA</i> , <i>cdtB</i> e <i>cdtC</i>	75

LISTA DE TABELAS

1: Comparação dos grupos caso e controle em relação à distribuição dos escores-z	79
2: Dados relativos à quantificação de DNA extraído das cepas padrão	81
3: Sumário dos resultados de ELISA <i>ProSpect</i> ® <i>Campylobacter Microplate Assay</i> para os grupos caso e controle	82
4: Sumário dos resultados para genes <i>hipO</i> (<i>C. jejuni</i>) e <i>ask</i> (<i>C. coli</i>) nos grupos caso e controle	83
5: Sumário dos resultados de PCR para detecção dos genes <i>cdtA</i> , <i>cdtB</i> e <i>cdtC</i> em amostras positivas para <i>C. jejuni</i> (PCR, <i>hipO</i> ⁺)	88

LISTA DE SÍMBOLOS

°: ' '' : graus, minutos e segundos (localização geográfica)

α : alfa

β : beta

κ : kappa

°C: grau Celsius

cm: centímetro

CO₂: gás carbônico

g: gramas

H₂O: água

KDa: Kilodalton

Kg: quilogramas

Km²: quilômetros quadrados

m: metros

M: Molar (concentração)

mg: miligramas

μg: microgramas

mL: mililitros

μL: microlitros

μm: micrometros

μM: micromolar (concentração)

N: Normal (concentração)

n: número amostral, estatística

n^o: número

ng: nanogramas

nm: nanômetros

O₂: oxigênio

p: probabilidade de estar ocorrendo erro tipo I, estatística (conclusão errônea de que os grupos diferem entre si)

pb: pares de bases

P.A.: para análise

pg: picogramas

pH: potencial hidrogeniônico

®: Marca registrada

R²: Indicador da linearidade da reta

™: Marca registrada

V: Volts

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

16S: Gene da cadeia 16S do RNA ribossomal de *H. pylori*

A_{260/230}: Razão entre as leituras de absorvância (espectrofotômetro) realizadas em 260nm e 230nm

A_{260/280}: Razão entre as leituras de absorvância (espectrofotômetro) realizadas em 260nm e 280nm

AIDS: Síndrome da imunodeficiência adquirida

AMPc: Adenosina monofosfato cíclico

AS: Antisense (iniciador de PCR sentido antisense)

ask: gene da aspartato quinase de *C. coli*

ask⁺: Amostras positivas para detecção do gene da aspartato quinase de *C. coli*

ask⁻: Amostras negativas para detecção do gene da aspartato quinase de *C. coli*

ATCC: *American Type Collection Culture*

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

cadF: Gene da proteína ligante à fibronectina (*Fibronectin binding protein*)

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

cdtA: gene de porção A da toxina citoletal distensora

cdtB: gene de porção B da toxina citoletal distensora

cdtB⁺: Amostras positivas para detecção do gene da porção B da toxina citoletal distensora

cdtB⁻: Amostras negativas para detecção do gene da porção B da toxina citoletal distensora

cdtC: gene de porção C da toxina citoletal distensora

CE: Ceará

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

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

ciaB: Gene do antígeno de invasão B

CLDT: Toxina citoletal distensora

COMEPE: Comitê de Ética em Pesquisa da UFC

CONEP: Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

CT: Toxina colérica

CXCL20: Quimiocina MIP-3

DALY: Inabilidade ajustada em anos de vida (*Disability-adjusted life year*)

DEU: Alemanha (*Deutschland*)

DNA: Ácido desoxirribonucleico

***dnaJ*:** Gene da proteína chaperona dnaJ

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

EHEC: *E. coli* enterotohemorrágica

EIEC: *E. coli* enterotoinvasiva

ELISA: Ensaio imunoenzimático (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

***ELISA ProSpect*®:** ELISA para detecção de *Campylobacter* sp. (*ELISA ProSpect*® *Campylobacter* Microplate Assay)

EPEC: *Escherichia coli* enteropatogênica

ETEC: *E. coli* enterotoxigênica

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz

***flaA*:** gene da flagelina

G₂: fase G₂ da interfase do ciclo celular

GBR: Reino Unido

GBS: Síndrome de Guillain-Barré

GD: Gonçalves Dias

HAZ: Escore-z altura por idade (*height-for-age z-score*)

Hela: Células de carcinoma humano

***hipO*:** gene da hipurato hidrolase de *C. jejuni*

***hipO*⁺:** Amostras positivas para detecção do gene da hipurato hidrolase de *C. jejuni*

***hipO*⁻:** Amostras negativas para detecção do gene da hipurato hidrolase de *C. jejuni*

HIV: Vírus da Imunodeficiência humana

HL: Toxina termo-sensível de *E.coli* (*heat-labile*)

HS:19: Cepa de *Campylobacter* com sorotipo Penner HS:19

HS:41: Cepa de *Campylobacter* com sorotipo Penner HS:41

iam: Gene de marcador associado à invasão (*invasion associated marker*)

iam⁺: Amostras positivas para detecção do gene de marcador associado à invasão

iam⁻: Amostras negativas para detecção do gene de marcador associado à invasão

IBD: *Inflammatory Bowel Disease*

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICAM-1: Molécula de adesão celular 1 (*Intercellular Molecular Adhesion Molecule 1*)

iNOS: Óxido nítrico sintase induzida (*Inductible Nitric Oxide Synthase*)

IL-8: interleucina 8

IMC: Índice de massa corporal

INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

LFF: Lactoferrina fecal

LOS: lipooligosacarídeos

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

NCHS: *National Center for Health Statistics (USA)*

NCTC: *National Collection of Type Cultures*

NF- κ B: Fator nuclear transcripcional kappa B

PCR: Reação da polimerase em cadeia

pldA: Gene para fosfolipase A

PU: Parque Universitário

pVir: Gene plasmidial da proteína de secreção tipo IV

racR: Gene da proteína de resposta termorreguladora (*response regulation protein*)

RNA: Ácido ribonucléico

RT-PCR: Reação em cadeia da polimerase com uso de transcriptase reversa

S: Senso (iniciador de PCR sentido senso)

SA: Antígenos de superfície (*surface antigen*)

SNP: Polimorfismo em um único nucleotídeo (*Single nucleotide polymorphisms*)

SPSS: *Statistical Package for Social Sciences*

SSGD: Setor de Segurança e Gerenciamento de Dados

STx: toxina de *Shigella* (*Shiga toxin*)

SZ: Suíça (*Switzerland*)

TAE: Tampão Tris-Acetato EDTA

Taq: DNA polimerase estável, para uso em PCR

TCLE: Termo de consentimento livre e esclarecido

TE: Tampão Tris-HCl, EDTA

TGI: Trato gastrointestinal

T_H1: Resposta imune do tipo celular

T_H2: Resposta imune do tipo humoral

TMB: Tetra metil benzidina

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

TRO: Terapia de reidratação oral

Tris-HCl: Tampão tris (hidroximetil)aminometano-ácido clorídrico

UFC: Universidade Federal do Ceará

UNICAMP: Universidade Estadual de Campinas

UPC/IBIMED: Unidade de Pesquisas Clínicas do Instituto de Biomedicina

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

UVa: Universidade da Virgínia (Charlottesville, USA)

Vero: Células renais de macaco africano do gênero *Cercopithecus*

virBII: Gene para proteína de secreção tipo IV

WAZ: Escore-z peso por idade (*weight-for-age z-score*)

Web: Rede de alcance mundial (*World Wide Web*)

Website: Coleção de páginas da web

WHO: Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*)

WHZ: Escore-z peso-por-altura (*weight-for-height z-score*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 Doenças Diarréicas: Impacto no mundo e no Brasil	22
1.2 <i>Campylobacter</i> sp.	25
1.2.1 O gênero.....	25
1.2.2 Evolução temporal sobre o conhecimento das campilobacterioses	29
1.2.3 Características das campilobacterioses	30
1.2.4 Transmissão das campilobacterioses	32
1.2.5 Fisiopatologia da infecção por <i>Campylobacter</i> sp.	33
1.2.6 Fatores de virulência do gênero <i>Campylobacter</i>	34
1.3 Aspectos epidemiológicos das campilobacterioses	38
1.3.1 Campilobacterioses intestinais em países desenvolvidos.....	38
1.3.2 Campilobacterioses intestinais em países em desenvolvimento.....	39
1.3.3 Diferenças sócio-econômicas marcantes.....	41
1.4 Aspectos clínicos	42
1.5 Identificação de <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>	43
2 JUSTIFICATIVA	46
3 OBJETIVOS	47
3.1 Objetivo geral.....	47
3.2 Objetivos específicos.....	47
4 MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1 População estudada	48
4.1.1 Tipo e duração do estudo.....	50
4.1.2 Critérios de inclusão	50

4.1.3 Considerações éticas	50
4.2 Coleta de dados e amostras	51
4.2.1 Triagem e entrevista	51
4.2.2 Medidas antropométricas e escores-z	52
4.2.3 Coleta e processamento inicial das amostras fecais	53
4.3 Definição dos grupos: Casos x Controles	55
4.4 Extração de DNA fecal	55
4.5 Ensaio imunoenzimático (ELISA)	57
4.5.1 ELISA para <i>Campylobacter</i>	57
4.5.2 ELISA para Lactoferrina fecal (LFF)	59
4.6 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)	61
4.6.1 Sumário das PCRs realizadas	61
4.6.2 Cepas padrão	62
4.6.3 Definição dos Iniciadores das PCRs	63
4.7 Detecção do gene da hipurato hidrolase (<i>hipO</i>) de <i>C. jejuni</i> por PCR ..	64
4.7.1 Obtenção do DNA bacteriano (<i>C. jejuni</i>)	64
4.7.2 Detecção do Gene (<i>hipO</i>)	66
4.7.3 Condições para a amplificação do produto (<i>hipO</i>).....	67
4.8 Detecção do gene da aspartato quinase (<i>ask</i>) de <i>C. coli</i> por PCR	68
4.8.1 Obtenção do DNA bacteriano (<i>C. coli</i>)	68
4.8.2 Detecção do Gene (<i>ask</i>)	69
4.8.3 Condições para a amplificação do produto (<i>ask</i>).....	69
4.9 Detecção do gene da cadeia 16S do RNAr (<i>16S</i>) de <i>H. pylori</i> por PCR..	70
4.9.1 Obtenção do DNA bacteriano (<i>H. pylori</i>)	70
4.9.2 Detecção do Gene (<i>16S</i>)	71

4.9.3 Condições para a amplificação do produto (<i>16S</i>).....	71
4.10 Detecção dos genes <i>cdtA</i>, <i>cdtB</i> e <i>cdtC</i> da CDT de <i>C. jejuni</i> por PCR..	72
4.10.1 Obtenção do DNA bacteriano (<i>E. coli</i> CLDT 866/36)	72
4.10.2 Detecção dos genes (<i>cdtA</i> , <i>cdtB</i> e <i>cdtC</i>)	73
4.10.3 Condições para a amplificação dos produtos (<i>cdtA</i> , <i>cdtB</i> , <i>cdtC</i>)	74
4.11 Eletroforese dos produtos amplificados	75
4.12 Acondicionamento e análise estatística dos dados	76
5 RESULTADOS	78
5.1 Caracterização da população	78
5.2 Dados laboratoriais do primeiro processamento das amostras	79
5.3 Extração de DNA	80
5.4 ELISA para <i>Campylobacter</i> sp.	81
5.5 Produtos das PCRs	83
5.5.1 Detecção do gene <i>hipO</i> de <i>C. jejuni</i>	84
5.5.2 Detecção do gene <i>ask</i> de <i>C. coli</i>	85
5.5.3 Detecção do gene <i>16S</i> de <i>H. pylori</i>	86
5.5.4 Detecção do gene <i>cdtA</i> , <i>cdtB</i> e <i>cdtC</i> de <i>C. jejuni</i>	87
5.6 Parâmetros nutricionais	90
5.7 ELISA para LFF	92
6 DISCUSSÃO	96
7 CONCLUSÕES	106
REFERÊNCIAS.....	107
ANEXOS.....	132

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças diarreicas: Impacto no mundo e no Brasil

As doenças diarreicas constituem um grande problema de saúde pública, principalmente na população infantil. É a segunda causa mais freqüente de morte em crianças com idade inferior a 60 meses (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 1999), sendo responsável por 16% das 10,4 milhões de mortes de crianças com menos de 5 anos de idade ocorridas anualmente em todo o mundo (WHO, 2004).

A Organização Mundial de Saúde (WHO) define como diarreia três ou mais evacuações líquidas por dia. A diarreia pode ser causada por razões variadas, entretanto, a maioria dos episódios em países em desenvolvimento é de origem infecciosa (ALAM; ASHRAF, 2003; WHO 2008). Quando é um sintoma de infecção gastrointestinal, pode ser causada por uma variedade de agentes etiológicos como bactérias, vírus e parasitas intestinais (MONKEMÜLLER; WILCOX, 2001; PODEWILS *et al.*, 2004; QADRI, 1990).

Existem três formas clínicas de diarreia: diarreia aguda, diarreia invasiva e diarreia persistente. A diarreia aguda é a mais comum em indivíduos imunocompetentes e pode ser líquida, com impacto na hidratação do paciente, ou disentérica, quando as fezes são sanguinolentas e com presença de muco, além de forte componente inflamatório associado (ALAM; ASHRAF, 2003).

A infecção intestinal por agentes etiológicos diversos é usualmente disseminada por água ou alimentos contaminados, de pessoa a pessoa ou resultado de higiene precária. A diarreia leva à perda de fluidos, desidratação e pode ser muito impactante em crianças malnutridas ou indivíduos com imunidade comprometida (RICE *et al.*, 2000; WHO, 2008).

A partir da década de 80, a implantação da terapia de rehidratação oral (TRO) gerou uma redução importante na mortalidade ocasionada pelas doenças diarreicas (LIMA; GUERRANT, 1992; PETRI Jr. *et al.*, 2008; THAPAR; SANDERSON, 2004). Estudos no Brasil, Egito, México e Filipinas confirmaram o impacto positivo do uso de TRO. Em 1980, o

número anual de mortes em crianças menores de 5 anos por diarreia era de 4,6 milhões e em 2000, esse número caiu para 1,5 milhão de mortes (VICTORA *et al.*, 2000).

No Brasil, a diarreia era responsável por 17,3% dos óbitos infantis entre 1985-1987, caindo para 4,2% em 2003-2005. No entanto, a proporção de mortes por diarreia é, ainda hoje, quatro vezes maior na região Nordeste quando comparada à região Sudeste, evidenciando diferenças regionais quanto ao acesso e qualidade da atenção à saúde (COMISSÃO NACIONAL SOBRE DETERMINANTES SOCIAIS DA SAÚDE, 2008).

Apesar do declínio sobre a mortalidade, o impacto da diarreia sobre a morbidade ainda persiste (GUERRANT *et al.*, 2002; KOSEK; BERN; GUERRANT, 2003; LIMA; GUERRANT, 2004; THAPAR; SANDERSON, 2004).

O primeiro relatório da WHO sobre o impacto global das doenças, realizado em 1990, introduziu uma medida chamada DALY (*disability-adjusted life years*, inabilidade ajustada em anos de vida), medida única para quantificar o impacto de doenças, injúrias e fatores de risco que ultrapassa os limites da avaliação de impacto por mortalidade e morbidade. O DALY é baseado na quantidade de anos de vida perdidos por morte prematura e na quantidade de anos de vida vividos em condição inferior à de saúde plena. Um DALY representa a perda de um ano de vida saudável (WHO, 2004).

Quando avaliadas em relação ao DALY, as doenças diarreicas continuaram em segundo lugar no ranking mundial das doenças mais impactantes, contribuindo com 72,8 milhões de anos de vida saudável perdidos, ficando à frente de doenças como distúrbios depressivos, doença cardíaca isquêmica, vírus da imunodeficiência humana adquirida/síndrome da imunodeficiência adquirida (HIV/AIDS), prematuridade neonatal, acidentes automobilísticos e tuberculose; perdendo apenas para as doenças respiratórias (WHO, 2004).

Além do grande impacto sobre os anos de vida saudáveis perdidos, as doenças diarreicas têm sido implicadas em outras duas questões que representam um grande desafio à saúde pública: o ciclo vicioso diarreia-desnutrição e o prejuízo cognitivo (LIMA *et al.*, 2000; PETRI Jr. *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2008; WALKER *et al.*, 2007).

O ciclo vicioso diarreia-desnutrição foi postulado nas últimas décadas e pode ser compreendido da seguinte maneira: um passo limitante da nutrição normal é a função absorptiva intestinal. Indivíduos desnutridos são mais gravemente afetados pelas infecções

intestinais e essas, por conseguinte, limitam a capacidade absorptiva intestinal (BLACK; BROWN; BECKER, 1984; CAUFIELD *et al.*, 2004; GUERRANT *et al.*, 1992a; LIMA *et al.*, 1992, 2000; MATA, 1992; MOORE *et al.*, 2000; RICE *et al.*, 2000; WEISSTAUB; ARAYA, 2008). Assim sendo as infecções intestinais são tanto causa como consequência da desnutrição (GADEWAR; FASANO, 2005; GUERRANT *et al.*, 2008).

Quanto ao impacto na função cognitiva, doenças diarreicas e desnutrição têm sido associadas com déficit cognitivo em crianças (BERKMAN *et al.*, 2002; LORNTZ *et al.*, 2006). Escores de teste de inteligência não-verbal obtidos por crianças de 6-10 anos de idade foram inversamente correlacionados com o número de episódios de diarreia ocorridos nas mesmas crianças 4-7 anos antes (NIEHAUS *et al.*, 2002). Foi observada também uma redução na fluência verbal semântica no subconjunto de crianças que mais apresentaram quadros de diarreia em seus primeiros dois anos de vida (PATRICK *et al.*, 2005).

As doenças diarreicas estão ainda associadas com inflamação intestinal em graus variados (LUNN, 2000; ALCANTARA *et al.*, 2003; SAMIE *et al.*, 2007a, 2007b).

O baixo desempenho do crescimento durante a infância é um fato freqüente em muitos países em desenvolvimento. Um trabalho realizado na Gâmbia associou a baixa estatura com ocorrência de enteropatia no intestino delgado, decorrente de infecção intestinal. Dois mecanismos estariam relacionados: primeiramente, ocorre atrofia parcial dos vilos intestinais que leva à redução da absorção de lactose e outros nutrientes. Em seguida, o dano à mucosa intestinal proporciona condições para a translocação de macromoléculas para a corrente sanguínea, acarretando em resposta imune inflamatória sistêmica e local (LUNN, 2000).

A avaliação da inflamação intestinal se dá por métodos diretos e menos sensíveis, como a procura por leucócitos fecais e também por métodos indiretos incluindo a pesquisa de lactoferrina fecal, por ELISA sanduíche. Lactoferrina fecal é uma glicoproteína encontrada em leucócitos polimorfonucleares ativados (FRIED *et al.*, 2002).

Quando um processo inflamatório causado por espécies de *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter jejuni* ou *Clostridium difficile* está presente, na grande maioria dos casos, os leucócitos fecais podem facilmente ser detectados por microscopia óptica (GUERRANT *et al.*, 1992b).

A pesquisa por lactoferrina fecal tem sido reportada na literatura como um marcador útil da presença de leucócitos fecais, mesmo quando a morfologia destes não está bem

preservada (GUERRANT *et al.*, 1992b). A lactoferrina fecal demonstrou apresentar maior sensibilidade que os leucócitos fecais ou sangue oculto nas fezes no rastreamento de patógenos invasivos (HUICHO *et al.*, 1996, 1997; KANE *et al.*, 2003; RUIZ-PELÁEZ; MATTAR, 1999; VENKATARAMAN *et al.*, 2003).

1.2 *Campylobacter* sp.

1.2.1 O Gênero

A família *Campylobacteraceae* pertence à classe *Epsilonproteobacteria* da ordem *Campylobacteriales* que inclui dois outros gêneros, *Arcobacter* e *Sulfurospirillum*. Os dois primeiros gêneros contêm espécies patogênicas para o homem e animais, enquanto o gênero *Sulfurospirillum* está formado por espécies de vida livre isoladas de ambientes aquáticos (FERNÁNDEZ, 2008).

Campylobacteraceae é constituída de bacilos Gram-negativos curvos, em forma de S ou espiralados, medindo 0,2 a 0,9 μ m de largura e 0,5-5 μ m de comprimento. Não formam esporos e são móveis por flagelação monopolar ou bipolar monotríquia. Apresentam metabolismo do tipo respiratório. A grande maioria é das espécies é microaerófila, sendo que algumas ainda podem proliferar em aerobiose e outras em anerobiose. São todas oxidase-positivas e incapazes de fermentar ou oxidar os hidratos de carbono (FERNÁNDEZ, 2008).

As espécies do gênero *Campylobacter* são de natureza zoonótica e possuem genomas pequenos (1,6-2,0 megabases). Podem estabelecer associação de longo termo com seus hospedeiros, algumas vezes, com consequências patogênicas (VANDAMME, 2000). No quadro 1, estão listadas as principais espécies encontradas em associação com processos infecciosos do ser humano, indicando seus principais reservatórios e dosnças associadas no homem e nos animais (adaptado de FERNÁNDEZ, 2008).

Quadro 1 - Principais espécies de *Campylobacter* encontradas em associação com processos infecciosos do ser humano

Espécies	Reservatórios	Doença no ser humano	Doença em animais
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	Bovinos, ovinos	Septicemia, enterite, aborto, meningite	Aborto espontâneo em bovinos e ovinos
<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	Bovinos	Septicemia (rara)	Infertilidade infecciosa no bovino
<i>C. upsaliensis</i>	Cães, gatos, macacos	Enterite, septicemia	Gastroenterite em cães e gatos
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>hyointestinalis</i>	Suínos, bovinos, hamsters	Enterite, septicemia	Enterites em suínos e bovinos
<i>C. concisus</i>	Humanos	Doença periodontal, enterite, septicemia	Não descrita ainda
<i>C. sputorum</i> subsp. <i>sputorum</i>	Humanos, bovinos, ovinos, suínos	Abscessos	Enterite necrótica em suínos
<i>C. lari</i>	Gaivotas, outras aves, cães, gatos	Enterite, septicemia	Não descrita ainda
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	Humanos (com e sem diarreia), cães e galinhas	Enterite, septicemia	Não descrita ainda
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	Aves e mamíferos	Gastronterite, septicemia	Enterite em cães e gatos jovens, aborto em ovinos
<i>C. coli</i>	Aves e mamíferos	Gastronterite, septicemia	Enterite em cães e gatos jovens, aborto em ovinos
<i>C. curvus</i>	Humanos	Infecção da cavidade oral, enterite, septicemia, peritonite	Não descrita ainda
<i>C. gracilis</i>	Humanos	Infecção gengival, infecções de vísceras, cabeça e pescoço, abscessos	Não descrita ainda
<i>C. showae</i>	Humanos	Placa dentária, infecção de canais dentários	Não descrita ainda

Fonte: Fernández (2008).

Atualmente, o gênero *Campylobacter* contém dezesseis espécies e seis subespécies. *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni*, *C. jejuni* subsp. *doylei*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* e *C. helveticus* formam um grupo geneticamente homogêneo que é o mais comumente isolado de amostras diarréicas humanas e animais (ON, 2001; PRASAD; DIXIT; AYYAGARI, 2001).

C. jejuni e *C. coli* são as espécies do gênero que estão mais associadas com doença diarréica (ALTEKRUSE *et al.*, 1999; BUTZLER, 2004; COKER *et al.*, 2002; GILLESPIE *et al.*, 2002; SOROKIN *et al.*, 2007), sendo *C. jejuni* a mais prevalente (ALLOS, 2001). Segue adiante (FIGURA 1) foto obtida por microscopia eletrônica de varredura de *C. jejuni* NCTC 11168 (LAGIER; PRATT; THREADGILL, 2008).

C. upsaliensis é encontrado em proporções semelhantes em cultura de fezes diarréicas como em cultura de sangue de pacientes com bacteremia. Geralmente, os pacientes com bacteremia por *C. upsaliensis* apresentam sérias condições clínicas pré-existentes e a bacteremia parece ser secundária à infecção intestinal (JIMENEZ *et al.*, 1999; LABARCA *et al.*, 2002).



Figura 1 - *Campylobacter jejuni* NCTC 11168. Microscopia eletrônica de varredura

Fonte: LaGier, Pratt e Threadgill (2008)

C. concisus, *C. showae*, *C. curvus*, *C. rectus*, *C. gracilis*, *C. sputorum* e *C. hominis* parecem ser espécies filogeneticamente muito relacionadas. A maioria delas ocorre na

cavidade oral humana, embora *C. hominis* tenha sido encontrada somente no intestino humano e *C. sputorum* é também encontrado nos tratos entérico e reprodutivo de vários animais (ON, 2001).

Atualmente, *C. concisus* tem sido associado com diarreia em humanos com frequência cada vez mais elevada. Na Cidade do Cabo, África, em um estudo envolvendo 20.458 amostras de fezes diarreicas de pacientes pediátricos, *C. concisus* foi a segunda espécie mais prevalente (23,78%; 1.013/4.260) de *Campylobacter* sp. isolada (MATSHEKA; LASTOVICA; ELISHA, 2001; WHO, 2001). Em trabalho na Bélgica, *C. concisus* foi isolado de crianças com e sem diarreia (VANETTERIJCK *et al.*, 1996).

C. fetus subsp. *fetus*, *C. fetus* subsp. *venerealis*, *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *C. hyointestinalis* subsp. *lawsonii* são espécies fenotípica e genotipicamente semelhantes (ON, 2001).

C. fetus subsp. *venerealis* é encontrado em desordens do trato reprodutivo de bovinos, causando aborto e infertilidade infecciosa (ON, 2001). *C. fetus* subsp. *fetus* pode ser encontrado em humanos como microorganismo zoonótico oportunista associado com bacteremia. Raramente é isolado de pacientes com diarreia (FERNÁNDEZ *et al.*, 2008).

C. hyointestinales subsp. *hyointestinalis* ocorre em trato entérico suíno e *C. hyointestinales* subsp. *lawsonii* em estômago de porcos. *C. mucosalis* era anteriormente descrito como *C. sputorum* subsp. *mucosalis* e constitui uma espécie de difícil diferenciação em relação à espécie *C. concisus* (KONEMAN *et al.*, 2001). *C. lanienae* também pertencem ao gênero e sua nomeação taxonômica foi sugerida por Logan *et al.* (2000) e On (2001).

As novas ferramentas moleculares abrem campo para a elucidação do quadro taxonômico do gênero, o que acaba por gerar propostas para descrições recentes de novas espécies e subespécies (*C. peloridis* sp. nov., *C. lari* subsp. *concheus* subsp. nov. e automaticamente *C. lari* subsp. *lari* subsp. nov.) (DEBRUYNE *et al.*, 2009).

Campylobacter constitui, portanto, um gênero complexo, ainda não completamente compreendido, sendo alvo de intensa investigação no intuito de elucidar certas considerações quanto à sua ampla biodiversidade (DEBRUYNE *et al.*, 2009; DUIM *et al.*, 2001; GUPTA, 2006; LASTOVICA; LEROUX, 2000; ON, 2001; WHO, 2001).

1.2.2 Evolução temporal sobre o conhecimento das campilobacterioses

Em 1886, Theodor Escherich publicou uma série de artigos nos quais descrevia uma bactéria espiral encontrada em associação com o muco do intestino grosso de 16 entre 17 crianças que morreram em decorrência de doença diarréica. A tentativa de cultivar tal bactéria em meio sólido não obteve sucesso (SNELLING *et al.*, 2005).

As dificuldades em isolar o microorganismo a partir de material fecal permaneceram até 1972, data do primeiro isolamento a partir desse tipo de amostra. Durante esse longo intervalo, vários pesquisadores como McFayden e Stockman (1906), víbrio relacionado a aborto epizootico em cabras, Vinzent *et al.* (1947), isolamento de víbrios a partir do sangue de três grávidas com septicemia, King (1957), descrição de um víbrio causador de enterite em crianças, se depararam com o microorganismo em seus estudos sem poderem descrever definitivamente o singular “víbrio” que até meados de 1950 só era isolado a partir de amostras veterinárias ou a partir de sangue de pacientes que apresentavam bacteremia e/ou aborto séptico (BUTZLER, 2004; SKIRROW, 2006; WHO, 2001).

Sebald e Véron (1963) nomearam o gênero *Campylobacter*, baseados na forma do microorganismo (do grego *Kampulus*, encurvado e *Bacter*, bactéria) e nas importantes diferenças em relação aos víbrios verdadeiros, *Vibrio cholerae* e *Vibrio parahaemolyticus*. Para essa nova denominação foram consideradas as diferenças bioquímicas e antigênicas, além do DNA relativamente pequeno com característico perfil citosina-guanosina, variando entre 28 e 46mol% (ON, 2001; WHO, 2001; FERNÁNDEZ, 2008).

Desde então, o gênero tem sido alvo de grande atenção científica. Principalmente *C. jejuni* e *C. coli* vêm sendo relacionados como agentes etiológicos importantes de doenças diarréicas tanto nem países desenvolvidos como em países em desenvolvimento (ALLOS, 2001; ALTEKRUSE *et al.*, 1999; BUTZLER, 2004; COKER *et al.*, 2002; GILLESPIE *et al.*, 2002).

A sequência genômica completa de *C. jejuni* NCTC 11168 foi publicada em 2000 (PARKHILL *et al.*, 2000; WELLCOME TRUST SANGER INSTITUTE, 2008). Atualmente estão disponíveis, tanto em *websites* como em publicações, seis genomas de *C. jejuni* e

seqüências de outras quatro cepas de *Campylobacter* spp. (J. CRAIG VENTER INSTITUTE, 2008; FOUTS *et al.*, 2005; HOFREUTER *et al.*, 2006; POLY *et al.*, 2007).

1.2.3 Características das Campilobacterioses

O trato gastrointestinal (TGI) possui uma complexa diversidade de microorganismos. Assim, a identificação de um microorganismo em particular no TGI ou nas fezes de um paciente com doença intestinal não indica, necessariamente, que o estado clínico resulta da presença de tal organismo. Por essa razão, a associação de causalidade é particularmente desafiadora para doenças gastrointestinais (LOWE; YANSOUNI; BEHR, 2008).

Os agentes mais bem estabelecidos de gastroenterites bacterianas agudas são *Escherichia coli* e *Campylobacter jejuni*, que mostraram ter preenchido o postulado de Koch de causalidade em estudos com voluntários humanos (BLACK *et al.*, 1988; LOWE; YANSOUNI; BEHR, 2008).

O postulado de Koch constitui-se de quatro afirmativas que devem ser confirmadas para que se estabeleça relação de causalidade entre um microorganismo e uma doença: a) a presença do agente deve ser sempre comprovada em todos os indivíduos que sofram da doença em questão e, a partir daí, isolada em cultura pura; b) o agente não poderá ser encontrado em casos de outras doenças; c) uma vez isolado, o agente deve ser capaz de reproduzir a doença em questão após a sua inoculação em animais experimentais; d) o mesmo agente deve poder ser recuperado desses animais experimentalmente infectados e de novo isolado em cultura pura (BROCK, 1999).

Na infecção experimental duas cepas de *C. jejuni* ingeridas por 111 adultos voluntários causaram diarreia. Os sintomas relacionados à cepa mais severa variavam de fezes pouco consistentes à disenteria, com uma média, por voluntário, de 15 evacuações diarréicas/dia e volume total de 1.500 mL/dia. A cepa mais branda gerou uma média de 5 evacuações diarréicas e um volume total de 500mL de fezes diarréicas. Todos os pacientes apresentaram leucócitos fecais. Um ano após, foi realizada infecção experimental em

macacos, com caracterização semelhante à infecção humana por *C. jejuni* (BLACK *et al.*, 1988; RUSSEL *et al.*, 1989).

Resumidamente temos que campilobacteriose é uma descrição coletiva para infecções causadas por membros do gênero *Campylobacter*. As campilobacterioses de maior importância em saúde pública são as infecções entéricas zoonóticas causadas por *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* (ALTEKRUSE *et al.*, 1999).

Em muitos países industrializados, *C. jejuni* é a bactéria mais frequentemente isolada de casos de diarreia infecciosa. Em países em desenvolvimento, tanto *C. jejuni* como *C. coli* são altamente prevalentes, sendo mais comumente associados com diarreia em crianças menores de 2 anos de idade e também em portadores assintomáticos (FRIEDMAN *et al.*, 2000; OBERHELMAN; TAYLOR, 2000).

Tanto as campilobacterioses quanto suas seqüelas são sub-reconhecidas devido à inexistência de programas de vigilância específicos. Isso acontece por que as infecções por *Campylobacter* sp. raramente são fatais e também devido ao pequeno número de surtos (WHO, 2001).

No entanto, a importância dessa infecção em saúde pública vem crescendo devido à uma série de fatores, tais como:

a) O aumento da incidência de campilobacterioses, principalmente nos países desenvolvidos, a partir de 1990 (BAKER; SNEYD; WILSON, 2007; FROST, 2001).

b) As novas espécies que vêm sendo descritas como patógenos humanos (ENGBERG *et al.*, 2000; LABARCA *et al.*, 2002; LASTOVICA; SKIRROW; 2000; PRASAD; DIXIT; AYYAGARI, 2001).

c) O aumento amplamente reportado do número de cepas resistentes à antibioticoterapia (principalmente às fluoroquinolonas) e a implicação decorrente dessa resistência em relação aos aspectos clínicos e epidemiológicos da infecção (ALFREDSON; KOROLIK, 2007; BAKELI *et al.*, 2008; GIBREEL; TAYLOR, 2006; HAMER; GILL, 2002; HANNINEN; HANNULA, 2007; HELMS *et al.*, 2005; NELSON *et al.*, 2004; THE CAMPYLOBACTER SENTINEL SURVEILLANCE SCHEME COLLABORATORS, 2002).

d) A infecção em pacientes portadores do vírus HIV que vem elevando as taxas de mortalidade relacionadas à infecção pelo gênero *Campylobacter* (CÁRCAMO *et al.*, 2005; JENKIN; TEE, 1998; KOWNHAR *et al.*, 2007; MOLINA *et al.*, 1995; ROBINSON; PUGH, 2002; SAMIE *et al.*, 2007a; SMITH *et al.*, 2002; SNIJDERS *et al.*, 1997).

e) O estudo de vacinas relativamente avançado. Existem atualmente três potenciais vacinas, duas em estudo pré-clínico (uma de *C. jejuni* atenuado e outra não-celular, constituída de uma subunidade da proteína flagelina de *C. jejuni*) e uma em estudo clínico (candidato celular, *C. jejuni* inativado) (WALKER, 1999, 2005).

1.2.4 Transmissão das Campilobacterioses

A via de transmissão mais comum das campilobacterioses intestinais é a fecal-oral, sendo necessária uma dose de cerca de 500-800 células/mL, valor muito baixo se comparado a outros enteropatógenos frequentes como *Shigella spp.* (10^3 células/mL) e *Salmonella spp.* (10^5 células/mL) (YOUNG; DAVIS; DIRITA, 2007).

A campilobacteriose é uma doença zoonótica e, portanto, os agentes etiológicos vivem de forma comensal em outros nichos (ANDRADE *et al.*, 2007; DIAS *et al.*, 1990; FRENCH *et al.*, 2009; VANGERWE *et al.*, 2009). *C. jejuni* e *C. coli* fazem parte da microbiota intestinal normal de vários animais e pássaros, particularmente aqueles envolvidos na cadeia alimentar humana (galináceos, suínos, bovinos) e, por isso, a infecção por *C. jejuni/coli*. é também conhecida como uma doença de origem alimentar.

A transmissão, esquematizada a seguir (FIGURA 2) se dá principalmente (mas não exclusivamente) pela ingestão de alimentos contaminados, como carne mal cozida de frango, leite não pasteurizado e água contaminada com fezes de animais (WHO, 2001; YOUNG; DAVIS; DIRITA, 2007).

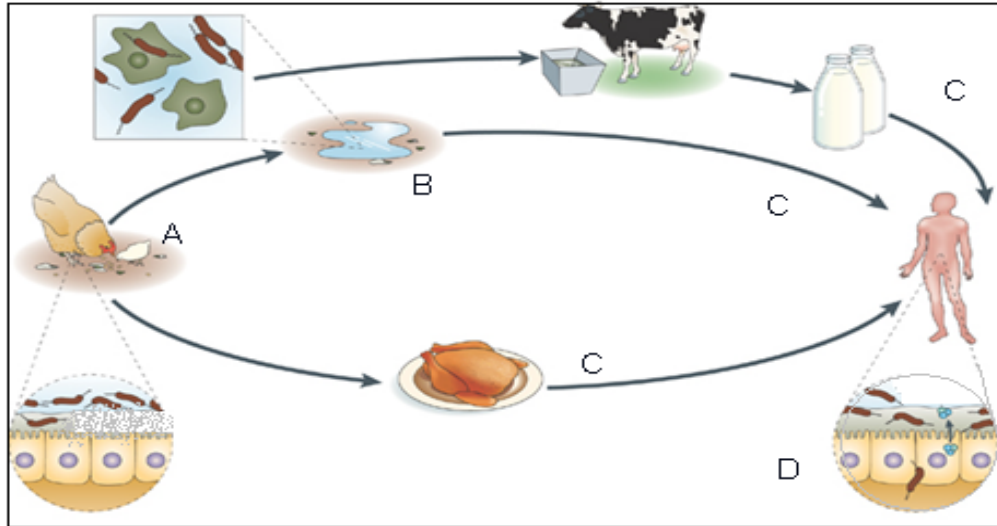


Figura 2 - Vias de transmissão de *C. jejuni*. A) A bactéria *C. jejuni* coloniza o trato gastrointestinal de galináceos e bovinos. B) Pode ocorrer a contaminação da água; o microorganismo possivelmente forma um biofilme com amebas de vida livre. C) Pode ocorrer contaminação alimentar. As fontes mais frequentes de contaminação humana são: água contaminada, leite cru, carne de frango mal cozida e/ou alimentos. D) Em humanos, o microorganismo pode invadir a mucosa intestinal causando diarreia e inflamação

Fonte: Young, Davis e DiRita (2007)

1.2.5 Fisiopatologia da Infecção por *Campylobacter* sp.

Campylobacter jejuni e *C. coli* compartilham a maioria das características fisiopatológicas e, portanto, os nomearemos aqui como *Campylobacter* sp.

Para estabelecer uma infecção *Campylobacter* sp. deve ultrapassar as barreiras mecânicas e imunológicas do trato gastrointestinal (TGI). A camada de muco do TGI se presta como uma primeira linha de defesa, mas certas características do microorganismo contribuem com a habilidade de *Campylobacter* sp. em penetrar essa barreira, principalmente sua motilidade e sua forma curvada. Depois de penetrar a camada mucóide, *Campylobacter* sp. pode interagir com as células epiteliais (YOUNG; DAVIS; DIRITA, 2007).

Campylobacter sp. pode aderir às células epiteliais utilizando diferentes adesinas, no entanto, o papel dessas proteínas na infecção ainda é incerto. A estrutura flagelar parece ter papel de organela secretora de proteínas, conhecidas como proteínas *Cia* – antígenos invasivos de *Campylobacter*, que medeiam a invasão às células epiteliais. Os mecanismos envolvidos na ação desse grupo de proteínas ainda não estão completamente esclarecidos (KOPECKO; HU; ZAAL, 2001; POLY; GUERRY, 2008).

Existem evidências de que *C. jejuni* pode romper as junções firmes do epitélio intestinal, assim a invasão do microorganismo parece ser tanto transcelular (endocitose pela célula intestinal) como paracelular (rompimento das junções firmes) (CHEN *et al.*, 2006; LAMB-ROSTESKI *et al.*, 2008). As junções firmes (*tight junctions*) são proteínas que agem como barreira paracelular para o movimento de água, solutos e células imunes, estabelecendo polaridade e prevenindo a mistura de componentes entre os compartimentos apicais e basolaterais dos enterócitos (CEREIJIDO *et al.*, 1998; MADARA, 1998; MITIC; ANDERSON, 1998).

Interações entre *Campylobacter* sp. e células epiteliais, células dendríticas e macrófagos podem desencadear a ativação do fator nuclear transcripcional NF- κ B, resultando na liberação de quimiocinas como CXCL20 e citocinas, principalmente IL-8, que contribuem tanto para diarreia inflamatória como para a eliminação do patógeno (CHEN *et al.*, 2006; YOUNG; DAVIS; DIRITA, 2007).

A resposta imune específica necessária para a eliminação de *Campylobacter* sp. é a resposta do tipo celular (T_H1) e presumivelmente envolve a participação de células dendríticas e macrófagos (YOUNG; DAVIS; DIRITA, 2007).

1.2.6 Fatores de Virulência do Gênero *Campylobacter*

Propriedades específicas relacionadas aos passos de adesão, colonização, invasão e produção de toxinas parecem ser determinantes na infecção por *Campylobacter* spp. (WASSENAAR, 1997).

Vários fatores de virulência têm sido estudados a fim de elucidar as propriedades envolvidas no mecanismo de patogenicidade e trazer subsídio à compreensão sobre a vasta

gama de apresentações clínicas associadas com a infecção por *Campylobacter* spp. (AL-MAHMEED *et al.*, 2006). A produção de toxinas (enterotoxinas e citotoxinas – QUADRO 2) e a capacidade infectiva de certas cepas relacionados a alguns genes (QUADRO 3) parecem modular as apresentações clínicas das gastroenterites por *Campylobacter* (TALUKDER *et al.*, 2008).

Quadro 2 - Tipos de toxinas produzidas pelo gênero *Campylobacter*

Tipo de Toxina	Ação	Denominação
Enterotoxinas	Proteínas que desregulam adenilato ciclase, elevam níveis intracelulares de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) e consequentemente aumentam o fluxo de íons e geram diarreia aquosa	CT (toxina colérica), HL (toxina termo-sensível de <i>E.coli</i>). / Detecção em cepas de <i>Campylobacter</i> sp. isoladas da Bélgica, EUA, África do Sul, Costa Rica, Canadá, Índia (32-100%)
Citotoxinas	Proteínas que destroem células-alvo	70KDa, Hela
		Hela e Vero
		Similar à STx (toxina de <i>Shigella</i>)
		Com atividade hemolítica
		Hepatotoxina
		Toxina citoletal distensora (CDT)

Fonte: Wassenaar (1997)

Quadro 3 - Genes de virulência do gênero *Campylobacter*

Gene	Função da proteína codificada	Deteccção (%)
<i>flaA</i>	Aderência e Colonização	100
<i>cadF</i>		100
<i>racR</i>		100
<i>dnaJ</i>		100
<i>ceuE</i>	Sistema secretor	82,5
<i>virB11</i>	Invasão celular	0
<i>ciaB</i>		95
<i>pldA</i>		100

Fonte: Talukder *et al.*(2008)

Guerrant *et al.* (1987), seguidos de Johnson e Lior (1988), foram os primeiros grupos a descrever a produção de toxina citoletal distensora (CDT) por *C. jejuni* (GUERRANT *et al.*, 1987; JOHNSON; LIOR, 1988). Tal toxina gera distensão celular em várias linhagens celulares, incluindo as células renais de macaco africano do gênero *Cercopithecus* (linhagem Vero) e células de carcinoma humano (linhagem HeLa) (GUERRANT *et al.*, 1987; FERNÁNDEZ; TRABULSI, 1995).

Após um período de distensão lenta que dura 2 a 4 dias , as células se desintegram. Johnson e Lior rastream a produção da toxina em mais de 500 isolados de *C. jejuni*, obtidos de diferentes países, e demonstraram que 41% das amostras pesquisadas produziam CDT (JOHNSON; LIOR, 1988; PICKETT *et al.*, 1996).

A ação dessa toxina se deve ao aprisionamento do ciclo celular na fase G₂ da intérfase, o que gera um bloqueio da proliferação celular, pois a célula fica impedida de entrar em mitose. A CDT entra na célula eucariótica, alcança seu núcleo e quebra o DNA. As células afetadas se distendem até entrarem em apoptose (CEELEN *et al.*, 2006; DeRYCKE;

OSWALD, 2001; GE; SCHAUER; FOX, 2008; HEYWOOD; HENDERSON; NAIR, 2005; PICKETT; WHITEHOUSE, 1999). A CDT é, portanto, uma toxina do tipo cicloestatina ou ciclomodulina (OHARA; OSWALD; SUGAI, 2004). O aspecto das células afetadas é exemplificado na figura a seguir (FIGURA 3).

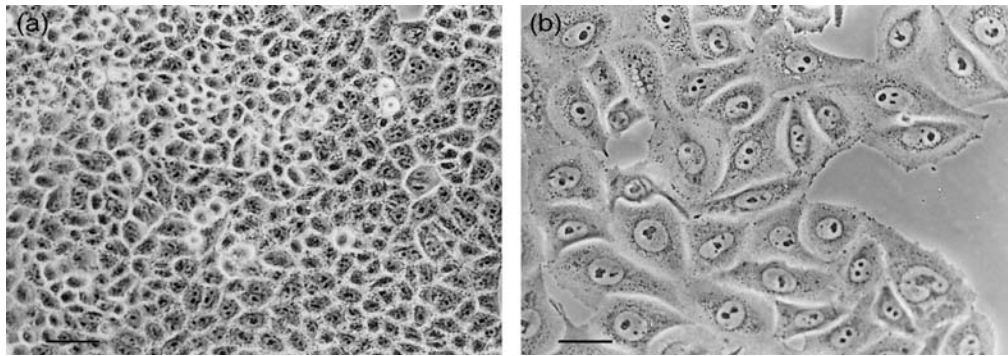


Figura 3 - Alteração celular causada pela toxina citoletal distensora (CDT) de *C. jejuni* em células HeLa. A) Células HeLa normais 72 horas após adição de solução sem CDT. B) Células HeLa 72 horas após a adição de CDT recombinante. As células encontram-se grosseiramente distendidas

Fonte: Pickett e Whitehouse (1999).

Nota: Barra (escala) = 36µm.

A atividade de CDT requer a função de três genes cromossomais adjacentes, *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*, para que ocorra a formação da holotoxina tripártide que exibe a toxicidade celular completa. Lara-Tejero e Gálan, em 2001, demonstraram a necessidade das três subunidades para o alcance do efeito citotóxico total (LARA-TEJERO; GÁLAN, 2001).

Em modelo murino de infecção entérica, Purdy *et al.* (2000) demonstraram que *C. jejuni* mutante para o gene *cdt* apresenta capacidade de invasão reduzida em comparação à bactéria selvagem.

Outro gene de virulência ligado à capacidade de invasão de *Campylobacter* sp. é o gene para o marcador associado à invasão (*iam*). Estudos *in vitro* demonstraram que esse marcador genético cromossomal presente em certas cepas de *C. jejuni* está associado com aderência e invasão (CARVALHO *et al.*, 2001).

Al-Mahmeed *et al.* (2006) caracterizaram o perfil de dois genes de virulência, *cdtB* e *iam*, em população do Golfo Pérsico. Cinquenta das 96 cepas isoladas de *C. jejuni* (52%) foram caracterizadas como *cdtB*⁺/*iam*⁺, 31% como *cdtB*⁺/*iam*⁻ e 17% como *cdtB*⁻/*iam*⁻. A detecção das cepas positivas para 1 ou para os 2 genes pesquisados foi significativamente

maior nas crianças com idade inferior a 3 anos de idade. Foi também demonstrada associação entre os portadores de cepas *cdtB*/*iam*⁻ e caráter assintomático da infecção.

Com relação aos plasmídeos, o estudo no gênero *Campylobacter* ainda é discreto. Em 2000, foi caracterizado o plasmídeo *pVir*, relacionado com capacidade de aderência e invasão *in vitro* e virulência *in vivo* (modelo animal) (BACON *et al.*, 2000). Tracz *et al.* (2005) associaram a detecção de tal plasmídeo às infecções mais invasivas, de caráter disentérico.

Além dos genes de virulência supracitados, uma importante estrutura que possui função na interação entre *C. jejuni* e o ambiente é sua camada externa composta de lipooligosacarídeos (LOS). Essa estrutura externa é altamente variável entre as diferentes cepas *Campylobacter* e está relacionada com a virulência da bactéria. Os LOS de *C. jejuni* possuem papel no mimetismo molecular com gangliosídeos do hospedeiro (PERERA *et al.*, 2007), na evasão à resposta imune do hospedeiro (KARLYSHEV; KETLEY; WREN, 2005) e também nos processos de adesão e invasão (FOUTS *et al.*, 2005; KANIPES *et al.*, 2004). Recentemente, Jeon *et al.* (2009); Padilla e Costa (2008) demonstraram que os LOS de superfície de *C. jejuni* contribuem para a resistência ao tratamento com eritromicina e possuem papel na transformação natural por aquisição de DNA livre.

1.3 Aspectos Epidemiológicos das Campilobacterioses

1.3.1 Campilobacterioses Intestinais em Países Desenvolvidos

Campylobacter sp. é um dos microorganismos mais amplamente relacionados à etiologia de doenças diarréicas em todo o mundo (POLY; GUERRY, 2008).

Nos Estados Unidos e em outras nações industrializadas, *Campylobacter jejuni* é o agente etiológico mais frequentemente isolado de doença diarréica. Em 1997, *C. jejuni* ou *C. coli* foi identificado através de vigilância de dados laboratoriais em 25,2 por 100.000 habitantes (FRIEDMAN *et al.*, 2000). Esse número representa uma pequena fração do número total de infecções norte-americanas, visto que muitos doentes não procuram auxílio médico e também por que nem toda consulta médica gera um resultado de coprocultura (WHO, 2001).

No entanto, estimativas desse país apontam que 1% da população americana é afetada anualmente, gerando 13.000 internações hospitalares e 124 mortes anuais (SAMUEL *et al.*, 2004; CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2006).

Na Nova Zelândia, a incidência reportada de campilobacteriose cresceu vertiginosamente nas décadas de 80 e 90: de 14/100.000 habitantes em 1981 para 120/100.000 habitantes em 1990 e, finalmente, 363/100.000 habitantes em 1998 (BAKER; SNEYD; WILSON, 2007; LAKE *et al.*, 2000).

No Reino Unido, *Campylobacter jejuni* é a causa mais freqüente de infecção gastroentérica desde 1981. A estimativa de incidência alcança 420.000 casos/ano (FROST, 2001; FROST; GILLESPIE; O'BRIAN, 2002; SMITH *et al.*, 2006). *Campylobacter coli*, por sua vez, apesar de constituir um agente etiológico menos relevante das campilobacterioses, apresenta um grande impacto na saúde britânica. A estimativa de casos ocorridos em 2000 foi de 25.000 casos de diarreia infecciosa por *C. coli*, aproximadamente 1.000 internações com 4.000 dias totais de internação e 11 mortes; gerando um custo estimado em 4 milhões de libras (TAM *et al.*, 2003).

1.3.2 Campilobacterioses Intestinais em Países em Desenvolvimento

Em países em desenvolvimento, *C. jejuni* e *C. coli* parecem ser hiperendêmicos. Em países como Nigéria, Tanzânia, China, Tailândia, Bangladesh e Egito, *Campylobacter* sp. é uma das bactérias mais frequentemente isoladas das fezes de crianças com diarreia (COKER *et al.*, 2002; OBERHELMAN; TAYLOR, 2000).

Apesar do grande impacto das campilobacterioses intestinais, não existem programas de vigilância nacional em campilobacterioses na grande maioria dos países em desenvolvimento, e, portanto, os dados epidemiológicos da infecção são provenientes, majoritariamente, de dois tipos de estudos realizados nessas áreas: estudos caso-controle e estudos de vigilância baseados em dados laboratoriais concernentes aos patógenos causadores de diarreia (LEVINE, 2006; WHO, 2001).

Em geral, os países em desenvolvimento apresentam taxas de isolamento de *Campylobacter* sp., a partir de amostras de fezes diarréicas de crianças menores de 5 anos, em torno de 5 a 20% (COKER *et al.*, 2002).

Em estudo multicêntrico envolvendo crianças menores de 36 meses de idade, amostras de fezes de 3.640 casos de diarréia e 3.279 controles foram coletadas. *C. jejuni* foi encontrado em 11% dos casos (400/3.640) e 7% dos controles (230/3.279) (HUILAN *et al.*, 1991).

No Brasil, estudos caso-controle relacionados à diarréia adquirida em comunidade realizados na década de 1980, apresentaram achados similares: em 1984, na cidade de São Paulo, González *et al.* (1984) realizaram a coprocultura de amostras de 125 crianças divididas em três grupos; *C. jejuni* foi isolado em 9,3% dos casos de diarréia aguda, 6,5% dos casos de diarréia crônica e 5,3% dos controles. Três anos mais tarde, em Belo Horizonte, Minas Gerais, estudo caso-controle envolvendo 98 crianças com diarréia e 30 crianças sem diarréia, todas menores de 2 anos de idade, isolou *C. jejuni* de 11,2% dos casos e 6,6% dos controles (MENDES *et al.*, 1987).

Em estudo prospectivo sobre diarréia adquirida na comunidade, na região Nordeste, Guerrant *et al.* (1983), determinaram que *C. jejuni* foi responsável por 7,5% das diarréias, no entanto, no delineamento desse estudo não foi incluída a pesquisa em grupo controle.

Estudos prospectivos com crianças com diarréia atendidas em ambulatório pediátrico, sem internação, demonstraram um quadro bastante diverso: em 1998, um estudo prospectivo realizado na cidade de São José do Rio Preto, São Paulo; com 196 crianças com menos de 5 anos de idade com diarréia aguda e 33 crianças sem diarréia, todas atendidas em ambulatório pediátrico local, determinou que a prevalência de *C. jejuni* foi de apenas 0,5% dos casos (1/196) e 0% nos controles (ALMEIDA *et al.*, 1998). Em 1999, na capital, São Paulo, Toporovsky *et al.* (1999) encontraram *Campylobacter jejuni* em 5% dos casos (5/100 crianças) e 0% dos controles (0/100 crianças). Na capital baiana, em 2005, Diniz-Santos *et al.* (2005) não detectaram *Campylobacter* spp. em nenhuma amostra estudada (260 amostras).

Alguns trabalhos brasileiros não estão diretamente relacionados à detecção clínica de *Campylobacter* sp., mas sim à diversidade de nichos que o microorganismo pode assumir. Lauria-Filgueiras *et al.* (1998), do Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, RJ), avaliaram a diversidade de *C. jejuni* e *C. coli* isolados de três estações de tratamento de esgoto no Rio de Janeiro e também a circulação de espécies termofílicas de

Campylobacter em primatas não-humanos (ANDRADE *et al.*, 2007; LAURIA-FILGUEIRAS; HOFER, 1989, 1998).

Dias *et al.* (1990), em Minas Gerais, avaliaram a presença de *C. jejuni* tanto em carcaças de frango, como nas fezes dos trabalhadores de abatedouro. O grupo isolou *C. jejuni* de 38% das carcaças e 13,3% das fezes dos trabalhadores.

A relativa escassez de dados brasileiros e a grande diversidade dos achados sobre a identificação do gênero *Campylobacter* como enteropatógeno faz vigente a necessidade de mais estudos.

1.3.3 Diferenças Sócio-econômicas Marcantes

Uma diferença marcante entre a epidemiologia de doenças diarréicas causadas por *Campylobacter* spp. em países desenvolvidos *versus* países em desenvolvimento refere-se às espécies *C. jejuni* e *C. coli*. Enquanto nos países desenvolvidos, *C. coli* é o agente etiológico em menos de 5% das campilobacterioses intestinais, nos países sul-americanos, *C. coli* já foi isolado em aproximadamente 25% das doenças diarréicas causadas por *Campylobacter* sp. (FERNÁNDEZ *et al.*, 1995; FERNÁNDEZ *et al.*, 2008).

Outra diferença marcante relaciona-se com a idade dos indivíduos acometidos pela doença. Nos países desenvolvidos, os adultos jovens representam a população mais acometida. Tal fato pode ser explicado pelas vias principais de transmissão nos países desenvolvidos, que são consumo de frango mal cozido e viagens turísticas, visto que *C. jejuni* é uma das bactérias mais isoladas em casos de diarréia do viajante. As diarréias do viajante acometem cerca de 20-50% dos 35 milhões de turistas dos países industrializados para os países em desenvolvimento (ADACHI *et al.*, 2000; GALLARDO *et al.*, 1998).

Nos países em desenvolvimento, a faixa etária mais acometida pelas doenças diarréicas causadas por *C. jejuni* compreende crianças até 3 anos de idade (ALBERT *et al.*, 1999). Dallal *et al.* (2006), demonstraram que *Campylobacter* sp. é o agente etiológico mais freqüentemente isolado no primeiro ano de vida (73,3%). No segundo ano de vida, sua participação como agente etiológico cai para 26,7% e a partir do terceiro ano de vida não é mais encontrado (DALLAL; KHORRAMIZADEH; MOEZARDALAN, 2006).

1.4 Aspectos Clínicos

As enterites por *Campylobacter* spp. em países em desenvolvimento resultam em diarreia aquosa e não-inflamatória, enquanto infecções similares em nações desenvolvidas tipicamente resultam em enterite aguda inflamatória (WALLIS, 1994).

A patogênese da campilobacteriose por *C. jejuni* é muito influenciada pela virulência da cepa e também pela susceptibilidade relativa do hospedeiro, sendo mais grave em pacientes desnutridos ou imunologicamente comprometidos (ZILBAUER *et al.*, 2008).

Interessantemente, estudos epidemiológicos apontam a existência de dois tipos de doença, dependendo da situação sócio-econômica em que o paciente se insere. Nos países desenvolvidos, as campilobacterioses se manifestam como disenteria autolimitada. Nos países em desenvolvimento, a diarreia aquosa é predominante e a infecção é mais frequente em crianças, que provavelmente se tornam naturalmente imunizadas contra uma infecção na vida adulta. Os indivíduos afetados que adquirem a infecção em viagens geralmente apresentam a gama de sintomas comuns à sua região de origem. Essa disparidade provavelmente se deve aos padrões de resposta imunológica T_H1 x T_H2 que refletem diferentes níveis de imunidade pré-existente, produtos de estímulos imunes diferentes em cada ambiente. O padrão T_H1 medeia uma resposta celular e inflamatória e o padrão T_H2 medeia resposta humoral e suprime respostas celulares (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000; OBERHELMAN; TAYLOR, 2000; YOUNG; LINDSAY; DIRITA, 2007).

Resumidamente temos que: a doença diarreica aguda é o resultado mais freqüente da infecção por *Campylobacter* spp. Após um período de incubação de aproximadamente 24-72 horas, os sintomas aparecem, sendo os mais comuns: dor abdominal, febre, vômito e cefaléia (ALLOS, 2001). A dor pode ser localizada ou generalizada, difícil de distinguir de quadro de apendicite aguda (BLAKELOCK; BEASLEY, 2003). O tipo de diarreia desenvolvida apresenta grande variação individual, podendo ser moderada, não-inflamatória e aquosa até severa e disentérica (BLASER, 1997). A infecção é auto-limitada e dura aproximadamente 7 dias em pacientes imunocompetentes (ZILBAUER *et al.*, 2008).

Campylobacter jejuni já foi implicado em uma variedade de outras condições clínicas que são raras e ainda de limitado impacto em saúde pública: bacteremias, septicemias, endocardites, infecção do trato urinário, peritonites, meningites e aborto séptico (BUTZLER, 2004; WALLIS, 1994; YOUNG; LINDSAY; DIRITA, 2007).

Uma séria complicação de infecção por *C. jejuni* é a Síndrome de Guillain-Barré (GBS). Gastroenterite por *C. jejuni* é reconhecida como a infecção mais identificada que precede a GBS. Com a erradicação da poliomielite, GBS é a atual causa mais freqüente de paralisia aguda flácida (NACHAMKIN, 2002).

GBS é uma demielização aguda do sistema nervoso periférico que afeta 1-2 pessoas por 100.000 na população norte-americana a cada ano. Os casos de GBS relacionados com infecção prévia por *C. jejuni* nos Estados Unidos são, aproximadamente, 2.400 casos/ano. Entre os anos de 2000 e 2004, a incidência variou entre 1,65 e 1,79/100.000 habitantes (ALSHEKHLEE *et al.*, 2008).

O risco de desenvolver GBS é aumentado após infecção com certos sorotipos de *C. jejuni*, como HS:19 e HS:41 (PERERA *et al.*, 2007; YUKI; OKADA, 2005; WHO, 2001).

O tratamento de tal síndrome é sintomático e requer cuidados médicos intensivos, suporte respiratório e medidas de reconhecimento precoce de falha respiratória. Nos estágios iniciais da neuropatia, a troca de plasma abrevia o tempo de recuperação. O tratamento oral ou intravenoso com antiinflamatórios esteróides não gera melhora (FRENZEN, 2008; WINER, 2001).

Apesar da infecção por *C. jejuni* ser a mais identificada como precessora do desenvolvimento de GBS (30% dos casos de GBS são precedidos por infecção por *C. jejuni*), o risco real de se desenvolver GBS após infecção por *C. jejuni* é pequeno (<1 caso de GBS por 1.000 infecções por *C. jejuni*) (NACHAMKIN, 2002; WHO, 2001).

1.5 Identificação de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*

Uma grande proporção de casos de doença diarréica apresenta etiologia desconhecida nos países em desenvolvimento, principalmente pela dificuldade de acesso ao atendimento

médico e, quando esse é realizado, os métodos disponíveis, como microscopia e coprocultura, possuem baixa sensibilidade e/ou requerem estrutura e pessoal treinado que muitas instituições não possuem (AJJAMPUR *et al.*, 2008).

Trabalhos recentes avaliaram a detecção de patógenos pelos métodos convencionais e moleculares (AJJAMPUR *et al.*, 2008; AMAR *et al.*, 2004). A adição de técnicas moleculares aumentou a identificação de patógenos em 76,5 % das amostras diarréicas em estudo caso-controle (AJJAMPUR *et al.*, 2008).

Em trabalho realizado por Amar *et al.* (2004), a detecção de *Campylobacter spp.* (7,6%), *Salmonella spp.* (4%) e *Clostridium perfringens* (3%) foi similar pelas técnicas convencional e molecular, enquanto a detecção de *Cryptosporidium spp.* e *Giardia spp.* aumentou 22 vezes em relação à microscopia convencional.

Os métodos tradicionais de identificação para o gênero *Campylobacter* envolvem o uso de meios de cultura seletivos contendo uma série de agentes antimicrobianos para suprimir o crescimento de outras bactérias. O cultivo é seguido de testes bioquímicos como redução nitrato/nitrito, hidrólise de hipurato e susceptibilidade ao ácido nalixídico. Apesar dos meios de cultura serem extremamente úteis para o isolamento inicial de *Campylobacter sp.*, os métodos bioquímicos para a identificação são geralmente tediosos e podem gerar resultados ambíguos. O isolamento de *Campylobacter* requer a inoculação de amostra fecal no meio seletivo, seguida de incubação em ambiente microaerófilo a 42°C por 48 horas. Uma incubação adicional do isolado por 24-48 horas é necessária para a identificação fenotípica completa (ABUBAKAR *et al.*, 2007; LASTOVICA; LEROUX, 2000; ON, 1996).

Campylobacter sp. é uma das bactérias mais fastidiosas e de crescimento lento quando comparada a outros enteropatógenos. Portanto, o diagnóstico molecular para detecção de *Campylobacter* diretamente de amostras de fezes, dispensando a coprocultura, se faria útil, com abreviação do tempo de diagnóstico e conseqüente impacto na decisão sobre o manejo clínico do paciente infectado (WAEGEL; NACHAMKIN, 1996).

A reação da polimerase em cadeia (PCR) já vem sendo extensivamente aplicada para a detecção de agentes infecciosos (ECHEVERRIA; SETHABUR; SERICHANTALERGS, 1993; GILBERT; JAMES; SINTCHENKO, 1999). PCR permite a amplificação de uma região pré-selecionada de DNA e é uma técnica altamente sensível e específica (LOUIE; LOUIE; SIMOR, 2000; NISSEN; SLOOTS, 2002).

Uma série de trabalhos vem avaliando a detecção de *Campylobacter spp.* por técnicas moleculares (AMAR *et al.*, 2004; DEBRUYNE *et al.*, 2008; JENSEN *et al.*, 2005; KULKARNI *et al.*, 2002; LAWSON *et al.*, 1997; LINTON *et al.*, 1997; WAEGEL; NACHAMKIN, 1996) e têm encontrado correlação satisfatória entre os métodos moleculares e os convencionais.

Oyfofo *et al.* (1992) revelaram detecção de quantidades tão ínfimas quanto 0,0062 pg de DNA purificado de *C. coli*. A detecção mínima encontrada por PCR foi de 30-60 bactérias (*C. jejuni*) em amostras de fezes humanas.

Um trabalho recente determinou a prevalência de infecção por *Campylobacter spp.*, *Helicobacter pylori* e *Arcobacter spp.* em amostras fecais provenientes da região de Venda, Limpopo, África do Sul, com utilização exclusiva de métodos moleculares específicos (SAMIE *et al.*, 2007a).

2 JUSTIFICATIVA

Como explanado na introdução, vários aspectos relacionados à doença diarréica causada por *Campylobacter* sp. precisam de melhor caracterização, principalmente na região Nordeste, a região brasileira mais acometida por doenças diarréicas na infância (COMISSÃO NACIONAL SOBRE DETERMINANTES SOCIAIS DA SAÚDE, 2008).

Quanto aos aspectos epidemiológicos, a relativa escassez de dados brasileiros sobre a epidemiologia das campilobacterioses intestinais e a grande diversidade dos achados sobre a identificação do gênero *Campylobacter* como enteropatógeno faz vigente a necessidade de mais estudos.

A conhecida sobreposição de efeitos relacionados à desnutrição infantil, inflamação intestinal e infecção entérica por vários microorganismos pode ser avaliada de forma mais direcionada aos patógenos *C. jejuni* e *C. coli*.

Portanto, o trabalho atual, que pretende avaliar a detecção molecular de *C. jejuni* e *C. coli*, além de inflamação intestinal e aspectos nutricionais, em um estudo caso-controle com crianças da área urbana de Fortaleza, CE, se justifica por todas as questões supracitadas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo principal do presente estudo foi avaliar a prevalência de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* como agente etiológico de diarreia em crianças de 2-36 meses, residentes em duas comunidades da área urbana de Fortaleza.

3.2 Objetivos específicos

- a) Investigar a detecção molecular de *C. jejuni* e/ou *C. coli* na população estudada.
- b) Determinar a variabilidade genética de *C. jejuni* em relação à presença de um fator de virulência, a toxina citolética distensora.
- c) Avaliar a relação entre desnutrição (determinada pelos escores-z) e detecção de *Campylobacter* sp.
- d) Avaliar a ocorrência de inflamação intestinal (determinada pela semiquantificação de lactoferrina fecal) nas infecções causadas por *Campylobacter* sp.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 População Estudada

Duas comunidades urbanas da cidade de Fortaleza constituíram o local de estudo desse trabalho: a comunidade Gonçalves Dias e a comunidade Parque Universitário.

Fortaleza é a capital do estado brasileiro Ceará. É um município com 313Km². É limitado ao norte pelo Oceano Atlântico, ao sul pelos municípios de Maranguape, Pacatuba e Aquiraz; a oeste pelos municípios de Caucaia e Maranguape e a leste pelo município de Aquiraz e Oceano Atlântico. A sede municipal se situa a 15 metros de altitude e sua posição geográfica é determinada pelo paralelo de 3°43'02'' de latitude sul em sua intersecção com o meridiano 38°32'35'' de longitude oeste (IBGE, 2008b). A população da cidade é de 2.431.415 habitantes (IBGE, 2008a).

A comunidade Gonçalves Dias localiza-se na zona urbana de Fortaleza, nos bairros Bela Vista e Rodolfo Teófilo. Seus limites são a Rua Chile à oeste, ao sul a Rua Amazonas, à leste a Rua Francisca Clotilde e ao norte a Rua Humberto Monte. O posto de atendimento da UPC/IBIMED na comunidade Gonçalves Dias está localizado a aproximadamente 3°74' ao sul da linha do Equador e 38°55' a oeste do meridiano de Greenwich.

A comunidade Parque Universitário localiza-se no bairro Pici de Fortaleza. Está delimitada pela Avenida Pernambuco a oeste, Ruas Timbaúba e Uruguaiana ao sul, Rua Amazonas a leste e pelo Campus do Pici ao sul. A localização geo-referenciada é, aproximadamente, 3°44' ao sul da linha do Equador e 38°34' a oeste do meridiano de Greenwich.

A delimitação das comunidades foi documentada pela Secretaria de Infra-Estrutura do município e gentilmente cedida à UPC-IBIMED pela Secretaria de Administração da Prefeitura Municipal de Fortaleza em abril de 2005.

As duas comunidades (FIGURA 4) apresentam condições sócio-econômicas similares, como, por exemplo: cerca de 60% dos domicílios possuem água encanada, menos de 10% possuem sanitário com descarga, 85% das mães não completaram o ensino fundamental e 75% das famílias vivem com menos de 02 salários mínimos/mês (Dados internos; Setor de Segurança e Gerenciamento de Dados - SSGD, UPC/IBIMED, 1998).

O time de vigilância da Unidade de Pesquisas Clínicas do Instituto de Biomedicina da Universidade Federal do Ceará (UPC/IBIMED, UFC) realizou seu trabalho dentro das comunidades. A equipe, composta por uma enfermeira e três agentes de saúde, é bastante familiarizada com ambas as comunidades, sendo que alguns integrantes possuem residência fixa nesses locais.

Todo o trabalho de seleção e inclusão no estudo (triagem, assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido), de captação de dados epidemiológicos (entrevista, preenchimento da ficha epidemiológica), aferição de medidas antropométricas, instrução parental quanto à coleta de amostras fecais e encaminhamento das amostras obtidas para o Laboratório de Doenças Infecciosas da UPC/IBIMED foi realizado pelo grupo supracitado.



Figura 4 - Delimitação e localização relativa das comunidades Parque Universitário e Gonçalves Dias em Fortaleza, CE.

Fonte: *Google Earth*, 2008. Organizado por SSGD, UPC/IBIMED.

4.1.1 Tipo e Duração do Estudo

Esse estudo é do tipo epidemiológico, observacional, analítico, caso-controle.

A duração do estudo, incluindo as etapas de seleção, inclusão, triagem, aplicação de questionário epidemiológico, coleta de medidas antropométricas e amostras foi de 16 meses (março/2007 a julho/2008). O processamento inicial das amostras foi realizado de forma concomitante às coletas. A pesquisa molecular, incluindo as extrações de DNA, ensaios imuno-enzimáticos (ELISA) e reações de polimerase em cadeia (PCR) foram realizadas entre setembro/2007 e novembro/2008.

4.1.2 Critérios de Inclusão

Eram três os critérios de inclusão:

- 1) Crianças com idade entre 2 a 36 meses.
- 2) Crianças moradoras das comunidades Gonçalves Dias ou Parque Universitário.
- 3) Obtenção do consentimento escrito do pai ou responsável pela criança.

4.1.3 Considerações Éticas

O presente estudo faz parte de um dos objetivos de um estudo maior intitulado “Intervenção com Micronutrientes e Impacto em Longo Prazo no Brasil”, que foi aprovado com recomendações pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) (registro n°. 12729, processo n°. 25000.017262/2006-38, parecer n°. 760/2006) em 14 de julho de 2006 e recebeu parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da UFC (COMEPE/UFC) (ofício n°. 550/2006, protocolo n°. 238/05) em 22 de setembro de 2006, após atendimento das recomendações exigidas (ANEXOS A e B). O início das atividades foi autorizado pelo COMEPE/UFC em 31 de outubro de 2006 (ofício n°. 701/06) (ANEXO C).

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE, contido no ANEXO D) foi revisado e aprovado pelo COMEPE/UFC (ofício n°. 550/2006, protocolo n°. 238/05) em 22 de setembro de 2006 e em 25 de maio de 2007 (complementações, ofício n°. 407/07) (ANEXOS B e E).

Os pais ou responsáveis forneceram o consentimento por escrito, assinando um documento que descrevia os objetivos do trabalho, os procedimentos a serem realizados com a criança, os riscos e benefícios da participação no estudo, questões relacionadas à confidencialidade e telefones de contato em caso de dúvidas. Todos eles receberam uma cópia do termo.

Em relação à confidencialidade, todas as crianças foram identificadas através de números codificados, não sendo identificadas pelo nome em nenhum documento do estudo. Os dados foram incorporados no banco de dados referente ao projeto duas vezes por duas pessoas diferentes do Setor de Segurança e Gerenciamento de Dados (SSGD), da UPC/IBIMED, UFC, e as digitações foram comparadas através do Programa *Access* MICROSOFT (New York, NY, USA).

4.2 Coleta de Dados e Amostras

Toda a coleta de dados e amostras foi realizada pela equipe de trabalho de campo. A coleta de dados se deu através de questionário epidemiológico e sua interrogação se dava junto ao pai ou responsável pela criança. O questionário era precedido pelo processo de triagem e era sucedido pela etapa de coleta do material fecal da criança (ANEXOS F e G).

4.2.1 Triagem e Entrevista

No processo de triagem, o time de campo considerava os critérios de inclusão: residência em uma das duas comunidades estudadas, idade da criança compreendida entre 02 e 36 meses, assinatura do TCLE pelo pai ou responsável.

A ficha epidemiológica que fazia parte do questionário realizado com os responsáveis pelas crianças continha informações sócio-demográficas e econômicas. As variáveis questionadas foram: Renda familiar; Tempo de moradia no domicílio; Número de compartimentos do domicílio; Tipo de casa (taipa ou alvenaria); Origem da água de beber (encanada, chafariz, bomba, poço/cacimba, mineral, da torneira); Condicionamento da água; Tipo de sanitário, sua localização e compartilhamento; Existência de água e sabão para lavagem das mãos; Frequência de defecação ao redor da casa; Existência de animal (galinha, porco, cachorro, gato, pássaros).

As questões exclusivamente relacionadas às crianças foram: Idade, sexo, peso, altura, índice de massa corporal (IMC), circunferência do braço e medida da prega cutânea.

O questionário foi aplicado pelo time de campo e levado ao SSGD, UPC/IBIMED, UFC.

4.2.2 Medidas Antropométricas e Escores-z

A equipe de campo realizou medidas de estatura, peso, circunferência braquial e espessura da prega cutânea das crianças incluídas no estudo. A aferição da estatura foi realizada com as crianças descalças na posição vertical, utilizando-se um antropômetro com precisão de 0,1cm. As crianças menores de dois anos foram medidas deitadas, na posição supina (medida do comprimento). Para aferição da massa corporal, as crianças foram pesadas trajando roupas leves e descalças, utilizando-se uma balança digital portátil. A circunferência do braço foi obtida através do emprego de uma fita métrica flexível, aderida à pele, na altura do ponto médio braquial. A medida da espessura da prega cutânea foi medida a partir do ponto médio posterior do braço não dominante, com o uso de um paquímetro.

As medidas antropométricas foram convertidas em escores-z pelo SSGD da UPC/IBIMED. Os escores-z produzidos foram: HAZ (*height-for-age*: altura por idade), WAZ (*weight-for-age*: peso por idade) e WHZ peso-por-altura (*weight-for-height*: peso por altura), utilizando *software* antropométrico.

Os escores-z antropométricos correspondem ao número de desvios padrão acima ou abaixo do valor médio fornecido pelo *National Center for Health Statistics* (NCHS, *National Health and Nutrition Examination Survey*, Center for Disease Control and Prevention, Hyattsville, MD, USA) e *International Reference Population (Global Database on Child Growth and Malnutrition*, World Health Organization, Genebra, SZ). O cálculo de IMC foi realizado dividindo-se o peso (Kg) pela altura (m) ao quadrado.

4.2.3 Coleta e Processamento Inicial das Amostras Fecais

Após os procedimentos iniciais de seleção e inclusão no estudo (triagem, assinatura do TCLE), de captação de dados epidemiológicos (entrevista, preenchimento da ficha epidemiológica) e aferição de medidas antropométricas, os pais ou responsáveis recebiam um copo plástico e estéril, padrão para a coleta de fezes. Foi dada, pela equipe de campo, a orientação quanto ao procedimento adequado de coleta do material fecal de sua criança.

No dia seguinte, o membro da equipe retornava à residência da criança para o recebimento da amostra coletada. Caso a amostra fecal não fosse coletada, o grupo de campo retornava à residência por até cinco dias úteis, quando a criança era, então, excluída do estudo por falta de material.

A amostra coletada era armazenada entre 2 e 8°C e, no prazo máximo de quatro horas, era transportada em caixa térmica contendo gelo para o Laboratório de Doenças Infecciosas, da UPC/IBIMED, da Faculdade de Medicina, da UFC.

Ao chegar ao laboratório, as amostras eram acondicionadas na temperatura entre 2 e 8°C até seu processamento. No máximo seis horas após a coleta, os espécimes fecais eram examinados quanto à caracterização das fezes (líquidas, semilíquidas, formadas, semiformadas) e aliqüotados em dois microtubos estéreis identificados por código de barras, com capacidade para 1,8mL. As alíquotas eram então colocadas em caixas e era confeccionado o mapa de localização das amostras. Após esse passo, as alíquotas eram armazenadas em freezer -80°C para posterior extração do DNA fecal e realização dos ensaios imunoenzimáticos (ELISA).

Uma porção do material não estocado foi empregada no diagnóstico de helmintos e protozoários. Inicialmente, foi realizada uma concentração de parasitas fecais com o Kit *Fecal Parasite Concentrator Kit*, EVERGREEN (Los Angeles, CA, USA), segundo instruções do fabricante. Tal kit se baseia no método de Ritchie modificado (concentração pelo álcool-éter). A identificação de ovos de helmintos e cistos de protozoários nas amostras de fezes foi realizada em um esfregaço do material concentrado, com adição de lugol. Outro esfregaço foi corado através da técnica de Ziehl-Nielsen modificada para a pesquisa de *Cryptosporidium* sp.

Todas as etapas acima descritas, que foram realizadas pela equipe de campo e pelo Laboratório de Doenças Infecciosas, estão esquematizadas de forma resumida no fluxograma a seguir (FIGURA 5).

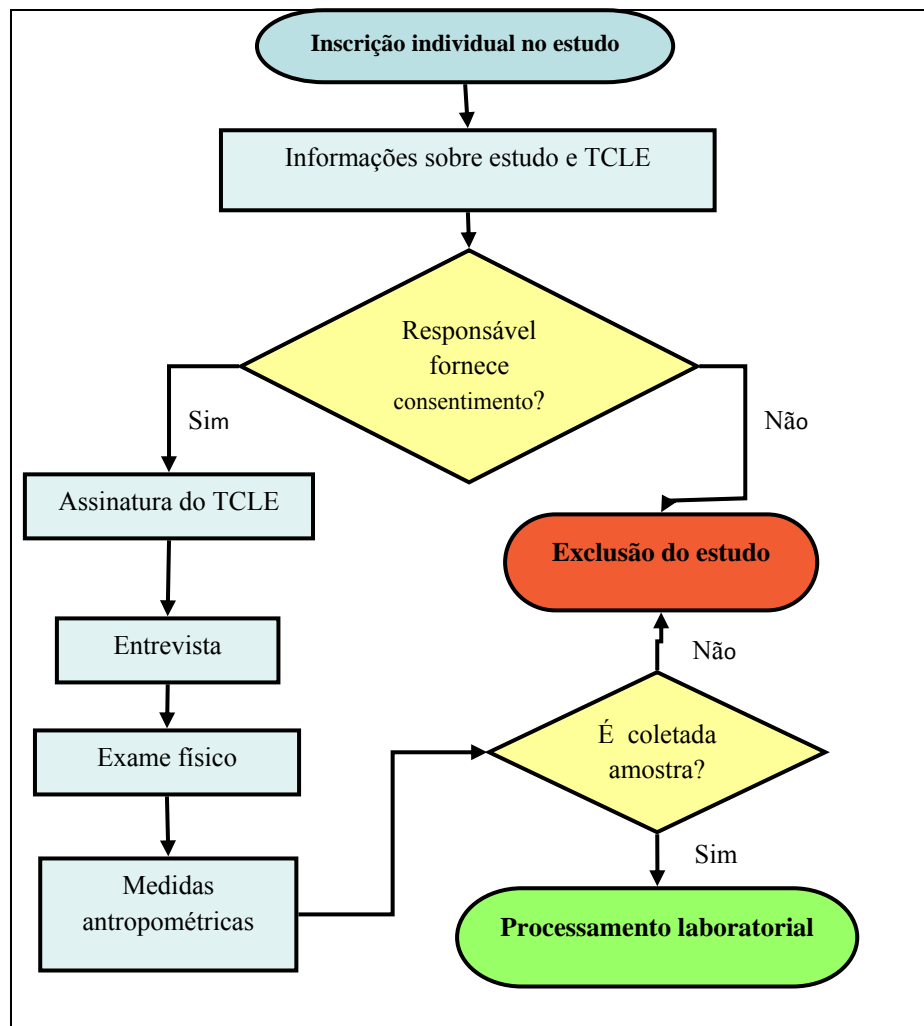


Figura 5 - Fluxograma representativo das etapas do presente estudo relacionadas à seleção, triagem e coleta de dados e amostra.

4.3 Definição dos Grupos: Casos X Controles

A partir do preenchimento da ficha epidemiológica, os casos foram definidos a partir do banco de dados pela resposta parental “sim” à pergunta: “Sua criança apresentou diarreia nos últimos 14 dias?”.

Oitenta e quatro crianças apresentavam a resposta “sim” à essa pergunta. Oitenta e três crianças tiveram seguimento no estudo como casos.

Duzentas e quarenta e uma (241) crianças apresentavam a resposta parental “não” à mesma pergunta. Oitenta e três dessas crianças foram escolhidas aleatoriamente pelo programa Excel (*Microsoft Office Excel*) e tiveram seguimento no estudo como controles.

4.4 Extração de DNA Fecal

O DNA fecal foi extraído utilizando o *QIAamp DNA Stool Mini Kit*, QIAGEN® (*Valencia, CA - USA*), segundo instruções do fabricante.

Resumidamente o protocolo se deu da seguinte maneira: aproximadamente 200mg ou 200µL de fezes foram incubadas com 1,4mL de tampão ASL. A mistura foi agitada vigorosamente em vórtex por no mínimo 1 minuto ou até que a mistura estivesse totalmente homogeneizada.

A mistura foi incubada por 5 minutos a 95°C. O lisado foi homogeneizado por 15 segundos e centrifugado por 1 minuto para precipitação das partículas fecais.

Em seguida, 1,2mL do sobrenadante foram transferidos para um novo microtubo de 2mL contendo *InhibitEX*, uma resina em forma de comprimido. Resina e lisado são agitados vigorosamente até dissolução completa do comprimido.

A mistura foi incubada por 1 minuto à temperatura ambiente a fim de gerar máxima adsorção dos inibidores pela matriz e foi submetida a uma nova centrifugação por 3 minutos.

Todo o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5mL e submetido a uma centrifugação por 3 minutos, para evitar que a resina contaminasse a próxima etapa.

Foram transferidos 200µL do sobrenadante para um microtubo de 1,5mL contendo 15µL de proteinase K. Adicionou-se 200µL de tampão AL (constituído de hidrócloro de guanidina). A nova mistura sofreu breve homogeneização e foi levada à incubação por 10 minutos a 70°C. A adição de 200µL de etanol P.A. finalizou a desnaturação protéica.

Após centrifugação rápida, a mistura foi transferida para um microtubo contendo um filtro composto de uma membrana de sílica-gel. O DNA foi adsorvido à membrana durante uma breve centrifugação (1 minuto).

O filtro foi transferido para um novo microtubo coletor, sendo o filtrado descartado. A membrana foi lavada em dois passos de centrifugação. No primeiro deles, 500µL do tampão AW1 foram adicionados à membrana e submetidos à centrifugação durante 1 minuto. A membrana foi transferida para um novo tubo coletor e o filtrado foi descartado.

No segundo passo de lavagem, 500µL do tampão AW2 foram adicionados à membrana e submetidos à centrifugação durante 3 minutos.

Para a retirada de todo tampão de lavagem antes da eluição final, o filtrado foi descartado e o filtro foi colocado de volta ao mesmo tubo coletor e submetido a uma nova centrifugação de 1 minuto.

A membrana, contendo o DNA concentrado e purificado, foi transferida para um novo microtubo de 1,5mL. Adicionou-se, então, 200µL do tampão de eluição AL e incubou-se por 1 minuto à temperatura ambiente.

O DNA obtido foi armazenado a -20°C em microtubos identificados por código de barras em duas alíquotas contendo 100µL cada uma para posterior análise de quantidade e qualidade de DNA extraído e para PCR.

Todas as centrifugações foram realizadas a 20.000g à temperatura ambiente. Cada bateria de extração era realizada com 18 amostras.

A função de cada reagente utilizado no kit é descrita sucintamente no quadro 4.

Quadro 4 - Função dos reagentes do Kit *QIAamp DNA Stool Mini Kit* QIAGEN para extração de DNA fecal.

Item	Reagente	Função
01	Tampão ASL	Promove lise celular
02	Resina Inhibitex	Adsorve inibidores enzimáticos e outras impurezas encontradas em alta concentração nas fezes.
03	Proteinase K	Promove digestão enzimática.
04	Tampão AL	Promove precipitação de macromoléculas e solubilização de lipídes.
05	Etanol	Promove precipitação de ácidos nucleicos.
06	Membrana de sílica	Mantém o DNA em sua trama para a finalização da extração (lavagens e eluição).
07	Tampão AW1	Por apresentarem características de pH e concentração de sais peculiares, o uso desses tampões gera remoção de impurezas residuais, sem retirar o DNA da membrana.
08	Tampão AW2	
09	Eluente AE	Solução tampão que retira o DNA da membrana sílica e o deixa em condições de uso. Pode ser armazenado a -20°C.

Fonte: QIAGEN, 2007 - Manual de Instruções.

4.5 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

4.5.1 ELISA para *Campylobacter*

Para detecção de *Campylobacter* sp. foi utilizada uma ELISA sanduíche para pesquisa de antígeno, Kit Remel *ProSpect® Campylobacter Microplate Assay*, REMEL™ (Lenexa, KS, USA), de acordo com instruções do fabricante.

Esse ensaio em microplaca foi utilizado para detecção de um antígeno de superfície específico de *Campylobacter* sp. (SA, *surface antigen*), compartilhado por *C. jejuni* e *C. coli*

(REMEL, 2005). As instruções do Kit trazem uma extensa lista de microorganismos da microbiota do cólon humano que, segundo testes do fabricante, não geram reação cruzada com o Kit. Essa lista inclui: *Helicobacter pylori*, *H. cinaedi*; *Campylobacter curvis*, *C. fetus*, *C. lari*, *C. rectus*, *C. spoturum*; *Arcobacter butzleri*; *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterotoxigena (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (EHEC), *E. coli* *Stx* negativa; *Escherichia hermenii*; *Enterobacter cloacae*; *Enterococcus faecalis*; *Citrobacter braakii*; *Klebsiella pneumoniae*; *Proteus vulgaris*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Shigella dysenteriae*, *S. flexneri* e *S. sonnei*; *Staphylococcus aureus*; *Yersinia enterocolitica*; *Salmonella typhimurium* e *Serratia liquefacians* (REMEL®, 2008).

Foram adicionados 600 µL de tampão diluente em microtubos plásticos de 2,0mL identificados com o número das amostras. As fezes foram então retiradas do freezer -80°C e homogeneizadas, uma a uma.

Foram adicionados 300mg de fezes ou 300µL (caso as fezes fossem diarreicas) à cada tubo contendo o diluente. As amostras preparadas foram então homogeneizadas e deixadas em geladeira até o momento de adição à placa de ELISA.

Para cada placa foi realizado um mapa de amostras, para localização das amostras e controles (inclusos no kit).

Após a adição das amostras e controles, a placa passou por três incubações sucessivas, intercaladas com as etapas de lavagem.

Para a primeira incubação (60 minutos) foram adicionadas as amostras e controles negativo e positivo à placa. Quando reagentes, as amostras continham o antígeno de superfície que se ligou aos anticorpos da fase sólida (anticorpo policlonal anti-SA). As lavagens vigorosas após a incubação removeram os componentes fecais não ligados.

A segunda incubação (30 minutos) foi realizada com a adição do conjugado enzimático. O conjugado enzimático é também um anticorpo policlonal anti-SA ligado à enzima peroxidase. As lavagens vigorosas após a incubação removeram o conjugado enzimático não ligado.

A terceira incubação, com o substrato cromógeno TMB (tetra-metil benzidina), ocorreu por 10 minutos. A ação da enzima peroxidase no substrato foi revelada pelo

cromógeno, que sofreu um processo de oxidação dando origem a um produto de cor azul na amostra reagente.

A solução de parada interrompeu o processo de oxidação e deixou amarela a cor final resultante das amostras positivas e do controle positivo. Assim, a última etapa foi a adição da solução de parada (ácido sulfúrico 1N) e subsequente leitura das absorbâncias em 450nm em leitor de ELISA *Microplate Reader 230S*, ORGANON TEKNIKA® (Durham, NC, USA).

Todas as incubações se deram à temperatura ambiente. As lavagens foram realizadas de forma vigorosa com tampão para lavagem incluso no Kit.

Os resultados foram interpretados como demonstrado no quadro 5.

Quadro 5 - Interpretação dos resultados do ensaio *ProSpect® Campylobacter Microplate Assay*, REMEL.

Leitura da densidade óptica a 450nm	Resultado	Código do resultado no banco de dados
< 0,130	Negativo	0
0,130 – 0,170	Indeterminado	3
> 0,170	Positivo	1
-	Não realizado	2

Fonte: REMEL (2005)

4.5.2 ELISA para Lactoferrina Fecal (LFF)

Foi realizada a detecção e semiquantificação da concentração de LFF em cada amostra com utilização do Kit IBD (*Inflammatory Bowel Disease*) Scan®, TECHLAB™ (Blacksburg, VA, USA), segundo instruções do fabricante.

Para o preparo das amostras foram reservados três microtubos plásticos de 2,0mL identificados para cada amostra. A identificação se relacionava com o número da amostra e com as diluições utilizadas: 1/10, 1/100 e 1/1000. Foram adicionados 450µL de tampão

diluinte em todos os tubos. As fezes foram então retiradas do freezer -80°C e homogeneizadas, uma a uma.

Foram adicionados 50mg de fezes ou $50\mu\text{L}$ (caso as fezes fossem diarréicas) ao primeiro tubo (“1/10”) de cada amostra. A primeira diluição foi então homogeneizada e foram realizadas as diluições seriadas de cada amostra (“1/100” e “1/1000”).

Para cada placa foi realizado um mapa de amostras, para localização das amostras, padrões e controles (sendo padrões e controles inclusos nos Kits).

Após a adição das diluições das amostras, dos padrões e dos controles, a placa passou por três incubações sucessivas, intercaladas com as etapas de lavagem.

Para a primeira incubação (60 minutos), foram adicionadas às placas as amostras, padrões e controles. Quando reagentes, as amostras continham lactoferrina fecal que se ligava aos anticorpos da fase sólida (anticorpo policlonal anti-lactoferrina). As lavagens vigorosas após a incubação removeram os componentes fecais não ligados.

A segunda incubação (30 minutos) foi realizada com a adição do conjugado enzimático. O conjugado enzimático é também um anticorpo policlonal anti-lactoferrina ligado à enzima peroxidase. As lavagens vigorosas após a incubação removeram o conjugado enzimático não ligado.

A terceira incubação, com o substrato cromógeno TMB (tetra-metil benzidina), ocorreu por 10 minutos. A ação da enzima peroxidase no substrato foi revelada pelo cromógeno, que sofreu um processo de oxidação dando origem a um produto de cor azul na amostra reagente.

A solução de parada interrompeu o processo de oxidação e deixou amarela a cor final resultante das amostras positivas. Assim, a última etapa foi a adição da solução de parada (ácido sulfúrico 1N) e subsequente leitura das absorbâncias em 450nm em leitor de ELISA *Microplate Reader 230S*, TEKNIKA (Durham, NC, USA).

Todas as incubações se deram à 37°C . As lavagens foram realizadas de forma vigorosa com tampão para lavagem incluso no Kit.

Para que os resultados fossem expressos de forma semiquantitativa, os valores de absorbâncias encontrados para os padrões foram levados à construção de uma curva e a

equação obtida serviu para a determinação semiquantitativa da concentração de lactoferrina fecal em cada amostra.

Os resultados foram interpretados como demonstrado no quadro 6.

Quadro 6 - Interpretação dos resultados semiquantitativos de ELISA para LFF, Kit *IBD® Scan*, TECHLAB.

Concentração (µg/g de fezes)	Resultado	Código do resultado no banco de dados
0 – 7,00	Negativo	0
7,01 – 25,00	Positivo Escore 1+	1
25,01 – 50,00	Positivo Escore 2+	3
> 50,00	Positivo Escore 3+	4
-	Não-realizado	2

Fonte: Adaptado de TECHLAB (2009)

4.6 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

4.6.1 Sumário das PCRs realizadas

O quadro 7 contém um resumo das reações realizadas:

Quadro 7 - Resumo das PCR realizadas no presente estudo

Item	Reação / Utilidade	Gene pesquisado - localização	Microorganismo detectado	Tamanho do produto amplificado
01	hipO / Detecção	<i>hipO</i> (gene para hipurato hidrolase de <i>C. jejuni</i>) – localização cromossômica	<i>C. jejuni</i>	176pb
02	ask / Detecção	<i>ask</i> (gene para aspartato quinase de <i>C. coli</i>) – localização cromossômica	<i>C. coli</i>	502pb
03	16S / Detecção	Gene para cadeia 16S do RNA ribossomal de <i>H. pylori</i> - localização cromossômica	<i>H. pylori</i>	139pb
04	cdtA / Virulência	Gene <i>cdtA</i> para toxina distensora letal (CDT) de <i>C. jejuni</i> - localização cromossômica	<i>C. jejuni</i>	175pb
05	cdtB / Virulência	Gene <i>cdtB</i> para CDT de <i>C. jejuni</i> - localização cromossômica	<i>C. jejuni</i>	418pb
06	cdtC / Virulência	Gene <i>cdtC</i> para CDT de <i>C. jejuni</i> - localização cromossômica	<i>C. jejuni</i>	270pb

4.6.2 Cepas padrão

As cepas padrão utilizadas nas reações de polimerase em cadeia foram:

1. *Campylobacter jejuni* (ATCC® 33291)
2. *Campylobacter coli* (INCQS 00263)
3. *Helicobacter pylori* (gentilmente cedido pela Dra. Lúcia Libanez, Laboratório de Gastroenterologista, UPC-IBIMED)

4. *Escherichia coli* enteroagregativa O42 (gentilmente cedida pelo Dr. Richard Guerrant, UVa/Virginia, USA).
5. *Escherichia coli* CLDT 866/36 (gentilmente cedida pelo Dr. Tomomasa Yano, UNICAMP/Campinas).
6. Bacilo sugestivo de *Campylobacter sp.* (gentilmente cedido pela Dra. Ila Fernanda Nunes Lima, Laboratório de Doenças Infecciosas, UPC-IBIMED).

4.6.3 Definição dos Iniciadores das PCRs

Toda a literatura científica consultada para a definição dos iniciadores de cada reação PCR realizada nesse estudo (BANG *et al.*, 2003; CANER *et al.*, 2008; JENSEN *et al.*, 2005; KULKARNI *et al.*, 2002; LAGIER *et al.*, 2004; LAWSON *et al.*, 1999; LINTON *et al.*, 1997; LUND *et al.*, 2003; NAKARI; PUHAKKA; SIITONEN, 2008; PERSSON; OLKEN, 2005; SAMIE *et al.*, 2007a; YAMAZAKI-MATSUNE *et al.*, 2007; WAEGEL; NACHAMKIN, 1996) foi sistematicamente revista e sujeita à conferência e análise com o uso da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) disponibilizada via web pelo *National Center for Biotechnology Information* (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, Bethesda, MD – USA).

Os iniciadores utilizados encontram-se no quadro 8.

Quadro 8 - Iniciadores utilizados no presente estudo

Item	Gene pesquisado (Microorganismo detectado, utilidade da pesquisa)	Iniciadores (S: Senso, AS: Anti-senso), Seqüência 5' → 3'
01	<i>hipO</i> (<i>Campylobacter jejuni</i> , detecção)	S: ATGATGGCTTCTTCGGATAG
		AS: GTCCTATGCTTACAACACTGC
02	<i>ask</i> (<i>Campylobacter coli</i> , detecção)	S: GGTATGATTTCTACAAGCGAG
		AS: ATAAAAGACTATCGTCGCGTG
03	Cadeia 16S do RNAr (<i>Helicobacter pylori</i> , detecção)	S: GCGACCTGCTGGAACATTAC
		AS: CGTTAGCTGCATTACTGGAGA
04	<i>cdtA</i> (<i>C. jejuni</i> , virulência)	S: TTGGCGATGCTAGAGTTTGG
		AS: ACCGCTGTATTGCTCATAGGG
05	<i>cdtB</i> (<i>C. jejuni</i> , virulência)	S: CTCGCGTTGATGTAGGAGCTA
		AS: GCAGCTAAAAGCGGTGGAGTA
06	<i>cdtC</i> (<i>C. jejuni</i> , virulência)	S: AGCCTTTGCAACTCCTACTGG
		AS: GCTCCAAAGGTTCCATCTTC

Todos os iniciadores foram utilizados em concentração final 0,2µM. As temperaturas de anelamento utilizadas (descritas nos itens abaixo) foram definidas após testes de padronização.

4.7 Detecção do Gene da Hipurato Hidrolase (*hipO*) de *C. jejuni* por PCR

4.7.1 Obtenção do DNA Bacteriano (*C. jejuni*)

Foi realizado o crescimento bacteriológico da cepa controle *Campylobacter jejuni* ATCC® 33291.

A cepa ATCC 33291 de *C. jejuni* foi gentilmente cedida pelo Laboratório chefiado pelo Dr. Richard Guerrant no Centro pela Saúde Global (*Center for Global Health* - Charlottesville, VA, USA).

O microorganismo foi cultivado em meio de cultura Difco™ *Columbia Blood Agar* como base (Difco BD® 279240, DIFCO-BD® - Sparks, MD, USA) e adição de 5% de sangue de carneiro e dos suplementos *Campylobacter Growth Supplement* (Oxoid™ SR0232E, OXOID® – Cambridge, GBR) e *Campylobacter Selective Supplement Blaser-Wang* (Oxoid™ SR0098E, OXOID® – Cambridge, GBR), de acordo com instruções do fabricante.

O agente liofilizado foi reconstituído com solução salina estéril e uma alíquota dessa solução foi adicionada à placa de meio de cultura em condições padronizadas de microbiologia (chama acesa, swab estéril).

A placa foi colocada em uma jarra microbiológica contendo o gerador de microaerofilia Microaerobac® (PROBAC - São Paulo, SP, BRA) segundo instruções do fabricante. O ambiente microaerófilo é constituído de uma atmosfera de 3 a 5 % de oxigênio (O₂) e 10% de gás carbônico (CO₂). A jarra foi então selada e levada à estufa a 37°C por 48 horas.

Após o período de crescimento, o microorganismo foi analisado quanto às características morfológicas, coloração Gram e teste da oxidase. A morfologia das colônias de espécies de *Campylobacter* em meios sólidos seletivos varia de planas, acinzentadas, irregulares, secas ou úmidas a colônias arredondadas, convexas, brilhantes, de bordas inteiras. O *Campylobacter* é um bastonete Gram-negativo que apresenta uma morfologia típica em esfregaços corados em forma de S, em asa de gaivota ou em largas espirais (FERNÁNDEZ, 2008).

O teste da citocromo oxidase foi positivo. A citocromo oxidase é uma enzima da classe das oxidoredutases. O reagente tetra metil-p-fenilenodiamina reage diretamente com o citocromo c e produz um composto de cor azul (azul-de-indofenol). Foi utilizado procedimento indireto com tiras de papel, no qual a colônia escolhida é retirada da placa de Petri, esfregada em tira de papel e então são adicionadas algumas gotas da solução reagente recém preparada (Reagente SIGMA® 07770). As colônias de bactérias que possuem atividade de citocromo oxidase desenvolvem cor azul-escuro no sítio de inoculação dentro de 10 segundos (KONEMAN *et al.*, 2001).

Uma porção do cultivo foi retirada da placa de Petri com auxílio de uma alça de platina esterilizada em chama e colocada em um tubo para microcentrifuga identificado contendo 200 µL de água deionizada MilliQ™, MILLIPORE® (Billerica, MA, USA) estéril.

A extração do DNA de *C. jejuni* se deu pela incubação da alíquota do microorganismo em água fervente e centrifugação para uso do sobrenadante, como se segue: o tubo contendo 200 µL de água e a porção do cultivo foi levado à incubação por 15 minutos em água fervente (100°C). O material foi centrifugado por 3 minutos a 15.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de microcentrifuga estéril identificado e o pellet foi descartado.

O sobrenadante obtido foi levado à quantificação por espectrofotometria. Foram utilizados 5 µL do material obtido e 95 µL de tampão TE 1X (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8,00) e essa diluição foi colocada em cubeta de 8,5mm, apropriada para leitura no aparelho Eppendorf® BioPhotometer (Eppendorf - Hamburg, DEU).

4.7.2 Detecção do Gene (*hipO*)

Para a detecção do gene *hipO* de *C. jejuni*, inicialmente foi preparado uma mistura dos reagentes necessários à reação. Essa solução inicial continha todos os reagentes para a realização da PCR, exceto o DNA das amostras: *AmpliTaq Gold® PCR Master Mix 2X*, APPLIED BIOSYSTEMS® (Foster City, CA, USA); água MilliQ® estéril, e os iniciadores *hipO*, senso e anti-senso, descritos no quadro 5 (item 4.6.3).

A solução contendo os reagentes foi então aliqotada em cada microtubo para PCR, sendo 22,5µL em cada tubo, para uma reação final de 25µL.

A PCR para detecção do gene *hipO* de *C.jejuni* foi realizada para as 166 amostras do estudo. Cada bateria de PCR foi realizada com aproximadamente 45 amostras, estando inclusos em cada bateria os controles positivo (DNA extraído de *C. jejuni* ATCC® 33291) e negativos da reação (DNA extraído de *C. coli* INCQS 00263 para especificidade dos iniciadores e água MilliQ® estéril para controle de qualidade da reação). Foram adicionados 2,5µL de DNA em cada tubo identificado com o número da amostra.

Após a adição do DNA extraído de cada amostra, os microtubos foram levados ao termociclador *MyCycler*TM BIORAD® (San Diego, SA, USA), programado de acordo com as condições de amplificação otimizadas nesse estudo.

4.7.3 Condições para a Amplificação do Produto (*hipO*)

Os parâmetros utilizados para a detecção do gene *hipO* de *C. jejuni* encontram-se pormenorizados abaixo no quadro 9. Tais parâmetros foram determinados após testes prévios de identificação da melhor temperatura de anelamento e otimização da reação.

Quadro 9 - Programação dos ciclos para amplificação na PCR para detecção do gene *hipO* de *C. jejuni*.

Passos (nº de ciclos)	Descrição	Temperatura	Tempo
01 (01 ciclo)	Desnaturação	95°C	10 minutos
02 (35 ciclos)	Desnaturação	95°C	30 segundos
	Anelamento	51°C	30 segundos
	Extensão	72°C	45 segundos
03 (01 ciclo)	Extensão final	72°C	10 minutos

Após a reação para amplificação, os produtos foram mantidos a -20°C até o momento da corrida eletroforética (descrito no item 4.11).

4.8 Detecção do Gene da Aspartato Quinase (*ask*) de *C. coli* por PCR

4.8.1 Obtenção do DNA Bacteriano (*C. coli*)

A cepa INCQS 00263 / ATCC® 33559 foi cedida pelo Instituto Nacional de Controle em Qualidade de Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/FIOCRUZ - Rio de Janeiro, RJ, BRA).

O cultivo de tal microorganismo foi realizado da mesma forma descrita para o cultivo de *C. jejuni* (item 4.7.1).

Uma porção do cultivo foi retirada da placa de Petri com auxílio de uma alça de platina esterilizada em chama e colocada em um tubo para microcentrifuga identificado contendo 100µL de água deionizada (MilliQ®) estéril.

A extração do DNA de *Campylobacter coli* se deu pelo uso do Kit *QIAamp*TM *DNA Stool Mini Kit*, QIAGEN® (Valencia, CA, USA), protocolo modificado, com remoção da etapa de adsorção de inibidores pela resina *Inhibitex*.

O DNA de *C. coli* foi extraído pelo kit *QIAamp*TM devido ao fato de que várias tentativas de extração de DNA do isolado por fervura em água não geraram o resultado esperado. Mohran *et al.* (1998), reportaram diferença na sensibilidade da detecção molecular de cepas de *C. jejuni* e principalmente *C. coli* quando o método de extração utilizado se baseava em fervura do isolado em água. Nesse trabalho, 45 isolados tiveram o DNA extraído por dois métodos: fervura em água e extração com proteinase K/SDS. Pelo método de fervura, o DNA obtido de 12% dos isolados de *C. jejuni* e 43% dos isolados de *C.coli* não gerou amplificação por PCR (resultado negativo). Pelo método de extração com proteinase K–SDS, todas as amostras foram positivas.

Resumidamente, realizamos: a) incubação dos 100µL da suspensão do cultivo com tampão AL por 5 minutos a 95°C; b) digestão enzimática com Proteinase K e Tampão AL por

10 minutos a 70°C; c) centrifugação em coluna de sílica-gel para adsorção do DNA pela coluna e d) lavagens para retirada de contaminantes (tampões AW1 e AW2).

O DNA eluído em 200 µL de tampão AE foi levado à quantificação como descrito para a quantificação do DNA extraído de *C. jejuni* (item 4.7.1).

4.8.2 Detecção do Gene (*ask*)

Para a detecção do gene *ask* de *C. coli*, inicialmente foi preparado uma mistura dos reagentes necessários à reação. Essa solução inicial continha todos os reagentes para a realização da PCR, exceto o DNA das amostras: *AmpliTaq Gold® PCR Master Mix 2X*, APPLIED BIOSYSTEMS (Foster City, CA, USA); água MilliQ® estéril, e os iniciadores *ask*, senso e anti-senso, descritos no quadro 5 (item 4.6.3).

A solução contendo os reagentes foi então aliquoteada em cada microtubo para PCR, sendo 22,5µL em cada tubo, para uma reação final de 25µL.

A PCR para detecção do gene *ask* de *C.coli* foi realizada para as 166 amostras do estudo. Cada bateria de PCR para detecção do gene *ask* foi realizada com aproximadamente 45 amostras, estando inclusos em cada bateria os controles positivo (DNA extraído de *C. coli* INCQS 00263) e negativos da reação (DNA extraído de *C. jejuni* ATCC 33291 para especificidade dos iniciadores e água MilliQ® estéril para controle de qualidade da reação). Foram adicionados 2,5µL de DNA em cada microtubo identificado com o número da amostra.

Após a adição do DNA extraído de cada amostra, os microtubos foram levados ao termociclador *MyCycler™* BIORAD® (San Diego, SA, USA), programado de acordo com as condições de amplificação otimizadas nesse estudo.

4.8.3 Condições para a Amplificação do Produto (*ask*)

Os parâmetros utilizados para a detecção do gene *ask* de *C. coli* foram iguais aos descritos para a detecção de *C. jejuni* e encontram-se pormenorizados no quadro 6, item

(4.7.3). Tais parâmetros foram determinados após testes prévios de identificação da melhor temperatura de anelamento e otimização da reação.

Após a reação para amplificação, os produtos foram mantidos a -20°C até o momento da corrida eletroforética (descrito no item 4.11).

4.9 Detecção do Gene da Cadeia 16S do RNA Ribossomal de *H. pylori* por PCR

Foram testadas 45 amostras na PCR para pesquisa do gene para cadeia 16S de RNA ribossômico de *H. pylori*. As amostras escolhidas foram aquelas positivas para o teste ELISA *ProSpect*® *Campylobacter Microplate Assay*, sendo 19 casos e 26 controles.

Tal reação foi escolhida a fim de avaliar a especificidade do ensaio ELISA *ProSpect*® quanto ao gênero detectado. *Helicobacter* é correlato ao gênero *Campylobacter*, pertencente à mesma ordem (Campylobacteriales).

4.9.1 Obtenção do DNA Bacteriano (*H. pylori*)

O DNA de *Helicobacter pylori* foi gentilmente cedido pela Prof. Dra. Lúcia Libanez e sua equipe do Laboratório de Gastroenterologia da UPC-IBIMED.

Comunicação escrita do Laboratório supracitado forneceu um resumo dos procedimentos seguidos até a obtenção do DNA: amostras de fragmentos de biópsias gástricas contendo *H. pylori* foram aplicadas em meio de cultura ágar-sangue com suplemento Skirrow e condicionados em atmosfera microaerófila. O isolado foi identificado como *H. pylori* através da morfologia das colônias e testes catalase, oxidase e urease positivos.

Para extração do DNA, as colônias foram retiradas da placa com swab estéril, imersas em tampão fosfato e centrifugadas até a formação de precipitado, que foi utilizado para a extração do material genômico das amostras com os reagentes do *QIAamp*™ *DNA mini Kit*, QIAGEN® (Valencia, CA, USA), conforme instruções do fabricante. Após a extração do DNA, as amostras foram estocadas a -20°C .

A alíquota de DNA recebida foi levada à quantificação por espectrofotometria que ocorreu como descrito para a quantificação de DNA de *C. jejuni* (item 4.7.1).

4.9.2 Detecção do Gene (*16S*)

Para a detecção do gene para cadeia 16S do RNA ribossômico de *H. pylori* (*16S*) foi preparado uma mistura dos reagentes necessários à reação. Essa solução inicial continha todos os reagentes para a realização da PCR, exceto o DNA das amostras: *AmpliTaq Gold® PCR Master Mix 2X*, APPLIED BIOSYSTEMS® (Foster City, CA, USA); água MilliQ® estéril, e os iniciadores *16S* senso e anti-senso, descritos no quadro 5 (item 4.6.3).

A solução contendo os reagentes foi então aliquotada em cada microtubo para PCR, sendo 22,5µL em cada tubo, para uma reação final de 25µL.

A PCR para detecção do gene *16S* de *H. pylori* foi realizada para as 45 amostras do estudo que foram positivas na ELISA para *Campylobacter* sp.. Todas as amostras foram testadas em uma única bateria, estando inclusos os controles positivo (DNA extraído de *H.pylori*) e negativos da reação (DNA extraído de *C. coli* INCQS 00263 e DNA extraído de *C. jejuni* ATCC® 33291 para especificidade dos iniciadores e água MilliQ® estéril para controle de qualidade da reação). Foram adicionados 2,5µL de DNA em cada tubo identificado com o número da amostra.

Após a adição do DNA extraído de cada amostra, os microtubos foram levados ao termociclador *MyCycler™* BIORAD® (San Diego, SA, USA), programado de acordo com as condições de amplificação otimizadas nesse estudo.

4.9.3 Condições para a Amplificação do Produto (*16S*)

Os parâmetros utilizados para a amplificação do gene *16S rRNA* de *H. pylori*, diferem daqueles utilizados para amplificação de *hipO* e *ask* apenas na temperatura de anelamento. Resumidamente, utilizamos 3 passos, sendo: 1) 01 ciclo para desnaturação inicial a 95°C por

10 minutos; 2) 35 ciclos de 95°C por 30 segundos (desnaturação), 55°C por 30 segundos (anelamento) e 72 °C por 45 segundos (extensão) e 3) 01 ciclo de extensão final a 72 °C por 10 minutos. Tais parâmetros foram determinados após testes prévios de identificação da melhor temperatura de anelamento e otimização da reação.

Após a reação para amplificação, os produtos foram mantidos a -20°C até o momento da corrida eletroforética (descrito no item 4.11).

4.10 Detecção dos Genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* da Toxina Citoletal Distensora de *C. jejuni* por PCR

4.10.1 Obtenção do DNA Bacteriano (*E. coli* CLDT 866/36)

A amostra padrão foi *C. jejuni* ATCC® 33291, e o DNA utilizado foi o mesmo da extração realizada para o controle positivo da reação *hipO* (4.7.1).

O DNA extraído de *Escherichia coli* CLDT 866/36 foi utilizado para teste de especificidade dos iniciadores. A cepa supracitada foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Tomomasa Yano da UNICAMP, SP.

A cepa foi recebida e levada imediatamente ao cultivo microbiológico em meio ágar *MacConkey*. O ágar *MacConkey* é um meio de cultura seletivo para isolamento de enterobactérias. Os sais biliares e o cristal violeta presentes inibem o crescimento de microorganismos Gram-positivos. A presença de lactose e indicador de pH vermelho neutro permite a diferenciação entre bactérias capazes ou não de fermentar esse açúcar (McAULIFFE, 1998; KONEMAN *et al.*, 2001).

Após cultivo inicial, as colônias foram levadas ao isolamento e identificação em API20E, BIOMERIEUX INC.® (Hazelwood, MO, USA) com excelente identificação. A extração do DNA foi realizada pela fervura de uma porção do cultivo inicial, como descrito para extração de *C. jejuni* ATCC® 33291 (item 4.7.1).

O DNA extraído foi levado à quantificação e armazenado a -20°C até o momento da utilização nas reações de PCR.

4.10.2 Detecção dos Genes (*cdtA*, *cdtB* e *cdtC*)

Para a detecção dos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* para CDT de *C. jejuni* foram preparadas três soluções, uma para amplificação de cada gene, contendo os reagentes necessários às reações. Cada solução inicial continha todos os reagentes para a realização da PCR, exceto o DNA das amostras: *GoTaq Green® PCR Master Mix 2X*, PROMEGA® (Madison, WI, USA); água MilliQ® estéril, e os iniciadores senso e anti-senso (que diferiram entre as três soluções) descritos no quadro 5 (item 4.6.3).

As soluções contendo os reagentes foram então aliquotadas em microtubos para PCR, sendo 22,5µL em cada tubo, para uma reação final de 25µL.

As PCRs para detecção dos genes para CDT (*cdtA*, *cdtB* e *cdtC*) foram realizadas nas 17 amostras do estudo que foram positivas na PCR para gene *hipO* e/ou na PCR para detecção do gene *ask*. Segue abaixo no quadro 10, trazendo esquema ilustrativo do perfil dessas amostras:

Quadro 10 - Representação das amostras utilizadas nas ampliações de *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*.

Item	PCRs positivas	Grupo	n
01	<i>hipO</i> apenas	Caso	6
		Controle	5
		Total	11
02	<i>ask</i> apenas	Caso	3
		Controle	0
		Total	3
03	<i>hipO</i> e <i>ask</i>	Caso	2
		Controle	1
		Total	3

Foram também testadas 07 amostras que tiveram resultado positivo na *ELISA ProSpect*® com resultado negativo nas PCR realizadas anteriormente. Essas 07 amostras foram escolhidas aleatoriamente.

Todas as amostras foram testadas em uma bateria única, estando inclusos os controles positivo (DNA extraído de *C. jejuni* ATCC® 33291) e negativos da reação (DNA extraído de *E. coli* CLDT para avaliação da especificidade dos iniciadores e água MilliQ® estéril para controle de qualidade da reação).

Como controle da especificidade dos iniciadores, além do DNA de *E. coli* CLDT 866/36, foram também testados DNA dos seguintes microorganismos: *Escherichia coli* 042, *H. pylori*, *C. coli* INCQS 00263 e um bacilo sugestivo de *Campylobacter sp.* gentilmente cedido pela Dra. Ila Fernanda Nunes Lima.

Foram adicionados 2,5µL de DNA em cada tubo identificado com o número da amostra e o gene pesquisado.

Após a adição do DNA extraído de cada amostra, os microtubos foram levados ao termociclador *MyCycler*™ BIORAD® (San Diego, SA, USA), programado de acordo com as condições de amplificação otimizadas nesse estudo.

4.10.3 Condições para a Amplificação dos Produtos (*cdtA*, *cdtB* e *cdtC*)

Os parâmetros utilizados para a amplificação dos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* foram os mesmos e encontram-se pormenorizados abaixo no quadro 11. Tais parâmetros foram determinados após ensaios prévios de identificação das melhores temperaturas de anelamento e otimização das reações.

Quadro 11 - Programação dos ciclos para amplificação (PCR) para detecção dos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*.

Passos (nº de ciclos)	Descrição	Temperatura	Tempo
01 (01 ciclo)	Desnaturação	95°C	5 minutos
02 (35 ciclos)	Desnaturação	95°C	30 segundos
	Anelamento	56°C	30 segundos
	Extensão	72°C	45 segundos
03 (01 ciclo)	Extensão final	72°C	5 minutos

Após finalizadas as reações para amplificação, os produtos foram mantidos a -20°C até o momento da corrida eletroforética (descrito no item 4.11).

4.11 Eletroforese dos Produtos Amplificados

Os produtos amplificados de todas as reações foram aplicados em gel de agarose a 1,2% para visualização dos resultados.

Para as reações de detecção de microorganismo (PCRs para *hipO*, *ask* e *16S rRNA*), 10µL do produto de reação de cada amostra foram homogeneizados e misturados com aproximadamente 2µL de corante para aplicação 6X (*Blue/Orange Loading dye 6X* – PROMEGA®, Madison, WI, USA). O volume total foi aplicado ao gel horizontal de agarose, preparado com Tampão TAE 1X (Tampão Tris-Acetato-EDTA: Tris 2,0M; Ácido acético 0,8M; EDTA 0,025M; pH 8,0) e 1,2% de agarose ultra-pura (Agarose Ultra-Pure - GIBCOBRL®, Gaithersburg, MD, USA).

Para as reações de detecção de genes de virulência (PCRs para *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*), foi dispensada a etapa de adição de corante para aplicação, visto que a *Taq* polimerase utilizada nessas reações é pronta para aplicação.

A corrida eletroforética foi realizada inicialmente a 80V por 5 minutos e 95V por mais aproximadamente 30 minutos com fonte *PowerPac™ Basic* BIORAD® (San Diego, SA, USA). Logo em seguida, o gel foi levado à agitação constante por 20 minutos em solução de brometo de etídio 1,0 µg/mL; preparada a partir de Brometo de Etídio 1%, FISHER® (Fair Lawn, NJ, USA) em Tampão TAE 1X.

As bandas foram visualizadas em transluminador de luz ultravioleta e fotografadas no sistema *ChemiDoc XRS*, BIORAD® (Hercules, CA, USA).

Em todos os géis, um poço foi reservado para a aplicação de uma mistura de fragmentos de DNA com tamanhos conhecidos para comparação dos tamanhos dos produtos de PCR. Essa solução é um marcador de peso molecular e gera um efeito de escada na visualização de bandas. Foi utilizado um marcador de 100pb (*Ladder 100bp, 50 lanes* – PROMEGA®, Madison, WI, USA).

4.12 Acondicionamento e Análise Estatística dos Dados

Todos os dados gerados foram codificados em planilha Excel, *MICROSOFT®* (New York, NY, USA) e adicionados por dois digitadores independentes.

Os códigos dos resultados de ELISA foram definidos nos itens 4.5.1 e 4.5.2 (quadros 2 e 3, respectivamente). A codificação para os resultados de PCR foi: 0= Negativo (produto com tamanho esperado não visualizado em gel de agarose); 1 = Positivo (produto com tamanho esperado visualizado em gel de agarose), 2 = Não realizado.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o *Statistical Package for Social Sciences* versão 11.0 (*SPSS Inc™*, Chicago, IL, USA). Para a análise descritiva e estatística dos dados foram utilizados tabelas e gráficos e, no caso de variáveis contínuas, empregaram-se medidas de resumo. Os gráficos foram realizados utilizando-se o *software GraphPad Prism* versão 3.0 (*GraphPad Software™*, San Diego, CA, USA). Utilizou-se o *software EpiInfo* versão 6.0 (*Center for Diseases Control*, Atlanta, GA, USA) para o cálculo dos escores-z a partir das medidas antropométricas.

O teste de *Shapiro-Wilk* foi empregado para verificar a normalidade dos dados e o teste de *Levene* para checar a igualdade das variâncias. Os testes não pareados t de Student foram utilizados para verificar a existência de diferenças entre grupos de dados contínuos e com distribuição normal. No caso de não normalidade da distribuição, utilizou-se o teste de Mann-Whitney. O nível de significância de 5% foi empregado em todos os testes.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da População

A caracterização de toda a população estudada (84 casos e 241 controles) encontra-se pormenorizada em trabalho recente do Laboratório de Doenças Infecciosas (LIMA, 2008).

A população alvo de atenção do presente estudo (83 casos e 83 controles) apresenta as seguintes características:

Na maioria dos fatores sócio-demográficos estudados (renda familiar, tipo de casa, tempo de residência, número de moradores, origem da água de beber, fervura da água antes do consumo, condicionamento da água na residência, compartilhamento ou não do sanitário, existência de água e sabão no banheiro, frequência de evacuação ao redor da casa, existência de animal) e dos parâmetros individuais (idade das crianças, altura, peso, índice de massa corporal e circunferência do braço do indivíduo) não foram observadas diferenças significativas entre casos e controles.

Os grupos caso e controle foram semelhantes quanto ao sexo e idade ($p=0,533$ e $p=0,1265$, respectivamente). Dentre os casos, temos 35/83 meninas (42,2%) e 48/83 meninos (57,8%). No grupo dos controles são 44,8% de crianças do sexo feminino e 55,2% de crianças do sexo masculino. Nos casos, a média de idade foi de 18,89 meses e nos controles, 16,60 meses.

Três variáveis estudadas revelaram diferença estatística entre os grupos de casos e controles: tipo de sanitário, número de compartimentos do imóvel habitado e prega cutânea do indivíduo.

Na variável “tipo de sanitário”, 49,3% dos controles habitavam casas em que o sanitário possuía descarga d’água e para 50,7% dos controles, as casas possuíam fossa. Dentre os casos, apenas 27,4% das casas habitadas possuíam descarga d’água e 72,6% utilizavam fossa como meio sanitário ($p= 0,007$).

Para a variável “número de compartimentos do imóvel habitado” ($p=0,0469$), a média entre os casos foi de 3,85 compartimentos e entre os controles 4,46 compartimentos.

A prega cutânea dos casos apresentou valor médio de 7,072 cm; e dos controles, 7,763 cm ($p= 0,0374$).

Os parâmetros nutricionais, avaliados pelos escores-z HAZ (escore-z altura-por-idade), WAZ (escore-z peso-por-idade) e WHZ (escore-z peso-por-altura), estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 - Comparação dos grupos caso e controle em relação à distribuição dos escores-z.

Escore-z	Grupo	n	Média	Desvio padrão	p
HAZ	Caso	71	-0,571	1,298	0,340
	Controle	73	-0,372	1,193	
WAZ	Caso	71	-0,296	1,343	0,044
	Controle	73	0,156	1,318	
WHZ	Caso	71	0,306	1,300	0,022
	Controle	73	0,769	1,093	

Houve diferença estatística entre os grupos caso e controle para os escores-z WAZ e WHZ. Para o escore-z WAZ, os casos apresentaram uma média de -0,296, e os controles, 0,156 ($p= 0,044$). Para o escore-z WHZ, as médias encontradas foram 0,306 para os casos e 0,769 para os controles ($p= 0,022$).

5.2 Dados Laboratoriais do Primeiro Processamento das Amostras

Os dados do primeiro processamento laboratorial das amostras são utilizados nesse estudo principalmente como ferramenta para caracterizar as amostras.

Quanto à característica das fezes, não houve diferença entre os grupos caso e controle ($p=0,362$). No grupo dos casos, 78,8% das fezes eram formadas; 11,3% semiformadas; 3,8% não-formadas; 6,3% líquidas. No grupo controle, 84,6% das fezes eram formadas; 3,8% semiformadas; 5,1% não-formadas e 6,4% líquidas.

Quanto à presença de outros microorganismos no exame parasitológico de fezes, 19,5% dos casos e 17,1% dos controles possuíam algum parasita nas fezes, discriminados a seguir: *Ascaris lumbricoides* (9,8% dos casos e 4,9% dos controles), *Trichuris trichiura* (6,1% dos casos e 3,7% dos controles), *Entamoeba coli* (2,4% dos casos); *Giardia lamblia* (6,1% dos casos, 7,3% dos controles); *Hymenolepis nana* (1,2% dos controles) e *Strongiloides stercoralis* (1,0% dos controles).

5.3 Extração de DNA

Todas as amostras fecais dos 83 casos e 83 controles foram extraídas e quantificadas. As amostras geralmente apresentavam qualidade e concentração satisfatórias e, em caso contrário, era buscada outra alíquota para realização de nova extração.

As amostras padrão foram devidamente identificadas antes da extração (exemplo na FIGURA 6).

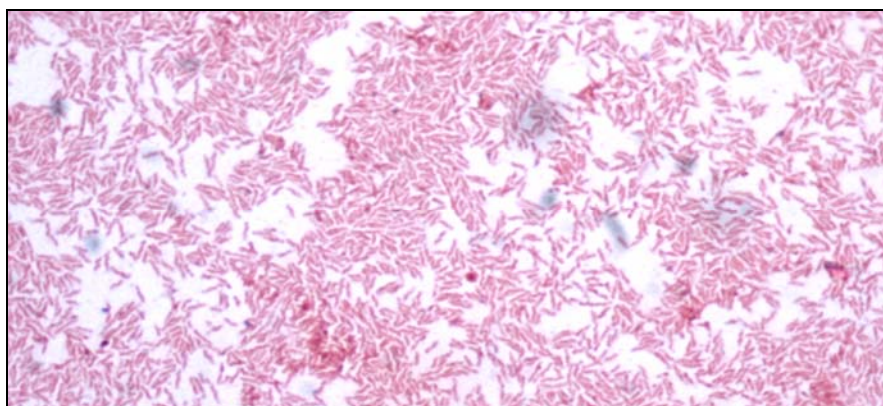


Figura 6: Foto da coloração de Gram de *Campylobacter coli* INCQS 00263 cultivado no Laboratório de Doenças Infecciosas, UPC-IBIMED/UFC

Fonte: Foto gentilmente realizada pelo Dr. Reinaldo Barreto Oriá.

DNA das cepas padrão foram extraídos e a quantificação, realizada em espectrofotômetro Eppendorf® BioPhotometer (Eppendorf - Hamburg, DEU) com as leituras nas absorvâncias 230nm, 260nm, 280nm e 320nm, denunciou que os parâmetros concentração e qualidade atingiram níveis satisfatórios, como pode ser evidenciado na tabela 2.

Tabela 2 - Dados relativos à quantificação de DNA extraído das cepas padrão

Item	Microorganismo	Concentração (µg/mL)	Razões		Qualidade
			A _{260/280}	A _{260/230}	
01	<i>C. jejuni</i>	77,32	2,07	2,04	Satisfatória
02	<i>C. coli</i>	104,46	1,90	1,91	Satisfatória
03	<i>H. pylori</i>	102,23	1,94	2,10	Satisfatória
04	<i>E. coli</i> CLDT 866/36	119,26	1,68	1,91	Satisfatória
05	<i>E. coli</i> 042	23,44	1,39	0,57	Satisfatória
06	Bacilo sugestivo de <i>Campylobacter sp.</i>	30,95	1,55	-	Satisfatória, com reservas

5.4 ELISA para *Campylobacter sp.*

Foram testados 80 casos e 82 controles com o ensaio ELISA ProSpect para *Campylobacter sp.* Casos e controles foram testados na ELISA para *Campylobacter* em duas ocasiões distintas. Os valores das absorvâncias encontradas a 450nm dos controles positivo e negativo foram os seguintes em cada uma das placas:

- a) Placa A (testou a maioria dos casos): Controle positivo: 1,357; Controle negativo: 0,095
- b) Placa B (testou a maioria dos controles): Controle positivo: 2,097; Controle negativo: 0,077

Os resultados obtidos para as amostras seguem na tabela 3.

Tabela 3 - Sumário dos resultados para ELISA *ProSpect*® *Campylobacter* *Microplate Assay* para os grupos Caso e Controle.

Grupos	ELISA		
	Positivo (%)	Negativo (%)	Indeterminado (%)
Casos	19/80 (23,75)	60/80 (75,00)	1/80 (1,25)
Controles	26/82 (31,71)	44/82 (53,66)	12/82 (14,63)
Total	45/162 (27,78)	104/162 (64,20)	13/162 (8,02)

Não foram encontradas diferenças significativas entre casos e controles quanto à detecção de *Campylobacter sp.* por ELISA ($p=0,660$) (FIGURA 7).

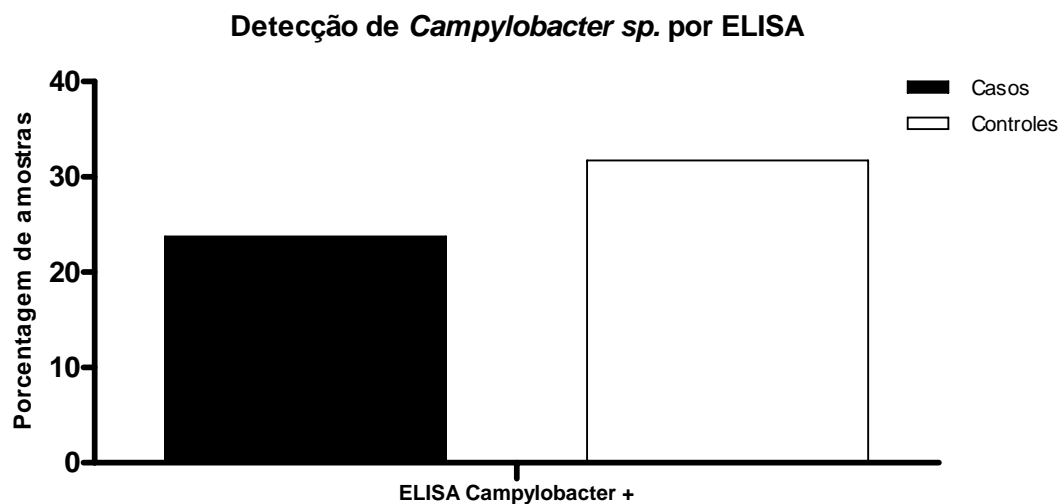


Figura 7 - Resultados de ELISA *ProSpect*® *Campylobacter* *Microplate Assay* para os grupos Caso e Controle. Foram testadas 162 amostras, sendo 80 casos e 82 controles por ELISA *ProSpect*® segundo instruções do fabricante. A leitura das absorvâncias foi realizada em espectrofotômetro de placa *Microplate Reader 230S*, *Organon*. Foi detectado *Campylobacter sp.* em 23,75% (19/80) dos casos e 31,71% (26/82) dos controles; sendo que a diferença entre os grupos não foi significativa ($p=0,660$). ELISA: ensaio imuno-enzimático.

Foi observada diferença significativa, $p=0,0152$, das médias do escore-z HAZ entre os resultados do ensaio ELISA *ProSpect*® no grupo dos casos. Segundo os dados observados, as

amostras do grupo com diarreia e resultado positivo para ELISA *ProSpect*® pertencem às crianças com um menor valor médio de HAZ quando comparado ao valor médio de HAZ das crianças do mesmo grupo cujas amostras foram negativas no ensaio ELISA *ProSpect*®.

5.5 Produtos das PCRs

Resumidamente, as amplificações obtidas estão listadas na tabela a seguir (TABELA 4).

Tabela 4 - Sumário dos resultados de PCR para genes *hipO* (*C. jejuni*) e *ask* (*C. coli*) nos grupos Caso e Controle.

Grupos	PCR (Detecção do gene)			
	<i>hipO</i> ⁺ (%)	<i>ask</i> ⁺ (%)	<i>hipO</i> ⁺ e <i>ask</i> ⁺ (%)	<i>hipO</i> ⁺ ou <i>ask</i> ⁺ (%)
Casos	6/83 (7,2)	3/83 (3,6)	2/83 (2,4)	11/83 (13,25)
Controles	5/83 (6,0)	0/83 (0,0)	1/83 (1,2)	6/83 (7,2)
Total	11/166 (6,63)	3/166 (1,81)	3/166 (1,81)	17/166 (10,24)

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas quanto à detecção de *C. jejuni* ou *C. coli* entre casos e controles (FIGURA 8).

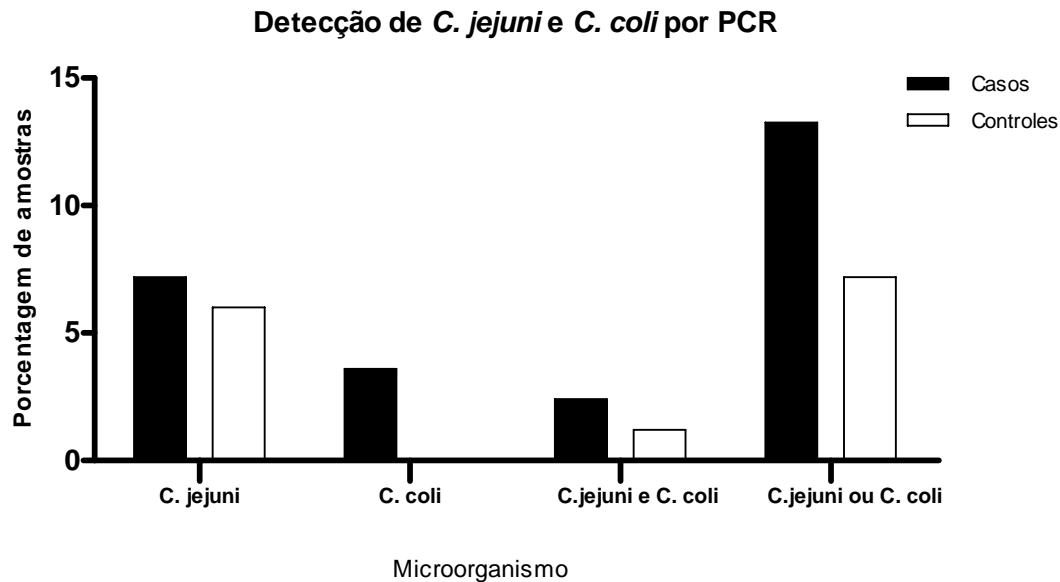


Figura 8 - Resultados da detecção de *C. jejuni* e *C. coli* por PCR. Foram testadas 166 amostras (83 casos e 83 controles) por PCR para detecção dos genes *hipO* e *ask*. Foram detectados, no grupo dos casos, 7,2% (6/83) de amostras positivas para *C. jejuni* e 3,6% (3/83) de amostras positivas para *C. coli* (sendo que a co-infecção foi detectada em 2,4%, 2/83, dos casos). Foram detectados, no grupo dos controles, 6,0% de amostras positivas para *C. jejuni* (sendo que a co-infecção *C. jejuni* e *C. coli* foi detectada em 1,2% dos controles). Não houve diferença significativa entre os grupos caso e controle. PCR: Reação da Polimerase em Cadeia. *hipO*: gene da hipurato hidrolase de *C. jejuni*; *ask*: gene da aspartato quinase de *C. coli*.

5.5.1 Detecção do Gene *hipO* de *C. jejuni*

Foram testadas todas as 166 amostras na PCR para o gene *hipO*. Os produtos de amplificação foram visualizados em corrida eletroforética. No grupo dos casos, 8/83 amostras (9,6%) apresentaram amplificação do produto. Dentre os controles, 6/83 amostras (7,2%) apresentaram amplificação do produto.

Segue abaixo foto de uma revelação da corrida eletroforética para os produtos amplificados na PCR para *hipO* (FIGURA 9).

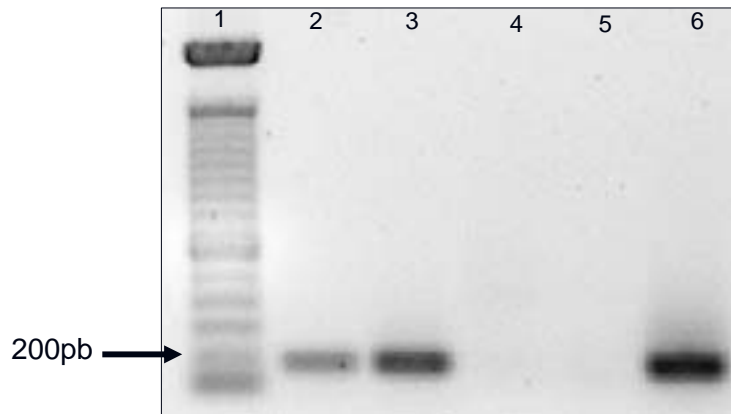


Figura 9 - Foto do resultado da PCR para *C. jejuni*, gene *hipO*, 176pb. Coluna 1: Marcador molecular, 100pb. Colunas 2,3: Amostras positivas; Coluna 4: Amostra negativa. Coluna 5: H₂O MilliQ estéril (controle negativo); Coluna 6: Controle positivo (DNA extraído de *C. jejuni* ATCC® 33291 – extração por fervura em água). PCR: Reação da Polimerase em Cadeia; *hipO*: gene para hipurato hidrolase de *C. jejuni*.

5.5.2 Detecção do Gene *ask* de *C. coli*

Foram testadas todas as 166 amostras na PCR para o gene *ask*. Os produtos de amplificação foram visualizados em corrida eletroforética. No grupo dos casos, 5/83 amostras (6,0%) apresentaram amplificação do produto. Dentre os controles, apenas 1/83 amostras (1,2%) apresentou amplificação do produto.

Segue foto de uma revelação da corrida eletroforética para os produtos amplificados na PCR para *ask* (FIGURA 10).

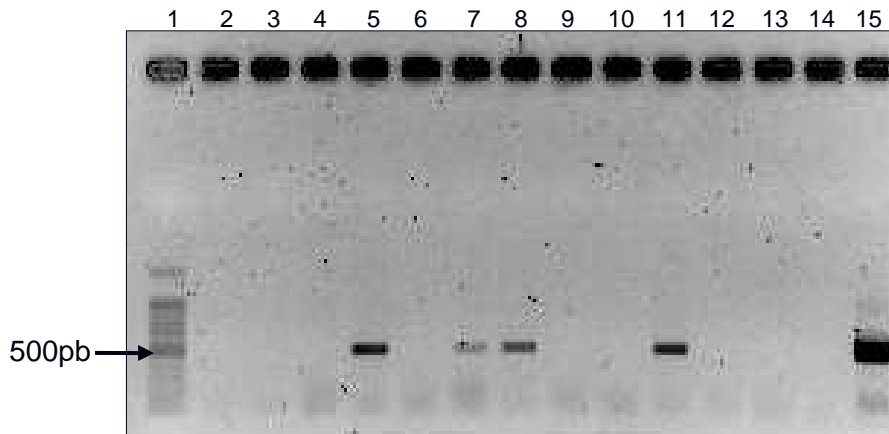


Figura 10 - Foto do resultado da PCR para *C. coli*, gene *ask*, 502pb. Coluna 1: Marcador molecular, 100pb. Colunas 5, 7, 8 e 11: Amostras positivas; Colunas 2, 3, 4, 6, 9, 10, 12 e 13: Amostras negativas. Coluna 14: H₂O MilliQ estéril (controle negativo); Coluna 15: Controle positivo (DNA extraído de *C. coli* INCQS 00263 – extração com *QIAampStool Mini Kit*, protocolo modificado). PCR: Reação da Polimerase em Cadeia. *ask*: Gene da aspartato quinase de *C. coli*.

5.5.3 Detecção do Gene da Cadeia 16S de RNA Ribossômico de *H. pylori*

Foram testadas 45 amostras na PCR para pesquisa do gene para cadeia 16S de RNA ribossômico de *H. pylori*. As amostras escolhidas foram todas aquelas positivas para o teste ELISA *ProSpect™ Campylobacter Microplate Assay*, sendo 19 casos e 26 controles. Tais amostras foram escolhidas a fim de avaliar a especificidade do ensaio ELISA quanto ao gênero detectado.

Os produtos de amplificação foram visualizados em corrida eletroforética. Não ocorreu amplificação em nenhuma das amostras testadas, tanto no grupo dos casos como no grupo dos controles (positivos no ensaio ELISA para *Campylobacter* sp.).

Segue foto de uma revelação da corrida eletroforética para os produtos amplificados na PCR para detecção de *H. pylori* (FIGURA 11).

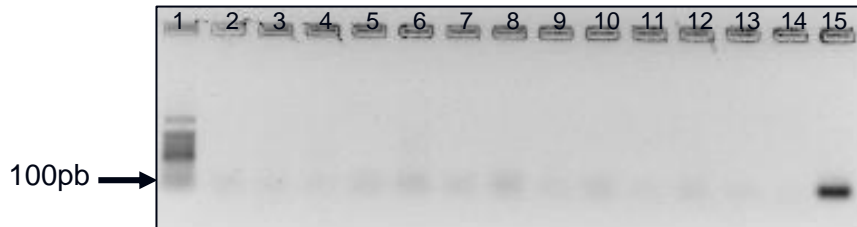


Figura 11 - Foto do resultado da PCR para *H. pylori*, gene *16S rRNA*, 139pb. Coluna 1: Marcador molecular, 100pb. Colunas 2 a 13: Amostras negativas; Coluna 14: H₂O MilliQ estéril (controle negativo); Coluna 15: Controle positivo (DNA extraído de *H. pylori* – extração com kit *QIAamp*). PCR: Reação da Polimerase em Cadeia; *16S rRNA* = Gene para cadeia 16S de *H. pylori*.

5.5.4 Detecção dos Genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* de *C. jejuni*

Foram testadas 24 amostras na PCR para pesquisa dos genes para CDT de *C. jejuni*. Esse ensaio foi realizado a fim de pesquisar o perfil genotípico relacionado aos genes adjacentes cromossomais para a CDT (*cdtA*, *cdtB* e *cdtC*) considerados genes de virulência.

Dentre as amostras escolhidas estavam:

1) Todas aquelas positivas na PCR para *C. jejuni* (gene *hipO*⁺: 6 casos e 5 controles), positivas para *C. coli* (gene *ask*⁺: 3 casos) e positivas em ambas as amplificações (*hipO*⁺; *ask*⁺: 2 casos e 1 controle; total = 17 amostras – Tabela 4).

2) Sete amostras escolhidas aleatoriamente (*hipO*⁻; *ask*⁻, ELISA *Campylobacter ProSpect* positivas).

3) DNA dos controles microbiológicos (*C. jejuni*, *C. coli*, *E. coli* CLDT, *E. coli* O42, *H. pylori*, Bacilo sugestivo de *Campylobacter sp.*).

Os produtos de amplificação foram visualizados em corrida eletroforética.

Três amostras de casos positivas para *C. jejuni* foram positivas para *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* (3/8; 37,5%). Dentre os controles, 4/6 amostras foram positivas para *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*

(66,7%). Essa diferença de detecção dos genes para CDT em casos e controles não foi significativa ($p=0,553$).

Não ocorreu amplificação de *cdtA*, *cdtB* nem *cdtC* nas amostras com amplificação somente do gene para aspartato quinase de *C. coli* (*ask*⁺). Também não ocorreu amplificação em nenhuma das 07 amostras testadas que foram positivas somente para *ELISA ProSpect*® *Campylobacter Microplate Assay*, REMEL.

Dentre os controles microbiológicos, as amostras positivas para *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* foram: DNA de *C. jejuni* ATCC® 33291 e DNA de Bacilo sugestivo de *Campylobacter*. Os demais DNA extraídos de controles microbiológicos (*C. coli*, *E. coli* 042, *E.coli* CLDT 866/36, *H. pylori*) não geraram amplificação em nenhuma das reações.

A tabela 5 sumariza os resultados de detecção dos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* por PCR.

Tabela 5 - Sumário dos resultados de PCR para detecção dos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* em amostras positivas para *C. jejuni* (PCR, *hipO*⁺).

Grupos	<i>cdtA</i>⁺, <i>cdtB</i>⁺, <i>cdtC</i>⁺ (%)
Casos	3/8 (37,5)
Controles	4/6 (66,7)
Total	7/14 (50,0)

Seguem abaixo fotos da revelação da corrida eletroforética para os produtos amplificados na PCR para detecção de *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* (FIGURAS 12, 13 e 14, respectivamente).

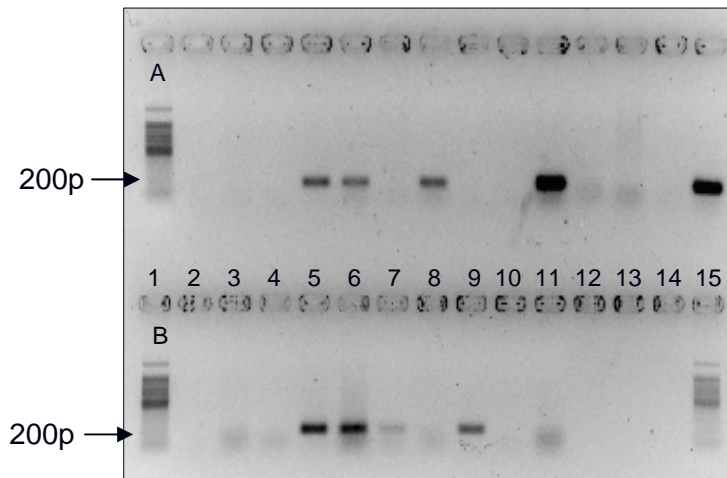


Figura 12 - Foto do resultado da PCR para gene *cdtA* para CDT de *C. jejuni*, 175pb. Colunas 1A, 1B e 15B: Marcador molecular, 100pb. Colunas 5 e 6 (A e B), 7B, 8A, 9B: Amostras positivas; Colunas 2, 3, 4 e 10 (A e B), 7A, 8B, 9A; 11B; 12 e 13 (A): Amostras negativas. Coluna 14A: H₂O MilliQ estéril (controle negativo); Coluna 15: Controle positivo (DNA extraído de *C. jejuni* ATCC 33291 – extração por fervura em água); Coluna 11A: Bacilo sugestivo de *Campylobacter* sp.; Colunas 12-14B: vazias. PCR: Reação da Polimerase em Cadeia. *cdtA*: gene para CDT de *C. jejuni*. CDT = toxina citoletal distensora; A= superior; B= inferior.

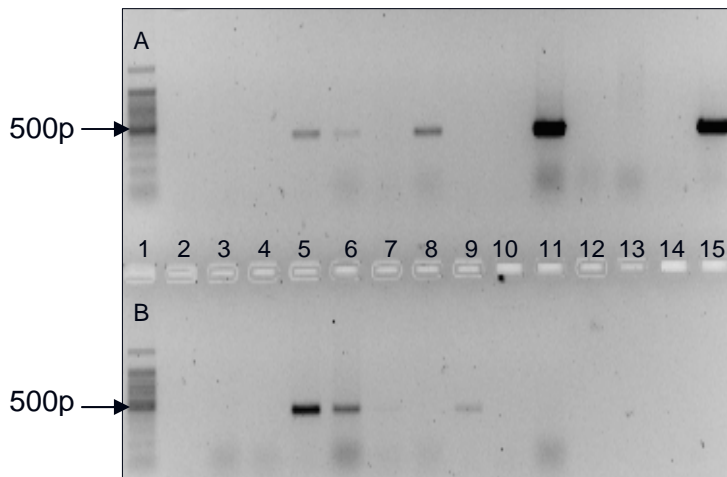


Figura 13 - Foto do resultado da PCR para gene *cdtB* para CDT de *C. jejuni*, 418pb. Colunas 1A, 1B: Marcador molecular, 100pb. Colunas 5 e 6 (A e B), 8A, 9B: Amostras positivas; Colunas 2, 3, 4, 7 e 10 (A e B), 8B, 9A; 11B; 12 e 13 (A): Amostras negativas. Coluna 14A: H₂O MilliQ estéril (controle negativo); Coluna 15: Controle positivo (DNA extraído de *C. jejuni* ATCC 33291 – extração por fervura em água); Coluna 11A: Bacilo sugestivo de *Campylobacter* sp.; Colunas 12-15B: vazias. PCR: Reação da Polimerase em Cadeia. *cdtB*: gene para CDT de *C. jejuni*. CDT = toxina citoletal distensora; A= superior; B= inferior.

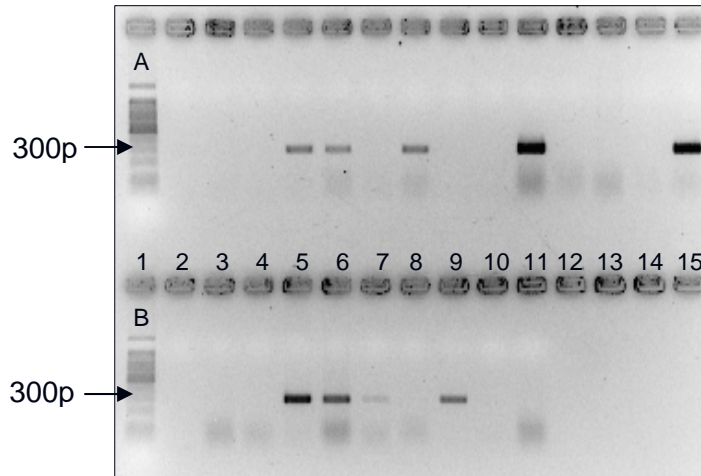


Figura 14 - Foto do resultado da PCR para gene *cdtC* para CDT de *C. jejuni*, 270pb. Colunas 1A, 1B: Marcador molecular, 100pb. Colunas 5 e 6 (A e B), 8A, 9B: Amostras positivas; Colunas 2, 3, 4 e 10 (A e B), 8B, 9A; 11B; 12 e 13 (A): Amostras negativas. Coluna 14A: H₂O MilliQ estéril (controle negativo); Coluna 15: Controle positivo (DNA extraído de *C. jejuni* ATCC 33291 – extração por fervura em água); Coluna 11A: Bacilo sugestivo de *Campylobacter* sp.; Colunas 12-15B: vazias. PCR: Reação da Polimerase em Cadeia. *cdtC*: gene para CDT de *C. jejuni*. CDT = toxina citoletal distensora; A= superior; B= inferior.

5.6 Parâmetros Nutricionais

Quanto à avaliação dos escores-z, de acordo com os resultados da análise estatística, foram observadas:

1) diferença significativa ($p=0,0073$) das médias do escore-z WAZ entre os grupos para o resultado da PCR *hipO* positivo (*hipO*⁺). Segundo os dados observados, o grupo casos apresenta um valor médio inferior ao valor médio encontrado para o grupo dos controles.

2) diferença significativa ($p=0,0209$) das médias do escore-z WHZ entre os grupos para o resultado da PCR *hipO*⁺. Segundo os dados observados, o grupo casos apresenta um valor médio inferior ao grupo dos controles.

3) diferença significativa ($p=0,0003$) das médias do escore-z WHZ entre os resultados do PCR *hipO* no grupo dos casos. Segundo os dados observados, os casos *hipO*⁺ apresentam um menor valor médio de WHZ do que os casos *hipO*⁻.

Os dois primeiros achados foram esquematizadas na figura 15.

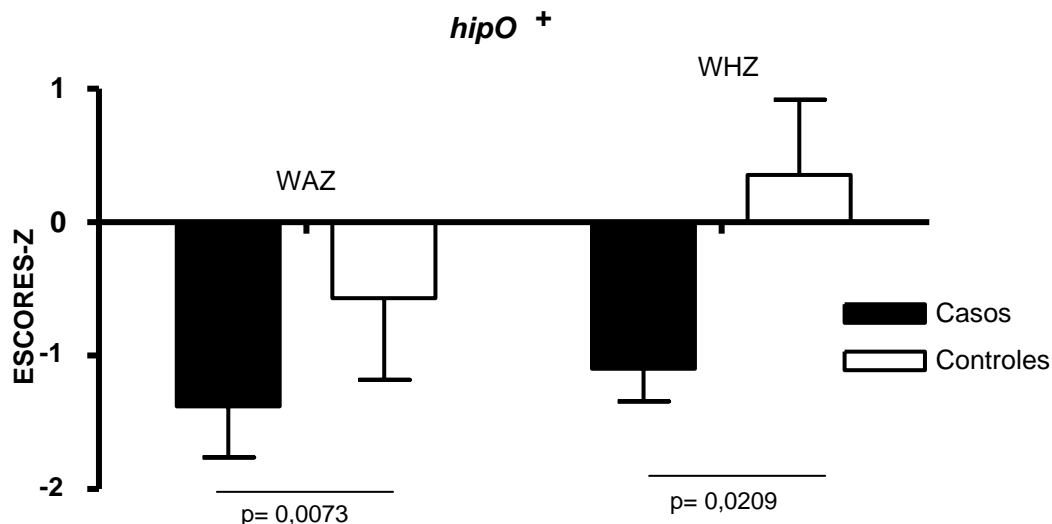


Figura 15 - Representação da correlação entre as médias de WAZ e médias de WHZ para casos e controles *hipO*⁺. A detecção de *C.jejuni* foi realizada por PCR para gene *hipO*. Os escores-z WAZ e WHZ foram obtidos a partir de cálculos realizados com as medidas antropométricas das crianças. Medidas antropométricas: medidas de altura, peso, prega cutânea e índice de massa corporal (IMC). Escores-z: Parâmetros nutricionais para avaliação de desnutrição obtidos a partir de medidas antropométricas. WAZ: escore-z peso-por-idade; WHZ: escore-z peso-por-altura; *hipO*⁺: amostras positivas para detecção molecular de *C. jejuni*; *hipO*: gene da hipurato hidrolase de *C. jejuni*; PCR: Reação da Polimerase em Cadeia.

Ao expandimos a análise para portadores de *C. coli*, ou seja, o grupo analisado passa a ser *hipO* e/ou *ask* positivo (s), observamos que:

4) Existe diferença significativa entre os grupos *hipO*⁺ e/ou *ask*⁺ (portadores) em relação aos valores médios de WAZ e WHZ ($p=0,036$ e $p=0,035$, respectivamente) onde, segundo os dados observados, em média o grupo dos portadores possui valores inferiores que o grupo dos não-portadores (*hipO*⁻ e *ask*⁻).

5.7 ELISA para Lactoferrina Fecal

Foram testadas todas as amostras (83 casos e 83 controles). Para cada placa foram adicionados os controles e padrões, e foram geradas quatro equações diferentes para fins de semiquantificação da concentração de lactoferrina encontrada em cada amostra, visto que foram utilizadas 04 placas para a completude das avaliações.

As equações foram geradas pela adição dos dados de leitura das absorbâncias em 450nm encontradas com o teste dos padrões de lactoferrina utilizados (6,25ng/mL; 12,5ng/mL; 25,0ng/mL; 50,0ng/mL e 100,0ng/mL) que foram adicionados em cada uma das placas.

Os valores de leitura de absorbância em 450nm de cada amostra foram levados à equação da respectiva placa, e assim, foram gerados os valores de concentração. A unidade final de concentração gerada pela equação foi μg de lactoferrina/g de fezes.

As equações geradas e os valores de R^2 (que indicam qualidade ótima da reta quanto mais próximo de 1,000) encontram-se a seguir (FIGURA 16).

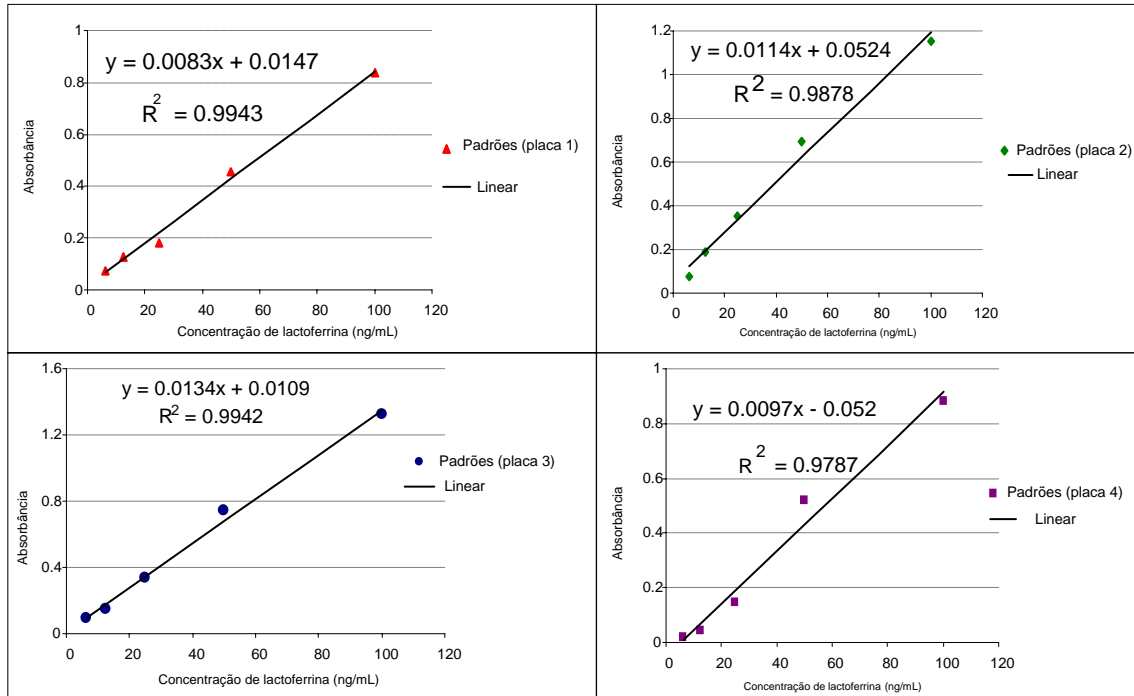


Figura 16 - Gráficos das equações obtidas pela leitura da absorbância (450nm) dos padrões do Kit *IBD® Scan, TECHLAB*. As equações foram obtidas pela adição das leituras de absorbância a 450 nm dos padrões levados ao ensaio ELISA para LFF concomitantemente aos testes das amostras. A concentração das amostras era obtida pelo uso da equação gerada em cada ensaio, sendo x a concentração da amostra (incógnita) e y a absorbância gerada pelo ensaio da amostra. ELISA: ensaio imunoenzimático; LFF: lactoferrina fecal, R^2 : indicador da linearidade da reta; Padrão: amostra com concentração conhecida.

Os resultados de concentração de lactoferrina das amostras encontram-se de forma ilustrativa na figura 17. As diferenças encontradas entre os grupos caso e controle não foram significativas ($p = 0,660$).

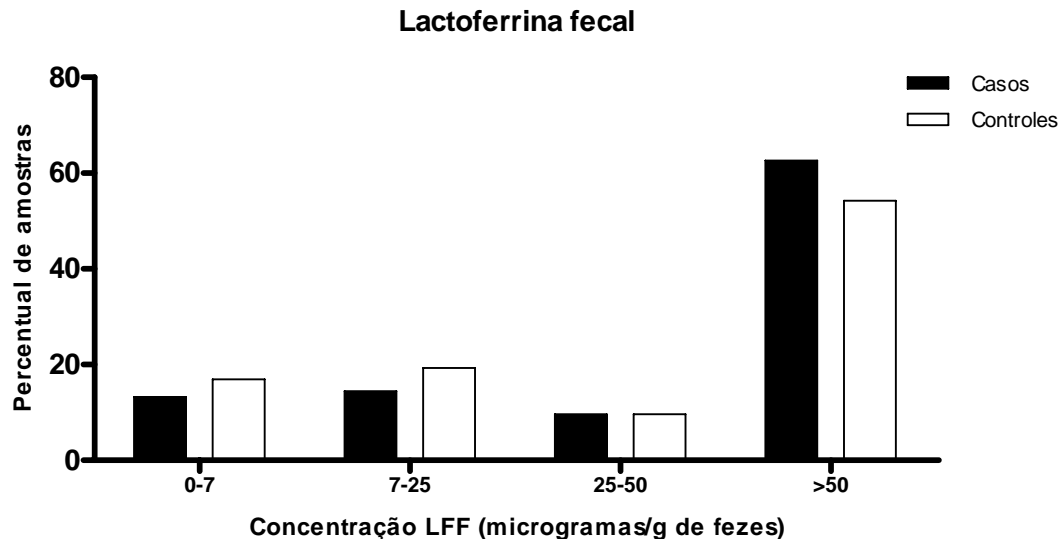


Figura 17 - Resultados de ELISA *IBD® Scan* para avaliação da inflamação intestinal (LFF) nos grupos Caso e Controle. Foram testadas 166 amostras, sendo 83 casos e 83 controles por ELISA para LFF, segundo instruções do fabricante. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro de placa *Microplate Reader 230S, Organon*. Os resultados foram semiquantificados e estratificados em 4 faixas de concentração de LFF ($\mu\text{g/g}$ de fezes): 0-7,00; 7,01-25,00; 25,01-50,00; >50,00. Não houve diferença significativa em relação aos resultados encontrados para os grupos caso e controle ($p=0,660$). ELISA: ensaio imunoenzimático; LFF: Lactoferrina fecal.

Em relação aos valores semiquantificativos de lactoferrina fecal, quando diferenciamos a comparação de casos *versus* controles para portadores de *C. jejuni* e/ou *C. coli* ($hipO^+$, ask^+ ou hip^+ e ask^+) *versus* não-portadores ($hipO^-$ e ask^-), também não foi encontrada diferença significativa entre os grupos caso e controle portadores de *C. jejuni* e/ou *C. coli* ($p=0,800$) (FIGURA 18).

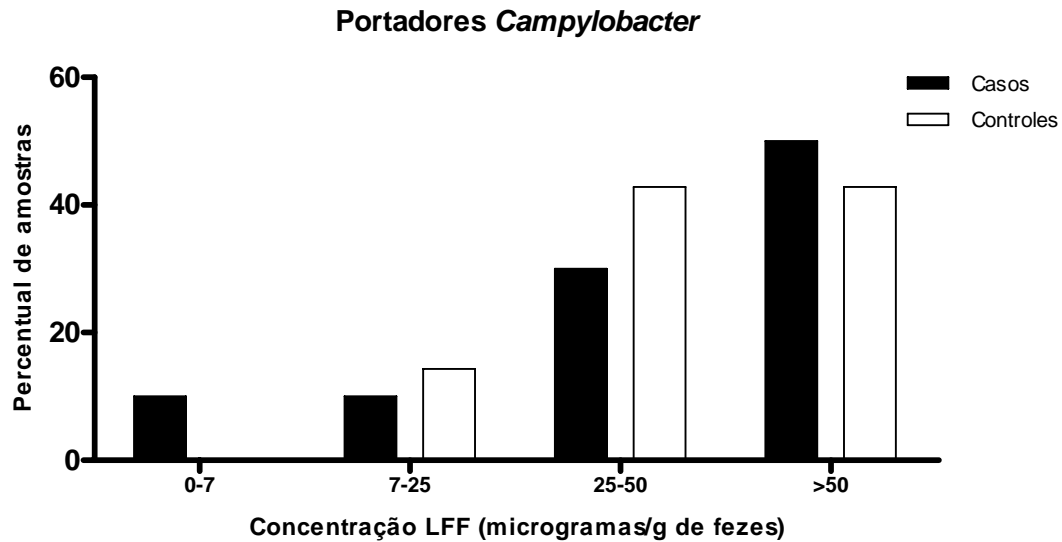


Figura 18 - Resultados de ELISA *IBD® Scan* para avaliação da inflamação intestinal (LFF) entre os portadores de *C. jejuni* ou *C. coli* nos grupos Caso e Controle. Foram testadas 166 amostras, sendo 83 casos e 83 controles por ELISA para LFF, segundo instruções do fabricante. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro de placa *Microplate Reader 230S, Organon*. Os resultados foram semiquantificados e estratificados em 4 faixas de concentração de LFF ($\mu\text{g/g}$ de fezes): 0-7,00; 7,01-25,00; 25,01-50,00; >50,00. Foi realizada a análise dos resultados de LFF semiquantitativa entre as amostras com detecção de *C. jejuni* ou *C. coli* por PCR. Portadores de *Campylobacter jejuni* e/ou *C. coli* foram encontrados em 17 amostras. Não houve diferença significativa em relação aos resultados encontrados para os indivíduos dos grupos caso e controle portadores de *Campylobacter sp* (detecção molecular) ($p= 0,800$). ELISA: ensaio imunoenzimático; LFF: Lactoferrina fecal; PCR: Reação da Polimerase em Cadeia.

6 DISCUSSÃO

Em relação à caracterização inicial dos grupos, as crianças com diarreia apresentaram escores-z WAZ e WHZ significativamente menores que as crianças do grupo controle.

Desde a década de 80 vem sendo reportado um ciclo vicioso que se estabelece entre diarreia e desnutrição, o qual prediz que a desnutrição gera infecções intestinais mais impactantes e essas, por conseguinte, limitam a capacidade absorptiva intestinal, contribuindo para o déficit nutricional (BLACK; BROWN; BECKER, 1984; GADEWAR; FASANO, 2005; GUERRANT *et al.*, 2008). Nossos dados, portanto, corroboram com esse paradigma.

Além disso, foram observadas diferenças significativas em relação às variáveis “tipo de sanitário” e “número de compartimentos do imóvel habitado”. No grupo dos casos, havia menor número de casas habitadas com descarga d’água e menor quantidade de compartimentos por imóvel habitado. Esses dados vão de encontro à prerrogativa de que diarreia está associada com condições de higiene e moradia mais precárias (FERNÁNDEZ *et al.*, 2008).

Os métodos de identificação para o gênero *Campylobacter* envolvem tradicionalmente o uso de meios seletivos de cultura seguido de testes bioquímicos, que necessitam de aproximadamente 72-96 horas para a identificação fenotípica completa (ABUBAKAR *et al.*, 2007).

A inovação do presente estudo está na detecção de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* direto das amostras fecais congeladas e, portanto, inviáveis para detecção pelos métodos microbiológicos padronizados. A detecção molecular do gênero *Campylobacter* tem sido descrita como ferramenta plausível e confiável (WAEGEL; NACHAMKIN, 1996; LINTON *et al.*, 1997; LAWSON *et al.*, 1999; METHERELL; LOGAN; STANLEY, 1999; KULKARNI *et al.*, 2002; PERSSON; OLKEN, 2005; SAMIE, 2007a; NAKARI; PUHAKKA; SIITONEN, 2008).

Em nosso estudo, também realizamos um ensaio imuno-enzimático (ELISA ProSpect® *Campylobacter* Microplate Assay) para servir de suporte aos achados moleculares. Tal ferramenta proporcionou maior robustez aos achados, visto que todas as amostras

positivas para PCR (para detecção tanto de *hipO* quanto de *ask*) foram também positivas para ELISA.

Como mencionado no item 4.6.3, os iniciadores utilizados foram todos analisados com a ferramenta *BLAST*. Todos apresentaram homologia de 100% com os genes pesquisados e exclusão de ao menos 15% com outros genes de espécies ou gêneros correlatos.

Na fase inicial de padronização e otimização das reações de amplificação, os iniciadores foram testados com DNA bacteriano extraído de cultura microbiológica para averiguação das especificidades, principalmente *C. jejuni* e *C. coli* entre si.

Os iniciadores utilizados para detecção de *C. jejuni* são muito específicos. A atividade da enzima hipurato hidrolase [N-benzoilglicina amidohidrolase (EC.3.5.1.32)] (INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, 2008; STEELE *et al.*, 2006) constitui a base para a reação bioquímica crítica que distingue *C. jejuni* das outras 15 espécies conhecidas do gênero *Campylobacter* (HANI; CHAN, 1995).

O gene que codifica a hipurato hidrolase é único no gênero e cromossomal (CANER *et al.*, 2008; HANI; CHAN, 1995; LINTON *et al.*, 1997) e a ausência de polimorfismos indica que *hipO* é um gene altamente conservado nas cepas de *C. jejuni*. Portanto, a detecção de *hipO* por PCR proporciona um teste útil para identificação dessa espécie (SLATER; OWEN, 1997).

Quanto ao gene para aspartato quinase (*ask*) de *C. coli*, a sequência foi depositada no banco de dados do *NCBI* por Linton *et al.* (1997), um dos grupos expoentes na identificação molecular tanto de *C. jejuni* como de *C. coli*.

Além disso, foram encontrados na literatura científica, dois trabalhos recentes que, buscando elucidar pontos mais avançados sobre a caracterização do gênero (identificação por DNA microarray e detecção de genes de virulência), utilizaram a amplificação dos genes *hipO* e *ask* como testes de segurança para confirmação molecular da identidade de *C. jejuni* e *C. coli*, respectivamente (TALUKDER *et al.*, 2008; VOLOKHOV *et al.*, 2003).

Vários trabalhos vêm demonstrando a validade da detecção de *Campylobacter* spp. diretamente das fezes por técnicas moleculares em comparação com as técnicas convencionais (AMAR *et al.*, 2004; KULKARNI *et al.*, 2000; LINTON *et al.*, 1997; PERSSON; OLKEN, 2005; VANNIASINKAM; LAISER; BURTON, 1999). Tais trabalhos têm demonstrado

resultados altamente satisfatórios (sensibilidade em torno de 98,5%) quando comparados ao isolamento microbiológico convencional.

O kit de extração do DNA de fezes utilizado em nosso trabalho é referenciado em vários outros estudos, alguns dos quais especificamente delineados para avaliação da performance do Kit (McORIST; JACKSON; BIRD, 2002; INGLIS; KALISCHUK, 2003) e outros delineados para avaliação da capacidade do mesmo em extrair DNA de *Campylobacter* spp. (COLLINS *et al.*, 2001; FUKUSHIMA; TSUNOMORI; SEKI, 2003; SAMIE *et al.* 2007a). Em todos os estudos supracitados, *QIAamp Stool DNA Mini Kit* alcançou performance satisfatória, por vezes superior à obtida por outros kits comerciais.

Encontramos, por PCR, detecção de *Campylobacter jejuni* em 9,6% dos casos e 7,2% dos controles. *Campylobacter coli* foi detectado por PCR em 6,0% dos casos e 1,2% dos controles. Tais índices de detecção são compatíveis com estudos caso-controle realizados no Brasil e em outros países em desenvolvimento (GONZÁLEZ *et al.*, 1984; MENDES *et al.*, 1987; HUILAN *et al.*, 1991; COKER *et al.*, 2002).

Observamos, além disso, que ocorre co-infecção (*hipO*⁺, *ask*⁺) em uma pequena porcentagem de casos (2/83; 2,4%) e controles (1/83; 1,2%).

Em relação aos resultados obtidos pelo ensaio imuno-enzimático, o teste ELISA *ProSpect*® para detecção de *Campylobacter* sp., observamos uma proporção bem maior de casos (19/80; 23,75%) e controles positivos (26/82; 31,71%).

Tal diferença pode ser devida ao fato de o ensaio ELISA geralmente ser menos específico que a PCR (ENDTZ *et al.*, 2000; TOLCIN *et al.*, 2000; DEDIST *et al.*, 2003). Além disso, o Kit utilizado talvez possa detectar alguma outra espécie de enteropatógeno presente nas amostras e não pesquisado no presente estudo.

Pela PCR para *H. pylori* (um dos poucos microorganismos que conseguimos obter para investigar a validade desses testes de reatividade cruzada realizados pelo fabricante), não obtivemos nenhuma amplificação das amostras, sugerindo que, realmente não há reação cruzada com o anticorpo anti-SA do Kit ELISA *ProSpect*® e o microorganismo *H. pylori*. Apesar de não termos pesquisado *H. pylori* nas outras amostras do estudo e tão pouco possuímos dados internos sobre a detecção desse microorganismo a partir de DNA fecal, dados da literatura confirmam a possibilidade de detecção de *H. pylori* a partir de DNA extraído de fezes com utilização de método de extração similar ao realizado com as amostras

fecais de nosso trabalho (MONTEIRO *et al.*, 2001; SAMIE *et al.*, 2007a; SICINSCHI *et al.*, 2003).

Ainda concernente à especificidade do ensaio ELISA, outras espécies do gênero *Campylobacter* poderiam estar implicadas na alta positividade encontrada com o uso do ensaio imunoenzimático *ProSpect*®. As instruções do Kit deixam em aberto se *C. upsaliensis*, *C. hyointestinales* ou *C. helveticus* geram reação cruzada. O fabricante menciona sucintamente que tais espécies podem ou não ser detectadas.

Fernández *et al.* (2008), em recente estudo no Chile, demonstraram que *C. upsaliensis*, *C. lari* e *C. fetus* spp. *fetus* foram isolados de material fecal de crianças, principalmente desnutridas, no Chile.

Nesse estudo chileno, os autores identificaram *C. upsaliensis* em 13,3% das crianças desnutridas e em 2,7% das crianças nutridas; *C. lari* em 7,6% das crianças desnutridas e *C. fetus* spp. *fetus* em 1,9% do total de crianças desnutridas.

Levando-se em consideração que nosso estudo possui um alto percentual de crianças com escores-z baixos principalmente no grupo dos casos, estudos mais detalhados se fazem necessários para fins de investigação da presença de outras espécies de *Campylobacter* na população estudada. Caso ocorra detecção de outras espécies do gênero, poderíamos avaliar a contribuição dessas para o percentual de positividade encontrado com o Kit ELISA *ProSpect*® *Campylobacter Assay*.

Além de *C. upsaliensis*, outro microorganismo que merece avaliação quanto à sua identificação na população de estudo é *C. concisus*. Tal espécie também tem sido reportada em estudos mais recentes como importante agente etilógico de doenças diarréicas em crianças com mais de um ano de idade (LASTOVICA; SKIRROW, 2000; MATSHEKA; LASTOVICA; ELISHA, 2001). Já possuímos tal microorganismo em nosso laboratório na forma liofilizada (também cedido gentilmente pelo INCQS - FIOCRUZ), assim como os iniciadores da PCR para sua detecção. Tal microorganismo ainda não foi testado por questões peculiares ao seu cultivo.

Outro estudo adicional interessante refere-se à avaliação da qualidade do Kit utilizado para extração de DNA, *QIAamp DNA Stool Mini Kit*. Embora esteja amplamente documentada na literatura científica a validade do mesmo para a extração do DNA de fezes (GIOFFRÉ *et al.*, 2004; HOLLAND *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2003; LIMA, 2008; McORIST;

JACKSON; BIRD, 2002; VANDENBERG; VANOORSCHOT, 2002) e utilização do DNA obtido para identificação molecular do gênero *Campylobacter* (COLLINS *et al.*, 2001; FUKUSHIMA; TSUNOMORI; SEKI, 2003; INGLIS; KALISCHUK, 2003; SAMIE, 2007a), seria interessante avaliar certo número de amostras com diagnóstico microbiológico de *Campylobacter* spp. e posterior extração do material fecal armazenado em freezer -80°C.

Dessa forma obteríamos uma validação adicional da capacidade de manutenção da detecção por métodos moleculares diretamente das amostras. Poderiam também ser avaliados mais de um Kit e/ou protocolo de extração de DNA das amostras fecais, tomando como exemplo alguns testes realizados em nosso laboratório para fins similares (LIMA, 2008).

Em relação à detecção por PCR de *Campylobacter* sp. entre as crianças do grupo controle, detectamos *C. jejuni* em 6,0% e *C. coli* em 1,2% dos controles.

A excreção assintomática de *Campylobacter* sp. é um fato epidemiológico comum observado em países em desenvolvimento (FERNÁNDEZ *et al.*, 1995; GONZÁLEZ *et al.*, 1984; HUILAN *et al.*, 1991; MENDES *et al.*, 1987).

Dados epidemiológicos sugerem que a alta frequência de portadores assintomáticos esteja relacionada com condições sanitárias precárias que promovem mais oportunidades de transmissão, gerando infecções repetidas (FERNÁNDEZ *et al.*, 1995).

Em indivíduos superexpostos, há desenvolvimento de imunidade e a infecção passa a ser subclínica. Isso ocorre em muitos países em desenvolvimento nos quais as crianças são repetidamente infectadas devido às condições sócio-econômicas em que vivem. Tal fato também ocorre em certas regiões onde há o costume de ingestão de leite cru (não-fervido, não-pasteurizado) e também em trabalhadores do ramo de abate animal (MOORE *et al.*, 2005).

Os dados do atual trabalho, portanto, corroboram com achados da literatura sobre as campilobacterioses intestinais em países em desenvolvimento.

Em relação aos parâmetros nutricionais, avaliados pelos escores-z, demonstramos que:

1) Foi observada diferença significativa das médias do escore-z HAZ entre os resultados do ensaio ELISA *ProSpect*® no grupo dos casos. Segundo os dados observados, as amostras do grupo com diarreia e resultado positivo para ELISA *ProSpect*® pertencem às

crianças com um menor valor médio de HAZ quando comparado ao valor médio de HAZ das crianças do mesmo grupo cujas amostras foram negativas no ensaio ELISA *ProSpect*®.

2) Existe diferença significativa das médias do WAZ e do WHZ entre os grupos para o resultado *hipO*⁺ onde, segundo os dados observados, o grupo caso apresenta um valor médio inferior ao grupo dos controles.

3) Ocorre diferença significativa das médias do WHZ entre os resultados do grupo dos casos, onde, segundo os dados observados, portadores de *C. jejuni* (*hipO*⁺) apresentam um menor valor médio do que o grupo *hipO*⁻.

Quando analisamos a detecção de *hipO* ou *ask*, ou seja, expandimos o grupo analisado para portadores de *C. jejuni* e/ou *C. coli*, demonstramos que

4) Ocorre diferença significativa das médias do WAZ e WHZ entre os resultados do PCR *hipO*⁺ e/ou *ask*⁺, onde, segundo os dados observados, os portadores de *C. jejuni* ou *C. coli*. (detecção molecular, *hipO*⁺ e/ou *ask*⁺) apresentam menores valores médios do que o grupo dos não-portadores (*hipO*⁺ e/ou *ask*⁺).

Dados recentes da literatura sul-americana encontraram associação entre isolamento de *Campylobacter* spp. e desnutrição, em crianças sem diarreia. Fernández *et al.* (2008), no Chile, demonstraram que os portadores de *Campylobacter* eram significativamente mais freqüentes entre o grupo de crianças desnutridas (31,4%; 33/105) que entre o grupo de crianças nutridas (9,9%, 11/111).

Estudos africanos demonstraram que, em crianças com diarreia, as taxas de isolamento de *Campylobacter* são maiores entre crianças desnutridas (KAKAI *et al.*, 1995; LLOYD-EVANS; DRASAR; TOMKINS,1983).

Nosso trabalho encontrou associação entre detecção de *Campylobacter* sp. e desnutrição.

Quanto à inflamação intestinal, sua avaliação, no presente estudo, deu-se através da semiquantificação do marcador lactoferrina fecal (LFF).

Não encontramos, no presente estudo, qualquer correlação entre as concentrações de LFF das amostras e a detecção molecular de *C. jejuni* ou *C. coli*. Não há diferença também entre casos e controles.

Embora em certas populações a pesquisa de LFF tem se mostrado útil para a identificação de pacientes com maior probabilidade de apresentarem gastroenterite bacteriana inflamatória (SAMIE *et al.*, 2007a; VENKATARAMAN *et al.*, 2003), o mesmo ensaio parece não apresentar o mesmo poder preditivo e/ou associativo no presente estudo.

Samie *et al.* (2007) encontraram, em amostras fecais provenientes da África do Sul, associação entre a infecção por *C. jejuni* e altos níveis de LFF. Nosso trabalho não encontrou tal associação. Esse fato pode estar relacionado tanto com diferenças intrínsecas das populações estudadas entre si, visto que na população africana houve também correlação entre a detecção de *C. jejuni* e *C. coli* com quadro de diarreia (tal associação não foi encontrada em nosso trabalho), bem como o fato de que tal estudo não possuía em seu grupo controle crianças menores de 3 anos de idade, população descrita como a mais acometida por infecção sub-clínica em países em desenvolvimento (COKER *et al.*, 2002; DALLAL; KHORRAMIZADEH; MOEZARDALAN, 2006).

Apesar da relativa simplicidade e velocidade com que os resultados das análises em larga escala de LFF são concluídos (comparados com a pesquisa de leucócitos fecais por microscopia óptica), uma questão prática se interpõe: as características da população de estudo, na qual as doenças diarréicas e as infecções subclínicas são frequentes e multifatoriais. Nessa situação, o ensaio se torna muito inespecífico para gerar qualquer informação clínica relevante (GILL *et al.*, 2003). Um exemplo claro do perfil multifatorial da infecção entérica clínica e sub-clínica vem da análise das co-infecções, demonstrada na caracterização da população do presente estudo (item 5.2): 19,5% dos casos e 17,1% dos controles possuíam algum parasita nas fezes.

Um estudo complementar de grande valia para aprimorar o entendimento sobre a inflamação intestinal na população estudada seria a ampliação do desenho do presente estudo, com adição de maior número de controles, no intuito de expandir a avaliação inicial. Outra proposta seria a busca de controles externos às comunidades estudadas, para avaliação do perfil de inflamação intestinal em uma população infantil que supostamente vive em condições sócio-econômicas mais favorecidas.

Sobre a pesquisa de fatores de virulência, principalmente de *C. jejuni*, estudos recentes têm gerado evidências muito interessantes sobre os determinantes genéticos da virulência de tal microorganismo (AL-MAHMEED *et al.*, 2006; PURDY *et al.*, 2000; TALUKDER *et al.*, 2008; WASSENAAR, 1997).

Bacon *et al.* (2000) associaram o gene plasmidial *pVir* com a severidade das gastroenterites por *Campylobacter*. O mesmo gene plasmidial foi associado com disenteria, também um sinal marcante de severidade da infecção (TRACZ *et al.*, 2005).

Al-Mahmeed *et al.* (2006) delinearam um perfil genotípico baseado na detecção dos genes *cdtB* e *iam*. O marcador associado à invasão (*iam*) de *C. jejuni* parece ter participação na infiltração e aderência do microorganismo aos enterócitos. O perfil genotípico de *C. jejuni cdtB⁺/iam⁺* mostrou-se estar associado com diarreia infantil em crianças com menos de 3 anos de idade.

No presente estudo, os genes para CDT (*cdtA*, *cdtB* e *cdtC*) foram encontrados em 50% (7/14) das amostras positivas para *C. jejuni* (*hipO⁺*), sendo encontrados em 37,5% dos casos (3/8 positivos para *hipO*) e 66,7% dos controles (4/6 positivos para *hipO*). Essa diferença entre os grupos não foi significativa.

Podemos inferir, portanto, que perfis genéticos diversos de *C. jejuni* circulam pela população estudada, sem necessariamente estarem associados isoladamente com as manifestações clínicas. A caracterização genotípica mais aprofundada se mostra, portanto, necessária e importante para elucidação desses achados iniciais.

Apesar de termos demonstrado a presença do gene para a holotoxina completa (CDT), não caracterizamos a expressão da mesma e nem seu efeito. Experimentos com a utilização de RT-PCR (reação em cadeia da polimerase com uso de transcriptase reversa) e estudos em cultura de células poderiam preencher essa lacuna, contando com a estrutura já montada para tais fins do LDI/UPC-IBIMED.

Moore *et al.* (2005), sugeriram que, no futuro, com os aprimoramentos na extração de DNA das amostras, teríamos testes mais sensíveis de detecção molecular. Eventualmente, o crescimento microbiológico poderia ser substituído por amplificação do DNA, meios de cultura por reagentes para PCR e estufa por termociclador.

Em contraste com essa sugestão, Foxman e Riley afirmam que técnicas moleculares não substituem os métodos convencionais, mas podem ser úteis quando direcionados às questões de complicada abordagem pelas técnicas convencionais, como os fatores relacionados à interação parasito-hospedeiro e a detecção de microorganismos inviáveis para cultivo (FOXMAN; RILEY, 2001).

As vantagens da detecção molecular incluem:

- a) Métodos baseados na detecção de ácidos nucleicos são rápidos e específicos.
- b) Há a possibilidade de detecção direta sem necessidade de cultura.
- c) Métodos moleculares podem facilitar a análise dos microorganismos danificados de forma subletal, que passariam por maior dificuldade para obtenção de crescimento microbiológico.

As desvantagens incluem:

- a) Custo (PCR ainda é uma técnica dispendiosa).
- b) Dificuldade de padronização para realização exclusiva dos métodos moleculares (ABUBAKAR *et al.*, 2007; WHO, 2001).
- c) Impossibilidade de obter um isolado para investigações fenotípicas complementares (WRIGHT; WYNFORD-THOMAS, 1990).
- d) Necessidade de realizar um ensaio separado para cada microorganismo.

Ainda assim, os estudos genéticos possuem alta relevância na elucidação de questões difíceis de avaliar unicamente pelos métodos microbiológicos de rotina. Um exemplo advindo do presente estudo é levantado pelo fato de que portadores de *Campylobacter* sp. não foram, no presente trabalho, significativamente mais freqüentes entre casos do que entre controles.

O perfil genético, tanto do microorganismo (genes de virulência, por exemplo) como do hospedeiro, podem ajudar a esclarecer tal questão.

Quanto aos determinantes genéticos do hospedeiro, existe uma crescente lista de genes com polimorfismos em um único nucleotídeo (*single nucleotide polymorphisms* - SNPs) que alteram os resultados de certas doenças infecciosas. Estudos mostram que o polimorfismo dos genes TNF- α (ABRAHAM; KROEGER, 1999; KNIGHT *et al.*, 1999; KROEGER; CARVILLE; ABRAHAM, 1997; McGUIRE *et al.*, 1994), ICAM-1 (CRAIG *et al.*, 2000; FERNANDEZ-REYES *et al.*, 1997) e iNOS (LEVESQUE *et al.*, 1999) predispõem a um curso mais severo da doença na infecção por *Plasmodium falciparum* (DESSEIN *et al.*, 2001).

Em outros estudos, Williams-Blangero *et al.* (2002a, 2002b, 2008) relataram a importância de determinantes genéticos na susceptibilidade diferencial para infecção e reinfecção por *Ascaris lumbricoides* e *Trichiuris trichiura*.

Em estudo realizado com uma população da área rural de Minas Gerais, Bethony *et al.* (2002) demonstraram que fatores genéticos do hospedeiro responderam por 27% da variação

da contagem de ovos de *Schistosoma mansoni*, e os fatores ambientais responderam apenas por 12% dessa variação. Tal estudo corrobora estudos genéticos prévios, também relacionados ao desfecho da esquistossomíase (DESSEIN *et al.*, 1992, 1999).

Quanto aos fatores genéticos do microorganismo, propriedades específicas como capacidade de adesão, colonização, invasão e produção de toxinas parecem ter papel no desencadeamento da infecção entérica. Vários trabalhos vêm buscando a elucidação do papel dos genes responsáveis por cada uma dessas etapas. Os genes *flaA*, *cadF*, *racR* e *dnaJ*, por exemplo, parecem estar envolvidos com as etapas de adesão e colonização. Os genes *ciaB* e *pldA* têm sido descritos como genes relacionados com a capacidade de invasão dos microorganismos do gênero *Campylobacter* (BANG *et al.*, 2003; DATTA; NIWA; ITOH, 2003; TALUKDER *et al.*, 2008).

Com base na vasta literatura científica sobre o assunto, sugerimos, portanto, que fatores genéticos (alguns SNPs do hospedeiro e/ou fatores de virulência do microorganismo) podem estar envolvidos no desencadeamento de diarreia, na susceptibilidade a uma resposta inflamatória e na correlação em longo prazo com desenvolvimento de sequelas.

7 CONCLUSÕES

Foi detectado, por PCR, *Campylobacter jejuni* em 9,6% dos casos e 7,2% dos controles e *Campylobacter coli* em 6,0% dos casos e 1,2% dos controles.

Os dados sugerem que o ensaio ELISA *ProSpect*® para *Campylobacter* sp. é útil como teste de rastreamento em amostras congeladas, inviáveis para realização de coprocultura, visto que todas as amostras positivas nas PCRs para *hipO* e/ou *ask* apresentaram também resultados positivos na ELISA para *Campylobacter* sp..

A detecção de ambos os microorganismos, *C. jejuni* e *C. coli*, em três amostras, sugere que ocorre, em menor grau (3,6%), co-infecção na população estudada.

Foram encontrados controles infectados por *C. jejuni* (7,2%) mostrando que ocorre infecção subclínica na população estudada - dado que corrobora a literatura científica sobre a prevalência de *C. jejuni* em controles nos países em desenvolvimento. A identificação molecular de *C. jejuni* entre os controles aponta fortemente para a necessidade de estudos complementares que se direcionem tanto ao perfil de genes de virulência de tal microorganismo (que por ventura estariam associados com o desencadeamento da doença) quanto ao perfil genético da população (que poderia estar associado com a susceptibilidade).

Sugerimos ainda que ocorra diversidade genotípica entre as cepas que infectam a população infantil estudada visto que foram detectados os genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* em 50% das amostras em que foram detectadas o gene *hipO* (*C. jejuni*).

Em relação aos parâmetros nutricionais, avaliados pelos escores-z, demonstramos que existe associação entre desnutrição e detecção de *Campylobacter* sp..

Não houve associação entre os valores de concentração de lactoferrina fecal e detecção de *Campylobacter* sp.

O presente estudo vem, portanto, colaborar com a demanda de mais estudos sobre campilobacteriose intestinal no Brasil.

REFERÊNCIAS

ABBAS, K. A.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J. S. Regulation of immune responses. In: _____ . **Cellular and Molecular Immunology**. 2nd. ed. Philadelphia, USA: W.B. Saunders Company, 2000. p. 205-220.

ABRAHAM, L. J.; KROEGER, K. M. Impact of -308 TNF promoter polymorphism on the transcriptional regulation of the TNF gene: relevance to disease. **J. Leuk. Biol.**, v. 66, n. 4, p. 562-566, 1999.

ABUBAKAR, I.; IRVINE, L.; ALDUS, C. F.; WYATT, G. M.; FORDHAM, R.; SCHELENZ, S.; SHEPSTONE, L.; HOWE, A.; PECK, M.; HUNTER, P. R. A systematic review of the clinical public health and cost-effectiveness of rapid diagnostic tests for the detection and identification of bacterial intestinal pathogens in faeces and food. **Health Technol. Assess.**, v. 11, n. 36, p. 1-216, 2007.

ADACHI, J.; OSTROVSKY-ZEICHNER, L.; DuPONT, H. L.; ERICSSON, C. D. Empirical antimicrobials for traveler's diarrhea. **Clin. Infect. Dis.**, v. 31, n. 4, p. 1079-1083, 2000.

AJJAMPUR, S.S.; RAJENDRAN, P.; RAMANI, S.; BANERJEE, I.; MONICA, B.; SANKARAN, P.; ROSARIO, V.; ARUMUGAM, R.; SARKAR, R.; WARD, H.; KANG, G. Closing the diarrhoea diagnostic gap in Indian children by the application of molecular techniques. **J. Med. Microbiol.**, v. 57, pt. 11, p.1364-1368, 2008.

AL-MAHMEED, A.; SENOK, A. C.; ISMAAEL, A.Y.; BINDAYNA, K.M.; TABBARA, K.S.; BOTTA, G. A. Clinical relevance of virulence genes in *Campylobacter* isolates in Bahrain. **J. Med. Microbiol.**, v. 55, n. 7, p. 839-843, 2006.

ALAM, N. H.; ASHRAF, H. Treatment of infectious diarrhea in children. Therapy in practice. **Ped. Drugs**. v. 5, n. 3, p. 151-165, 2003.

ALBERT, M. J.; FARUQUE, A. S. G.; FARUQUE, S. M.; SACK, R. B.; MAHALANABIS, D. Case-control study of enteropathogens associated with childhood diarrhea in Dhaka, Bangladesh. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, n. 11, p. 3458-3464, 1999.

ALCANTARA, C. S.; YANQ, C. H.; STEINER, T. S.; BARRETT, L. J.; LIMA, A. A.; CHAPPELL, C. L.; OKHUYSEN, P. C.; WHITE, A. C.; GUERRANT, R. L. Interleukin-8, tumor necrosis factor- α , and lactoferrin in immunocompetent hosts with experimental and

brazilian children with acquired cryptosporidiosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 68, n. 3, p. 325-328, 2003.

ALFREDSON, D. A.; KOROLIC, V. Antibiotic resistance and resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 277, n. 2, p. 123-132, 2007.

ALLOS, B. M. *Campylobacter jejuni* infections: update on emerging issues and trends. **Clin. Infect. Dis.**, v. 32, n. 8, p. 1201-1206, 2001.

ALMEIDA, M. T. G.; DA SILVA, R. M.; DONAIRE, L. M.; MOEIRA, L. E.; MARTINEZ, M. B. Enteropatógenos associados com diarreia aguda em crianças. **J. Pediatr. (RJ)**, v. 74, n. 4, p. 291-298, 1998.

ALTEKRUSE, S. F.; STERN, N. J.; FIELDS, P. I.; SWERDLOW, D. L. *Campylobacter jejuni* – An emerging foodborne pathogen. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 5, n. 1, p. 28-35, 1999.

ALSHEKHLEE, A.; HUSSAIN, Z.; SULTAN, B.; KATIRJI, B. Guillain-Barré syndrome: incidence and mortality rates in US hospitals. **Neurology**, v. 70, n. 18, p. 1608-1613, 2008.

AMAR, C. F.; EAST, C.; MACLURE, E.; MCLAUCHLIN, J.; JENKINS, C.; DUNCANSON, P.; WAREING, D. R. Blinded application of microscopy, bacteriological culture, immunoassays and PCR to detect gastrointestinal pathogens from faecal samples of patients with community-acquired diarrhoea. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 23, n. 7, p. 529-534, 2004.

ANDRADE, M. C. R.; GABEIRA, S. C. O.; ABREU-LOPES, D.; ESTEVES, W. T. C.; VILARDO, M. C. B.; THOMÉ, J. D. S.; CABELLO, P. H.; LAURIA-FILGUEIRAS, A. L. Circulation of *Campylobacter* spp. in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) held in captivity: a longitudinal study. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 1, p. 53-57, 2007.

BACON, D. J.; ALM, R. A.; BURR, D. H.; HU, L.; KOPECKO, D. J.; EWING, C. P.; TRUST, T. J.; GUERRY, P. Involvement of a plasmid in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 8, p. 4384-4390, 2000.

BAKELI, G.; SATO, K.; KUMITA, W.; SAITO, R.; ONO, E.; CHIDA, T.; OKAMUMRA, N. Antimicrobial susceptibility and mechanism of quinolone resistance in *Campylobacter jejuni* strains isolated from diarrheal patients in a hospital in Tokyo. **J. Infect. Chemother.**, v. 14, n. 5, p. 342-348, 2008.

- BAKER, M. G.; SNEYD, E.; WILSON, N. A. Is the major increase in notified campylobacteriosis in New Zealand real? **Epidemiol. Infect.**, v. 135, n. 1, p. 163-170, 2007.
- 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.
- BERKMAN, D. S.; LESCANOS, A. G.; GILMAN, R. H.; LOPEZ, S. L.; BLACK, M. M. Effects of stunting, diarrhoeal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: a follow-up study. **Lancet**, v. 359, n. 9306, p. 564-571, 2002.
- BETHONY, J.; WILLIAMS, J. T.; BLANGERO, J.; KLOOS, H.; GAZZINELLI, A.; SOARES-FILHO, B.; COELHO, L.; ALVES-FRAGA, L.; WILLIAMS-BLANGERO, S.; LOVERDE, P.T.; CORREA-OLIVEIRA, R. Additive host genetic factors influence fecal egg excretion rates during *Schistosoma mansoni* infection in a rural area in Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 67, n. 4, p. 336-343, 2002.
- BLACK, R. E.; BROWN, K. H.; BECKER, S. Malnutrition is a determining factor in diarrheal duration, but not incidence, among young children in a longitudinal study in rural Bangladesh. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 39, n. 1, p. 87-94, 1984.
- BLACK, R. E.; LEVINE, M. M.; CLEMENTS, M. L.; HUGHES, T. P.; BLASER, M. J. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. **J. Infect. Dis.**, v. 157, n. 3, p. 472-479, 1988.
- BLAKELOCK, R. T.; BEASLEY, S. W. Infection and the gut. **Semin. Pediatr. Surg.**, v. 12, n. 4, p. 265-274, 2003.
- BLASER, M. J. Epidemiologic and Clinical Features of *Campylobacter jejuni* infection. **J. Infect. Dis.**, v. 176, p. S103-S105, 1997.
- BROCK, T. D. **Robert Koch, a life in medicine and bacteriology**. Washington, DC: ASM Press, 1999.
- BUTZLER, J. P. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 10, n. 10, p. 868-876, 2004.

CAULFIELD, L. E.; de ONIS, M.; BROWN, K. H.; BECKER, S. Undernutrition as an underlying cause of child deaths associated with diarrhea, pneumonia, malaria, and measles. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 80, n. 1, p. 193-198, 2004.

CANER, V.; COKAL, Y.; CETIN, C.; SEN, A.; KARAGENC, N. The detection of *hipO* gene by real-time PCR in thermophilic *Campylobacter spp.* with very weak and negative reaction of hippurate hydrolysis. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 94, n. 4, p. 527-532, 2008.

CÁRCAMO, C.; HOOTON, T.; WENER, M. H.; WEISS, N. S.; GILMAN, R.; AREVALO, J.; CARRASCO, J.; SEAS, C.; CABALLERO, M.; HOLMES, K.K. Etiologies and manifestations of persistent diarrhea in adults with HIV-1 infection: a case-control study in Lima, Peru. **J. Infect. Dis.**, v. 191, n. 1, p. 11-19, 2005.

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, n. 4, p. 1353-1359, 2001.

CEELEN, L. M.; DECOSTERE, A.; DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK, F. Cytolethal distending toxin generates cell death by inducing a bottleneck in the cell cycle. **Microbiol. Res.**, v. 161, n. 2, p. 109-120, 2006.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food – 10 states, US, 2005. **JAMA**, v. 295, n. 19, p. 2241-2243, 2006.

CEREIJIDO, M.; VALDÉS, J.; SHOSHANI, L.; CONTRERAS, R. B. Role of tight junctions in establishing and maintaining cell polarity. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 60, p. 161-177, 1998.

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, n. 12, p. 6581-6589, 2006.

FUNDAÇÃO INSTITUTO OSWALDO CRUZ. Comissão Nacional sobre Determinantes Sociais da Saúde. **As causas sociais sobre as iniquidades em saúde no Brasil**. Rio de Janeiro, 2008. Disponível em: < <http://www.cndss.fiocruz.br/pdf/home/relatorio.pdf> >. Acesso em: 1 jun. 2009.

COKER, A.O.; ISOKPEHI, R.T.; THOMAS, B.N.; AMISU, K.O.; OBI, C.L. Human campylobacteriosis in developing countries. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, n. 3, p. 237-243, 2002.

COLLINS, E.; GLENNON, M.; HANLEY, S.; MURRAY, A.M.; CORMICAN, M.; SMITH, T.; MAHER, M. Evaluation of PCR/DNA probe colorimetric membrane assay for identification of *Campylobacter spp.* in human stool specimens. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 11, p. 4163-4165, 2001.

CRAIG, A.; FERNANDEZ-REYES, D.; MESRI, M.; McDOWALL, A.; ALTIERI, D.C.; HOGG, N.; NEWBOLD, C. A functional analysis of a natural variant of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1(Kilifi)). **Hum. Mol. Genet.**, v. 9, p. 525-530, 2000.

DALLAL, M.M.S.; KHORRAMIZADEH, M. R.; MOEZARDALAN, K. Occurrence of enteropathogenic bacteria in children in South Tehran. **East. Mediterr. Health J.**, v. 12, n. 6, p. 792-797, 2006.

DEBRUYNE, L.; SAMYN, E.; DeBRANT, E.; VANDENBERG, O.; HEYNDRICKX, M.; VANDAMME, P. Comparative performance of different PCR assays for the identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **Res. Microbiol.**, v. 159, n. 2, p. 88-93, 2008.

DEBRUYNE, L.; ON, S.L.W.; DeBRANT, E.; VANDAMME, P. Novel *Campylobacter lari*-like bacteria from human and molluscs: description of *C. peloridis* sp. nov., *C. lari* subsp. *concheus* subsp. nov. and *C. lari* subsp. *lari* subsp. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 59, Pt. 5, p. 1126-1132, 2009.

DEDIST, 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. 1085-1090, 2003.

DeRYCKE, J.; OSWALD, E. Cytolethal distending toxin (CDT): a bacterial weapon to control host cell proliferation? **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 203, n. 2, p. 141-148, 2001.

DESSEIN, A. J.; COUISSINIER, P.; DEMEURE, C.; RIHET, P.; KOHLSTAEDT, S.; CARNEIRO-CARVALHO, D.; OUATTARA, M.; GOUDOT-CROZEL, V.; DESSEIN, H.; BOURGOIS, A. Environmental, genetic and immunological factors in human resistance to *Schistosoma mansoni*. **Immunol. Invest.**, v. 21, n. 5, p. 423-453, 1992.

DESSEIN, A. J.; HILLAIRE, D.; ELWALI, N. E.; MARQUET, S.; MOHAMED-ALI, Q.; HENRI, S.; ABDELHAMEED, A. A.; SAED, O. K.; MAGZOUN, M. M.; ABEL, L. Severe hepatic fibrosis in *Schistosoma mansoni* infection is controlled by a major locus that is closely linked to the interferon-gamma receptor gene. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 65, n. 3, p. 709-721, 1999.

DESSEIN, A. J.; CHEVILLARD, C.; MARQUET, S.; HENRI, S.; HILLAIRE, D.; DESSEIN, H. Genetics of parasitic infection. **Drug Metab. Dispos.**, v. 29, n. 4, p. 484-488, 2001.

DIAS, T. C.; QUEIROZ, D.M.M.; MENDES, E.N.; PERES, J. N. Chicken carcasses as a source of *Campylobacter jejuni* in Belo Horizonte, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 32, n. 6, p. 414-418, 1990.

DINIZ-SANTOS, D. R.; SANTANA, J. S.; BARRETO, J. R.; ANDRADRE, M. G. M.; SILVA, L. R. Epidemiological and Microbiological Aspects of Acute Bacterial Diarrhea in Children from Salvador, Bahia, Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 9, n. 1, p. 77-83, 2005.

DUIM, B.; VANDAMME, B.; RIGTER, A.; LAEVENS, S.; DIJKSTRA, J. R.; WAGENAAR, J. A. Differentiation of *Campylobacter* species by AFLP fingerprinting. **Microbiology**, v. 147, n. 10, p. 2729-2737, 2001.

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 detection of *Campylobacter jejuni* in stool samples. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 19, n. 10, p. 794-797, 2000.

ENGBERG, J.; ON, S. L.W.; HARRINGTON, C. S.; GERNER-SMIDT, P. Prevalence of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter*, and *Sutterella* spp. in human fecal samples as estimated by a reevaluation of isolation methods for *Campylobacters*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 1, p. 286-291, 2000.

ECHEVERRIA, P.; SETHABUTR, O.; SERICHANTALERGS, O. Modern diagnosis (with molecular tests) of acute infectious diarrhea. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 22, n. 3, p. 661-682, 1993.

FERNÁNDEZ, H.; KAHLER, K.; SALAZAR, R.; RÍOS, M. A. Prevalence of thermotolerant species of *Campylobacter* and their biotypes in children and domestic birds and dogs in southern Chile. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 36, n. 5, p. 433-436, 1994.

FERNÁNDEZ, H.; TRABULSI, L. R. Invasive and enterotoxic properties in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated from humans and animals. **Biol. Res.**, v. 28, n. 3, p. 205-210, 1995.

FERNÁNDEZ, H.; VERA, F.; VILLANUEVA, M. P.; GARCÍA, A. Occurrence of *Campylobacter* species in healthy well-nourished and malnourished children. **Braz. J. Microbiol.**, v. 39, n. 1, p. 56-58, 2008.

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

FERNANDEZ-REYES, D.; CRAIG, A. G.; KYES, S. A.; PESHU, N.; SNOW, R. W.; BERENDT, A. R.; MARSH, K.; NEWBOLD, C. I. A high frequency African coding polymorphism in the N-terminal domain of ICAM-1 predisposing to cerebral malaria in Kenya. **Hum. Mol. Genet.**, v. 6, p. 1357-1360, 1997.

FOUTS, D. E.; MONGODIN, E. F.; MANDRELL, R. E.; MILLER, W. G.; RASKO, D. A.; RAVEL, J.; BRINKAC, L. M.; DeBOY, R. T.; PARKER, C.; DAUGHERTY, S. C.; DODSON, R. J.; SCOTT DURKIN, A.; MADUPU, R.; SULLIVAN, S. A.; SHETTY, J. U.; MOBOLANLE, A. A.; SHVARTSBEYN, A.; SCHATZ, M. C.; BADGER, J. H.; FRASER, C. M.; NELSON, K. E. Major structural differences and novel potential virulence mechanisms from the genomes of multiple *Campylobacter* species. **PLoS Biology**, v. 3, n. 1, p. 72-85, 2005.

FOXMAN, B.; RILEY, L. Molecular epidemiology: focus on infection. **Am. J. Epidemiol.**, v. 153, n. 12, p. 1135-1141, 2001.

FRENCH, N. P.; MIDWINTER, A.; HOLLAND, B.; COLLINS-EMERSON, J.; PATTISON R.; COLLES, F.; CARTER, P. Molecular epidemiology of *Campylobacter jejuni* isolates from wild bird faecal material in children's playgrounds. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, n. 3, p. 779-783, 2009.

FRENZEN, P. D. Economic costs of Guillain-Barré syndrome in the United States. **Neurology**, v. 71, n. 1, p. 21-27, 2008.

FRIED, K.; TARKANYL, K.; PRINZ, G.; BÁN, E. Detection of lactoferrin in feces for differential diagnosis in diarrhea. **Orvosi Hetilap**, v. 143, n. 37, p. 2141-2144, 2002.

FRIEDMAN, C. R.; NEIMANN, J.; WEGENER, H. C.; TAUXE, R. V. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. In:

NACHAMKIN, I.; BLASER, M. J. (Ed.). **Campylobacter**. 2nd ed. Washington, DC: ASM Press, 2000. p. 121-138.

FROST, J. A. Current epidemiological issues in human campylobacteriosis. **Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.**, v. 90, n. S6, p. 85S-95S, 2001.

FROST, J. A.; GILLESPIE, I. A.; O'BRIEN, S. J. Public health implications of *Campylobacter* outbreaks in England and Wales, 1995-9: epidemiological and microbiological investigations. **Epidemiol. Infect.**, v. 128, n. 2, p. 111-118, 2002.

FUKUSHIMA, H.; TSUNOMORI, Y.; SEKI, R. Duplex *Real-Time SYBR Green* PCR assays for detection of 17 species of food- or waterborne pathogens in stools. **J. Clin. Microb.**, v. 41, n. 11, p. 5134-5146, 2003.

GADEWAR, S.; FASANO, A. Current concepts in the evaluation, diagnosis, and management of acute infectious diarrhea. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 5, n. 6, p. 559-565, 2005.

GALLARDO, F.; GASCÓN, J.; RUIZ, J.; CORACHAN, M.; JIMENEZ DE ANTA, M.; VILA, J. *Campylobacter jejuni* as a cause of traveler's diarrhea: clinical features and antimicrobial susceptibility. **J. Travel Med.**, v. 5, n. 1, p. 23-26, 1998.

GE, Z.; SCHAUER, D. B.; FOX, J. G. *In vivo* virulence properties of bacterial cytolethal distending toxin. **Cell. Microbiol.**, v. 10, n. 8, p. 1599-1607, 2008.

GIBREEL, A.; TAYLOR, D. E. Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 58, n. 2, p. 243-255, 2006.

GILBERT, G. L.; JAMES, G. P.; SINTCHENKO, V. Culture shock. Molecular methods for diagnosis of infectious diseases. **Med. J. Aust.**, v. 171, n. 10, p. 536-539, 1999.

GILL, C. J.; LAU, J.; GORBACH, S. L.; HAMER, D. H. Diagnostic accuracy of stool assays for inflammatory bacterial gastroenteritis in developed and resource-poor countries. **Clin. Infect. Dis.**, v. 37, n. 3, p. 365-375, 2003.

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 hypothesis. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, n. 9, p. 937-942, 2002.

GIOFFRÉ, A.; MEICHTRI, L.; ZUMÁRRAGA, M.; RODRÍGUEZ, R.; CATALDI, A. Evaluación del kit QIAamp DNA stool purification para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga en hisopados de materia fecal bovina por PCR. **Rev. Argent. Microbiol.**, v. 36, n. 1, p. 1-5 2004.

GONZALES, Z.; FAGUNDES-NETO, U.; FERNANDEZ, J. H.; WERBA, J.; TRABULSI, L. R. Isolamento de *Campylobacter fetus ssp. jejuni* em crianças normais e com diarreia. **J. Pediatr. (RJ, Brasil)**, v. 57, n. 2, p. 127-129, 1984.

GUERRANT, R. L.; KIRCHHOFF, L.V.; SHIEKDS, D. S.; NATIONS, M. K.; LESLIE, J.; deSOUZA, M. A.; ARAUJO, J. G.; CORREIA, L.L.; SAUER, K.T.; McCLELLAND, K.E. Prospective study of diarrheal illness in northeastern Brazil: patterns of disease, nutritional impact, etiologies, and risk factors. **J. Infect. Dis.**, v. 148, n. 6, p. 986-997, 1983.

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*. **Infect. Immun.**, v. 55, n. 1, p. 2526-2530, 1987.

GUERRANT, R. L.; SCHORLING, J. B.; McAULIFFE, J. F.; de SOUZA, M. A. Diarrhea as a cause and an effect of malnutrition: diarrhoea prevents catch up growth and malnutrition increases diarrhea frequency and duration. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 47, n. 1, pt. 2, p. 28-35, 1992a.

GUERRANT, R. L.; ARAÚJO, V.; SOARES, E.; KOTLOFF, K.; LIMA, A.A.; COOPER, W.H.; LEE, A.G. Measurement of fecal lactoferrin as a marker of fecal leucocytes. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, n. 5, p. 1238-1242, 1992b.

GUERRANT, R. L.; KOSEK, M.; MOORE, S.; LORNTZ, B.; BRANTLEY, R.; LIMA, A. A. Magnitude and impact of diarrheal diseases. **Arch. Med. Res.**, v. 33, n. 4, p. 351-355, 2002.

GUERRANT, R. L.; ORIÁ, R. B.; MOORE, S. R.; ORIÁ, M. O.; LIMA, A. A. Malnutrition as an enteric infectious disease with long-term effects on child development. **Nutr. Rev.**, v. 66, n. 9, p. 487-505, 2008.

GUPTA, R. S. Molecular signatures (unique proteins and conserved indels) that are specific for the epsilon proteobacteria (*Campylobacterales*). **BMC Genomics**, v. 7, n. 167, p. 1-17, 2006.

HAMER, D. H.; GILL, C. J. From the farm to the kitchen table: the negative impact of antimicrobial use in animals on humans. **Nutr. Rev.**, v. 60, n. 8, p. 261-264, 2002.

HANI, E. K.; CHAN, V. L. Expression and characterization of *Campylobacter jejuni* benzoylglycine amidohydrolase (Hippuricase) gene in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 177, n. 9, p. 2396-2402, 1995.

HÄNNINEN, M. L.; HANNULA, M. Spontaneous mutation frequency and emergence of ciprofloxacin resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 60, n. 6, p. 1251-1257, 2007.

HELMS, M.; SIMONSEN, J.; OLSEN, K.E.P.; MOLBAK, K. Adverse health events associated with antimicrobial drug resistance in *Campylobacter* species: a registry-based cohort study. **J. Infect. Dis.**, v. 191, n. 7, p. 1050-1055, 2005.

HEYWOOD, W.; HENDERSON, B.; NAIR, S.P. Cytolethal distending toxin: creating a gap in the cell cycle. **J. Med. Microbiol.**, v. 54, n. 3, p. 207-216, 2005.

HOFREUTER, D.; TSAI, J.; WATSON, R.O.; NOVIK, V.; ALTMAN, B.; BENITEZ, M.; CLARK, C.; PERBOST, C.; JARVIE, T.; DU, L.; GÁLAN, J.E. Unique features of highly pathogenic *Campylobacter jejuni* strain. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 8, p. 4694-4707, 2006.

HOLLAND, J. L.; LOUIE, L.; SIMOR, A. E.; LOUIE, M. PCR detection of *Escherichia coli* O157:H7 directly from stools: evaluation of commercial methods of purifying fecal DNA. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 4108-4113, 2000.

HUICHO, L.; CAMPOS, M.; RIVERA, J.; GUERRANT, R. L. Fecal screening tests in the approach to acute infectious diarrhea: a scientific overview. **Pediatr. J. Infect. Dis.**, v. 15, n. 6, p. 486-494, 1996.

HUICHO, L.; GARAYCOCHEA, V.; UCHIMA, N.; ZERPA, R.; GUERRANT, R. L. Fecal lactoferrin, fecal leukocytes and occult blood in the diagnostic approach to childhood invasive diarrhea. **Pediatr. J. Infect. Dis.**, v. 16, n. 7, p. 644-647, 1997.

HUILAN, S.; ZHEN, L. G.; MATHAN, M. M.; MATHEW, M. M.; OLARTE, J.; ESPEJO, R.; KHIN, M. U.; GHAFOR, M. A.; KHAN, M. A.; SAMI, Z.; SUTTON, R. G. Etiology of acute diarrhoea among children in developing countries: a multicentre study in five countries. **Bull. World Health Org.**, v. 69, n. 5, p. 549-555, 1991.

INGLIS, G. D.; KALISCHUK, L.D. Use of PCR for direct detection of *Campylobacter* species in bovine feces. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, n. 6, p. 3435–3447, 2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Disponível em:<<http://biblioteca.ibge.gov.br-fozdeiguazu.pdf>>. Acesso em: 2 out. 2008a.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Disponível em:<<http://biblioteca.ibge.gov.br-fozdeiguazu.pdf>>. Acesso em: 2 out. 2008b.

INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY. Disponível em:<<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/5/1/32.html>>. 2 Nov. 2008.

J. CRAIG VENTER INSTITUTE. Microbial Sequencing Center. Disponível em:<<http://msc.jcvi.org/campy/index.shtml>>. Acesso em: 2 Oct. 2008.

JENKIN, G. A.; TEE, W. *Campylobacter upsaliensis*-associated diarrhea in human immunodeficiency virus-infected patients. **Clin. Infect. Dis.**, v. 27, n. 4, p. 816-821, 1998.

JENSEN, A.N.; ANDERSEN, M.T.; DALSGAARD, A.; BAGGESEN, D. L.; NIELSEN, E. M. Development of real-time PCR and hybridization methods for detection and identification of thermophilic *Campylobacter* spp. in pig faecal samples. **J. Appl. Microbiol.**, v. 99, n. 2, p. 292-300, 2005.

JEON, B.; MURAOKA, W.; SCUPHAM, A.; ZHANG, Q. Roles of lipooligosaccharide and capsular polysaccharide in antimicrobial resistance and natural transformation of *Campylobacter jejuni*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 63, p. 462-468, 2009.

JIMENEZ, S. G.; HEINE, R. G.; WARD, P. B.; ROBINS-BROWNE, R. M. *Campylobacter upsaliensis* gastroenteritis in childhood. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 18, n. 11, p. 988-992, 1999.

JOHNSON, W. M.; LIOR, H. A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Campylobacter* spp. **Microb. Pathog.**, v. 4, n. 2, p. 115-126, 1988.

KAKAI, R.; WALMOLE, I. A.; BWAYO, J. J.; NDINYA-ACHOLA, J. O. Enteric pathogens in malnourished children with diarrhoea. **East Afr. Med. J.**, v. 72, n. 5, p. 288-289, 1995.

KANE, S.V.; SANDBORN, W. J.; RUFO, P. A.; ZHOLUDEV, A.; BOONE, J.; LYERLY, D.; CAMILLERI, M.; HANAUER, S. B. Fecal lactoferrin is a sensitive and specific marker in identifying intestinal inflammation. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 98, n. 6, p. 1309-1314, 2003.

KANIPES, M. I.; HOLDER, L. C.; CORCORAN, A. T.; MORAN, A. P.; GUERRY, P. A deep-rough mutant of *Campylobacter jejuni* 81-176 is non-invasive for intestinal epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 4, p. 2452-2455, 2004.

KARLYSHEV, A.V.; KETLEY, J. M.; WREN, B. W. The *Campylobacter jejuni* glycome. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 29, n. 2, p. 377-390, 2005.

KNIGHT, J. C.; UDALOVA, I.; HILL, A.V.; GREENWOOD, B. M.; PESHU, N.; MARSH, K.; KWIATKOWSKI, D. A polymorphism that affects OCT-1 binding to the TNF promoter region is associated with severe malaria. **Nat. Genet.**, v. 22, p. 145-150, 1999.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WASHINGTON Jr., C. W. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 5. ed. São Paulo: Ed. MEDSI, 2001.

KOPECKO, D. J.; HU, L.; ZAAL, K. J. M. *Campylobacter jejuni* – microtubule-dependent invasion. **Trends Microbiol.**, v. 9, n. 8, p. 389-396, 2001.

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 Org.**, v. 81, n. 3, p. 197-204, 2003.

KOWNHAR, H.; SHANKAR, E. M.; RAJAN, R.; VENGATESAN, A.; RAO, U. A. Prevalence of *Campylobacter jejuni* and enteric bacterial pathogens among hospitalized HIV infected versus non-HIV infected patients with diarrhoea in southern India. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 39, n. 10, p. 862-866, 2007.

KROEGER, K. M.; CARVILLE, K. S.; ABRAHAM, L. J. The -308 tumor necrosis factor alpha promoter polymorphism effects transcription. **Mol. Immunol.**, v. 34, p. 391-399, 1997.

KULKARNI, S. P.; LEVER, S.; LOGAN, J. M.; LAWSON, A.J., STANLEY, J., SHAFI, M.S. Detection of *Campylobacter* species: a comparison of culture and polymerase chain reaction based methods. **J. Clin. Pathol.**, v. 55, n. 10, p. 749-753, 2002.

LABARCA, J. A.; STURGEON, J.; BORENSTEIN, L.; SALEM, N.; HARVEY, S. M.; LEHNKERING, E.; REPORTER, R.; MASCOLA, L. *Campylobacter upsaliensis*: another pathogen for consideration in the Unites States. **Clin. Infect. Dis.**, v. 34, n. 11, p. 1541, 2002.

LaGIER, M. J.; JOSEPH, L. A.; PASSARETTI, T. V.; MUSSER, K. A.; CIRINO, N. M. A real-time multiplexed PCR assay for detection and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **Mol. Cell. Probes**, v. 18, n. 4, p. 275-282, 2004.

LaGIER, M.; PRATT, E.; THREADGILL, D. **Scanning electron micrograph of *Campylobacter jejuni***. Disponível em:<

<http://www.microbelibrary.org/asmonly/details.asp?id=2734&Lang=>>. Acesso em: 2 June 2008.

LAKE, R. J.; BAKER, M. G.; GARRET, N.; SCOTT, W. G.; SCOTT, H. M. Estimated number of cases of foodborne infectious diseases in New Zealand. **N. Z. Med. J.**, v. 113, n. 1113, p. 278-281, 2000.

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, n. 8, p. 3390-3398, 2008.

LARA-TEJERO, M.; GÁLAN, J. E. CdtA, CdtB and CdtC form a tripartide complex that is required for cytolethal distending toxin activity. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 7, p. 4358-4365, 2001.

LASTOVICA, A. J.; SKIRROW, M. B. Clinical significance of *Campylobacter* and related species other than *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. In: NACHAMKIN, I.; BLASER, M. J. (Ed.). *Campylobacter*. 2nd ed. Washington DC: ASM Press, 2000. p. 89-120.

.LASTOVICA, A. J.; LEROUX, R. E. Efficient isolation of Campylobacteriaceae from stools. *J. Clin. Microbiol.*, v. 38, n. 7, p. 2798-2799, 2000.

LAURIA-FILGUEIRAS, A. L.; HOFER, E. Occurrence of thermophilic *Campylobacter* in different points of a sewage treatment station in Rio de Janeiro, RJ. **Rev. Microbiol. Soc. Bras. Microbiol.**, v. 20, n. 8, p. 303-308, 1989.

LAURIA-FILGUEIRAS, A. L.; HOFER, E. Diversity of *Campylobacter* isolates from three activated sludge systems. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 3, p. 295-298, 1998.

LAWSON, A. J.; LINTON, D.; STANLEY, J.; OWEN, R. J. Polymerase chain reaction detection and speciation of *C. upsaliensis* and *C. helveticus* in human faeces and comparison with culture techniques. **J. Appl. Microbiol.**, v. 83, n. 3, p. 375-380, 1997.

LAWSON, A. J.; LOGAN, J. M.; O'NEILL, G. L.; DESAI, M.; STANLEY, J. Large-scale survey of *Campylobacter* species in human gastroenteritis by PCR and PCR-Enzyme-linked immunoabsorbent assay. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, n. 12, p. 3860-3864, 1999.

LEVESQUE, M. C.; HOBBS, M. R.; ANSTEY, N. M.; VAUGHN, T. N.; CHANCELLOR, J. A.; POLE, A.; PERKINS, D. J.; MISUKONIS, M. A.; CHANOCK, S. J.; GRANGER, D. L.; WEINBERG, J. B. Nitric oxide synthase type 2 promoter polymorphisms, nitric oxide production, and disease severity in Tanzania children with malaria. **J. Infect. Dis.**, v. 180, p. 1994-2002, 1999.

LEVINE, M. M. Enteric infections and the vaccines to counter them: future directions. **Vaccine**, v. 24, n. 18, p. 3865-3873, 2006.

LI, M.; GONG, J.; COTTRILL, C.; YU, H.; DE LANGE, C.; BURTON, J.; TOPP, E. Evaluation of *QIAamp® DNA Stool Mini Kit* for ecological studies of gut microbiota. **J. Microbiol. Methods**, v. 54, n. 1, p. 13-20, 2003.

LIMA, A. A.; FANG, G.; SCHORLING, J. B.; DeALBUQUERQUE, L.; McAULIFFE, J. F.; MOTA, S.; LEITE, R.; GUERRANT, R. L. Persistent diarrhea in Northeast Brazil: etiologies and interactions with malnutrition. **Acta Paediatr.**, v. 81, Suppl. 381, p. 39-44, 1992.

LIMA, A. A.; GUERRANT, R. L. Persistent diarrhea in children: epidemiology, risk factors, pathophysiology, nutritional impact, and management. **Epidemiol. Rev.**, v. 14, p. 222-242, 1992.

LIMA, A. A.; MOORE, S. R.; BARBOZA, M. S.; SOARES, A. M.; SCHLEUPNER, M. A.; NEWMAN, R. D.; SEARS, C. L.; NATARO, J. P.; FEDORKO, D. P.; WUHIB, T.; SCHORLING, J. B.; GUERRANT, R. L. Persistent diarrhea signals a critical period of increased diarrhea burdens and nutritional shortfalls: a prospective cohort study among children in northeastern Brazil. **J. Infect. Dis.**, v. 181, n. 5, p. 1643-1651, 2000.

LIMA, A. A.; GUERRANT, R. L. Strategies to reduce the devastating costs of early childhood diarrhea and its potential long-term impact: imperatives that we can no longer afford to ignore (Editorial Commentary). **Clin. Infect. Dis.**, v. 38, n. 11, p. 1552-1554, 2004.

LIMA, I. F. N. **Genes codificadores de virulência, inflamação e avaliação nutricional da infecção intestinal associada com *Escherichia coli* enteroagregativa em crianças de Fortaleza, Ceará, Brasil.** 2008. 197 f. Tese (Doutorado) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

LINTON, D.; LAWSON, A. J.; OWEN, R. J.; STANLEY, J. PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, n. 10, p. 2568-2572, 1997.

LLOYDE-EVANS, N.; DRASAR, B. S.; TOMKINS, A. M. A comparison of the prevalence of *Campylobacter*, *Shigellae* and *Salmonellae* in faeces of malnourished and well nourished children in the Gambia and Northern Nigeria. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 77, n. 2, p. 245-247, 1983.

LOGAN, J. M.; BURNENS, A.; LINTON, D.; LAWSON, A. J.; STANLEY, J. *Campylobacter lanienae* sp. nov., a new species isolated from workers in an abattoir. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 50, Pt. 2, p. 865-872, 2000.

LORNTZ, B.; SOARES, A. M.; PINKERTIN, R.; GANSNEDER, B.; BOVBJERG, V. E.; GUYATT, H.; LIMA, A. M.; GUERRANT, R. L. Early childhood diarrhea predicts impaired school performance. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 25, n. 6, p. 513-520, 2006.

LOUIE, M.; LOUIE, L.; SIMOR, A.E. The role of DNA amplification technology in the diagnosis of infectious diseases. **Can. Med. Assoc. J.**, v. 163, n. 3, p. 301-309, 2000.

LOWE, A. M.; YANSOUNI, C. P.; BEHR, M. A. Causality and gastrointestinal infections: Koch, Hill, and Crohn's. **Lancet Infect. Dis.**, v. 8, n. 11, p. 720-726, 2008.

LUND, M.; WEDDERKOPP, A.; WAINO, M.; NORDENTOFT, S.; BANG, D. D.; PEDERSON, K.; MADSEN, M. Evaluation of PCR detection of *Campylobacter* in a national broiler surveillance programme in Denmark. **J. Appl. Microbiol.**, v. 94, n. 5, p. 929-935, 2003.

LUNN, P. G. The impact of infection and nutrition on gut function and growth in childhood. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 59, n. 1, p. 147-154, 2000.

MADARA, J. M. Regulation of movement of solutes across tight junctions. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 60, p. 143-159, 1998.

MATA, L. Diarrheal disease as a cause of malnutrition. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 47, n. 1, Pt. 2, p. 16-27, 1992.

MATSHEKA, M. I.; LASTOVICA, A. J.; ELISHA, B. G. Molecular identification of *Campylobacter concisus*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 10, p. 3684-3689, 2001.

McAULIFFE, M. I. L. T. **Prevalência de enteropatógenos em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV): enfoque na *Escherichia coli* enteroagregativa (EAaggEC).** 1998. 113 f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1998.

McGUIRE, W.; ALLSOPP, A.V.; GREENWOOD, B. M. ; KWIATKOWSKI, D. Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. **Nature**, v. 371, p. 508-510, 1994.

McORIST, A. L.; JACKSON, M.; BIRD, A.R. A comparison of five methods for extraction of bacterial DNA from human faecal samples. **J. Microbiol. Methods**, v. 50, n. 2, p. 131-139, 2002.

MENDES, E. N.; QUEIROZ, D. M. M.; CISALPINO, E. O.; PERES, J. N.; PENNA, F. J.; FIGUEIREDO-FILHO, P. P. Occurrence of *Campylobacter jejuni* in children with or without diarrhea, in Belo Horizonte. **Rev. Microbiol. Soc. Bras. Med.**, v. 181, n. 1, p. 25-30, 1987.

METHERELL, L. A.; LOGAN, J. M. J.; STANLEY, J. PCR-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for detection and identification of *Campylobacter* species: application to isolates and stool samples. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, n. 2, p. 433-435, 1999.

MITIC, L. L.; ANDERSON, J. M. Molecular architecture of tight junctions. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 60, p. 121-142, 1998.

MOHRAN, Z. S.; ARTHUR, R. R.; OYOFO, B. A.; PERUSKI, L. F.; WASFY, M. O.; ISMAIL, T. F.; MURPHY, J. R. Differentiation of *Campylobacter* isolates on the basis of sensitivity to boiling in water as measured by PCR-detectable DNA. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, n. 1, p. 363-365, 1998.

MONKEMÜLLER, K. E.; WILCOX, C. M. Gastrointestinal infections in children. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 17, n. 1, p. 35-39, 2001.

MOLINA, J.; CASIN, I.; HAUSFATER, P.; GIRETTI, E.; WELKER, Y.; DECAZES, J.; GARRAIT, V.; LAGRANGE, P.; MODAI, J. *Campylobacter* infections in HIV-infected patients: clinical and bacteriological features. **AIDS**, v. 9, n. 8, p. 881-885, 1995.

MONTEIRO, L.; GRAS, N.; VIDAL, R.; CABRITA, J.; MÉGRAUD, F. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human feces by PCR: stability and removal of inhibitors. **J. Microbiol. Methods**, v. 45, n. 2, p. 89-94, 2001.

MOORE, S. R.; LIMA, A. A.; SCHORLING, J. B.; BARBOZA, M. S.; SOARES, A. M.; GUERRANT, R. L. Changes over time in the epidemiology of diarrhea and malnutrition among children in an urban Brazilian shantytown, 1989 to 1996. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 4, n. 4, p. 179-186, 2000.

MOORE, J. E.; CORCORAN, D.; DOOLEY, J. S. G.; FANNING, S.; LUCEY, B.; MATSUDA, M.; MCDOWELL, D. A.; MÉGRAUD, F.; MILLAR, C. B.; O'MAHONY, R.; O'RIORDAN, L.; O'ROURKE, M.; RAO, J. R.; ROONEY, P. J.; SAILS, A.; WHYTE, P. *Campylobacter*. **Vet. Res.**, v. 36, n. 3, p. 351-382, 2005.

NACHAMKIN, I. Chronic effects of *Campylobacter* infection. **Microbes Infect.**, v. 4 n. 4, p. 399-403, 2002.

NAKARI, U. M.; PUHAKKA, A.; SIITONEN, A. Correct identification and discrimination between *Campylobacter jejuni* and *C. coli* by standardized hippurate test and species-specific polymerase chain reaction. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 27, p. 513-518, 2008.

NELSON, J. M.; SMITH, K. E.; VUGIA, D. J.; RABATSKY-HER, T.; SEGLER, S. D.; KASSENBERG, H. D.; ZANSKY, S. M.; JOYCE, K.; MARANO, N.; HOEKSTRA, R. M.;

ANGULO, F. J. Prolonged diarrhea due to ciprofloxacin-resistant *Campylobacter* infection. **J. Infect. Dis.**, v.190, n. 6, p. 1150–1157, 2004.

NIEHAUS, M. D.; MOORE, S. R.; PATRICK, P. D.; DERR, L. L.; LORNTZ, B.; LIMA, A. A.; GUERRANT, R. L. Early childhood diarrhea is associated with diminished cognitive function 4 to 7 years later in children in northeast Brazilian shantytown. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 66, n. 5, p. 590-593, 2002.

NISSEN, M. D.; SLOOTS, T. D. Rapid diagnosis in pediatric infections diseases: the past, the present and the future. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 21, n. 6, p. 605-612, 2002.

OBERHELMAN, R. A.; TAYLOR, D. N. *Campylobacter* infection in developing countries. In: NACHAMKIN, I.; BLASER, M. J. (Ed.). **Campylobacter**. 2nd ed. Washington DC: ASM Press, 2000. p. 139-154.

OHARA, M.; OSWALD, E.; SUGAI, M. Cytolethal distending toxin: a bacterial bullet targeted to nucleus. **J. Biochem.**, v. 136, n. 4, p. 409-413, 2004.

ON, S. L.W. Identification methods for campylobacters, helicobacters, and related organisms. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 9, n. 3, p. 405-422, 1996.

ON, S. L.W. Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns. **J. Appl. Microbiol.**, v. 30, p. 1S-15S, 2001.

OYOFO, B. A.; THORNTON, S. A.; BURR, D. H.; TRUST, T. J.; PAVLOVSKIS, O. R.; GUERRY, P. Specific detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, n. 10, p. 2613-2619, 1992.

PADILLA, G.; COSTA, S. O. P. Genética Bacteriana. In: TRABULSI, L. D.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p. 37-49.

PARKHILL, J.; WREN, B. W.; MUNGALL, K.; KETLEY, J. M.; CHURCHER, C.; BASHAM, C.; 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, n. 6770, p. 665-668, 2000.

- PATRICK, P. D.; ORIÁ, R. B.; MADHAVAN, V.; PINKERTON, R. C.; LORNTZ, B.; LIMA, A. A.; GUERRANT, R. L. Limitations in verbal fluency following heavy burdens of early childhood diarrhea in Brazilian shantytown children. **Child Neuropsychol.**, v. 11, n. 3, p. 233-244, 2005.
- PERERA, V. N.; NACHAMKIN, I.; UNG, H.; PATTERSON, J. H.; McCONVILLE, M. J.; COLOE, P. J.; FRY, B. N. Molecular mimicry in *Campylobacter jejuni*: role of the lipooligosaccharide in inducing anti-ganglioside antibodies. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 50, n. 1, p. 27-36, 2007.
- PERSSON, S.; OLSEN, K. E. P. Multiplex PCR identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples. **J. Med. Microbiol.**, v. 54, n. 11, p. 1043-1047, 2005.
- PETRI, W.A.; MILLER, M.; BINDER, H. J.; LEVINE, M. M.; DILLINGHAM, R.; GUERRANT, R. L. Enteric infectious, diarrhea, and their impact on function and development. **J. Clin. Invest.**, v. 118, n. 4, p. 1277-1290, 2008.
- PICKETT, C. L.; PESCI, E. C.; COTTLE, D. L.; RUSSEL, G.; ERDEM, A. N.; ZEYTIN, H. Prevalence of cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter sp. cdtB* genes. **Infect. Immun.**, v. 64, n. 6, p. 2070-2078, 1996.
- PICKETT, C. L.; WHITEHOUSE, C. A. The cytolethal distending toxin family. **Trends Microbiol.**, v. 7, n. 7, p. 292-297, 1999.
- PODEWILS, L. J.; MINTZ, E. D.; NATARO, J. P.; PARASHAR, U. D. Acute, infectious diarrhea among children in developing countries. **Semin. Pediatr. Infect. Dis.**, v. 15, n. 3, p. 155-168, 2004.
- POLY, F.; READ, T.; TRIBBLE, D. R.; BAQAR, S.; LORENZO, M.; GUERRY, P. Genoma sequence of clinical isolate of *Campylobacter jejuni* from Thailand. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 7, p. 3425-3433, 2007.
- POLY, F.; GUERRY, P. Pathogenesis of *Campylobacter*. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 24, n. 1, p. 27-31, 2008.
- PRASAD, K. N.; DIXIT, A. K.; AYYAGARI, A. *Campylobacter* species associated with diarrhoea in patients from a tertiary care centre of north India. **Indian J. Med. Res.**, v. 114, p. 12-17, 2001.

PURDY, D.; BUSWELL, C. M.; HODGSON, A. E.; McALPINE, C.; HENDERSON, I.; LEACH, S. A. Characterisation of cytolethal distending toxin (CDT) mutants of *Campylobacter jejuni*. **J. Med. Microbiol.**, v. 49, n. 5, p. 473-479, 2000.

QADRI, S. M. Infectious diarrhea. Managing a misery that is still worldwide. **Postgrad. Med.**, v. 88, n. 5, p. 169-175, 1990.

QIAGEN. **QIAamp® DNA Stool Handbook**. 2nd ed. 2007. Disponível em: <<http://www1.qiagen.com/literature/Default.aspx?Term=stool+dna+mini-kit&Language=EN&LiteratureType=4%3b8%3b9%3b10&ProductCategory=0>>. Acesso em: 3 Dec. 2007.

REMEL. **ProSpect® Campylobacter Microplate Assay – Instruction's Guide**. Disponível em: <<http://www.oxidshop.com/scripts/wgate/zqc4233584ed5/~fINlc3Npb249QzExOm94dWtzaHBsOjAwMDAuMDE4Yi44NmY1YjU0NiZ+aHR0cF9jb250ZW50X2NoYXJzZXQ9aXNvLTg4NTktMSZ+U3RhdGU9OTE5OS4wMDIuMDIuMDU=?qcwww-selcharg=D&qcwww-selmatnr=++++2&qcwww-selwerks=REM&qcwww-kunnr=106343&~okcode=CERT>>. Acesso em: 1 Dec.2008.

RICE, A. L.; SACCO, L.; HYDER, A.; BLACK, R.E. Malnutrition as an underlying cause of childhood deaths associated with infectious diseases in developing countries. **Bull. World Health Org.**, v. 78, n. 10, p. 1207-1221, 2000.

ROBINSON, R. A.; PUGH, R. N. Dogs, zoonoses and immunosuppression. **J. R. Soc. Promot. Health**, v. 122, n. 2, p. 95-98, 2002.

RUIZ-PELÁEZ, J. G.; MATTAR, S. Accuracy of fecal lactoferrin and other stool tests for diagnosis of invasive diarrhea at a Colombian pediatric hospital. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 18, n. 4, p. 342-346, 1999.

RUSSEL, R. G.; BLASER, M. J.; SARMIENTO, J. I.; FOX, J. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in *Macaca nemestrina*. **Infect. Immun.**, v. 57, n. 5, p. 1438-1444, 1989.

SAMIE, A.; OBI, C. L.; BARRETT, L. J.; POWELL, S. M.; GUERRANT, R. L. Prevalence of *Campylobacter* species, *Helicobacter pylori* and *Arcobacter* species in stool sample from the Venda region, Limpopo, South Africa: studies using molecular diagnostic methods. **J. Infect.**, v. 54, n. 6, p. 558-566, 2007a.

SAMIE, A.; OBI, C. L.; DILLINGHAM, R.; PINKERTON, R. C.; GUERRANT, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli* in Venda, South Africa: Distribution of virulence-related genes by multiplex polymerase chain reaction in stool samples of human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative individuals and primary school children. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 77, n. 1, p. 142-150, 2007b.

SAMUEL, M. C.; VUGIA, D. J.; SHALLOW, S.; MARCUS, R.; SEGLER, S.; MCGIVERN, T.; KASSENBOG, H.; REILLY, K.; KENNEDY, M.; ANGULO, F.; TAUXE, R. V. Epidemiology of sporadic *Campylobacter* infection in the United States and declining trend in incidence, FoodNet 1996-1999. **Clin. Infect. Dis.**, v. 38, Suppl. 3, p. S165-S174, 2004.

SANTOS, D. N.; ASSIS, A. M. O.; BASTOS, A. C. S.; SANTOS, L. M.; SANTOS, C. A. S. T.; STRINA, A.; PRADO, M. S.; ALMEIDA-FILHO, N. M.; RODRIGUES, L. C.; BARRETO, M. L. Determinants of cognitive function in childhood: a cohort study in a middle income context. **BMC Public Health**, v. 8, n. 202, p. 1-15, 2008.

SICINSCHI, L.; CORREA, P.; BRAVO, L. E.; SCHNEIDER, B. G. Detection and typing of *Helicobacter pylori cagA/vacA* genes by radioactive, one-step polymerase chain reaction in stool samples from children. **J. Microbiol. Methods**, v. 52, n. 2, p. 197-207, 2003.

SLATER, E. R.; OWEN, R. J. Restriction fragment length polymorphism analysis shows that the hippuricase gene of *Campylobacter jejuni* is highly conserved. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 25, n. 4, p. 274-278, 1997.

SMITH, S. I.; OTUONYE, M. N.; OMONIGBEHIN, E. A.; NIKOTH, A.; OKANY, C. C.; ARIYO, F.; BADARU, O. S.; AJAYI, A.; COKER, A. O. Prevalence of *Campylobacter* species among HIV/AIDS patients in Nigeria. **Br. J. Biomed. Sci.**, v. 59, n. 3, p. 162-163, 2002.

SMITH, A.; REACHER, M.; SMERDON, W.; ADAK, G. K.; NICHOLS, G.; CHALMERS, R. M. Outbreaks of waterborne infectious intestinal disease in England and Wales, 1992-2003. **Epidemiol. Infect.**, v. 134, n. 6, p. 1141-1149, 2006.

SNELLING, W. J.; MATSUDA, M.; MOORE, J. E.; DOOLEY, J. S. G. Under the microscope: *Campylobacter jejuni*. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 41, n. 4, p. 297-302, 2005.

SNIJDERS, F.; KULIPER, E. F.; de WEVER, B.; van der HOEK, L.; DANNER, S. A.; DANKERT, J. Prevalence of *Campylobacter*-associated diarrhea among patients infected with human immunodeficiency virus. **Clin. Infect. Dis.**, v. 24, n. 6, p. 1107-1113, 1997.

SKIRROW, M. B. John McFadyean and the centenary of first isolation of *Campylobacter* species. **Clin. Infect. Dis.**, v.43, n. 9, p. 1213-1217, 2006.

SOROKIN, M.; USEIN, C. R.; IRIMIA, M.; DAMIAN, M. A laboratory-based survey of *Campylobacter* infections in Prahova County. **Roum. Arch. Microbiol. Immunol.**, v. 66, n. 3/4, p. 85-89, 2007.

STEELE, M.; MARCONE, M.; GYLES, C.; CHAN, V. L.; ODUMERU, J. Enzymatic activity of *Campylobacter jejuni* hippurate hydrolase. **Protein Eng. Des. Sel.**, v. 19, n. 1, p. 17-25, 2006.

TAM, C. C.; O'BRIEN, S. J.; ADAK, G. K.; MEAKINS, S. M.; FROST, A. *Campylobacter coli* – an important foodborne pathogen. **J. Infect.**, v. 47, n. 1, p. 28-32, 2003.

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. 1485-1488, 2008.

TECHLAB. NCCLS Format. Disponível em: <http://www.techlab.com/product_details/t5009.htm>. Acesso em: 2 May 2009.

THAPAR, N.; SANDERSON, I. R. Diarrhoea in children: an interface between developing and developed countries. **Lancet**, v. 363, n. 9409, p. 641-653, 2004.

THE CAMPYLOBACTER SENTINEL SURVEILLANCE SCHEME COLLABORATORS. Ciprofloxacin resistance in *Campylobacter jejuni*: case-case analysis as a tool for elucidating risks at home and abroad. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 50, n. 4, p. 561-568, 2002.

TOLCIN, R.; LaSALVIA, M. M.; KIRKLEY, B. A.; VETTER, E. A.; FRANKLIN, R.; COCKERILL, I. I. I.; PROCOP, G. W. Evaluation of the *Alexon-Trend ProSpect* *Campylobacter* microplate assay. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 10, p. 3853-3855, 2000.

TOPOROVSKI, M. S.; MIMICA, I. M.; CHIEFFI, P. P.; PASCHOALOTTI, M. A.; DIAS, A. M. G.; SILVA, C. B. Diarréia aguda em crianças menores de 3 anos de idade: recuperação de enteropatógenos nas amostras fecais de pacientes comparada à de grupo controle. **J. Pediatr. (RJ, Brasil)**, v. 75, n. 2, p. 97-104, 1999.

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, n. 6, p. 838-843, 2005.

VANDAMME, P. Taxonomy of the family Campylobacteriaceae. In: NACHAMKIN, I.; BLASER, M. J. (Ed.). **Campylobacter**. 2nd ed. Washington DC: ASM Press, 2000. p. 3-26.

VANDENBERG, N.; Van OORSCHOT, R. A. H. Extraction of human nuclear DNA from feces samples using the QIAamp DNA stool mini kit. **J. Forensic Sci.**, v. 47, n. 5, p. 993-995, 2002.

VANETTERIJCK, R.; BREYNAERT, J.; REVETS, H.; DEVREKER, T.; VANDENPLAS, Y.; VANDAMME, P.; LAUWERS, S. Isolation of *Campylobacter concisus* from feces of children with and without diarrhea. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n. 9, p. 2304-2306, 1996.

VANGERWE, T.; MIFLIN, J. K.; TEMPLETON, J. M.; BOUMA, A.; WAGENAAR, J. A.; JACOBS-REITSMA, W. F.; STEGEMAN, A.; KLINKENBER, G. D. Quantifying transmission of *Campylobacter jejuni* in commercial broiler flocks. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, n. 3, p. 625-628, 2009.

VANNIASINKAM, T.; LANSER, J. A.; BARTON, M. D. PCR detection of *Campylobacter spp.* in clinical specimens. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 28, n. 1, p. 52-56, 1999.

VENKATARAMAN, S.; RAMAKRISHNA, B. S.; KANG, G.; RAJAN, D. P.; MATHAN, V.I. Faecal lactoferrin as a predictor of positive faecal culture in south Indian children with acute diarrhoea. **Ann. Trop. Paediatr.**, v. 23, n. 1, p. 9-13, 2003.

VICTORA, C. G.; BRYCE, J.; FONTAINE, O.; MONASCH, R. Reducing deaths from diarrhoea through oral rehydration therapy. **Bull. World Health Org.**, v. 78, n. 10, p. 1246-1255, 2000.

VOLOKHOV, D.; CHIZHIKOV, V.; CHUMAKOV, K.; RASOOLY, A. Microarray-based identification of thermophilic *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari* and *C. upsaliensis*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 9, p. 4071-4080, 2003.

YAMAZAKI-MATSUNE, W.; TAGUCHI, M.; SETO, K.; KAWAHARA, R.; KAWATSU, K.; KUMEDA, Y.; KITAZATO, M.; NUKINA, M.; MISAWA, N.; TSUKAMOTO, T. Development of a multiplex PCR assay for identification of *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari* and *Campylobacter upsaliensis*. **J. Med. Microbiol.**, v. 56, pt. 11, p. 1467-1473, 2007.

YOUNG, K. T.; DAVIS, L. M.; DiRITA, V. J. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 5, n. 9, p. 665-679, 2007.

YUKI, N.; ODAKA, M. Ganglioside mimicry as a cause of Guillain-Barré syndrome. **Curr. Opin. Neurol.**, v. 18, n. 5, p. 557-561, 2005.

WAEGEL, A.; NACHAMKIN, I. Detection and molecular typing of *Campylobacter jejuni* in fecal samples by polymerase chain reaction. **Mol. Cell. Probes**, v.10, n. 2, p. 75-80, 1996.

WALKER, R. I. *Campylobacter* vaccine development: a key to controlling enteric diseases. **Expert Opin. Invest. Drugs**, v. 8, n. 2, p. 107-113, 1999.

WALKER, R. I. Considerations for the development of whole cell bacterial vaccines to prevent diarrheal diseases in children in developing countries. **Vaccine**, v. 23, n. 26, p. 3369-3385, 2005.

WALKER, S. P.; WACHS, T. D.; GARDNER, J. M.; LOZOFF, B.; WASSERMAN, G. A.; POLITT, E.; CARTER, J. A. Child development: risk factors for adverse outcomes in developing countries. **Lancet**, v. 369, n. 9556, p. 145-157, 2007.

WALLIS, M. R. The pathogenesis of *Campylobacter jejuni*. **Br. J. Biomed. Sci.**, v. 51, n. 1, p. 54-64, 1994.

WASSENAAR, T. M. Toxin production by *Campylobacter spp.* **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 10, n. 3, p. 466-476, 1997.

WEISSTAUB, G.; ARAYA, M. Acute malnutrition in Latin America: the challenge of ending avoidable deaths. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 47, Suppl. 1, p. S10-14, 2008.

WELLCOME TRUST SANGER INSTITUTE. Disponível em: <http://www.sanger.ac.uk/Projects/C_jejuni/>. Acesso em: 2 Dec. 2008.

WILLIAMS-BLANGERO, S.; MCGARVEY, S. T.; SUBEDI, J.; WIEST, P. M.; UPADHAYAY, R. P.; JHA, B.; OLDS, J. R.; GUANLING, W.; BLANGERO, J. Genetic component to susceptibility to *Trichuris trichiura*: evidence from two Asian populations. **Proc. Genet. Epidemiol.**, v. 22, n. 3, p. 254-264, 2002a.

WILLIAMS-BLANGERO, S.; VANDEBERG, J. L.; SUBEDI, J.; AIVALIOTIS, M. J.; RAI, D. R.; UPADHAYAY, R. P.; JHA, B.; BLANGERO, J. Genes on chromosomes 1 and 13 have significant effects on *Ascaris* infection. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 99, n. 88, p. 5533-5538, 2002b.

WILLIAMS-BLANGERO, S.; VANDEBERG, J. L.; SUBEDI, J.; JHA, B.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; BLANGERO, J. Localization of multiple quantitative trait loci influencing susceptibility to infection with *Ascaris lumbricoides*. **J. Infect. Dis.**, v. 197, n. 1, p. 66-71, 2008.

WINER, J.B. Guillain Barré syndrome. **J. Clin. Pathol. Mol. Pathol.**, v. 54, n. 6, p. 381-385, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Removing obstacles to healthy development: Report on Infectious Diseases**. Geneva, 1999. (Report No: WHO/CDS/99.1). Disponível em: <<http://www.who.int/infectious-diseases-report/pages/textonly.html>>. Acesso em: 2 Sept. 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Department of Communicable Disease Surveillance and Response. **The Increasing Incidence of Human Campylobacteriosis: Report and Proceedings of a WHO Consultation of Experts**. Geneva, 2001. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/hq/2001/WHO_CDS_CSRAPH_2001.7.pdf>. 2 Oct. 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The global burden of disease: 2004 update**. Geneva, 2004. Disponível em: <http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_full.pdf>. Acesso em: 3 Dec. 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Health Topics**. Geneva, 2008. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/diarrhoea/en/>>. Acesso em: 3 Dec. 2008.

WRIGHT, P. A.; WYNFORD-THOMAS, D. The polymerase chain reaction: miracle or mirage? A critical review of its uses and limitations in diagnosis and research. **J. Pathol.**, v. 162, n. 2, p. 99-117, 1990.

ZILBAUER, M.; DORREL, N.; WREN, B. W.; BAJAJ-ELLIOTT, M. *Campylobacter jejuni*-mediated disease pathogenesis: an update. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 102, n. 2, p. 123-129, 2008.

ANEXO A – Parecer CONEP



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

PARECER Nº 760/2006

Registro CONEP: 12729 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Registro CEP: 238/05 Processo nº 25000.017262/2006-38
 Projeto de Pesquisa: "Intervenção com micronutrientes e impacto a longo prazo no Brasil." Protocolo (Re-ICIDR) DMID 05-0071 - versão 3.0 – Tradução revisada em 23/11/2005. Pesquisador Responsável: Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima
 Instituição: Universidade Federal do Ceará /CE
 Patrocinador: National Institute of Allergy and Infectious Diseases - NIAID
 Área Temática Especial: Genética Humana; Cooperação Estrangeira

Após se proceder a análise das respostas ao Parecer CONEP nº 352/2006, referente ao projeto de pesquisa supracitado, considerou-se em geral atendidas/esclarecidas a maioria das questões. No entanto cabem ainda as seguintes considerações:

1. A resposta referente à questão 5 deve ser melhor esclarecida no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, devendo estar explicitada a responsabilidade do pesquisador mediante qualquer dano. Não basta apenas a citação quanto ao direito a reclamar legalmente.
2. Com relação à questão 6, foi anexado o encaminhamento solicitando análise e parecer do Comitê de Ética da Universidade de Virgínia, EUA (país de origem). Aguarda-se, portanto, o documento de aprovação por Comitê de Ética em Pesquisa desse país.
3. Quanto à questão 7, o pesquisador concorda com as citações das resoluções do CNS referentes à interrupção do estudo. Entretanto, deve estar esclarecido no próprio parágrafo da pág. 45 do protocolo as referências às resoluções e/ou anexar declaração de que caso haja necessidade de interrupção do estudo, a mesma se dará conforme o disposto nos itens III.3."z" e VII.13."f" da Res. CNS196/96 e item III.2."e" da Res. CNS 251/97.
4. A questão 8 foi parcialmente atendida. Nos critérios de inclusão não foi feita a referência aos 2000 familiares que serão doadores do material genético.
5. Em atendimento à questão 14, relativa ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido- TCLE, foram apresentados dois TCLE (um para a pesquisa com micronutrientes e outro para a pesquisa genética) em atendimento aos sub-itens da referida questão, porém com datas de versão de 08/04/2005, anterior à versão apresentada inicialmente (23/11/2005) e anterior à data do Parecer CONEP 352/2006 (datado de 20/04/2006). Esclarecer. Entende-se que as versões do TCLE devem constar data posterior ao parecer da CONEP.
6. No TCLE específico para a pesquisa para micronutrientes, deve ser excluída a frase que considera como benefício a assistência médica gratuita e o fornecimento gratuito dos suplementos em teste. Este fato poderia ser considerado como infringente à autonomia pois pode ser considerada uma

Cont. Parecer CONEP N° 760/2006

possível indução ao sujeito da pesquisa, infringindo a sua autonomia, uma vez que não se caracteriza realmente como benefício para os sujeitos, já que o acesso a tratamento deve ser garantido a todos. Tal frase poderia ser colocada, por exemplo, num item denominado "custos".

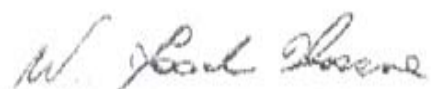
7. No TCLE específico para a pesquisa genética não cabe referências a administração do medicamento em estudo, mencionada em alguns itens. Rever.

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, com a seguinte recomendação a ser acompanhada pelo CEP que informará a CONEP:

- Que sejam atendidas as questões acima, antes do início do estudo.

Situação: Protocolo aprovado com recomendação

Brasília, 14 de julho de 2006.



WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS

ANEXO B – Ofício COMEPE

Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº 550/2006

Fortaleza, 22 de setembro de 2006

Protocolo nº 238/05

Pesquisador responsável: Aldo Ângelo Moreira Lima

Deptº./Serviço: Universidade Federal do Ceará-UFC

Título do Projeto: "Intervenção com micronutrientes e impacto a longo no Brasil" Protocolo (Re-ICDR) DMID 05-0071

Levamos ao conhecimento de V.S^a, que o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº196 de 10 de outubro de 1996 e complementares, aprovou o protocolo versão 3.0 – tradução revisada em 23/11/2005 e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do projeto supracitado na reunião do dia 26 de janeiro de 2006.

Outrossim, informamos, que após atendidas as recomendações feitas pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP no parecer 760/2006, o referido estudo foi aprovado.

Atenciosamente,

Dr. Fernando A. Frota Bezerra
Coordenador do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/UFC

ANEXO C – Ofício COMEPE, Autorização

Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N° 701/06

Fortaleza, 31 de outubro de 2006

Prezado Doutor,

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – COMEPE de acordo com as Resoluções 196/96 e complementares, aprovou na reunião do dia 26 de outubro de 2006 a **autorização para início das atividades do estudo 238/05 "Intervenção com Micronutrientes e impacto a longo prazo no Brasil"**.

Atenciosamente,

Dr. Fernando A. Frota Bezerra
Coordenador do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/UFC

Ao Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima
Investigador

ANEXO D – Termo de Consentimento

*Intervenção com Micronutrientes e Impacto a Longo Prazo no Brasil
Parque Universitário, Estudo Baseado na Comunidade
(PU: Objetivos 1a, 2a, 2b e 2c do estudo)*

Nome do Participante _____ N° Casa _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O que estamos tentando descobrir:

Estamos convidando você, sua criança e todos os moradores de sua casa para participar de uma pesquisa de genética para infecções gastrintestinais e impedimento de crescimento e desenvolvimento. Este estudo tem colaboração internacional entre a Universidade Federal do Ceará e a Universidade da Virgínia, nos Estados Unidos. Células da boca, amostras de fezes e dados antropométricos serão coletadas para serem examinadas. Faremos testes de DNA nestas amostras coletadas para ver as características hereditárias que podem previamente produzir infecções gastrintestinais ou impedimento do crescimento e desenvolvimento.

O objetivo deste estudo é aprender sobre a tendência para infecções gastrintestinais e seus efeitos no desenvolvimento. O objetivo do teste genético é identificar os fatores que contribuem para o desenvolvimento de certas doenças.

Planejamos examinar detalhadamente a genética e as razões no ambiente das diarreias da primeira infância. Para fazer este tipo de teste, os investigadores obterão informações sobre todos os moradores da casa, pessoas da família ou não. Para maior proteção, os investigadores não revelarão informações médicas ou pessoais sobre nenhum participante do estudo. Para participar deste estudo você deve concordar em testarmos as características genéticas hereditárias realizadas nas amostras.

Você, sua criança e todos os moradores da casa foram selecionados porque moram no Parque Universitário ou na Comunidade Gonçalves Dias, bem como estão em nosso estudo em andamento.

O que acontecerá:

Existem duas partes para este estudo:

1. Um profissional de saúde (enfermeira e/ou agente de saúde) visitará sua casa e coletará duas amostras de fezes (uma no período chuvoso e outra no período seco) de todos os moradores da casa, quando possível;
2. Um profissional de saúde (enfermeira e/ou agente de saúde) coletará células bucais de todos os residentes (uma leve escovação de dentro da sua bochecha será realizada) e/ou uma técnica de enfermagem coletará uma amostra de sangue aproximadamente de 5ml de todos residentes da casa, quando possível;
3. Medidas antropométricas serão retiradas de todos os moradores da casa, quando possível;
4. Um psicólogo aplicará alguns testes que avaliam a capacidade de resolver problemas em sua criança que já faz parte de um estudo nosso;

Exclusões:

A psicóloga do estudo fará uma análise clínica para definir a participação. Sua criança não poderá participar do estudo se apresentar evidências de maiores desordens neuropsiquiátricas ou inabilidade para participar de um teste padronizado ou se tiver se mudado para uma área diferente.

Benefícios:

Não existem benefícios diretos pela participação neste estudo, embora outras pessoas possam algum dia se beneficiar da pesquisa a ser realizada usando suas amostras. Você não receberá benefícios financeiros se as suas amostras usadas na pesquisa levarem ao desenvolvimento de um produto comercial.

Riscos:

Não existem riscos sociais, psicológicos ou comunitários deste estudo.

Confidencialidade:

A confidencialidade e a privacidade dos seus dados ou de sua criança serão resguardados, segundo normas éticas brasileiras.

Responsabilidade e Compensação em Caso de Danos:

Se alguém de vocês apresentar qualquer dano como resultado direto do estudo, você deverá entrar em contato com o Dr. Aldo Lima no telefone: 33668437 para receber a terapia necessária. Qualquer dano resultante de sua participação será avaliado e tratado de acordo com os benefícios e assistência integral que você passa a ter direito ao assinar este formulário de consentimento e entrar na pesquisa, pois todo dano mediante o estudo é de inteira responsabilidade do pesquisador.

Para quem ligar:

Se você tem: (1) alguma questão sobre o estudo, por favor ligue para Dr Aldo A.M. Lima, Unidade de Pesquisa Clínica, UFC (Tel.: 33668445); (2) alguma questão sobre seus direitos como participante de um estudo, por favor ligue para Comitê de Ética em Pesquisa da UFC (COMEPE), Tel.: 3366.8346, ou peça a enfermeira do estudo para ajudar você a contatar com as pessoas citadas acima.

Direito de desistir:

Sua participação, de sua criança e de todos os moradores de casa neste estudo é completamente voluntária. Vocês são livres para se retirar do estudo a qualquer momento sem prejuízos. Apenas avise a um dos médicos ou enfermeiras que vocês não desejam continuar participando do estudo.

Numero total de participantes e duração da participação:

O número total de participantes para este protocolo está estimado em 2000 pessoas. A participação estará completa depois da finalização dos testes que avaliam a capacidade de resolver problemas.

Nome do Sujeito
(Se < 18 anos)

_____	_____	____/____/____
Pai ou Guardião Legal (NOME LETRA FORMA)	Pai ou Guardião Legal (ASSINATURA)	dd/ mm/ ano
_____	_____	____/____/____
Morador 1 (NOME LETRA FORMA)	Morador 1 (ASSINATURA)	dd/ mm/ ano
_____	_____	____/____/____
Morador 2 (NOME LETRA FORMA)	Morador 2 (ASSINATURA)	dd/ mm/ ano
_____	_____	____/____/____
Morador 3 (NOME LETRA FORMA)	Morador 3 (ASSINATURA)	dd/ mm/ ano
_____	_____	____/____/____
Morador 4 (NOME LETRA FORMA)	Morador 4 (ASSINATURA)	dd/ mm/ ano
_____	_____	____/____/____
Morador 5 (NOME LETRA FORMA)	Morador 5 (ASSINATURA)	dd/ mm/ ano
_____	_____	____/____/____
Morador 6 (NOME LETRA FORMA)	Morador 6 (ASSINATURA)	dd/ mm/ ano
_____	_____	____/____/____
Morador 7 (NOME LETRA FORMA)	Morador 7 (ASSINATURA)	dd/ mm/ ano
_____	_____	____/____/____
Morador 8 (NOME LETRA FORMA)	Morador 8 (ASSINATURA)	dd/ mm/ ano
_____	_____	____/____/____
Morador 9 (NOME LETRA FORMA)	Morador 9 (ASSINATURA)	dd/ mm/ ano
_____	_____	____/____/____
Morador 10 (NOME LETRA FORMA)	Morador 10 (ASSINATURA)	dd/ mm/ ano
_____	_____	____/____/____
	Assinatura da Testemunha	dd/ mm/ ano
_____	_____	____/____/____
	Assinatura do Membro da Pesquisa	dd/ mm/ ano

ANEXO E – Ofício COMEPE, Aprovação de Complementação

Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N° 407/07

Fortaleza, 25 de maio de 2007

Prezado Doutor,

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – COMEPE de acordo com as Resoluções 196/96 e complementares, aprovou na reunião do dia 24 de maio de 2007 o TCLE com complementação nos itens 1, 2, 3 referente ao estudo 238/05 intitulado: "Intervenção com micronutrientes e impacto a longo prazo no Brasil".

Atenciosamente,

Mirian Parente Monteiro

Dra. Mirian Parente Monteiro
Coordenadora Adjunta do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/UFC

Ao Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima
Investigador

ANEXO F – Formulário Ambiental e Sócio-Econômico



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
UNIDADE DE PESQUISAS CLÍNICAS
INSTITUTO DE BIOMEDICINA

Casa_ID
001

Projeto: UFC e UVa / CNPq – Genética
COMEPE: 238/05

Primeiro
Formulário

FORMULÁRIO AMBIENTAL E SÓCIO-ECONÔMICO DO PEDIGREE

A. Dados Demográficos:

1. Endereço: _____ No. _____ Bloco: _____ GD () PU()
2. Quanto tempo mora neste endereço _____

B. Informação da Família:

1. Quantas pessoas moram na casa? _____
2. Quantos compartimentos possui a residência? _____
3. Quantos compartimentos são utilizados para dormir? _____
4. Alguém da casa é fumante? _____ (1 = sim; 2 = não)
5. Quantas pessoas tem hábito de fumar na casa? _____ ()pai, ()mãe, ()outros, ()irmão
6. Você é responsável pela preparação dos alimentos na casa? _____ (1 = sim; 2 = não)
7. Antes de preparar os alimentos você tem tempo de lavar as mãos? _____ (1 = sim; 2 = não)
8. Alguém da família é hipertenso? _____ (1=Sim, 2=Não); Quem? ()pai, ()mãe, ()filhos, () outros
9. Alguém da família é diabético? _____ (1=Sim, 2=Não); Quem? ()pai, ()mãe, ()filhos, () outros

C. Condições Sócio-Econômicas e Sanitárias:

1. Tipo de casa? _____ (1 = taipa; 2 = alvenaria; 3 = mista)
2. A água para beber é proveniente de onde? (1 = sim; 2 = não)
 - a) encanada em casa?..... _____
 - b) chafariz?..... _____
 - c) bomba?..... _____
 - d) poço/cacimba?..... _____
 - e) carroça?..... _____
 - f) lagoa, riacho ou rio..... _____
 - g) água mineral (engarrafada) _____
 - h) outro, especificar: _____
3. Quando você (ou sua criança) bebe água, normalmente esta água vem diretamente da torneira? _____ (1 = sim; 2 = não)

Se **não**, indicar com (1 = sim; 2 = não) se praticam as procedências abaixo listadas:

 - a) Água fervida? _____
 - b) Usa filtro na torneira? _____
 - c) Água refrigerada? _____
 - d) Outra, especificar: _____
4. Existe recipiente na casa para guardar a água de beber? _____ (1 = sim; 2 = não)

Se sim, está o mesmo normalmente coberto? _____ (1 = sim; 2 = não)

Quantas pessoas bebem água do mesmo recipiente? _____



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
UNIDADE DE PESQUISAS CLÍNICAS
INSTITUTO DE BIOMEDICINA

Casa_ID
001

Projeto RE-ICIDR
Intervenção Com Micronutrientes e Impacto A Longo Prazo No Brasil
DMID: 05-0071 e COMEPE: 238/05

Primeiro
Formulário

5. Qual o tipo de sistema de sanitário que existe em sua casa?
- a) Tipo de sanitário: _____ (1 = com descarga d'água; 2 = fossa; 3 = sem sanitário)
- b) Onde está localizado o sanitário da família: _____
1 = dentro de casa 3 = dentro e fora da casa 9 = desconhecido
2 = fora da casa 4 = outro. Especificar: _____
- c) O sanitário é compartilhado com outra(s) família(s)? _____ (1 = sim; 2 = não)
- d) Existe hoje água em casa para lavar mãos no banheiro ou próximo ao mesmo? _____
(1 = sim, 2 = não)
- e) Existe hoje sabão no local para lavar as mãos? _____ (1 = sim; 2 = não)

Favor de usar os números abaixo para responder os itens a e b da questão 6, que serão sobre coisas que as pessoas muito ocupadas normalmente não tem tempo para fazer:

1 = geralmente 80/90%	3 = algumas vezes, <50%	9 = desconhecido
2 = usualmente, 50/60%	4 = nunca, <5%	

6. Qual a frequência com que crianças < 5 anos de idade defecam ao redor da casa? _____
(responde com: 1-9)

7. Na casa existe algum animal? _____ (1 = sim; 2 = não; 9 = desconhecido)

Se sim, assinale o tipo de animal:

- | | Quantidade |
|--|------------|
| <input type="checkbox"/> Cachorro | _____ |
| <input type="checkbox"/> Gato | _____ |
| <input type="checkbox"/> Galinha | _____ |
| <input type="checkbox"/> Outro. Especificar: | _____ |

8. Qual é aproximadamente, a renda mensal da família? _____ (em salários mínimos)
- | | | | |
|-----------|---------------|-------------|------------------|
| 1 = <1/4 | 2 = 1/4 a 1/2 | 3 = 1/2 a 1 | 4 = 1 a 2 |
| 5 = 2 a 3 | 6 = 3 a 5 | 7 = >5 | 9 = desconhecido |

Responsável: _____
_____/_____/_____

Data:

ANEXO G – Formulário de Coleta de Fezes e Dados Antropométricos



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
 UNIDADE DE PESQUISAS CLÍNICAS & INSTITUTO DE BIOMÉDICA
 Projeto: UFC e UVa / CNPq - Genética
 COMEPE: 23/5/05

1º Formulário de Coleta de Fezes e Dados Antropométricos - Período Chuvoso
 Pedigree

Quarto Formulário

"Rec N°"	Dt. Nasc. (dd/mm/aaaa)	Sexo**	Data da coleta dos Dados Antropométricos (dd/mm/aaaa)	Dados Antropométricos					História de Diarreia*** nos últimos 14 dias			Coleta de Fezes			Observações	
				Peso (Kg)	Altura 1 (cm)	Altura 2 (cm)	Altura 3 (cm)	Circunferência do braço (cm)	Praga Cutânea (mm)	Diarréia 1-Sim 2-Não	Se Sim, Nº de Dias de Diarréia	Número de Evacuações líquidas em 24 horas	Data em que foi realizado o copo para a coleta	Data em que a Amostra foi coletada		Agente de Saúde que coletou a amostra
00101																
00102																
00103																
00104																
00105																
00106																
00107																
00108																
00109																
00110																
00111																
00112																
00113																
00114																
00115																
00116																
00117																
00118																
00119																
00120																
00121																
00122																
00123																
00124																
00125																

*"Rec N°" - é o número de registro que o residente recebeu no Formulário Confidencial do Pedigree. **Sexo: F=Feminino, M=Masculino, *** Diarréia: no mínimo 3 evacuações líquidas em 24 horas

Responsável: _____