



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

**HERLICE DO NASCIMENTO VERAS**

**FATORES DE RISCO, DISFUNÇÃO DA BARREIRA INTESTINAL E  
CO-PATÓGENOS DE INFECÇÕES SUBCLÍNICAS CAUSADAS POR  
*Campylobacter jejuni* EM CRIANÇAS DA CIDADE DE FORTALEZA-CE,  
BRASIL**

FORTALEZA

2021

**HERLICE DO NASCIMENTO VERAS**

**FATORES DE RISCO, DISFUNÇÃO DA BARREIRA INTESTINAL E  
CO-PATÓGENOS DE INFECÇÕES SUBCLÍNICAS CAUSADAS POR  
*Campylobacter jejuni* EM CRIANÇAS DA CIDADE DE FORTALEZA-CE,  
BRASIL**

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

Orientador: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima.

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

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

---

- V584f Veras, Herlice do Nascimento.  
Fatores de risco, disfunção da barreira intestinal e co-patógenos de infecções subclínicas causadas por *Campylobacter jejuni* em crianças da cidade de Fortaleza - CE, Brasil / Herlice do Nascimento Veras. – 2021.  
114 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2021.  
Orientação: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima.
1. *Campylobacter jejuni*. 2. biomarcadores. 3. virulência. 4. infecções. I. Título.

CDD 616.9

---

**HERLICE DO NASCIMENTO VERAS**

**Fatores de risco, disfunção da barreira intestinal e co-patógenos de infecções subclínicas causadas por *Campylobacter jejuni* em crianças da cidade de Fortaleza - CE, Brasil**

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

Orientador: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima.

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

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

---

Profa. Dra. Anna Carolina Toledo da Cunha Pereira  
Universidade Federal do Delta do Parnaíba - PI

---

Profa. Dra. Giovanna Riello Barbosa Correia  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá  
Universidade Federal do Ceará

---

Profa. Dra. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia  
Universidade Federal do Ceará

*Para minha avó Maria Odete (in memoriam)*

## **AGRADECIMENTOS**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado essa oportunidade, e sempre ter me dado força e determinação desde o momento que deixei a minha cidade natal e vim para Fortaleza para me integrar em uma pós-graduação e conseguir chegar ao meu principal objetivo.

Agradeço ao Prof. Aldo Lima pela oportunidade e confiança para integrar em seu laboratório, e por todo o ensinamento fornecido durante os anos de mestrado e doutorado.

Agradeço a todos os amigos que me ajudaram durante esse período e fazem parte dos laboratórios de Doença Infecciosas e Toxonologia Molecular; Ana Karolina Santos, Marília Maia, Samilly Ribeiro, Cleber Ferreira, Thiago Miranda, Rafaela Pankov, Natalia Fernandes, Xhaulla Fonseca, Ivna Viana, Mariana Bona, Priscilla Souto, Lyvia Magalhães, Rafhaella Gondim; e os que já fizeram parte antes do laboratório, Pedro Henrique Quintela, Paloma Araújo, Mara Prata, Tamara Rodrigues, Adelvane Rodrigues; todos foram essenciais para conseguir alcançar esse objetivo.

Agradeço ao professor Dr. Alexandre Havt pelos ensinamentos, por ter me ajudado na integração ao laboratório, e por todo ensinamento sobre biologia molecular, dentre outros, que adquiri durante esse período.

Agradeço ao José Amadeus, Luciana França, Charliene Melo, José Quirino, Charles Melo, Katia Lima e Conceição de Maria e a toda equipe do INCT, UPC-NUBIMED.

Agradeço ao PPGMM, a coordenação, Profa. Rossana Cordeiro e Profa. Debora Castelo Branco, pelo ótimo trabalho, e a todos os professores do programa, além da ex-secretária Carolinda Soares, que tão brilhantemente fez parte dessa equipe.

Agradeço a banca de qualificação, Dr. Pedro Henrique Quintela e Dra. Silviane Praciano, por terem aceitado tão gentilmente o convite de participação.

Agradeço aos membros da banca avaliadora da tese, profa. Dra. Anna Carolina Toledo, profa. Dra. Camila Fernandes, profa. Dra. Giovanna Riello e ao prof. Alexandre Havt, por terem gentilmente aceitado o convite e por todas as contribuições realizadas.

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

Agradeço a minha mãe, Francisca das Chagas, e ao meu irmão, Francisco Lucas, por toda força e união durante todos os momentos bons e ruins que nossa família passou por esse período, sendo sempre minha fortaleza e a melhor parte de mim. E ao meu pai, Heliomar Veras pelo apoio inicial dessa jornada.

Agradeço a toda minha família (tias, primos, avós), que de alguma forma sempre me ajudaram em algum momento dessa jornada.

Agradeço em especial as minhas amigas e companheiras de jornada Ana Karolina Santos e Samara Rodrigues, por tanto anos de convivência, conhecimentos compartilhados e companheirismo.

Agradeço ao meu namorado Gleisson Rodrigues por todo apoio durante essa reta final e por ter contribuído com a construção do abstract desse trabalho.

A todos o meu muito obrigada!

*“A persistência é o menor caminho do êxito”*

*(Charles Chaplin)*

## RESUMO

**Introdução:** *Campylobacter* spp. é uma das principais causadas de infecção bacteriana causadas por ingestão de água ou alimentos contaminados no mundo. *Campylobacter jejuni* é considerada a espécie mais prevalente, sendo uma das principais causas de gastroenterites em humanos. **Objetivo** Investigar os fatores de risco, disfunção da barreira intestinal e co-patógenos de infecção subclínica causada por *Campylobacter jejuni* em crianças da cidade de Fortaleza – CE, Brasil. **Material e Métodos:** Foi realizado um estudo *Nested* caso-controle a partir de um estudo coorte longitudinal multicêntrico intitulado “Etiologia, Fatores de Risco e Interações de Infecções Entéricas e Desnutrição e as Consequências para a Saúde Infantil (MAL-ED)”, realizado entre agosto de 2010 a setembro de 2013. Participaram do estudo 233 crianças com idade entre 0-24 meses de idade, que foram divididas: grupo caso, com crianças que tiveram amostra(s) positiva(s) para *C. jejuni*, e grupo controle, com crianças que tiveram amostra(s) negativa(s) para *C. jejuni*. O diagnóstico bacteriano foi realizado através da extração do DNA bacteriano do material fecal, sendo utilizado a plataforma de qPCR TAC, para o diagnóstico de *C. jejuni/C.coli*, e logo após ocorreu o diagnóstico de *C. jejuni* por PCR convencional. A avaliação das medidas antropométricas WAZ, WHZ e HAZ foi realizada. Ocorreu a pesquisa de 20 genes de virulência de *C. jejuni*. Houve a avaliação da integridade da barreira intestinal através dos biomarcadores Lactose/Manitol (L/M) por HPLC, e Alfa-1-antitripsina (AAT), por ensaio imunoenzimático, além dos biomarcadores de inflamação Mieloperoxidase (MPO) e Neopterin (NEO), por ensaio imunoenzimático. **Resultados:** 27,03% (63/233) das crianças tiveram diagnóstico positivo apenas para *C. jejuni*. A falta de amamentação exclusiva se mostrou um fator de risco para infecções por *C. jejuni* nas crianças ( $P < 0,0001$ ; OR 11,25; IC 95% 3,664 – 35,66). Uso de filtros para o tratamento de água não é o suficiente para prevenir infecções por *C. jejuni* ( $P = 0,03$ ; OR 3,389; IC 95% 1,166 – 9,064). 33,33% (21/63) das crianças apresentaram mais de uma amostra positiva para o patógeno. Crianças do grupo caso com até 15 meses tiveram alteração na permeabilidade intestinal através da análise do ATT ( $P = 0,037$ ; IC 95% -0,2509 - 0,007929). O gene *cheW* foi o mais prevalente (84,13% - 53/63), e o gene *pVir* não teve prevalente (0% - 0/63). Coinfecção entre EPEC e *C. jejuni* foi a mais prevalente (44,44% - 28/63), com concomitante redução no WHZ das crianças que tiveram essa coinfecção ( $P = 0,0491$ ; IC 95% 0,001733 - 0,8458). EAEC foi o segundo patógeno mais prevalente (31,80% - 20/63), apresentando alteração na permeabilidade intestinal através da L/M ( $P = 0,0024$ ; IC 95% -0,1639 -0,03634) e AAT ( $P = 0,0103$ ; IC = -0,3850 - 0,05389), além da presença de inflamação através da NEO ( $P = 0,047$ ; IC 95% -4002 - 2626). **Conclusão:** Ocorreu uma alta taxa de infecções subclínicas causadas por *C. jejuni*, pois a presença do patógeno não influenciou no déficit de crescimento, nem causou inflamação, mas apresentou alteração na função da barreira intestinal. *C. jejuni* causou danos mais significativos, como déficit no crescimento, inflamação e alteração em mais marcadores de barreira intestinal quando em associação com os co-patógenos EPEC e EAEC, caracterizando uma possível presença de disfunção entérico ambiental.

**Palavras-chaves:** *Campylobacter jejuni*, biomarcadores, virulência, infecções.

## ABSTRACT

**Introduction:** *Campylobacter* spp. is one of the main causes of bacterial infection caused by the ingestion of water or food contaminated in the world. *Campylobacter jejuni* is the most prevalent species being one of the main reasons of gastroenteritis in humans. **Aim:** We wanted to investigate risk factors, intestinal barrier dysfunction and copathogens of subclinical infection caused by *Campylobacter jejuni* in children from the Fortaleza - CE, Brazil. **Material and Methods:** A Nested case-control study has been conducted from a multicentric longitudinal cohort study entitled “Etiology, Risk Factors and Interactions of Enteric Infections and Malnutrition and its Consequences for Children’s Health (MAL-ED)”, conducted between August 2010 and September 2013. The study included 233 children with ages between 0-24 months of age who were divided into two groups: case group with children who had positive samples for *C. jejuni*, and control group with children who had negative samples for *C. jejuni*. The bacterial diagnosis was performed with extracted fecal bacterial DNA using the TAC qPCR platform, which unspecifically diagnosed *C. jejuni* / *C. coli*, followed by the specific diagnosis of *C. jejuni* by conventional PCR. The evaluation of anthropometric measures WAZ, WHZ and HAZ was performed. We also investigated 20 virulence genes of *C. jejuni* through uniplex and multiplex PCR. We evaluated intestinal barrier integrity by HLPC detection of Lactose/Mannitol (L/M) and the immunoenzymatic assays for alpha-1-antitrypsin (AAT) and the inflammatory biomarkers of Myeloperoxidase (MPO) and Neopterin (NEO). **Results:** 27,03% (63/233) of these children had a positive diagnosis only for *C. jejuni*. The lack of breast-feeding alone displayed a risk factor for *C. jejuni* infections on the children (P <0,0001; OR 11,25; IC 95% 3,664 – 35,66). The usage of filters for water treatment was not enough to prevent infections by *C. jejuni* (P = 0,03; OR 3,389; IC 95% 1,166 – 9,064). In addition, 33,33% (21/63) of the children presented more than one positive sample for this pathogen. Children from the case group up to 15 months had a change on the intestinal permeability through the analysis of ATT (P = 0,037; IC 95% -0,2509 - 0,007929). The *cheW* gene was the most prevalent (84,13% - 53/63), but the gene *pVir* had no prevalence (0% - 0/63). Coinfection of EPEC and *C. jejuni* was the most prevalent (44,44% - 28/63) and, concomitantly, we found a reduction of WHZ of the children who had this coinfection (P = 0,0491; IC 95% 0,001733 - 0,8458). EAEC was the second most prevalent copathogen (31,80% - 20/63), which impaired intestinal impermeability through the L/M ratio (P = 0,0024; IC 95% -0,1639 -0,03634) and AAT (P = 0,0103; IC = -0,3850 - 0,05389), in addition to the correlation with inflammation through the detection of NEO (P = 0,047; IC 95% -4002 - 2626). **Conclusion:** There was a high rate of subclinical infections caused by *C. jejuni*, since the presence of this pathogen did not influence growth deficit, or cause inflammation, but altered the intestinal barrier function. *C. jejuni* caused more significant damage, such as growth deficit, inflammation and changes in intestinal barrier markers when in association with the cotathogens EPEC and EAEC, characterizing the presence of environmental enteric dysfunction.

**Keywords:** *Campylobacter jejuni*, biomarkers, virulence, coinfection.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Micrografia de <i>Campylobacter jejuni</i> e crescimento de <i>C. jejuni</i> em ágar modificado de carvão.....	23
Figura 2 –	Relação filogenética entre as principais espécies e subespécies de <i>Campylobacter</i> .....	24
Figura 3 -	Rotas de transmissão de <i>Campylobacter</i> spp.....	26
Figura 4 -	Representação das junções das células epiteliais intestinais.....	29
Figura 5 -	Estrutura do sistema flagelar de espécies de <i>Campylobacter</i> e seus principais componentes.....	32
Figura 6 -	Proteínas quimiotáticas responsáveis pela mudança na motilidade de <i>C. jejuni</i> .....	33
Figura 7 -	Mecanismos de invasão e colonização de <i>Campylobacter</i> spp.....	35
Figura 8 -	Ação da Toxina Citoletal Distensora na célula do hospedeiro.....	38
Figura 9 -	Fluxograma do estudo.....	48
Figura 10 -	Resumo da coleta dos dados, coleta de amostras e análise dos biomarcadores no estudo.....	58
Figura 11 -	Porcentagem de crianças com uma ou mais infecções detectadas para <i>C. jejuni</i> .....	63
Figura 12 -	Faixa etária de amostras positivas para <i>C. jejuni</i> ao longo dos 24 meses de idade das crianças do grupo caso.....	64
Figura 13 -	Análise temporal dos escores Z de crescimento nas crianças com o diagnóstico positivo para <i>C. jejuni</i> (caso) e diagnóstico negativo para <i>C. jejuni</i> (controle) entre 3 e 24 meses de idade.....	66
Figura 14 -	Resultados dos biomarcadores de integridade da barreira intestinal nos grupos com diagnóstico positivo para <i>C. jejuni</i> (caso) e diagnóstico negativo para <i>C. jejuni</i> (controle) durante os 15 meses de idade das crianças.....	67

Figura 15 - Resultados dos biomarcadores de inflamação nos grupos com diagnóstico positivo para <i>C. jejuni</i> (caso) e diagnóstico negativo para <i>C. jejuni</i> (controle) durante os 15 meses de idade das crianças.....	68
Figura 16 - Porcentagem de amostras que apresentaram coinfeção entre <i>C. jejuni</i> e outros enteropatógenos.....	71
Figura 17 - Resultados da avaliação do escores Z de crescimento WHZ entre os grupos que apresentaram coinfeção entre EPEC e <i>C. jejuni</i> (caso) e entre EAEC com <i>C. jejuni</i> (caso) e o grupo que não apresentou coinfeção entre os patógenos (controle).....	72
Figura 18 - Resultados dos biomarcadores de avaliação da permeabilidade intestinal entre o grupo que apresentou coinfeção entre EPEC e <i>C. jejuni</i> (caso) e o grupo que não apresentou coinfeção entre EPEC e <i>C. jejuni</i> (controle).....	73
Figura 19 - Resultados dos biomarcadores de inflação entre o grupo que apresentou coinfeção entre EPEC e <i>C. jejuni</i> (caso) e o grupo que não apresentou coinfeção entre EPEC e <i>C. jejuni</i> (controle).....	74
Figura 20 - Resultados dos biomarcadores de avaliação da integridade intestinal entre o grupo que apresentou coinfeção entre EAEC e <i>C. jejuni</i> (caso) e o grupo que não apresentou coinfeção entre EAEC e <i>C. jejuni</i> (controle).....	75
Figura 21 - Resultados dos biomarcadores de inflação entre o grupo que apresentou coinfeção entre EAEC e <i>C. jejuni</i> (caso) e o grupo que não apresentou coinfeção entre EAEC e <i>C. jejuni</i> (controle).....	76

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Patógenos diagnosticados na plataforma de ensaio TAC-PCR em tempo real no projeto MAL-ED.....	51
Tabela 2 –	Iniciadores utilizados nos protocolos do PCR para o diagnóstico específico e detecção de genes de virulência para <i>C. jejuni</i> com a função de cada gene e condições de ciclagem para as reações de PCR uniplex e multiplex.....	53
Tabela 3 -	Caracterização da avaliação inicial das crianças com o diagnóstico positivo para <i>C. jejuni</i> (caso) e diagnóstico negativo para <i>C. jejuni</i> (controle) .....	60
Tabela 4 -	Avaliação das características da mãe ou cuidador da criança.....	61
Tabela 5 -	Caracterização socioeconômica das crianças com o diagnóstico positivo para <i>C. jejuni</i> (caso) e diagnóstico negativo para <i>C. jejuni</i> (controle).....	62
Tabela 6 -	Escore Z de crescimento das crianças com o diagnóstico positivo para <i>C. jejuni</i> (caso) e diagnóstico negativo para <i>C. jejuni</i> (controle) até 24 meses de idade.....	65
Tabela 7 -	Prevalência dos genes de virulência de <i>C. jejuni</i> entre as amostras das crianças positivas para o microrganismo.....	69
Tabela 8 -	Análise da regressão logística multivariada entre o score WHZ de crescimento e os genes de virulência de <i>C. jejuni</i> .....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS

**Ajs:** Junções aderentes do epitélio (*adherens junctions*)

**AAT:** Alfa-1-antripsina

**AS:** Antisenso (iniciador de PCR sentido antisenso)

**AL:** Tampão de lise celular

**ASL:** Tampão de lise celular

**ATE:** Eluente celular

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

**AW1:** Tampão de lavagem 1

**AW2:** Tampão de lavagem 2

***cadF*:** Gene regulador da proteína de adesão a fibronectina (*Campylobacter adhesion to fibronectin*)

***capA*:** Gene regulador da proteína A de adesão (*Campylobacter adhesion protein A*)

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

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

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

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

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

***cheA*:** Gene regulador da proteína quimiotática A (*chemotaxis protein A*)

***cheR*:** Gene regulador da proteína quimiotática R (*chemotaxis protein R*)

***cheW*:** Gene regulador da proteína quimiotática W (*chemotaxis protein W*)

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

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

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

**COMEPE:** Comitê de Ética em Pesquisa da UFC

**CONEP:** Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

**CVA:** Ágar sangue para *Campylobacter* (*Campy blood ágar*)

**CXCL20:** quimiocina da subfamília CL20

**DEA:** Disfunção entérico ambiental

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

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

**DPM:** Desvio padrão da média

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

**ELISA:** Ensaio imunoenzimático (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

**EAEC:** *Escherichia coli* enteroagregativa

**EIEC:** *Escherichia coli* enteroinvasiva

**EPEC:** *Escherichia coli* enteropatogênica

**EPM:** Erro padrão da média

**ETEC:** *Escherichia coli* enterotoxigênica

**Fe:** Ferro

**FeEnt:** Enteroquelina férrica

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

***flaB*:** Gene da flagelina B de *C. jejuni* (*flagellin B*)

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

**Fn:** Fibronectina

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

**G2:** Fase do ciclo celular

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

**GroESL:** *Anaplasma phagocytophilum Protein*

**HAZ:** Score Z altura-pela-idade (*Height-for-Age*)

**HeLa:** Linhagem celular

**Hep-2:** Linhagem celular

**HPLC:** Cromatografia Líquida de Alta Performance (*High Performance Liquid Chromatography*)

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

**HSP90:** Proteína de choque térmico 90

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

**IBD:** Doença do intestino inflamado

**IL-1 $\alpha$ :** Interleucina - 1 $\alpha$

**IL-1 $\beta$ :** Interleucina - 1 $\beta$

**IL-6:** Interleucina - 6

**IL-8:** Interleucina - 8

**jlpA:** Lipoproteína A (*jejuni lipoprotein A*)

**kataA:** Gene regulador da proteína catalase A (*catalase*)

**LDI:** Laboratório de Doenças Infecciosas

**L/M:** lactulose/manitol

**LOS:** Lipoligossacarídeo

**LT:** Toxina lábil

**MAL-ED:** Etiologia, fatores de risco e interação das infecções entéricas com a desnutrição e consequências para a saúde da criança (*The Etiology, Risk Factors, and Interactions of Enteric Infections and Malnutrition and the Consequences for Child Health*)

**MPO:** Mioloperoxidase

**MS2:** |Bacteriófago

**N:** Número de amostras

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

**NCTC:** *National Collection of Type Cultures*

**NEO:** Neopterina

**NF-κB:** Fator nuclear kappa B

**NUBIMED:** Núcleo de Biomedicina

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

**p19:** Hipotética proteína (*hypothetical protein*)

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

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

**PhHV:** Phocine Herpesvirus

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

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

**qPCR:** Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

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

**RNA:** Ácido ribonucleico

**RPM:** Rotação por minuto

**RT-PCR:** Reação em cadeia da polimerase em tempo real

**S:** Senso (iniciador de PCR sentido senso)

**SGB:** Síndrome de Guillain-Barré

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

**SPSS:** *Statistical Package for Social Sciences*

**SSGD:** Setor de Segurança e Gerenciamento de Dados

**STEC:** *Escherichia coli* enterotoxigênica produtora da toxina Shiga

**TAC:** *TaqMan Array Card*

**TCLE:** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**TGI:** Trato gastrointestinal

**TJs:** Junções firmes (*Tight Junctions*)

**TNF- $\alpha$ :** Fator de necrose tumoral

**Tlps:** Proteína do tipo transdutor

**TLRs:** Receptor do tipo toll (*toll-like receptors*)

**TSS3:** Sistema de secreção do tipo III

**UFC:** Universidade Federal do Ceará

**UV:** Ultravioleta

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

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

## LISTA DE SIMBOLOS

**μg:** Microgramas

**μM:** Micromolar

**Da:** Dalton

**g:** Grama

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de hidrogênio

**IC:** Intervalo de confiança

**kDa:** Kilodalton

**M:** Molar

**Mb:** Megabases

**mg:** Miligramas

**mL:** Mililitros

**mm:** Milímetros

**mOsm;** Miliosmol

**nm:** Nanômetros

**O<sub>2</sub>:** Oxigênio

**°C:** Graus Celsius

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

**pb:** Pares de bases

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	20
2.	REFERENCIAL TEÓRICO.....	22
2.1	<i>Campylobacter</i> spp.....	22
2.2	Fontes de transmissão de campylobacterioses.....	25
2.3	Epidemiologia das infecções causadas por <i>Campylobacter</i> spp.....	26
2.4	Patobiologia e fatores de virulência de <i>Campylobacter</i> spp.....	28
2.4.1	<i>Trato gastrointestinal e resposta imune do hospedeiro as infecções por Campylobacter</i> spp.....	28
2.4.2	<i>Fatores de virulência de espécies de Campylobacter</i> .....	30
2.5	Manifestações subclínicas causadas por espécies de <i>Campylobacter</i> .....	38
2.6	Manifestações clínicas causadas por espécies de <i>Campylobacter</i> .....	40
2.7	Diagnóstico das espécies de <i>Campylobacter</i> .....	41
2.8	Tratamento das campylobacterioses.....	42
2.9	Prevenção e controle das campylobacterioses.....	43
3	OBJETIVOS.....	45
3.1	Objetivo geral.....	45
3.2	Objetivos específicos.....	45
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	46
4.1	Desenho do estudo e aprovação ética.....	46
4.2	Obtensão dos dados e coleta de amostras.....	48
4.3	Obtenção das medidas antropométricas.....	49
4.4	Extração do material fecal para o diagnóstico das cepas de <i>Campylobacter jejuni</i> .....	49

4.5	Diagnóstico molecular das cepas de <i>C. jejuni</i> .....	50
4.6	Diagnóstico molecular genes de virulência de <i>C. jejuni</i> .....	52
4.7	Avaliação da integridade da barreira intestinal e biomarcadores imunoinflamatórios.....	57
4.8	Análise estatística.....	57
4.9	Organização das coletas do estudo.....	58
5	<b>RESULTADOS</b> .....	59
5.1	Caracterização da população do estudo.....	59
5.2	Avaliação do número de infecções por <i>C. jejuni</i> e a distribuição por idade das crianças positivas para o patógeno.....	63
5.3	Avaliação dos dados antropométricos.....	64
5.4	Avaliação dos biomarcadores de permeabilidade e inflamação intestinal.....	66
5.5	Avaliação do perfil de genes de virulência das crianças com amostras positivas para <i>C. jejuni</i> .....	68
5.5.1	<i>Análise da regressão logística multivariada entre os genes de virulência de C. jejuni com o Z-score de crescimento WHZ</i> .....	69
5.6	Avaliação da coinfeção entre outros microrganismos e <i>C. jejuni</i> .....	70
5.6.1	<i>Avaliação do Z - score de crescimento WHZ com amostras das crianças que apresentaram coinfeção com C. jejuni</i> .....	71
5.6.2	<i>Avaliação dos biomarcadores de permeabilidade intestinal e inflamação com amostras das crianças que apresentaram coinfeção com C. jejuni</i> ....	72
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	77
7	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	88

<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>89</b>
	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>90</b>
	<b>APENDICES.....</b>	<b>103</b>
	<b>APENDICE A – TCLE.....</b>	<b>103</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>106</b>
	<b>ANEXO A- REGISTRO CONEP 16701.....</b>	<b>106</b>
	<b>ANEXO B - REGISTRO COMEPE Nº 246/09.....</b>	<b>111</b>

## 1 INTRODUÇÃO

*Campylobacter* spp. estão entre as principais causas de infecções bacterianas transmitidas pelo consumo de alimentos e água contaminados, sendo um dos principais agentes causadores de gastroenterites no mundo (MAN, 2011; WHO, 2012; COSTA & IRAOLA, 2019). *Campylobacter jejuni* é a espécie mais prevalente, sendo responsável por cerca de 70 a 90% dos casos de campylobacterioses (KAAKOUSH et al., 2015; COSTA & IRAOLA, 2019). As principais fontes de contaminação para o ser humano incluem consumo de água não tratada, leite não pasteurizado, ou outros produtos alimentícios contaminados, como laticínios, além de infecções ocasionadas de pessoa-a-pessoa (EPPS et al., 2013; SKARP et al., 2016; BERTHENET et al., 2019).

Nos últimos anos, em países desenvolvidos, os casos de gastroenterites provocados por *Campylobacter* spp. excederam os causados por bactérias que mais comumente eram as responsáveis por essas infecções nesses países (MURRAY et al., 2010; EFSA, 2015), onde espécies como *C. jejuni* chegou a ser isolada de pacientes com infecções do trato gastrointestinal com uma frequência de cerca de 3 a 4 vezes maior do que *Salmonella* spp., *Shigella* spp. ou *Escherichia coli* (TAYLOR et al., 2013; MARDER et al., 2017). Em países em desenvolvimento, infecções pelo microrganismo são endêmicas, não apresentam um perfil sazonal, e são geralmente limitadas a população infantil (HAVELLAR et al., 2009; KAAKOUSH et al., 2015).

As manifestações clínicas de infecções causadas por *C. jejuni* pode variar desde diarreia aquosa, sem a presença de sangue, até uma diarreia inflamatória grave, acompanhada de dor abdominal e febre (MAN et al., 2011; BURNAHM & HENDRIXSON, 2018). Além disso, há uma alta prevalência de infecções assintomáticas, sendo esse fator já associado com déficit no desenvolvimento de crianças acometidas por espécies de *Campylobacter*, mais especificamente por *C. jejuni*, levando a um quadro de desnutrição (QUETZ et al., 2010; LEE et al., 2013; ROGAWSKI et al., 2018; VERAS et al., 2018; HAQUE et al., 2019; ROUHANI et al., 2019).

A associação entre infecções subclínicas provocadas por *Campylobacter* spp. e déficit no desenvolvimento de crianças ocorrem principalmente nos dois primeiros anos de vida (AMOUR et al., 2016; PLATTS-MILLS et al., 2017; HAQUE et al., 2019). Além disso, infecções provocadas por espécies de *Campylobacter* já foram associadas ao aumento da permeabilidade intestinal e inflamação tanto local como sistêmica, sugerindo que a união desses fatores possa está diretamente associado a redução do crescimento linear dessas crianças, além

da associação com disfunção entérico ambiental (RIDDLE et al., 2012; MBUYA & HUMPHREY; 2015; AMOUR et al., 2016; HAQUE et al., 2019).

A patobiologia das infecções provocadas por *Campylobacter* spp. que podem acarretar infecções diarreicas, ou levar ao estado de desnutrição do indivíduo, ainda não são bem esclarecidos, mas alguns fatores genéticos relacionados à virulência do patógeno já vem sendo elucidados, como fatores que estão envolvidos na motilidade mediada por flagelos, adesão às células epiteliais do intestino, invasão e sobrevivência bacteriana nas células do hospedeiro, bem como a capacidade de produzir toxinas (RAO et al., 2011; BANG et al., 2003; KRUTKIEWICZ et al., 2010; QUETZ et al.; 2012; VERAS et al.; 2018). A presença desses fatores de virulência de forma individual, ou em combinação, podem ser responsáveis pela modulação da infecção provocadas por *C. jejuni*, aliada a fatores de risco (socioeconômicos e demográficos) e estado imunológico do hospedeiro (VERAS et al.; 2018; WYSOK & WOJTACKA, 2018; HAQUE et al.; 2019; SINGH & MALLICK, 2019).

Diante disso, considerando o aumento no número de casos de infecções causadas por *C. jejuni*, os fatores de riscos que podem estar associados com o aumento de infecções causadas pelo microrganismo, aliados à frequência de infecções em crianças nos primeiros anos de vida e a presença de fatores genéticos relacionados à virulência bacteriana, o presente estudo visa avaliar o impacto de infecções provocadas por *C. jejuni* em crianças com infecções subclínicas na cidade de Fortaleza – CE, através da avaliação de fatores de riscos econômicos e sociais, parâmetros antropométricos, presença de genes de virulência, resposta imunoinflamatória, permeabilidade intestinal, e a influência de copatógenos relacionados a patobiologia do microrganismo.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Campylobacter* spp.

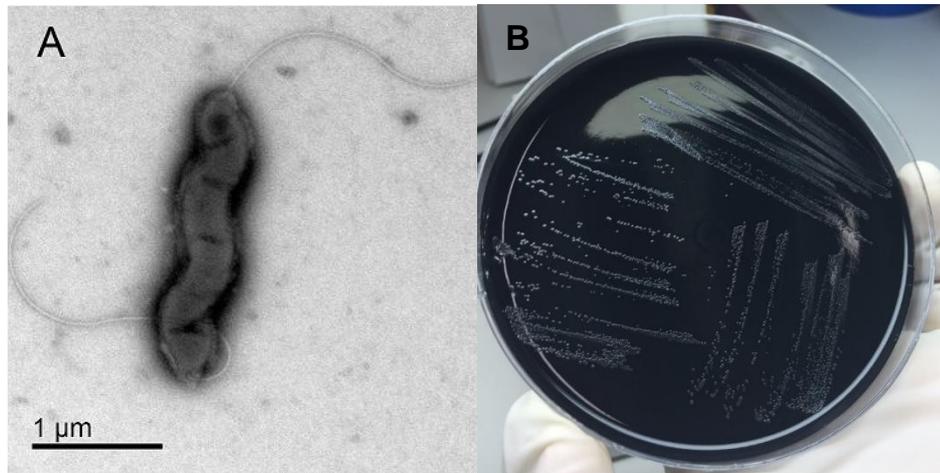
O gênero *Campylobacter* (do grego *Kampulus*, encurvado e *Bacter*, bactéria) pertence à família Campylobacteraceae, ordem Campylobacterales, classe Epsilonproteobacteria, do filo Proteobacteria (SKIRROW, 2006; FITZGERALD, 2015). A primeira identificação do gênero aconteceu em 1913 por McFaydean e Stockman, após encontrarem um microrganismo em forma de curva causando aborto em ovinos e bovinos. Essa bactéria permaneceu sem nome até 1919, quando Smith e Taylor isolaram o mesmo microrganismo em fluidos fetais bovinos, nomeando o microrganismo de *Vibrio fetus*. Já em 1963, Sebalt e Véron propuseram o gênero *Campylobacter*, reclassificando *V. fetus* para *Campylobacter fetus* (SMITH & TAYLOR, 1919; VÉRON & CHATELAIN, 1973; SMIBERT, 1978).

Além desta longa importância como patógeno que causam infecções em animais desde o início do século XX, *C. fetus* foi posteriormente identificado como agente causador de infecções em humanos (GUERRANT et al., 1978). Contudo, a maior relevância de *Campylobacter* spp. como um dos principais causadores de infecções entéricas em humanos foi descoberta apenas no início dos anos 80, após o desenvolvimento e implementação de meios seletivos de cultura para o isolamento de espécies de *Campylobacter* a partir de amostras fecais (NEWMAN & LAMBERT, 1980; STEELE et al., 1985).

*Campylobacter* spp. são bactérias Gram-negativas, delgadas, em formato de bastão ou espiraladas (0.2-0.8  $\mu\text{m}$  x 0.5-5  $\mu\text{m}$ ), que podem possuir flagelos, ou não (**Figura 1.A**). Algumas espécies possuem múltiplos flagelos, como *C. showae*, enquanto algumas espécies não possuem flagelo, como *C. gracilis* (MOORE et al., 2005; MAN, 2011; IGWARAN & OKOH, 2019). As espécies de *Campylobacter* são indol negativo, oxidase positiva, hipurato positivo, catalase positivo, nitrato positivo e não utilizam glicose como fonte de energia, sendo utilizado peptona como fonte de nutrientes. A maioria das espécies crescem em condições microaerófilas, mas algumas espécies, como *C. curvus*, *C. rectus* e *C. concius*, precisam de condições anaeróbias para seu crescimento (FERNÁNDEZ, 2008; MAN, 2011; PAL, 2017).

A partir do desenvolvimento do meio de cultura Skirrow foi possível avançar nos estudos de espécies de *Campylobacter*. Este meio contém peptonas como fonte de nutrientes, sangue lavado de cavalo e antibióticos para prevenir o crescimento de outros microrganismos. Estes ingredientes formam a base para a maioria dos meios de uso comum no isolamento de *Campylobacter* (POST, 1995) (**Figura 1.B**).

**Figura 1:** Micrografia de *Campylobacter jejuni* e crescimento de *C. jejuni* em ágar modificado de carvão.

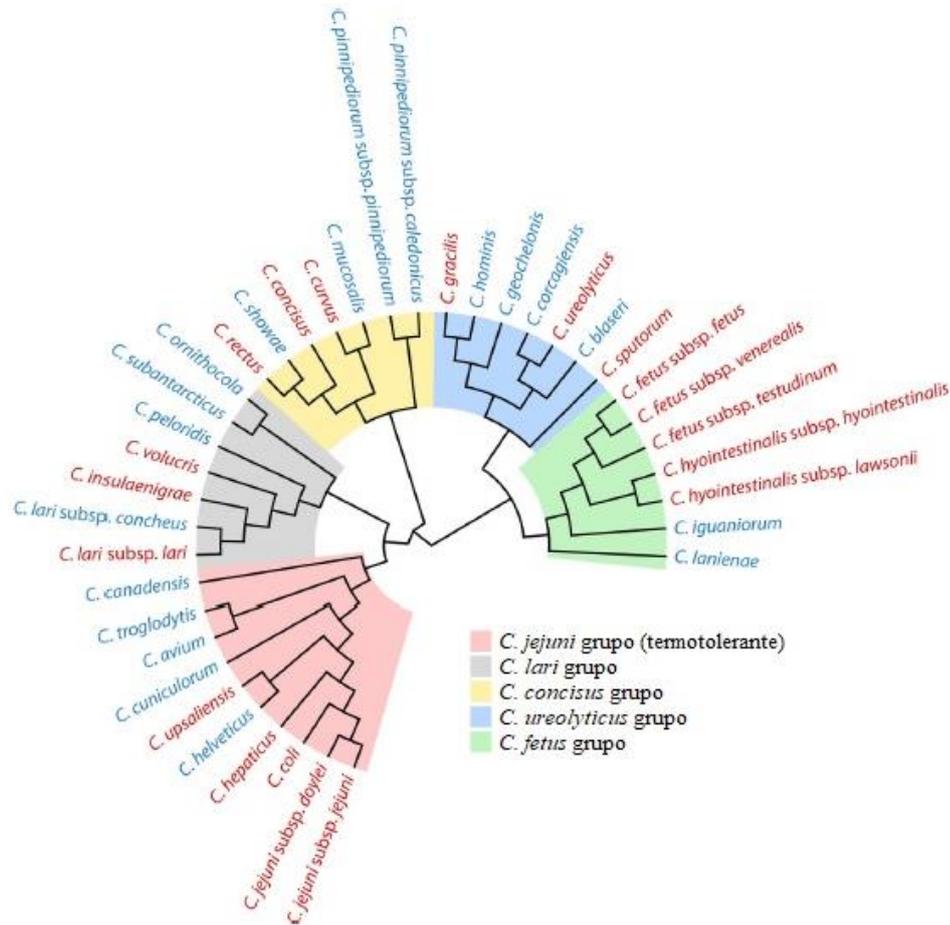


A: Micrografia de *C. jejuni* mostrada através de microscopia eletrônica; B: Crescimento de *C. jejuni* em ágar Karmali, mostrando a presença de colônias com cerca de 1,0 a 1,5 mm de diâmetro, brilhantes e na coloração cinza. Fontes: KLANČNIK et al., 2020; Próprio autor.

*Campylobacter* spp. são um grupo de bactérias que tem a capacidade de colonizar o trato gastrointestinal de diferentes animais, principalmente aves e mamíferos, e atualmente, o estudo de espécies de *Campylobacter* são de enorme importância devido ao aumento do número de espécies que são implicadas em causar infecções em animais e humanos (MAN, 2011; KAAKOUSH et al., 2015).

Desta forma, já foram identificados cerca de 32 espécies e 9 subespécies de *Campylobacter*. Essas espécies se agrupam em cinco grupos filogenéticos, todos contendo microrganismos patogênicos, destacando a relevância clínica de todo o gênero (**Figura 2**). Cerca de 15 espécies já foram relacionadas como agentes causadores de infecções em humanos e/ou em animais, sendo muitas delas frequentemente associadas a diversas apresentações clínicas, como gastroenterites, meningites, abscessos, sepse e infecções periodontais (MAN, 2011; COSTA & IRAOLA, 2019). *C. jejuni* é a espécie mais relevante e mais bem descrita, sendo uma das principais causas de gastroenterites bacteriana em humanos. Outras espécies de *Campylobacter* de maior prevalência em infecções em humanos são *C. coli*, *C. lari* e *C. upsaliensis* (MAN, 2011, TABOADA et al., 2013; KAAKOUSH et al., 2015).

**Figura 2:** Relação filogenética entre as principais espécies e subespécies de *Campylobacter*.



Árvore filogenética de *Campylobacter* spp., dividindo o gênero em cinco grupos distintos: *C. jejuni*, *C. lari*, *C. concisus*, *C. ureolyticus* e *C. fetus*. Os nomes foram atribuídos considerando os aspectos clínicos relevantes das espécies dentro de cada grupo. As espécies com nomes escritos em vermelho são as documentadas como causadoras de infecções em humanos e/ou outros animais. As espécies com nomes escritos em azul não foram documentadas como causadoras de infecções. Fonte: Adaptado de COSTA & IRAOLA, 2019.

As espécies de *Campylobacter* são microrganismos fastidiosos, ou seja, necessitam de condições especiais para seu cultivo em meio de cultura microbiológico. Para o isolamento do microrganismo em material fecal é necessária uma incubação a 42°C, em ambiente microaerófilo (5% de O<sub>2</sub>, 10% de CO<sub>2</sub>, 85% de N<sub>2</sub>). Algumas espécies (*C. sputorum*, *C. concisus*, *C. mucosalis*, *C. curvus*, *C. rectus* e *C. hyointestinalis*) ainda exigem a presença adicional de hidrogênio. Os meios de cultura são seletivos, com a presença de sangue ou carvão mineral, além de conter antibióticos para impedir o crescimento de bactérias competitivas (GEE et al., 2002; FACCIOLÀ et al., 2017).

## 2.2 Fontes de transmissão de campylobacterioses

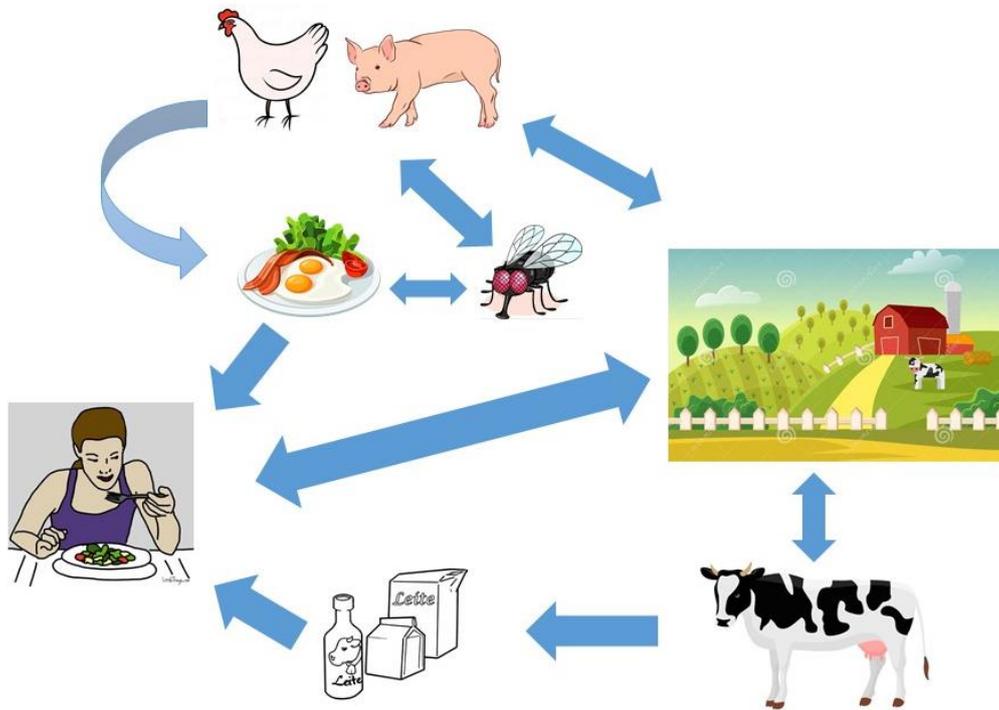
As espécies de *Campylobacter* são microrganismos comensais do trato gastrointestinal de muitos animais selvagens (patos e gaivotas), animais de criação (gado, porcos) e animais domésticos (cães e gatos), além disso é predominante em todas as espécies aviárias próprias para consumo humano (DAMBORG et al., 2004; DEARLOVE et al., 2016).

São microrganismos responsáveis por zoonoses e sua transmissão que ocorre pela via fecal-oral, através da ingestão de alimentos e água contaminados (GRZYBOWSKA-CHLEBOWCZYK et al., 2013; ROSNER et al., 2017). O principal nicho ambiental é representado pelo trato gastrointestinal de todas as espécies aviárias, particularmente aves de capoeira, galinhas poedeiras, perus, patos e avestruzes, que são considerados as principais vias de transmissão da bactéria. O consumo de carne de origem aviária, de fato, representa cerca de 50% a 70% dos casos humanos de campylobacterioses. Contudo, até o consumo de leite não pasteurizado, carne vermelha crua, frutas e vegetais com limpeza inadequada, já foram identificados como possíveis rotas de transmissão (EFSA, 2015, FACCIOLA et al., 2017; HANSSON et al., 2018; IGWARAN & OKOH, 2019; DIRIBA et al., 2021).

Viagem a países endêmicos, principalmente países em desenvolvimento, que possuem uma incidência de casos de campylobacterioses durante todas as épocas do ano, também é um fator de risco para infecções pelo microrganismo (GRZYBOWSKA-CHLEBOWCZYK et al., 2013; DAVIS et al., 2016).

*Campylobacter* spp. também podem ser transmitido através do contato de pessoa-a-pessoa, mas principalmente por contato direto com animais, sejam de criação ou domésticos, além da transmissão realizada por vetores, como moscas, que podem ter contato direto com alimentos contaminados (EFSA, 2015; EVERS et al., 2016; KUHN et al., 2021). Diante disso, a identificação e compreensão das rotas de transmissão da campylobacterioses são cruciais para a prevenção e controle da infecção, além de contribuir para a elaboração de estratégia para o controle das campylobacterioses (NEWELL et al., 2017, SHER et al., 2021). Algumas das principais rotas de transmissão das infecções em humanos causadas por *Campylobacter* ssp. estão ilustradas na **Figura 3**.

**Figura 3:** Rotas de transmissão de *Campylobacter* spp.



As fontes de infecção de espécies de *Campylobacter* para o ser humano podem ser através do consumo de leite, carnes e de vegetais que não foram processados adequadamente. A contaminação para essas fontes alimentares pode vir através do ambiente já contaminado pelo microrganismo, que por consequência contamina os animais que convivem nesses locais. Da mesma forma, os seres humanos também se tornam fontes de infecção para ambientes. Vetores, como moscas também podem levar o microrganismo de fontes já contaminadas para animais e alimentos. Adaptado de IGWARAN & OKOH, 2019.

### 2.3 Epidemiologia das infecções causadas por *Campylobacter* spp.

Na última década, houve um aumento global do número de casos de campylobacterioses. A infecção pelo microrganismo aumentou na América do Norte, Europa e Austrália (WHO, 2012; KAAKOUSH et al., 2015). Dados epidemiológicos da África, Ásia, América do Sul e Oriente Médio ainda são incompletos, mas estudos multicêntricos nessas regiões indicam que a infecção é endêmica, e atinge principalmente crianças nos primeiros anos de vida (KOTLOFF et al., 2013; LIU et al., 2016; PLATT-MILLS et al., 2015; 2018, HAQUE et al., 2019).

De acordo com a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA), em 32 países europeus, *Campylobacter* spp. é o patógeno mais comum em infecção gastrointestinal bacteriana em humanos, sendo reportados mais de 246 mil casos de campylobacterioses em humanos apenas no ano de 2016 (EFSA, 2017). Nos Estados Unidos, as espécies de

*Campylobacter* são a causa mais comum de diarreia em humanos, afetando mais de 1,5 milhões de pessoas anualmente (CDC, 2019). Nesses países desenvolvidos, a infecção pelo microrganismo não é endêmica, e muitas vezes é associada a surtos, principalmente por produtos lácteos contaminados, além de ser observado um perfil sazonal da infecção, onde nos EUA, por exemplo, os casos são mais relatados durante o inverno e verão (TAYLOR et al., 2013; KAAKOUSH et al., 2015; CDC, 2019).

Nos países em desenvolvimento, a infecção é endêmica, não apresenta uma sazonalidade, e há um número significativo de casos assintomáticos (WAGENAAR, FRENCH & HAVELAAR, 2013). Em estudo multicêntrico do tipo coorte, denominado MAL-ED (*The Etiology, Risk Factors, and Interactions of Enteric Infections and Malnutrition and the Consequences for Child Health*), realizado em 8 países localizados na Ásia, África e América do Sul, tendo como alvo de estudo a população infantil, *Campylobacter* spp. foi o patógeno mais prevalente, nos primeiros dois anos de vida. A maior prevalência foi relatada principalmente no Peru, Bangladesh, África do Sul e Brasil. O ensaio imunoenzimático (ELISA) foi utilizado para esse diagnóstico (PLATTS-MILLS et al., 2015).

Já com uma nova abordagem de diagnóstico realizada nesse mesmo estudo, utilizando técnicas moleculares, *C. jejuni* e *C. coli*, foram o quarto patógeno com maior prevalência até os 12 meses de idade, e o sexto até os 24 meses de idade, principalmente no Peru, África do Sul, Índia e Paquistão (PLATTS-MILLS et al., 2018).

A diferença na incidência e número de casos notificados de diferentes países ou regiões, ou dentro do mesmo país podem variar substancialmente. É provável que esse fato ocorra, em parte, pela diferença na sensibilidade e especificidade das metodologias de diagnóstico do microrganismo, área, o perfil da população estudada, bem como no padrão e rigor na execução dos protocolos de vigilância sanitária, práticas alimentares e disponibilidade de reservatórios naturais para as espécies de *Campylobacter* nessas regiões. Além disso, é provável que as infecções representem apenas um pequeno percentual da real situação, devido às subnotificações (WAGENAAR, FRENCH & HAVELAAR, 2013).

No Brasil, estudo realizado na cidade de Fortaleza – CE, mostrou uma prevalência de 9,6% de infecções causadas por *C. coli* e *C. jejuni* em população infantil com diarreia, enquanto que a prevalência do microrganismo na população infantil que não apresentou sintomatologia foi de 7,2% (QUETZ et al., 2010) Estudo caso-controlado também realizado na cidade de Fortaleza - CE em crianças nutridas e desnutridas, mostrou uma prevalência de 11,18% de

infecção causadas por *C. jejuni/C. coli* nessa população (VERAS et al., 2018). Ambos os estudos utilizaram a reação em cadeia da polimerase (PCR), como diagnóstico.

Em contrapartida, na região Sul do Brasil um estudo apontou uma prevalência de apenas 2% de infecção por *Campylobacter* spp. A baixa prevalência nesse estudo pode ser explicada pelo uso de microbiologia convencional como técnica de diagnóstico (SILVA et al., 2016).

Outro fator que interfere no diagnóstico do microrganismo é que grande parte dos estudos epidemiológicos diagnosticam apenas as espécies *C. jejuni* e *C. coli*, comprometendo o diagnóstico das demais espécies (PLATTS-MILLS et al., 2014). No Peru, infecções provocadas por outras espécies de *Campylobacter* se mostraram mais severas que infecções causadas por *C. jejuni/C. coli* (FRANÇOIS et al., 2018). Esse fato demonstra a importância do diagnóstico das outras espécies de *Campylobacter*, tanto para mostrar a real situação do número de casos de campylobacterioses, como para compreender melhor a severidade da infecção causada por outras espécies do patógeno (BULLMAN et al., 2012; PLATTS-MILLS et al., 2014; FRANÇOIS et al., 2018).

## **2.4 Patobiologia e fatores de virulência de *Campylobacter* spp.**

### **2.4.1 Trato gastrointestinal e resposta imune do hospedeiro as infecções por *Campylobacter* spp.**

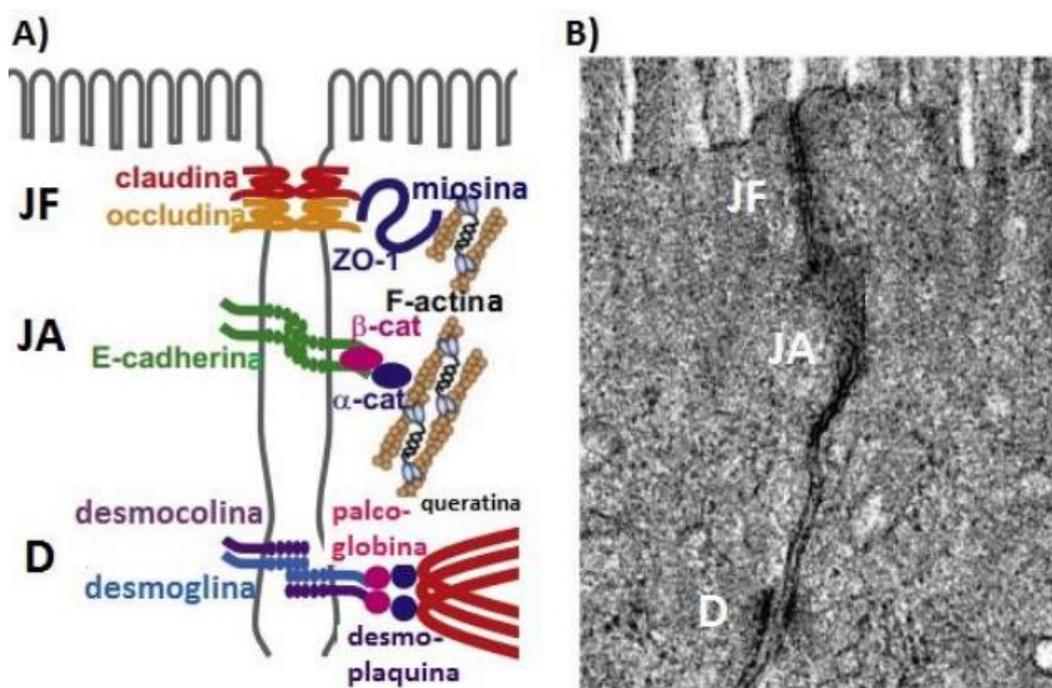
O trato gastrointestinal (TGI) em humanos compreende uma estrutura contendo quatro camadas celulares: a mucosa, submucosa, musculatura externa e serosa. A mucosa é a camada mais interna, sendo dividida em epitélio, lâmina própria e mucosas musculares. O epitélio mucoso do intestino delgado é constituído por uma única camada de células epiteliais, células caliciformes secretoras de muco, células de Paneth e células M. O epitélio ainda forma vilos e criptas que são cobertos por uma camada de muco altamente viscoso (RUBIN, 2007; FARRE & VICARIO, 2017).

A superfície da mucosa gastrointestinal é formada por células epiteliais que representam uma barreira efetiva através de junções intercelulares que separam os ambientes interno e externo, bloqueando a passagem de substâncias potencialmente nocivas. Além disso, as células epiteliais também são responsáveis pela absorção de nutrientes e eletrólitos. Portanto, neste contexto, é uma barreira semipermeável necessária para permitir, de forma seletiva, a entrada de substâncias essenciais para o meio intracelular (SALVO-ROMERO et al., 2015).

Agentes patogênicos entéricos, como *Campylobacter* spp., podem danificar o epitélio e desregular as funções da barreira intestinal através de mecanismos de patogenicidade, como a indução da morte de células do hospedeiro. Dentre as proteínas como possível alvo para o dano causado por *Campylobacter* spp. estão as proteínas formadoras de junções firmes (*Tight Junctions* - TJs) e junções aderentes do epitélio (*adherens junctions* - AJs), o que justificaria o aumento de permeabilidade e translocação de produtos bacterianos durante a infecção. (O'HARA e BURET, 2008; BOEHM et al., 2012) (**Figura 4**).

As TJs, junções aderentes e comunicantes e os desmossomos, tem a função de unir as células epiteliais intestinais (KARCZEWSKI et a., 2010). As TJs representam a principal barreira paracelular para o movimento de água, solutos e células imunes, estabelecendo polaridade e prevenindo a mistura de componentes entre compartimentos apical e basolateral dos enterócitos (CAPLAN et al., 2008) (**Figura 4**).

**Figura 4:** Representação das junções das células epiteliais intestinais.



Complexo juncional de células epiteliais intestinais (A) e sua respectiva eletromicrografia (B). No ápice encontra-se o complexo de junções firmes (TJs) com localização dos seus componentes estruturais (claudina, occludina e ZO-1 ligada à cadeia de miosina). Em seguida, o complexo de junções aderentes (AJs) e a localização de seus componentes estruturais (caderinas: E-caderina,  $\alpha$  e  $\beta$ -catenina). O complexo desmossomo (D) vem logo em seguida, com as respectivas localizações de seus componentes estruturais (desmoglina, desmocolina, desmoplaquina, placoglobina e filamentos de queratina). Adaptado de Choi et al. (2017).

A invasão do epitélio por cepas de *Campylobacter*, principalmente *C. jejuni*, *C. coli* e *C. concisus*, pode estar associada com o aumento da permeabilidade intestinal. No entanto,

ainda é necessário determinar, de maneira conclusiva, se a disfunção da barreira é uma consequência de danos no epitélio que estão associados com o aumento da morte celular, ou é atribuído à perda da função das junções firmes, que causam aumento da permeabilidade intestinal, como já tem sido observado para este patógeno (BELTINGER et al., 2008; WINE et al., 2008; MAN, 2011)

A resposta a infecções induzidas por espécies como *C. jejuni*, resulta na expressão de CXCL20, uma citocina responsável pelo recrutamento de células dendríticas. Essa expressão resulta na ativação e secreção do fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), induzindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas IL-8, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , e IL-6, e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), associado à maturação das células dendríticas. Além disso, há a expressão de receptores *toll-like* (TLRs) (YOUNG et al., 2007; FRIIS et al., 2009).

Os componentes da superfície celular de *C. jejuni*, como flagelina e o lipoligossacarídeo (LOS) são estimuladores fracos de TLR-5 e TLR-4, mas a ativação de TLR-2 por polissacarídeos de membrana de *C. jejuni*, em estudos *in vitro*, parece ser necessária para a montagem da resposta imune, marcada pela liberação de IL-6 (WATSON e GÁLAN, 2005; HAMEED, 2019). Estudo *in vivo*, com camundongos com deficiência na produção de TLRs, mostrou que TLR-4 é um dos principais indutores da inflamação intestinal, enquanto isso, TLR-2 foi um sinalizador na proteção da integridade da mucosa intestinal contra infecções por *C. jejuni* (STAHL et al., 2014).

#### **2.4.2 Fatores de virulência de espécies de *Campylobacter***

Os mecanismos exatos da infecção por *Campylobacter* spp. ainda não são completamente compreendidos, mas vários fatores de virulência já foram identificados, como flagelos, plasmídeos, adesinas, produção de toxinas e fatores quimiotáticos (KONKEL et al., 2001; MAN, 2011; BOLTON, 2015; SAME & TAMMA, 2018). A infecção inicial é estabelecida quando a bactéria se liga às células epiteliais intestinais através de filamentos semelhantes a fimbria. A colonização do trato gastrointestinal é então facilitada pelos flagelos e fatores quimiotáticos. (LASCOVITA, 2006; YONG et al., 2007; ZOETE et al., 2010)

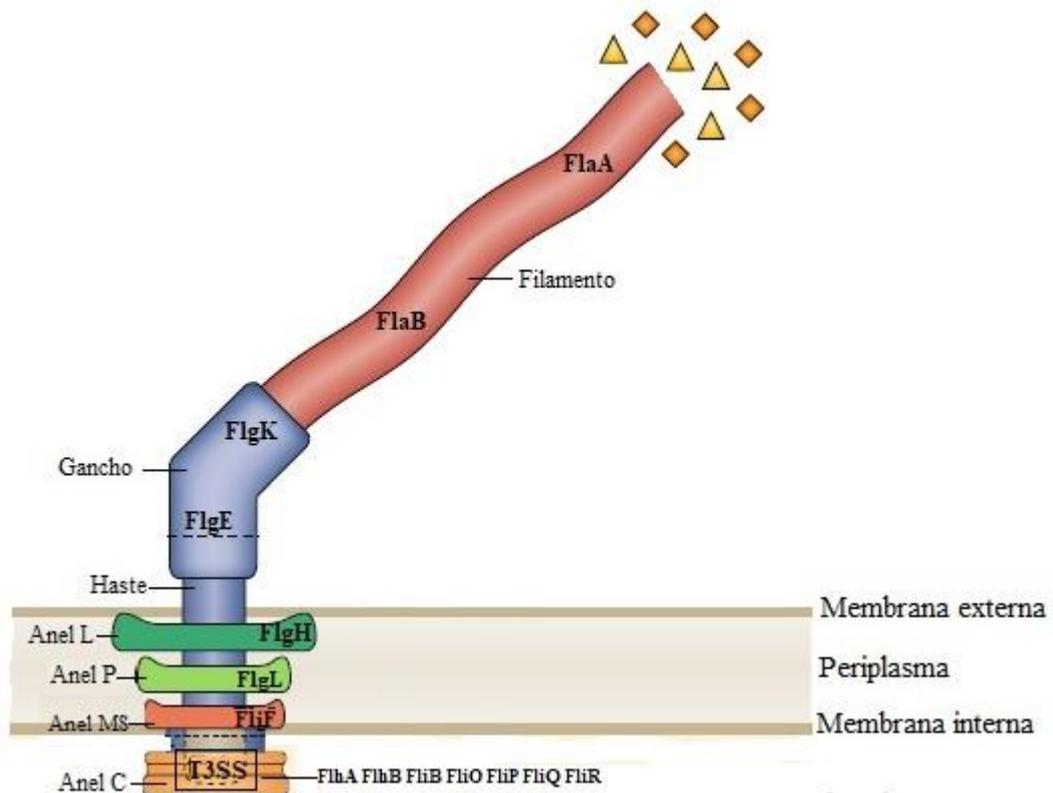
Existem uma variedade de outras proteínas de superfície e adesinas que facilitam a colonização e invasão de células do epitélio intestinal. Além disso, alguns isolados de *Campylobacter* contêm plasmídeos de alto peso molecular, que já foram associados a presença de sangue nas fezes, e acredita-se que contribua para o processo de invasão do microrganismo (TRACZ et al., 2005).

Um dos principais mecanismo de colonização é a motilidade do microrganismo, sendo esse um importante fator de sobrevivência de algumas espécies de *Campylobacter* sob diversas condições quimiotáticas com que se deparam no trato gastrointestinal dos hospedeiros (JAGANNATHAN & PENN, 2005). O sistema de motilidade, que acontece através dos flagelos, envolve um sistema quimiosensorial que controla o movimento flagelar, dependendo das condições ambientais onde o microrganismo é encontrado (VAN VLIET & KETLEY, 2001; HENDRIXSON & DIRITA, 2004).

Quimiotaxia e flagelinas são dois fatores importantes de virulência, que ajudam a levar a bactéria para uma efetiva colonização. Alguns desses fatores de virulência da motilidade de *Campylobacter* spp. e seus genes codificadores são o promotor  $\sigma 54$ , que regula o gene *flaB* e o promotor  $\sigma 28$ , que regula o gene *flaA*. O gene *flaA* aparenta ser um gene essencial para uma significativa invasão e colonização do epitélio do trato gastrointestinal do hospedeiro (HENDRIXSON, 2006; YOUNG et al., 2007; BOLTON, 2015). Além disso, reguladores do gancho do flagelo, como o gene *flgE*, codificante da proteína FlgE, se mostrou essencial para a motilidade e colonização bacteriana (GUERRY, 2007; VERAS et al., 2018).

O sistema flagelar também é responsável por secretar proteínas de virulência de *Campylobacter* spp., tendo uma função similar ao Sistema de Secreção do tipo III (T3SS). Essa função é realizada através de um conjunto de proteínas que estão presentes no sistema flagelar (KONKEL et al., 2004; NOVIK et al., 2010). Dessa forma, a formação geral do flagelo é composta por um corpo basal em formato de gancho e componentes estruturais presentes nos filamentos extracelulares. O corpo basal do gancho compreende a um gancho localizado na superfície, uma haste periplasmática e estruturas anelares associadas, além de uma base embutida no citoplasma e filamentos extracelulares (BOLTON, 2015; GUERRY, 2007; LERTSETHTAKARN et al., 2011). A estrutura flagelar do microrganismo pode ser observada na **Figura 5**.

**Figura 5:** Estrutura do sistema flagelar de espécies de *Campylobacter* e seus principais componentes.



A base do flagelo é composta pelos anéis C, MS, P e L. No anel C é composto pelas proteínas FlhA, FlhB, FliB, FliO, FliP, FliQ e FliR, que formam o sistema secretor da bactéria, sistema esse semelhante ao T3SS, que a bactéria não possui. O anel MS é composto pela proteína FliF, o anel P pela proteína FlgL e o anel L composto pela proteína FlgH. Na haste do flagelo se forma o gancho, que é composto pelas proteínas FlgE e FlgK. O filamento extracelular, é composto pelas proteínas FlaB e FlaA. Adaptado de Bolton, 2015 e Burnham & Hendrixson, 2019.

Os fatores quimiotáticos auxiliam as células bacterianas, através de respostas químicas, a se moverem para locais mais favoráveis para a sobrevivência bacteriana, como regiões com maior concentração de fontes de nutrientes e a busca por uma célula hospedeira. A quimiotaxia está bastante implicada na virulência do patógeno (ZAUTNER et al., 2012; KOROLIK, 2019).

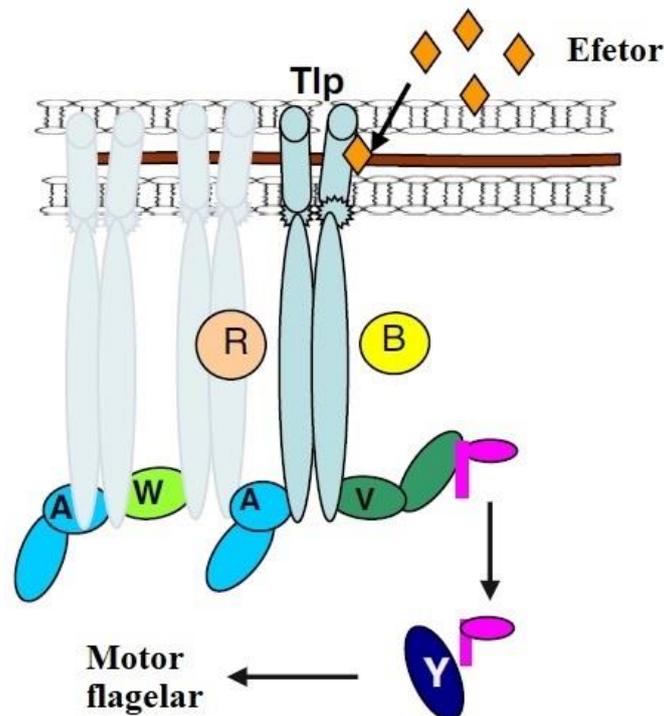
O primeiro passo deste processo é iniciado por receptores quimiossensoriais que reconhecem ligantes químicos e iniciam uma cascata de transdução de sinais, permitindo que a célula bacteriana se mova em direção a uma região favorável de sobrevivência. Os quimiossensores bacterianos respondem a esses estímulos externos com precisão e sensibilidade únicas, uma característica essencial da sobrevivência. Interrupção de qualquer componente da transdução dos sinais pode reduzir a capacidade do patógeno de colonizar e causar a infecção no hospedeiro (LEE et al.; 2001; HARTLEY-TASSELL et al., 2010).

Espécies de *Campylobacter*, como *C. jejuni* codificam uma única via quimiossensorial através de 11 receptores sensoriais, sendo o Tlps (proteína do tipo transdutor) um dos principais

(DAY et al., 2012). Algumas das proteínas envolvidas na sinalização da quimiotaxia são proteínas de domínio único, semelhantes às encontradas em *E. coli*, como CheY e CheW, e há alguns que não são encontrados em *E. coli*, mas são comuns em outras bactérias, como CheV e CheA, onde ambas possuem dois domínios. *C. jejuni* ainda possui outra proteína de domínio simples, a CheB, que é uma das responsáveis por receber os sinais transmitidos pelos receptores sensoriais (MARCHANT et al., 2002; KOROLIK & KETLEY, 2008).

Através das proteínas e receptores sensoriais, ocorre uma mudança no motor flagelar de *C. jejuni*, provocando uma modificação na rotação do flagelo, que deixa de ser no sentido anti-horário e passa para o sentido horário, efetuando uma mudança na motilidade da bactéria, alterando assim a direção de locomoção do microrganismo (ZAUTNER et al., 2012). O funcionamento e localização das proteínas e receptores responsáveis pela quimiotaxia de *C. jejuni*, podem ser observados na **Figura 6**.

**Figura 6:** Proteínas quimiotáticas responsáveis pela mudança na motilidade de *C. jejuni*.



Sinais químicos são captados através da Tlp (proteína tipo transdutora), e transmitidos para proteínas CheR (em laranja) e CheB (em amarelo). O sinal é em seguida transmitido para proteínas efectoras, como CheV (em verde escuro), CheA (em azul claro), de domínio duplo e CheW (em verde claro), de domínio simples. Através da proteína CheY que ocorre a mudança na rotação do motor flagelar de *C. jejuni*, auxiliando na motilidade junto ao flagelo bacteriano. Adaptado de Korolik, 2019.

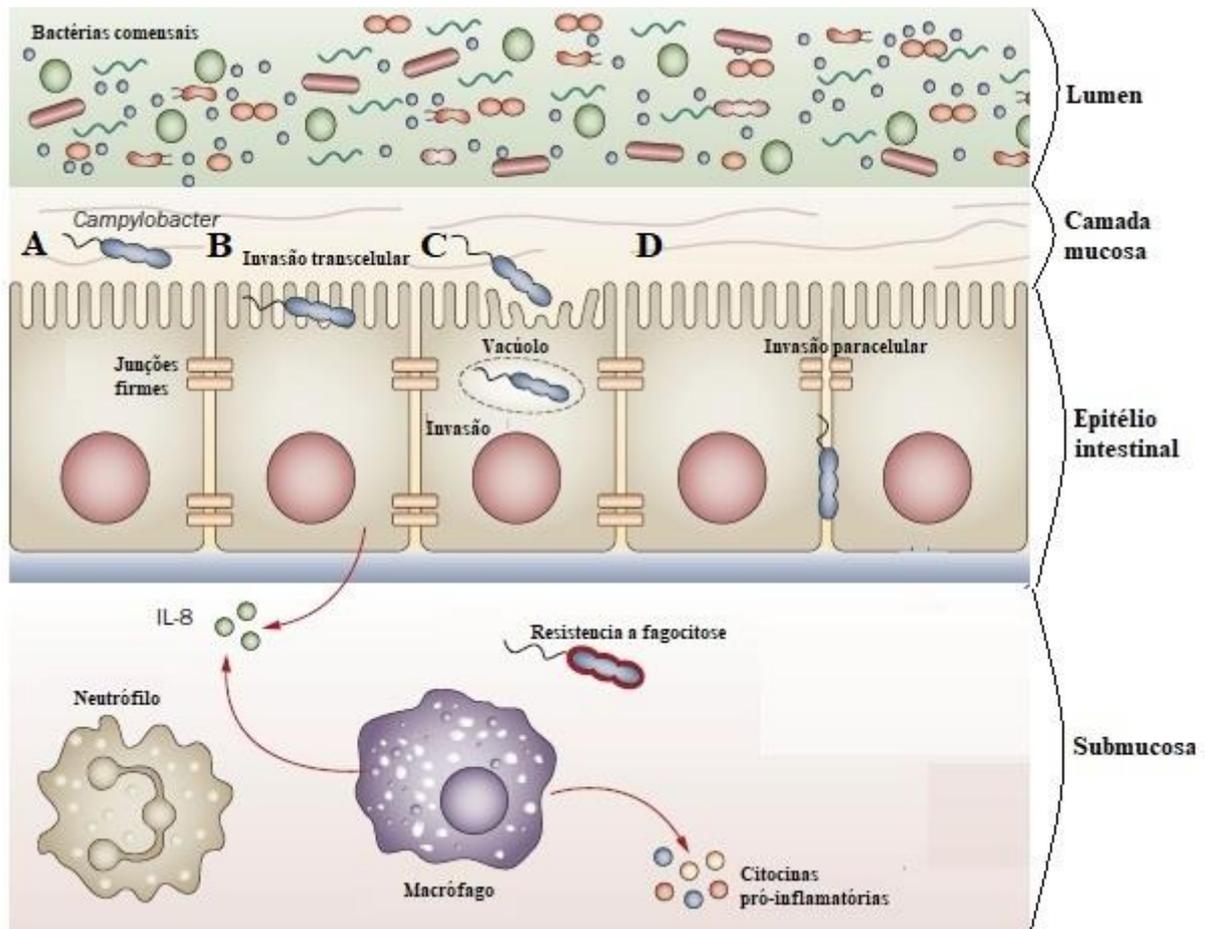
Após uma efetiva motilidade, o processo de adesão de *Campylobacter* as células epiteliais também representa uma propriedade de virulência muito importante na infecção em

humanos e animais, e isso não é crucial apenas para a sobrevivência do microrganismo fora do hospedeiro, mas também durante interações patógeno-hospedeiro, invasão do espaço intracelular e passagem das barreiras do hospedeiro, como a camada de muco do epitélio intestinal, e assim garantir a sobrevivência bacteriana (BOLTON, 2015; KLANČNIK et al., 2020).

A adesão do microrganismo às células do epitélio gastrointestinal é uma condição prévia para a colonização, que é mediada por algumas adesinas na superfície bacteriana (JIN et al., 2001). Os fatores de virulência na adesão incluem uma proteína de adesão, codificada pelo gene *capA* (*Campylobacter adhesion protein A*); uma fosfolipase, codificada pelo gene *pldA* (*phospholipase A*) responsável tanto pela adesão, como invasão bacteriana; uma lipoproteína codificada pelo gene *jlpA* (*jejuni lipoprotein A*), específica para a proteína de choque térmico 90 (HSP90), essencial para a sobrevivência celular; dentre outras (JIN et al., 2003). A aderência da bactéria à fibronectina F, regulado pelo gene *cadF* (*Campylobacter adhesion to fibronectin*), é outro importante fator de virulência de *Campylobacter*, que permite que o microrganismo se ligue à fibronectina, promovendo assim, a interação entre a bactéria e as células do hospedeiro e posteriormente a colonização (KONKEL et al., 1997; BOLTON, 2015; IGWARAN & OKOH, 2019).

A lesão intestinal ocorre através da invasão bacteriana, que pode gerar aumento da permeabilidade intestinal, através da ruptura das junções firmes, ou até mesmo levar a morte celular através de ação de toxinas bacterianas (BELTINGER et al., 2008; LAM-ROSTESKI et al., 2008). *C. jejuni* é capaz de penetrar na camada de muco das células epiteliais do hospedeiro sem entrar em contato com as criptas intestinais, podendo permanecer livremente na camada mucosa. Além disso, outro mecanismo de invasão é o encapsulamento bacteriano dentro de um vacúolo, evitando a ação de células de defesas do hospedeiro e de agentes antimicrobianos (FERRERO e LEE, 1988; WATSON e GALAN, 2008). Alguns dos mecanismos de invasão e colonização de espécies de *Campylobacter*, podem ser observados na **Figura 7**.

**Figura 7:** Mecanismos de invasão e colonização de *Campylobacter* spp.



**A:** *Campylobacter* spp. podem se locomover pela camada mucosa do epitélio, e assim se ligar e invadir células do epitélio intestinal do hospedeiro. **B:** Evidências mostram que *C. fetus* pode se translocar pelo epitélio intestinal pela via transcelular, induzindo uma resposta imune inata por meio da produção de interleucina-8 (IL-8) pelos macrófagos e a por consequência, produção de citocinas pró-inflamatórias, promovendo o processo inflamatório. **C:** *C. jejuni* tem a capacidade de se encapsular dentro de um vacúolo, evitando assim a ação de células de defesa do hospedeiro e de agentes antimicrobianos. **D:** Espécies como *C. jejuni* e *C. concisus* podem ter a capacidade de invadir a células epiteliais do hospedeiro através da via paracelular, por meio da ruptura das junções firmes. Adaptado de Man, 2011.

A invasão bacteriana é induzida pela injeção de proteínas secretoras nas células do hospedeiro através do sistema flagelar. Uma das proteínas secretadas é a CiaB (*Campylobacter invasion antigen B*), codificada pelo gene *ciaB*. Cepas de *C. jejuni* mutantes para *ciaB* mostraram redução da internalização na célula do hospedeiro (KONKEL et al., 1999). Além disso, existem um marcador genético de invasão celular, o *invasion-associated marker*, codificado pelo gene *iamA*, que pode estar relacionado a adesão e invasão de cepas de *C. jejuni* em células HEP-2 *in vitro* (CARVALHO et al., 2001). Plasmídeos de alto peso molecular, como o pVir, encontrado em algumas cepas de *Campylobacter* spp. possuem genes reguladores, como o *pVir*, que já foram associados a adesão e invasão bacteriana, onde sua presença tem também

tem sido relacionada a severidade da infecção causadas por cepas de *C. jejuni* (BACON et al., 2002; TRACZ et al., 2005).

*Campylobacter* spp. podem encontrar uma série de fatores ambientais no intestino do hospedeiro, tanto animal como em seres humanos, que requerem mecanismos para garantir a sobrevivência bacteriana. Esses mecanismos de adaptação permitem ao microrganismo a capacidade de alterar o uso de diferentes fontes de nutrientes, alterações de temperatura e a disponibilidade de oxigênio (VAN PUTTEN et al., 2009).

Dentre esses mecanismos de adaptação, estão os responsáveis pela captação de ferro (Fe), essencial para alguns processos biológicos, como a síntese de DNA, mas que também pode ser tóxico para a célula bacteriana em níveis elevados. Uma das proteínas responsáveis pela regulação desse processo é a Fur (*ferric uptake regulator*), codificada pelo gene *fur*, que é responsável pela regulação dos níveis de ferro e ação dos sideróforos, eliminando assim o excesso de ferro da célula bacteriana (BUTCHER et al., 2012; 2010; LEE e HELMANN et al., 2007).

Além dessas funções, a proteína Fur ainda é responsável pela regulação de outros sistemas de absorção de ferro, que envolvem as proteínas Ceu (*enterochelin uptake substrate-binding protein*), responsável por codificar a enteroquelina; e CfrA (*Receptor férrico de Campylobacter*), responsável pelo receptor da membrana externa da enteroquelina férrica (FeEnt), que é um sideróforo de alta afinidade responsável pela aquisição de ferro para a bactéria. Cepas de *C. jejuni* mutantes para os genes *cfrA* e *ceuE*, que são codificantes da proteínas CfrA e Ceu, respectivamente, tiveram um comprometimento na colonização de células do epitélio intestinal de frangos, além de gerar um alto índice de mortalidade das células bacterianas, pela falta de regulação dos níveis de Fe da bactéria (HOLMES et al., 2005; BUTCHER et al., 2012).

As mudanças de temperatura também podem prejudicar a sobrevivência bacteriana, onde algumas espécies de *Campylobacter* possuem um efetivo crescimento bacteriano a temperaturas entre 37°C e 42°C, sendo incapazes de crescer a temperaturas menores que 30°C, e para isso, espécies como *C. jejuni* possuem até 24 diferentes proteínas que auxiliam na resposta do microrganismo ao choque-térmico ((KONKEL et al., 1998). Um exemplo é a proteína DnaJ (*thermotolerance chaperone*), codificada pelo gene *dnaJ*, que garante a sobrevivência do microrganismo a variações abruptas de temperatura (STINTZI, 2003).

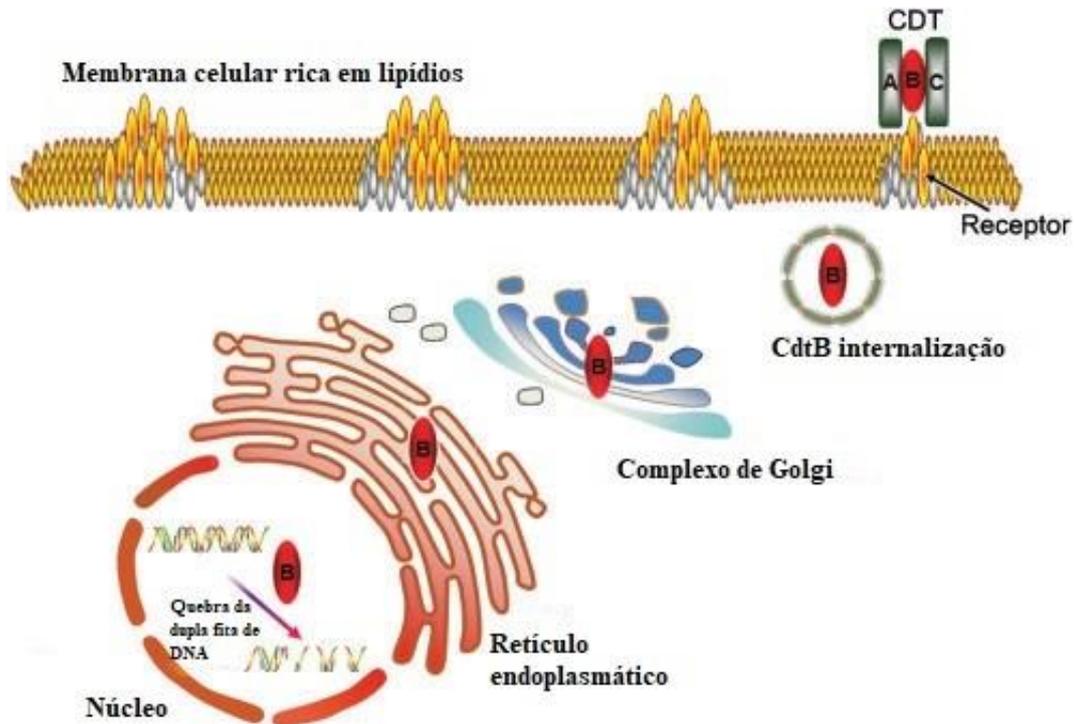
Outro sistema de proteína que regula o choque térmico, são as do sistema RacRS (*DNA-binding response regulator*), onde esse sistema de proteínas é regulado por genes importantes na colonização *in vivo* da bactéria, como o *racR* (VAN DER STEL et al., 2015). Bras e colaboradores (1999) demonstraram que cepas de *C. jejuni* mutantes para o gene *racR* apresentaram uma redução na taxa de crescimento a temperaturas de 42°C, em células epiteliais Caco-2.

A maioria das espécies de *Campylobacter* são microaerófilas, como as espécies mais prevalentes, *C. jejuni* e *C. coli*, por isso o contato com concentrações altas de oxigênio (O<sub>2</sub>) acaba sendo tóxico para o microrganismo, para isso essas espécies de *Campylobacter* possuem um sistema de defesa ao estresse oxidativo, que é composto por proteínas como a SodB (*Superoxido-dismutase protein*) e KatA (*Catalase A*), reguladas pelos genes *sodB* e *katA*, respectivamente (STORZ e IMLAY, 1999; ATACK e KELLY et al., 2009; OH et al., 2015). SodB é a principal defesa bacteriana contra danos causados pelo O<sub>2</sub>, onde a proteína tem a capacidade de converter duas moléculas de O<sub>2</sub> em peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e O<sub>2</sub> (OH et al., 2015). Já a proteína KatA é a única catalase que *C. jejuni* possui, e tem a capacidade de remover H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> das células, quebrando a molécula em água (H<sub>2</sub>O) e O<sub>2</sub> (ATACK e KELLY et al., 2009).

Outro fator de extrema importância para a patogenicidade de *Campylobacter* spp. é a produção da Toxina Citoletal Distensora (do inglês *cytolethal distending toxin*, CDT), muito comum em outras espécies bacterianas, como *Shigella* spp. e *E. coli* enterohemorrágica. A toxina está relacionada a processos inflamatórios provocados pelo microrganismo, além de ter a função de parar o ciclo celular das células do hospedeiro, causando morte celular por apoptose (GUERRANT et al., 1987; PICKETT et al., 1994; WHITEHOUSE et al., 1998).

A CDT possui três subunidades, denominadas CDTA, CDTB e CDTC, codificadas pelos genes *cdtA*, *B* e *C*, respectivamente. As subunidades CDTA e CDTC são responsáveis pela ligação aos receptores da membrana celular, permitindo, assim, a entrada da subunidade enzimática ativa da toxina na célula, a subunidade CDTB. Na célula hospedeira, a toxina age como a enzima desoxirribonuclease, bloqueando a quinase CDC2, essencial na transição para a fase G2 da mitose, e isso leva ao rompimento da dupla fita de DNA, fragmentação do núcleo e distensão celular, acarretando na apoptose da célula hospedeira (LARA-TEJERO e GALAN, 2000; 2001; LAI et al., 2016). Os efeitos da CDT na célula do hospedeiro podem ser observados na **Figura 8**.

**Figura 8:** Ação da Toxina Citoletal Distensora na célula do hospedeiro.



Ligação das subunidades CDTA e CDTC na célula do hospedeiro através de receptores ricos em colesterol, logo após ocorre a internalização da subunidade CDTB na célula hospedeira e transporte via Complexo de Golgi e Reticulo endoplasmático até o núcleo celular, onde a CDTB age, promovendo a quebra do ciclo celular. Adaptado de Jinadasa et al., 2011.

## 2.5 Manifestações subclínicas causadas por espécies de *Campylobacter*

Infecções por *Campylobacter* spp. já foram associadas com inflamação e diminuição das funções da barreira intestinal, além de redução no crescimento em crianças em países em desenvolvimento (BLACK et al., 1988; LEE et al., 2013; VERAS et al., 2018). Além do patógeno já ter sido associado como importante causa de infecções diarreicas em países em desenvolvimento como Paquistão, Bangladesh e Índia, *Campylobacter* teve a associação com a diminuição do crescimento em crianças em infecções assintomáticas para o patógeno (KOTLOFF et al., 2013; LEE et al., 2013; ROGAWSKI et al., 2018). Estudo realizado por Iqbal e colaboradores (2019) em infecções por *C.jejuni/C.coli* apresentou aumento na expressão de MPO fecal, e em certa medida, aumento em Reg1b, um marcador de regeneração de enterócitos. Assim, é possível determinar que *Campylobacter* pode ser um patógeno de importância emergente e pode estar envolvido na via causal da Disfunção Entérico Ambiental (DEA) em países em desenvolvimento (KOSEK et al., 2017; ROGAWSKI et al., 2018; IQBAL et al., 2019).

A DEA é definida como uma doença subclínica adquirida, que pode ser reversível, sendo associada com atrofia parcial dos vilos intestinais, aumento da profundidade das criptas e infiltração de linfócitos T na lâmina própria e no epitélio do intestino delgado em consequência da exposição frequente do intestino a patógenos exógenos durante a infância (KEUSCH et al., 2013; OWINO et al., 2016). Além disso, a DEA está associada ao aumento da permeabilidade intestinal e influxo de elementos inflamatórios através do epitélio intestinal. As alterações histológicas estão associadas a má absorção subsequente, prejuízo no desenvolvimento cognitivo, capacidade de resposta reduzida a intervenção nutricional, déficit de crescimento e redução da imunogenicidade de vacinas orais (CAMPBELL et al., 2003; GUERRANT et al., 2013; MAHFUZ et al., 2017).

O diagnóstico para a disfunção ainda não está totalmente estabelecido, além que os sintomas serem parecidos com outras doenças, como doença do intestino irritável, doença celíaca e alergias alimentares, torna a busca por biomarcadores de patogenicidade um desafio. Um dos primeiros testes a serem realizados foi a partir de biópsia intestinal e endoscopia, mas por serem procedimentos invasivos, muitas vezes acabam sendo um fator limitante (PRENDERGAST et al., 2015; MAHFUZ et al., 2017; MORAIS & SILVA, 2019).

Considerando a característica de aumento da permeabilidade intestinal, um teste de escolha seria o teste de lactulose / manitol. A lactulose é um dissacarídeo que penetra na barreira intestinal por via paracelular, por entre as células absortivas mucosas; enquanto que o manitol é um monossacarídeo que penetra na barreira por via transcelular, ou seja, através da membrana celular (FLEMING et al., 1990; DENNO et al., 2014). Quando ocorre comprometimento na barreira intestinal, há redução na absorção do monossacarídeo e conseqüentemente redução da sua excreção urinária, enquanto que quando ocorre aumento na permeabilidade intestinal, a lactulose também pode chegar à corrente sanguínea e ser excretada pelo rim (LINNANKOSKI et al., 2010; PRENDERGAST et al., 2015; MAHFUZ et al., 2017).

Outro biomarcador de permeabilidade intestinal que pode ser alternativa é a alfa-1-antitripsina (AAT), que tem a função de proteger as células dos efeitos deletérios das enzimas proteolíticas liberadas por neutrófilos estimulados. A proteína não é sintetizada no intestino e sua presença nas fezes pode ser consequência do aumento da permeabilidade intestinal e perda proteica secundária à inflamação da mucosa (KOSEK et al., 2014; PRENDERGAST et al., 2015).

Em relação a biomarcadores de inflamação, a mieloperoxidase (MPO), é uma enzima presente no citoplasma de neutrófilos e caracterizada como marcador de atividade neutrofílica, e a neopterina (NEO), produzida por macrófagos e células dendríticas, marcador de ativação de células *T-helper* (KOSEK et al., 2014; 2017).

A diminuição no crescimento é outro fator que pode ser consequência da disfunção entérico ambiental. Atualmente, a forma mais comum de desnutrição energético-proteico crônica é o déficit de crescimento linear com o score-Z de crescimento como peso pela idade, no inglês *Weight-for-Age* (WAZ) inferior a -2,0 desvios-padrão (*stunting*), onde a disfunção entérico ambiental pode ser considerada como um dos fatores determinantes do *stunting* (GWENYTH et al.; 2017; LOUIS et al., 2017; KOSEK et al., 2017).

## **2.6 Manifestações clínicas causadas por espécies de *Campylobacter***

As infecções causadas por espécies de *Campylobacter* causam um espectro de doenças, que incluem gastroenterites aguda, infecções extra-intestinais (bacteremia, abscesso e meningites, por exemplo) e complicações pós-infecciosas, além de infecções assintomáticas. Espécies como *C. jejuni* e *C. coli*, geralmente causam uma diarreia autolimitada, com duração entre 5 a 7 dias, sendo o início da sintomatologia entre 2 a 5 dias após a ingestão da bactéria (BLASER, 1997; SKIRROW & BLASER, 2000; YOUNG et al., 2007; FITZGERALD, 2015).

Os sintomas mais comuns apresentados são diarreia aguda aquosa, acompanhada de dor abdominal, febre, náuseas e vômito. Em neonatos e lactentes jovens, diarreia com sangue e sem febre, pode ser a única sintomatologia apresentada. Infecções extra-intestinais por *Campylobacter* spp. são mais frequentes e, além das pacientes imunocomprometidos, idosos ou grávidas, sendo mais comum a presença de bacteremia com ou sem a presença de diarreia (SKIRROW & BLASER, 2000; KUWABARA & YUKI, 2013).

Infecções pelo microrganismo podem provocar uma série de complicações pós-infecciosas, que incluem a síndrome de Guillain-Barré (SGB), artrite reativa e doença do intestino irritado (IBD) (MAN, 2011). SGB é uma condição neurológica, que é caracterizada pela fraqueza progressiva e simétrica dos membros superiores e inferiores, e *C. jejuni* é a espécie mais comumente identificada na síndrome, podendo a mesma causar paralisia em até 30% dos pacientes com SGB (KUWABARA & YUKI, 2013). Artrite reativa pode ocorrer entre 2% a 5% das infecções, e a IBD, uma condição inflamatória crônica do intestino, ocorre em até 33% dos pacientes com infecções por *Campylobacter* spp. (POPE et al., 2007; MARSHALL, 2009).

Estudos epidemiológicos apresentam índices bastante elevados de infecções assintomáticas, principalmente em países em desenvolvimento, sendo comuns em crianças nos dois primeiros anos de vida, sendo associada com a excreção prolongada do microrganismo nas fezes (FERNANDEZ et al., 2008; LEE et al., 2013; ROGAWSKI et al., 2018). Além disso, infecções ocasionadas por espécies como *C. jejuni* foram associadas com a diminuição do crescimento linear de crianças, podendo levar esses indivíduos a um quadro de desnutrição (QUETZ et al., 2010; VERAS et al., 2018; ROGAWSKI et al., 2018). Outras espécies de *Campylobacter* também podem levar a um quadro de desnutrição. Estudo realizado por Haque e colaboradores (2019), mostrou que outras espécies de *Campylobacter*, além de *C. jejuni* e *C. coli*, tiveram uma maior associação com a diminuição do crescimento linear de crianças menores de dois anos de idade, apesar de *C. jejuni* ter mostrado um maior índice de inflamação intestinal nesse público.

## **2.7 Diagnóstico das espécies de *Campylobacter***

A cultura microbiológica é considerada o “padrão ouro” para o diagnóstico de *Campylobacter* spp., tendo uma excelente especificidade, mas pelo fato do microrganismo ser muito fastigioso, condições especiais de cultivo devem ser empregados. A metodologia geralmente é otimizada para o diagnóstico das espécies de *Campylobacter* mais prevalentes, *C. jejuni* e *C. coli*, que necessitam de uma atmosfera microaerófila para crescimento, além de temperaturas de crescimento entre 37°C a 42°C, e meios de cultura enriquecidos por sangue ou carvão mineral, e com a presença de antimicrobianos para impedir o crescimento de outras espécies bacterianas (BESSEDE et al., 2011; IWAMOTO et al., 2012; VERAS et al., 2016; DAVIS & DIRITA, 2017).

E por conta desses fatores, a metodologia tem alguns problemas, como o fato do diagnóstico de *Campylobacter* spp. em infecções em humanos ser feito em material fecal, e os resultados da cultura são geralmente disponíveis entre 48 a 72h, o que não permite um tratamento prévio da infecção. Outros fatores pode ser o contato prolongado do microrganismo com atmosfera rica em O<sub>2</sub> e o uso de antimicrobianos nos meios de cultura, podem prejudicar o crescimento de outras espécies do microrganismo. Por esses motivos, a cultura consome mais tempo e subestima alguns diagnósticos, especialmente quando os requisitos da cultura não são completamente empregados, ou quando a infecção é causada por outras espécies, além de *C. jejuni* e *C. coli* (BESSEDE et al., 2011; 2018; FITZGERALD, 2015; BUSS et al., 2019). Isso

demonstra que apesar de uma excelente especificidade, esses fatores acabam diminuindo a sensibilidade dessa técnica de diagnóstico (BESSEDE et al., 2011; VERAS et al., 2016).

Em relação a testes bioquímicos, sua função é basicamente a diferenciação de espécies de *Campylobacter*, no entanto só é possível a diferenciação entre *C. jejuni* das outras espécies do microrganismo. Para isso, é utilizado o teste de hidrólise de hipurato, função essa que as outras espécies de *Campylobacter* não possuem (SENOK e BOTTA, 2009).

Ensaio imunoenzimáticos e imunocromatográficos são técnicas para diagnósticos rápidos que estão sendo empregados atualmente para diagnóstico de *Campylobacter* spp. Os ensaios imunoenzimáticos possuem uma excelente sensibilidade e os resultados são obtidos em até duas horas, mas em contrapartida, possuem uma especificidade regular. Esse fato ocorre pelo excesso de resultados falso positivos, onde a técnica diagnóstica espécies da bactéria que não possuem relevância clínica e acabam gerando uma reação cruzada, que tem como consequência um excesso de resultados gerados por meio dessa técnica (BESSEDE et al., 2011; PLATTS-MILLS et al., 2014; VERAS et al., 2016). Já os testes imunocromatográficos possuem uma rápida performance, com resultados gerados em até 15 minutos, podendo ser assim um diagnóstico promissor para *Campylobacter* spp. (BESSEDE et al., 2018).

Contudo, para o diagnóstico a nível de espécies, a reação em cadeia da polimerase (PCR), é a técnica mais adequada, além disso, o teste possui excelente especificidade e sensibilidade, comparado com as demais técnicas de diagnóstico para o microrganismo (BESSEDE et al., 2011; VERAS et al., 2016). As técnicas moleculares podem identificar o microrganismo em amostras de fezes congeladas, além de permitir o estudo da patobiologia do microrganismo, através de sequenciamento genômico de cepas, estudo de fatores de virulência, mecanismo de resistência a antimicrobianos, dentre outros. A técnica tem como desvantagem o alto custo, além de profissional devidamente qualificado e boa estrutura laboratorial (QUETZ et al., 2010; ON, 2013; FITZGERALD et al., 2016).

## **2.8 Tratamento das campylobacterioses**

As infecções causadas por espécies de *Campylobacter* são geralmente autolimitadas e normalmente não requerem terapia antimicrobiana, onde uma reidratação oral adequada e a manutenção do balanço eletrolítico são as principais fontes de tratamento utilizados (TERNHAG et al., 2007; SMITH & FRATAMICO, 2010). Contudo, em casos graves e prolongados de diarreia, disenteria, bacteremia ou outras infecções extra-intestinais, é indicado tratamento antimicrobiano imediato. A administração imediata de antimicrobianos também deve

ser usado em pacientes imunodeficientes e imunocomprometidos, além de gestantes (WHITEHOUSE et al., 2018).

Por um breve período, fluoquinolonas foram consideradas como tratamento de escolha para infecções por *Campylobacter*, no entanto, rapidamente o microrganismo adquiriu resistência a esses agentes antimicrobianos devido ao uso indiscriminado na indústria alimentícia em aves para o consumo humano (SMITH & FRATAMICO, 2010; WHITEHOUSE et al., 2018). Como alternativa, os macrolídeos, como eritromicina, ou em alguns casos, claritromicina ou azitromicina, são geralmente as drogas de escolha atualmente (ALLOS et al., 2010; SHANE et al., 2017; TORRES et al., 2020).

Historicamente, a incidência de resistência à eritromicina e outros macrolídeos é baixa, principalmente relacionado a *C. jejuni*, embora existam vários mecanismos pelos quais *Campylobacter* spp. podem adquirir resistência a esses agentes antimicrobianos, como bombas de efluxos e mutações em proteínas ribossomais (BOLINGER & KATHARIOU, 2017). Outro problema em relação ao uso de macrolídeos, é também o uso dessa classe de medicamento na produção alimentícia de origem animal, principalmente na criação de frangos de corte, que acaba aumentando os níveis de resistência do microrganismo a esses agentes (SIERRA-ARGUELLO et al., 2016).

Em estudo coorte multicêntrico, realizado no Peru, em crianças com menos de 5 anos de idade, foi observado uma alta incidência de resistência antimicrobiana a macrolídeos e fluoquinolonas, sugerindo como opção para tratamento de gastroenterites associadas a espécies de *Campylobacter*, principalmente *C. jejuni* e *C. coli*, a associação de amoxicilina ao ácido clavulânico (SCHIAFFINO et al., 2019).

## **2.9 Prevenção e controle das campylobacterioses**

A prevenção e controle de infecções por *Campylobacter* podem ser aplicadas diretamente a seres humanos de diferentes maneiras, como condições adequadas de saneamento básico, acesso a água potável, consumo de leite pasteurizado, cozimento adequado de alimentos de origem animal e uso de terapia adequada em casos de infecções (HANSSON et al., 2018; CDC, 2019).

Essas medidas de prevenção e controle também podem ser aplicadas a animais, como o uso de probióticos e prebióticos, combinados com estratégias de biossegurança no nível de fazendas, controle de vetores invertebrados e medidas higiênicas no abate de animais, pode

reduzir de forma significativa a carga de infecções por espécies como *C. jejuni* (BAFFONI et al., 2017). Além disso, o fornecimento de água e ração de boa qualidade para animais de criação e também monitoramento do uso regular de antimicrobianos nesses animais são medidas necessárias de prevenção para infecções pelo patógeno (MARON et al., 2013; HANSSON et al., 2018).

O desenvolvimento de uma vacina eficaz para a prevenção das campylobacterioses está em andamento há mais de 20 anos. O processo foi dificultado por vários fatores, que incluem a falta de um modelo animal adequado que mimetize a infecção pelo patógeno, presença de lipopolissacarídeos (LOS) que tem semelhança com os gangliosídeos que podem induzir doenças auto-imunes como a SGB, a falta de entendimento sobre os fatores de virulência de *C. jejuni*, e sobre os fatores imunológicos de proteção a doença. A carne de aves é considerada a principal fonte de infecção, e muita atenção tem sido dada pela medicina veterinária para o desenvolvimento de uma vacina para o controle da colonização de *C. jejuni* em frangos de corte (DE ZOETE et al., 2007; HERMANS et al., 2012; POLY et al., 2019; PUMTANG-ON, et al., 2021).

Em humanos, uma vacina candidata foi desenvolvida usando uma abordagem empírica, que consiste em uma vacina formada por bactérias inteiras mortas com formalina, combinadas com toxina lábil (LT) como adjuvante da mucosa. A vacina foi desenvolvida pelo *Navy Medical Research Institute* (EUA) e forneceu 87% de proteção contra a colonização intestinal em um pequeno número de voluntários (SCHNEE & PETRI, 2017). Outros estudos se concentram no uso de proteínas flagelares como candidatas a vacinas com administração via nasal (RIDDLE & GUERRY, 2016).

Por conta do risco de induzir SGB, uma cepa incapaz de induzir a síndrome deve ser considerada. Diante disso, uma vacina capsular conjugada, que em princípio poderia ser mais imunogênica e evitar o subsequente risco de SGB, já conferiu proteção em primatas não humanos (MONTEIRO et al., 2009; MAUE et al., 2014).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Investigar quais os fatores de risco, a ocorrência de disfunção da barreira intestinal e qual a influência de copatógenos na infecção subclínica causada por *Campylobacter jejuni* em crianças da cidade de Fortaleza – CE, Brasil.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar os principais fatores de risco determinantes como dados demográficos, sanitários e socioeconômicos envolvidos na infecção subclínica por *C. jejuni* em crianças residentes em comunidades na cidade de Fortaleza - CE.
- Determinar as medidas antropométricas das crianças com infecção subclínica para *C. jejuni* residentes em comunidades na cidade de Fortaleza – CE.
- Analisar marcadores de inflamação e permeabilidade intestinal na infecção subclínica por *C. jejuni* em crianças residentes em comunidades na cidade de Fortaleza - CE.
- Caracterizar o perfil dos genes de virulência presentes nas cepas de *C. jejuni* diagnosticadas nas amostras fecais das crianças com infecção subclínica residente em comunidades na cidade de Fortaleza – CE, correlacionando com o risco para desnutrição.
- Determinar os copatógenos intestinais associados a infecção subclínica causada por *C. jejuni* em crianças residentes em comunidades na cidade de Fortaleza - CE.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Desenho do estudo e aprovação ética

O presente estudo fez parte de um estudo coorte longitudinal multicêntrico realizado em 8 países em desenvolvimento, localizados nos continentes da Ásia, África e América do Sul, intitulado “Etiologia, fatores de risco e interações entre infecções entéricas e desnutrição e as consequências para a saúde e desenvolvimento infantil”, ou no inglês “*Etiology, Risk Factors, and Interactions of Enteric Infections and Malnutrition and the Consequences for Child Health and Development*” (MAL-ED), sendo idealizado pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América, no inglês *National Institutes of Health* (NIH) e financiado pela Fundação *Bill and Melinda Gates*.

No Brasil, o estudo foi realizado na cidade de Fortaleza, estado do Ceará, onde o estudo coorte ocorreu com crianças residentes em comunidades nas regionais III e IV da cidade (LIMA et al., 2014). No estudo coorte foram recrutadas cerca de 200 crianças que foram acompanhadas desde os 17 dias após o nascimento até os 24 meses de idade, durante o período de novembro de 2009 a fevereiro de 2012 (MAL-ED, 2014; LIMA et al., 2018).

O projeto MAL-ED obteve aprovação no Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP nº 15701), descrito no **Anexo A**, e do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará (COMEPE nº 246/09), descrito no **Anexo B**. O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foram assinados pelos pais ou responsáveis pela criança e pode ser observado no **Anexo C**.

Os critérios de inclusão para a participação do estudo foram:

- Bebês saudáveis inscritos no estudo até 17 dias após o nascimento;
- A família não ter planos de se mudar da comunidade selecionada por pelo menos 6 meses após a inscrição no estudo;
- Disponibilidade do responsável pela criança em ser visitado em casa duas vezes por semana (MAL-ED, 2014).

Enquanto que os critérios de exclusão foram:

- A família ter planos de se mudar da comunidade, ou passar um período acima de 30 dias distante da residência, durante os primeiros 6 meses de acompanhamento;
- A mãe ser menor de 16 anos de idade;
- A mãe já tenha outro filho participante do estudo;
- A criança tenha irmão gêmeo, trigêmio ou afins;
- O bebê tenha qualquer uma das seguintes indicações de doenças graves: hospitalização precoce, condição grave ou crônica diagnosticada por uma equipe médica (vírus da imunodeficiência humana (HIV), tuberculose, distúrbio neonatal, renal, hepático, pulmonar e / ou doença cardíaca, condições congênitas ou enteropatia - doença de Crohn, doença celíaca, colite ulcerativa ou doença de má absorção);
- O responsável pela criança não ter assinado o TCLE;
- O peso ao nascimento da criança seja menor que 1500g (MAL-ED, 2014).

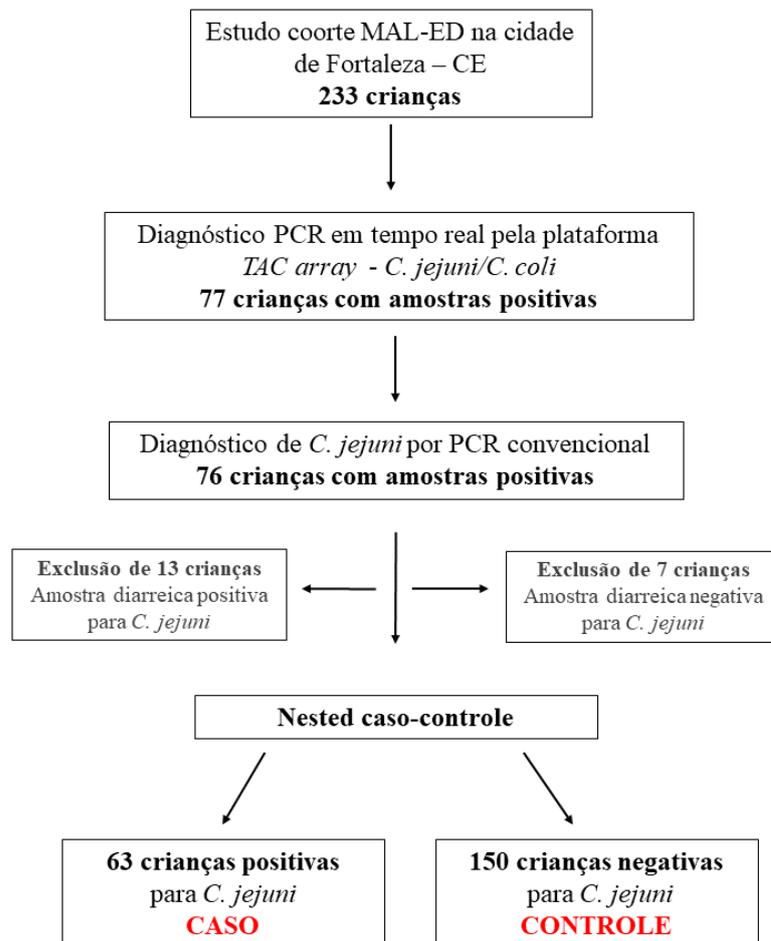
No estudo coorte do projeto MAL-ED no Brasil houve a participação de 233 crianças, onde as amostras fecais coletadas durante os dois primeiros anos de vida dessas crianças foram submetidas ao diagnóstico de 29 enteropatógenos através da plataforma de PCR em tempo real *TAC array* (Thermo Fisher, Carlsbad, CA, EUA), descrito com mais detalhes na seção 4.5. Dentre estes, foi realizado o diagnóstico das espécies *C. jejuni* e *C. coli* através de um gene em comum para as duas espécies (PLATTS-MILLS et al., 2018). O diagnóstico de apenas *C. jejuni* foi feito utilizando o PCR convencional (QUETZ et al., 2010).

A partir desse diagnóstico, nesse presente estudo, as crianças foram divididas em dois grupos distintos, as que possuíram pelo menos uma amostra positiva para *C. jejuni* durante esse período, e as que não possuíram amostra positiva para o patógeno. Desta forma, este estudo possui um desenho experimental *Nested* caso-controle, ou seja, estudo caso-controle criado a partir de um estudo coorte. No entanto, foi acrescido apenas mais um critério de exclusão, que foram crianças que possuíram alguma sintomatologia (diarreia, tosse, vômito, dor abdominal), totalizando 8 crianças, sendo incluído apenas o grupo de crianças positivas para o patógeno e que tiveram infecção assintomática.

Assim, este estudo tem como grupo caso as crianças que possuíram uma ou mais amostras fecais positivas para *C. jejuni*, com infecção assintomática, totalizando 63 crianças, e

crianças que não tiveram amostras positivas para o patógeno como o grupo controle, totalizando 150 crianças. O fluxograma do estudo pode ser observado na **Figura 9**.

**Figura 9:** Fluxograma do estudo.



Fonte: próprio autor

#### 4.2 Obtenção dos dados e coleta de amostras

Após a assinatura do TCLE, foram coletados, por uma equipe de campo, informações sobre medidas antropométricas da criança (comprimento, peso atual, peso ao nascimento e perímetro cefálico), cuidados infantis, características da mãe ou do cuidador, e da família que vive na mesma residência da criança, fontes de água, além de informações sobre fatores socioeconômicos, dados demográficos e sanitários, e outros parâmetros relacionados, a partir de um formulário padronizado (PSAKI et al., 2014; LIMA et al., 2017).

Após isso, ocorreram visitas nas residências pelo menos duas vezes por semana até a idade de dois anos das crianças, onde foram relatados dados de ocorrência de manifestações

clínicas nas crianças (tosse, febre, vômito, diarreia, dor abdominal e desidratação), uso de antimicrobianos, e ingestão de alimentos, além do leite materno. As medidas antropométricas foram obtidas mensalmente até os dois anos de vida da criança (MAL-ED, 2014; RICHARD et al., 2014; LIMA et al., 2017).

As amostras biológicas das crianças foram coletadas por agente de saúde, onde amostras fecais eram coletadas uma vez ao mês quando não se tinha casos relatados de diarreia, onde essas coletas mensais ocorreram até os 12 meses de idade da criança, após esse período, as coletas foram realizadas a cada três meses, até os 24 meses de idade. Amostras de urina foram coletadas nos meses 3, 6, 9, e 15 de idade da criança, para a realização de testes relacionados a permeabilidade intestinal. Todas as amostras biológicas, após a coleta, eram imediatamente transportadas para o Laboratório de Doenças Infecciosas (LDI), do Núcleo de Biomedicina (NUBIMED), da Faculdade de Medicina, na Universidade Federal do Ceará (UFC) (HOUPY et al., 2014; LIMA et al., 2017).

#### **4.3 Obtenção das medidas antropométricas**

As medidas antropométricas foram coletadas mensalmente por uma equipe de campo em todas as crianças utilizando procedimentos padronizados. O peso pela idade, do inglês *Weight-for-Age* (WAZ); peso pela altura, do inglês *Weight-for-Height* (WHZ); e a altura pela idade, do inglês *Height-for-Age* (HAZ) foram calculados de acordo com o *Multicentre Growth Reference Study Group program*, da Organização Mundial da Saúde (OMS) (MAL-ED, 2014).

#### **4.4 Extração de DNA a partir de amostras fecais para o diagnóstico das cepas de *Campylobacter jejuni***

O diagnóstico das cepas de *C. jejuni* foi realizado a partir das amostras fecais das crianças coletadas durante o período do estudo. Para isso, a primeira etapa foi a extração do DNA bacteriano das amostras, sendo utilizado Mini kit *QIAamp Stool DNA* (Qiagen, Valencia, CA, EUA).

O processo de extração consistiu na pesagem de 200mg da amostra fecal, sendo a mesma submetida a uma etapa de lise utilizando 400µL do tampão QIAamp ASL, com o acréscimo de 212 a 300µm de esferas de vidro (Sigma, St. Louis, MO, EUA). A lise foi executada utilizando o aparelho Mini-Beadbeater (BioSpec Products, Bartlesville, OK, EUA) para a homogeneização das amostras durante dois minutos. A seguir as amostras foram submetidas a incubação por 95°C por 5 min, centrifugadas em temperatura ambiente por 5 minutos a 14mil

RPM, em seguida foi adicionado o tampão QIAamp AL, para a precipitação de macromoléculas, etanol, para promover a precipitação dos ácidos nucleicos, e proteínase K, para promover a digestão de proteínas e inativação de nucleases. Ao final dessas, se deu início as etapas de lavagem e purificação do material genético, utilizando os tampões QIAamp AW1, AW2. O material genético ficou retido em filtros contendo membrana sílica, e para finalizar, houve a eluição do material genético utilizando o eluente QIAamp ATE. Após a extração, o material genético foi armazenado a temperatura de -80°C (LIU et al., 2016).

Dois controles internos, Phocine Herpesvirus (PhHV), controle para RNA, e o bacteriófago MS2, controle para DNA, foram adicionados ao tampão de lise para monitorar a eficiência da extração e amplificação. Durante todas as extrações um controle negativo foi incorporado para monitorar possíveis contaminações durante o processo (LIU et al., 2016).

Após o processo de extração, a quantificação e qualificação do DNA bacteriano foi realizada utilizando o espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, EUA). O aparelho utiliza um sistema de retenção de amostras, onde é utilizado microvolumes de amostra (1-2µl), não se fazendo necessária a diluição da amostra (Thermo Fisher Scientific, 2009).

#### **4.5 Diagnóstico molecular das cepas de *C. jejuni* e coinfeção.**

O diagnóstico molecular foi realizado em colaboração com pesquisadores da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) – RJ, utilizando a plataforma *TaqMan Array Card* (TAC) (Life Technologies), uma plataforma em formato de PCR em tempo real (qPCR) uniplex ou duplex, contendo cartões de detecção com até 384 poços, que tem sido utilizado para detecção de alvos múltiplos de infecção. Os ensaios foram validados em placas para a detecção de 29 enteropatógenos (**Tabela 1**) (incluindo bactéria, vírus, fungos e protozoários) contendo uma concentração final de iniciadores de 900nM e uma concentração de sonda de 250nM. Para a realização da transcriptase reversa (RT-PCR) do RNA das espécies de vírus no ensaio, o kit RT-PCR AgPath-ID One-Step (Applied Biosystems) foi utilizado. Dessa forma, o protocolo da reação teve as seguintes condições de ciclagem: 45°C por 20min e 95°C por 10min, seguido de 45 ciclos de 95°C por 15seg e 60°C por 1min (LIU et al., 2013; 2016; PLATTS-MILLS et al., 2018).

**Tabela 1:** Patógenos diagnosticados na plataforma de PCR em tempo real TAC no projeto MAL-ED.

	<b>Patógeno</b>	<b>Gene alvo</b>
<b>Vírus</b>	Adenovírus	Fiber gene
	Astrovírus	Capsid
	Norovírus GI/GII	GI ORF1-2 e GII ORF1-2
	Rotavirus	NSP3
	Sapovirus	<i>RdRp</i>
<b>Bactéria</b>	EAEC	<i>aaiC, aatA</i>
	EPEC atípica	<i>eae</i>
	EPEC típica	<i>bfpA</i>
	ETEC	<i>LT, STh e STp</i>
	STEC	<i>stx1, stx2</i>
	<i>Aeromonas</i>	Aerolysin
	<i>Campylobacter jejuni/coli</i>	<i>cadF</i>
	<i>Helicopacter pylori</i>	<i>ureC</i>
	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	<i>gyrB</i>
	<i>Salmonella</i>	<i>ttr</i>
	<i>Shigella/EIEC</i>	<i>ipaH</i>
<i>Vibrio cholerae</i>	<i>hlyA</i>	
<b>Fungos</b>	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	<i>ITS</i>
	<i>Encephalitozoon intestinalis</i>	SSU rRNA
<b>Protozoários</b>	<i>Cryptosporidium</i>	18S rRNA
	<i>Cyclospora cayetanensis</i>	18S rRNA
	<i>Cystoisospora bell</i>	18S rRNA
	<i>Entamoeba histolytica</i>	18S rRNA
	<i>Giardia</i>	18S rRNA
<b>Helmintos</b>	<i>Ancylostoma duodenale</i>	<i>ITS2</i>
	<i>Ascaris lumbricoides</i>	<i>ITS1</i>
	<i>Necator americanus</i>	<i>ITS2</i>
	<i>Strongyloides stercoralis</i>	Dispersed repetitive sequence
	<i>Trichuris trichiura</i>	18S rRNA
<b>Controles</b>	MS2	<i>MS2g1</i>
	PhHV	<i>gB</i>

EPEC: *Escherichia coli* enteropatogênica; EAEC: *Escherichia coli* enteroagregativa; ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigênica; EIEC: *Escherichia coli* enteroinvasiva; STEC: *Escherichia coli* produtora da toxina Shiga. Fonte: adaptado de Platts-Mills et al., 2018.

Na plataforma TAC foi realizado o diagnóstico inespecífico das espécies *C. jejuni* e *C. coli*, através do gene de adesão a fibronectina, o *cadF* (Tabela 1). Para o diagnóstico de *C. jejuni*, foi realizado um novo ensaio de PCR convencional utilizando o gene *hipO* (gene para hipurato hidrolase de *C. jejuni*) como alvo, sendo esse procedimento realizado no Laboratório de Doenças infecciosas – LDI, na cidade de Fortaleza (QUETZ et al., 2010; PLATTS-MILLS et al., 2018) *C. coli* também foi diagnosticada, utilizando o gene *ask* como alvo (aspartato

quinase) para fazer a distinção entre as duas espécies (QUETZ et al., 2010). A reação de PCR convencional foi realizada utilizando a enzima PCR Supermix (Brasil) (Invitrogen), contendo 18µl da enzima, 0,4µl de cada iniciador e 1,2µ de DNA, sendo um volume final de 20µl por reação. O protocolo de clivagem da reação foi realizado de acordo com QUETZ e colaboradores (2010), podendo ser observados na **Tabela 2**. Para o diagnóstico de *C. jejuni*, foi utilizado como controle positivo a cepa *C. jejuni* ATCC 33560, e para *C. coli* foi utilizado como controle positivo a cepa *C. coli* INCQS 00263, ambas cedidas gentilmente pela Fiocruz - RJ, e água *MilliQ* autoclavada como o controle negativo. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2% e corados com brometo de etídio para visualização no transiluminador UV ChemiDoc XRS (Bio-Rad).

#### **4.6 Detecção de genes de virulência de *C. jejuni***

Após o diagnóstico molecular específico para *C. jejuni*, foi realizado a pesquisa de 20 genes relacionados à virulência. Os genes têm suas funções relacionadas a adesão bacteriana, invasão, motilidade, quimiotaxia, produção de toxinas, sistema de captação de ferro, resposta ao estresse oxidativo e sobrevivência bacteriana.

Os genes de virulência foram divididos em painéis de acordo com as temperaturas de anelamento, sendo realizada a técnica de PCR multiplex e uniplex para a detecção. Todos os iniciadores foram desenhados utilizando o software *OligoPerfect Designer* (Invitrogen), sendo sintetizados pela Invitrogen (São Paulo, Brasil), aliquotados e armazenados de acordo com as com protocolos específicos do LDI. Os iniciadores utilizados para as pesquisas dos genes de virulência, bem como suas respectivas funções, e temperaturas usadas no protocolo das reações de PCR, podem ser observados na **Tabela 2**.

As reações para os genes de virulência foram realizadas utilizando 12,5ul da enzima PCR Platinum Multiplex master mix (Invitrogen), 2uM dos iniciadores senso e antisenso, com 2,5uL do DNA bacteriano, e água livre de nucleasse, sendo o volume final de 25uL. As reações foram realizadas no aparelho *Veriti Thermal Cycler* (Thermo Fisher). Para o diagnóstico de *C. jejuni*, foi utilizado como controle positivo as cepas *C. jejuni* ATCC 33560 e ATCC 33291, e água *MilliQ* autoclavada como o controle negativo. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2% ou 3% e corados com brometo de etídio para visualização no transiluminador UV ChemiDoc XRS (Bio-Rad) (QUETZ et al., 2012; VERAS et al., 2018).

**Tabela 2:** Iniciadores utilizados nos protocolos do PCR para o diagnóstico e detecção de genes de virulência para *C. jejuni* com a função de cada gene e condições de ciclagem para as reações de PCR uniplex e multiplex.

Genes alvo	Sequência dos iniciadores (5'- 3')	Função	Acesso ao GenBank, NCBI	Amplicons (pb)	Condições dos ciclos	Referencia
<i>Gene de diagnóstico para C. jejuni</i>						
<i>hipO</i> – gene para hipuricase de <i>C. jejuni</i>	S: ATGATGGCTTCTTCGGATAG AS: GCTCCTATGCTTACAACCTGC	Diagnóstico	FJ655194.1	176	35 ciclos: 20'' a 95°C, 20'' a 51° C, 45'' a 72 °C	Quetz et al., 2010
<i>Ask</i> – aspartato quinase de <i>C. coli</i>	S: GGTATGATTTCTACAAGCGAG AS: ATAAAAGACTATCGTCGCGTG	Diagnóstico	AF017758.1	502		
<b>Genes de virulência para <i>C. jejuni</i></b>						
<b>PAINEL MULTIPLEX 1</b>						
<i>cdtA</i> – <i>Cytolethal Distending Toxin</i> (CDT), porção A	S: TTGGCGATGCTAGAGTTTGG AS: ACCGCTGTATTGCTCATAGGG	Subunidade da toxina citoletal distensora	AY445094.1	175		
<i>cdtB</i> – <i>Cytolethal Distending Toxin</i> (CDT), porção B	S: CTCGCGTTGATGTAGGAGCTA AS: GCAGCTAAAAGCGGTGGAGTA	Subunidade da toxina citoletal distensora	AF053962.1	418	35 ciclos: 30'' a 95°C, 30'' a 56 °C, 45'' a 72 °C	Quetz et al., 2010
<i>cdtC</i> – <i>Cytolethal Distending Toxin</i> (CDT), porção C	S: AGCCTTTGCAACTCCTACTGG AS: GCTCCAAAGGTTCCATCTTC	Subunidade da toxina citoletal distensora	GQ491062.1	270		
<b>PAINEL MULTIPLEX 2</b>						

<i>ciaB</i> – <i>Campylobacter</i> invasion antigen B	S: TCATGCGGTGGCATTAGAATGGG AS:	Invasão	AF114831.1	658	35 ciclos: 30'' a 95°C, 30'' a 64 °C, 45'' a 72 °C	Konkel et al, 1999
<i>dnaJ</i> – chaperona DnaJ	S: AGGCTTTGGCTCATCACGTCG AS: GGTCGCTTCACCGCGTATGG	Sobrevivência ao choque térmico	AF053962.1	574		Konkel et al, 1998
<i>racR</i> – binding response regulator	S: TGGGGCTTCAAATCGGTGCTGA AS: GCGACCGATGATAACATCAAGGCT	Sobrevivência ao choque térmico	GQ491062.1	326		Hamidian et al, 2011
<b>PAINEL MULTIPLEX 3</b>						
<i>flaA</i> – flagelina	S: AGCTGCTTCGCAACTTTCTACGGT AS: TGCACCTCTCGGCTGCAAAGTCT	Motilidade	AF369585.1	325	35 ciclos: 30'' a 95°C, 30'' a 59 °C,	Fitzerald et al, 2001
<i>pldA</i> – fosfolipase A	S: AAGAGTGAGGCGAAATTCCA AS: GCAAGATGGCAGGATTATCA	Invasão	CP000025.1	385	45'' a 72 °C	Fouts et al, 2005
<b>PAINEL MULTIPLEX 4</b>						
<i>fur</i> - ferric uptake regulator	S: ACTCAAAAAGGGGAGTGATATGCT AS: GCAATCAAGGCTTGCTGTCT	Captação de ferro	X78965.1	399		Koolman, 2015
<i>sodB</i> – proteína superóxido dismutase	S: AAGTACAGGCTGTGGCTGTGG AS: AGGGCGTGCATTACGATGAT	Resposta ao estresse oxidativo	KF864551.1	292	35 ciclos: 45'' a 94°C, 45'' a 60 °C, 1'' a 72 °C	Veras et al., 2018
<i>cfrA</i> <i>Campylobacter</i> ferric receptor	S: GCTTAACGGGTGGTTATGCAG AS: CGGCTGTGTAGATTGCCCTA	Sistema de captação de ferro	KP288672.1	158		Veras et al., 2018

<i>jlpA</i> - jejuni lipoprotein A	S: CACAGGGAATCGACAGCATAGA AS: ACGCTCCGCCCATTAACATA	Adesão	AF295104.1	111		Veras et al., 2018
<b>PAINEL MULTIPLEX 5</b>						
<i>ceuE</i> - enterochelin uptake substrate-binding protein	F: GCAGGCGTTCCTGCTAAAAA R: GCGAGATTGAGGACCAAAGG	Sistema de captação de ferro	AL111168.1	396	35 ciclos: 45'' a 94°C, 45'' a 60 °C,	Veras et al., 2018
<i>flgE</i> - flagellar hook protein	S: CCTCCTGTTCTGCTTCACC AS: TGACGGCCTTGTAAGCTCAA	Motilidade	AY277720.1	270	1'' a 72 °C	
<i>cheW</i> - quimiotáctica W	S: CAGCATTTCCTCCAACCTCCA AS: ATGCCGCTCATTGATCTAGC	Quimiotaxia	EU189137.1	118		
<b>PAINEL MULTIPLEX 6</b>						
<i>katA</i> – catalase A	S: GCTGCTTGGGATTTTTGGAG AS: GCACGATTTACGGGCAAAAAG	Resposta ao estresse oxidativo	X85130.1	593	35 ciclos: 45'' a 94°C, 45'' a 60 °C,	Veras et al., 2018
<i>cheA</i> - quimiotáctica A	S: TCCATTCTACACCACGACCT AS: CAGCAACTCGTGCAGCAAAT	Quimiotaxia	EU189136.1	271	1'' a 72 °C	
<i>cheR</i> - quimiotáctica R	S: CACTCTCGCTCAATCGCTGT AS: GGCATTATTGGCTGCACAGA	Quimiotaxia	KC692482.1	131		
<b>REAÇÕES UNIPLEX</b>						
<i>pVir</i> – plasmídeo associado à disenteria	S: GAACAGGAAGTGGAAAACTAGC AS: TTCCGCATTGGGCTATATG	Invasão	AF226280.2	708	35 ciclos: 30'' a 95°C, 30'' a 55 °C, 1' a 72 °C	Bacon et al., 2002

---

<i>iamA</i> -	invasion-	S: GCTGCTTACCAACTCGCACA				35 ciclos: 45'' a	
associated marker		AS: CCAAAGCCATGACACGTGGA	Invasão	KM092517.1	235	94°C, 45'' a 60 °C, 1'' a 72 °C	Veras et al., 2018

---

Adaptado de: Quetz et al, 2012.

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

#### **4.7 Avaliação da integridade da barreira intestinal e biomarcadores imunoinflamatórios.**

Para a avaliação da permeabilidade, capacidade de absorção e danos na barreira intestinal, foi realizado o teste de lactulose/manitol (L/M), ocorrendo entre os meses 3 e 15 de idade das crianças, sendo as coletas realizadas por uma equipe de campo, e processadas no Laboratório de Doenças Infecciosas (LDI) por equipe capacitada. A avaliação aconteceu a partir da mensuração da excreção de lactulose, manitol e da razão de excreção de ambos, sendo realizado nas amostras de urinas coletadas nesse período. Para a realização do teste, as crianças jejuaram por duas horas, onde houve a coleta de uma amostra de urina antes da administração da lactulose (250 mg/mL) e manitol (50 mg/mL), em uma dose de 2mL/kg (dose máxima de 20 mL administrado) a uma concentração de 1002 mOsm / L por via oral, após esse processo, foi coletado as amostras de urina após a micção por 5 horas. O teste foi realizado através de Cromatografia Líquida de Alta Performance, do inglês High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (KOSEK et al., 2013; MAL-ED, 2014; LIMA et al., 2017).

Além disso, três biomarcadores adicionais também foram avaliados entre os meses 3 e 15 de idade das crianças. Estes incluíram Alfa-1-antitripsina - AAT (ImmuChrom - Heppenheim, Alemanha), também para permeabilidade intestinal; Mioloperoxidade - MPO (Immundiagnostik—Bensheim, Alemanha); e Neopterina – NEO (GenWay Biotech—San Diego, EUA). Todos foram realizados através de ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando as amostras fecais coletadas nesse período. Os ensaios aconteceram seguindo as instruções dos fabricantes (KOSEK et al., 2013; MAL-ED, 2014; LIMA et al., 2017).

#### **4.8 Análise estatística**

O presente estudo faz parte de um estudo Coorte multicêntrico que utilizou protocolos padronizados e ferramentas de coletas de dados iguais dentre todos os países participantes. Os protocolos internos de treinamento, controle e garantia de qualidade, permitiram manter um banco de dados de qualidade, sendo os dados digitalizados duas vezes através do software *Microsoft Access* (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, EUA), e validados por correspondência cruzada entre dois bancos de dados. Assim, os resultados numéricos foram plotados em planilhas de Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, EUA).

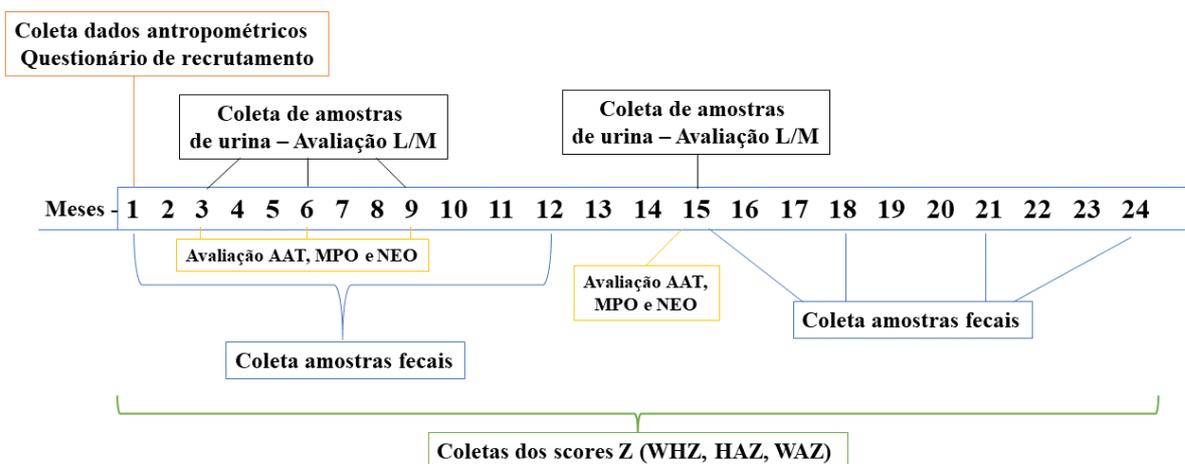
Após isso, as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SPSS versão 20.0, além da utilização do *GraphPad Prism* versão 8.0, como complementar. O teste Shapiro-Wilk ou Komogorov-Smirnov foram utilizados para avaliar a normalidade entre as variáveis, utilizado de acordo com o número de amostras; e o teste de Levene foi utilizado para analisar a homogeneidade das variáveis.

Com um valor de  $P > 0,1$ , as amostras são classificadas em normais para a curva de Gauss. Desta forma, utilizou-se de testes paramétricos para variáveis normais e não paramétricos para variáveis com  $P < 0,1$ . Assim, o teste t foi utilizado para a realização de testes paramétricos, e Mann-Whitney para teste não paramétricos entre dois grupos. Para mais de dois grupos foi utilizado ANOVA para testes paramétricos, e Kruskal Wallis para teste não paramétricos. Modelos de regressão logística multivariada foram utilizados para associar a influência dos fatores de virulência com desnutrição, determinada a partir dos scores de crescimento, utilizando a mediana como conjunto inicial de avaliação das variáveis. Para as variáveis qualitativas foram utilizados os testes de qui-quadrado, ou o teste exato de *Fisher*. O nível de significância considerável foi a partir de valor de  $P < 0,05$ .

#### 4.9 Organização das coletas do estudo

A **Figura 10** esquematiza um resumo de como ocorreram a coletas das amostras, dos dados do estudo e os períodos que ocorreram a avaliação dos biomarcadores.

**Figura 10:** Resumo da coleta dos dados, coleta de amostras e análise dos biomarcadores no estudo.



L/M: Lactulose e manitol; AAT: Alfa-1-antitripsina; MPO: Mieoloperoxidade; NEO: Neoptertina. Os dados de recrutamento e antropométricos foram coletados no recrutamento das crianças; Coleta de urina ocorreu nos meses 3, 6, 9 e 15 do estudo, mesmo período de análise da L/M; Coleta de fezes ocorre mensalmente até os 12 meses, logo após ocorreu de 3 em 3 meses, até os 24 meses. AAT, MPO e NEO foram analisados nos meses 3, 6, 9, e 15. Scores Z de crescimento foram coletados todos os meses, a análise no estudo ocorreu nos meses 3, 6, 9, 15 e 24.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Caracterização da população do estudo

O estudo coorte multicêntrico do MAL-ED, realizado na cidade de Fortaleza – CE, teve a participação de 233 crianças que foram acompanhadas dos 17 dias de vida até os 24 meses de idade. O diagnóstico molecular realizado através da plataforma TAC identificou a presença de 77/233 (33,05%) crianças diagnosticadas com *C. jejuni* ou *C. coli*. Com o diagnóstico através de PCR convencional feito por este trabalho, e utilizando o iniciador específico para *C. jejuni*, foi diagnosticado a presença deste patógeno em 76/233 (32,62%) das crianças do estudo, que apresentaram pelo menos uma amostra positiva para *C. jejuni* durante o período das coletas das amostras fecais, enquanto isso, 157/233 (67,38%) crianças não tiveram amostra positiva para o patógeno nesse período de 24 meses.

Por este presente trabalho se tratar de um estudo com crianças assintomáticas, 13 (5,58%) crianças positivas para o patógeno que apresentaram alguma sintomatologia, e 7 (3%) crianças negativas para o patógeno, que também apresentaram alguma sintomatologia, foram excluídas das análises do estudo. Desta forma, 63/233 (27,03%) crianças positivas para *C. jejuni* fizeram parte do grupo caso, e 150/233 (64,38%) crianças negativas para *C. jejuni* fizeram parte do grupo controle, sendo assim delimitado um estudo *Nested* caso-controle dentro do estudo coorte (**Figura 9**).

Dentre os grupos do estudo, o sexo masculino teve maior prevalência tanto no caso, com 53,9% (34/63), como no controle, com 51,3% (77/153) de prevalência, não havendo associação estatística entre os grupos com e sem infecção por *C. jejuni* ( $P= 0,727$ ; OR 0,900; IC 95% 0,499 – 1,623). Em relação a amamentação, as crianças que não tiveram uma amamentação exclusiva até os seis meses de idade se mostraram com um maior risco de adquirir infecção pelo microrganismo ( $P < 0,0001$ ; OR 11,25; IC 95% 3,664 – 35,66), apesar de que a média das crianças amamentadas com colostro foi cerca de 98,1% (209/233) ( $P = 0,583$ ; OR 0,412; IC 95% 0,057 – 2,993). Esses resultados podem ser observados na **Tabela 3**.

**Tabela 3:** Caracterização da avaliação inicial das crianças com o diagnóstico positivo para *C. jejuni* (caso) e diagnóstico negativo para *C. jejuni* (controle).

<b>Sexo</b>				
	<b>Total N = 213 N (%)</b>	<b>Caso N = 63 N (%)</b>	<b>Controle N = 150 N (%)</b>	<b>P Valor</b>
Masculino	111 (52,1)	34 (53,97)	77 (51,33)	0,727
<b>Amamentação</b>				
	<b>Total N = 213 N (%)</b>	<b>Caso N = 63 N (%)</b>	<b>Controle N = 150 N (%)</b>	<b>P Valor</b>
Colostro	209 (98,12)	61 (96,82)	148 (98,66)	0,583
Amamentação exclusiva	57 (26,76)	3 (4,76)	54 (36,0)	<0,0001*
Amamentação com fórmula	17 (7,98)	13 (20,63)	4 (2,66)	0,783

Dados antropométricos foram apresentados pela média e erro padrão da média (EPM), sendo usado o teste de *Shapiro-Wilk* como teste de normalidade, seguido do teste não-paramétrico de *Mann-Whitney*. Nas variáveis qualitativas foi realizado o teste exato de *fisher* ou qui-quadrado entre os grupos. \*Valor de P considerado estatístico foi de  $< 0,0001$ .

Em relação as características apresentadas pela mãe ou cuidador da criança, a idade média foi de 24,64 anos de idade ( $P = 0,369$ ; IC 95% 0,900 – 2,411), e apresentando por volta de 9,26 anos de estudo durante a vida ( $P = 0,827$ ; IC 95% 0,744 – 0,930) (**Tabela 4**). A idade da primeira gravidez da mãe apresentou diferença significativa entre os grupos, onde as crianças cujo as mães tiveram filhos mais cedo foram mais propícias à infecção pelo microrganismo ( $P = 0,041$ ; IC 95% 0,029 – 2,152) (**Tabela 4**).

Medidas de higiene pessoal da mãe/cuidador também foram avaliadas, os resultados mostraram que 41,58 % ( $P = 0,061$ ; OR 0,561; IC 95% 0,290 – 1,029) possuíam o hábito de sempre lavar as mãos após higienizar as crianças; 36,31% ( $P = 0,423$ ; OR 0,740; IC 95% 0,398 – 1,370) relataram que sempre higienizavam as mãos antes do preparo dos alimentos; 33,68% ( $P = 0,330$ ; OR 0,704; IC 95% 0,362 – 1,336) tinham sempre o hábito de higienizar as mãos após o uso do banheiro; e que 58,42% ( $P = 0,159$ ; OR 0,627; IC 95% 0,348 – 1,182) possuíam o hábito de usar papel higiênico (**Tabela 4**).

**Tabela 4:** Avaliação das características da mãe ou cuidador da criança.

<b>Caracterização materna/cuidador</b>				
	<b>Total N = 213 Média ± EPM</b>	<b>Caso N = 63 Média ± EPM</b>	<b>Controle N = 150 Média ± EPM</b>	<b>P valor</b>
Idade (anos)	24,64 ± 0,383	24,11 ± 0,650	24,87 ± 0,471	0,369
Anos de estudo	9,26 ± 0,193	9,19 ± 0,364	9,29 ± 0,228	0,827
Idade primeira gestação	18,87 ± 0,290	18,16 ± 0,397	19,22 ± 0,384	0,041*
Número de gestações	2,48 ± 0,119	2,49 ± 0,192	2,48 ± 0,150	0,963
<b>Higiene pessoal (mãe ou cuidador)</b>	<b>Total N = 190 N (%)</b>	<b>Caso N = 63 N (%)</b>	<b>Controle N = 127 N (%)</b>	<b>P valor</b>
Lavar as mãos após higienizar a criança	79 (41,58)	20 (31,75)	59 (46,46)	0,061
Lavar as mãos antes do preparo de alimentos	69 (36,31)	20 (31,75)	49 (38,58)	0,423
Lavar as mãos após o uso do banheiro	64 (33,68)	18 (28,57)	46 (36,22)	0,330
Uso de papel higiênico	111 (58,42)	32 (50,79)	79 (62,20)	0,159

As variáveis foram apresentadas pela média e erro padrão da média (EPM), sendo utilizado o teste de *Shapiro-Wilk* como teste de normalidade, seguido do teste não-paramétrico de *Mann-Whitney*, ou o teste t como paramétrico. Nas variáveis qualitativas foi realizado o teste exato de *fisher* ou qui-quadrado entre os grupos. \*Valor de P considerado estatístico foi de 0,041.

Os fatores socioeconômicos abordados foram relacionados às condições de moradia e saneamento básico. Dentre as condições de moradia, os imóveis onde residiam as crianças apresentaram uma média de 4,08 cômodos ( $P = 0,564$ ; IC 95% 0,739 – 0,405), com uma média de 1,73 quartos por imóvel ( $P = 0,301$ ; IC 95% 0,362 – 0,113) e cerca de 4,78 pessoas vivendo nesses imóveis ( $P = 0,148$ ; IC 95% 1,003 – 0,152) (**Tabela 5**).

Em relação a saneamento básico, 98,34% (122/124) dos entrevistados relataram que ocorria a interrupção frequente no fornecimento da água nas residências ( $P = 0,586$ ; OR 0,544; IC 95% 0,033 – 8,920). A fonte de água potável mais comumente fornecida as residências foi através de canalização para a habitação (118/190 – 62,11%;  $P = 0,634$ ; OR 1,210; IC 95% 0,6322 – 2,319), e por consequência, também foi a fonte de água para cozimento mais utilizado (184/190 – 96,84%;  $P = 0,095$ ; OR 0,2360; IC 95% 0,04428 – 1,045). Em relação ao tratamento da água, dentre os listados, o uso de filtro de água foi a forma de tratamento mais comum (20/103 – 19,41%;  $P = 0,03$ ; OR 3,389; IC 95% 1,166 – 9,064), onde o resultado mostrou que o uso desse tipo de tratamento de água não foi o suficiente para prevenir a infecção por *C. jejuni* em decorrência do consumo de fontes de água contaminada (**Tabela 5**).

Outra medida sanitária avaliada foi o tipo de acesso ao banheiro, e dentre os parâmetros listados, a descarga no sistema de esgoto encanado foi o mais presente nas residências, com

cerca de 90,53% das mesmas possuindo esse sistema, seguido de fossa séptica, apresentando 0,63% das residências utilizavam esse tipo de instalação  $P = 0,301$ ; OR 0,587; IC 95% 0,223 – 1,576) (Tabela 5).

**Tabela 5:** Caracterização socioeconômica das crianças com o diagnóstico positivo para *C. jejuni* (caso) e diagnóstico negativo para *C. jejuni* (controle).

<b>Caracterização socioeconômica e sanitária</b>				
	<b>Total N = 213 Média ± EPM</b>	<b>Caso N = 63 Média ± EPM</b>	<b>Controle N = 150 Média ± EPM</b>	<b>P valor</b>
<b>Moradia</b>				
Tempo vivendo no imóvel (anos)	2,46 ± 0,094	2,46 ± 0,171	2,46 ± 1,266	0,986
Quantidade de cômodos no imóvel	4,08 ± 0,123	4,19 ± 0,256	4,02 ± 0,133	0,564
Quantidade de quartos no imóvel	1,73 ± 0,055	1,81 ± 0,101	1,69 ± 0,065	0,301
Quantidade de pessoas vivendo no imóvel	4,78 ± 0,138	5,06 ± 0,113	4,64 ± 0,173	0,148
<b>Fornecimento contínuo da água</b>	<b>Total N = 124 N (%)</b>	<b>Caso N = 44 N (%)</b>	<b>Controle N = 80 N (%)</b>	<b>P valor</b>
As vezes interrompido	122 (98,39)	43 (97,73)	79 (98,75)	0,586
<b>Fonte de água potável</b>	<b>Total N = 190 N (%)</b>	<b>Caso N = 63 N (%)</b>	<b>Controle N = 127 N (%)</b>	<b>P valor</b>
Canalização para habitação	118 (62,11)	41 (65,08)	77 (60,63)	0,634
Poço protegido	7 (3,68)	2 (3,17)	5 (3,93)	1,0
Outros	65 (34,21)	20 (31,75)	45 (35,43)	0,631
<b>Fonte de água para cozimento</b>	<b>Total N = 190 N (%)</b>	<b>Caso N = 63 N (%)</b>	<b>Controle N = 127 N (%)</b>	<b>P valor</b>
Canalização para habitação	184 (96,84)	59 (93,65)	125 (98,42)	0,095
Torneira pública	1 (0,53)	0 (0,0)	1 (0,79)	1,0
Poço tubular ou furo	1 (0,53)	1 (1,59)	0 (0,0)	1,0
Poço protegido	3 (1,58)	2 (3,17)	1 (0,79)	1,0
Outro	1 (0,53)	1 (1,59)	0 (0,0)	1,0
<b>Tratamento da água</b>	<b>Total N = 103 N (%)</b>	<b>Caso N = 33 N (%)</b>	<b>Controle N = 70 N (%)</b>	<b>P valor</b>
Repouso	1 (0,97)	0 (0,0)	1 (1,43)	1,0
Filtro de água	20 (19,41)	11 (33,33)	9 (12,86)	0,03*
Água sanitária/cloro	1 (0,97)	0 (0,0)	1 (1,43)	1,0
Fervura	2 (1,94)	0 (0,0)	2 (2,85)	1,0
Outro	79 (76,70)	22 (66,66)	57 (81,43)	0,133
<b>Tipos de acesso a banheiro</b>	<b>Total N = 190 N (%)</b>	<b>Caso N = 63 N (%)</b>	<b>Controle N = 127 N (%)</b>	<b>P valor</b>
Sem instalação	3 (1,58)	1 (1,59)	2 (1,57)	1,0
Fossa sem descarga	1 (0,53)	1 (1,59)	0 (0,0)	1,0

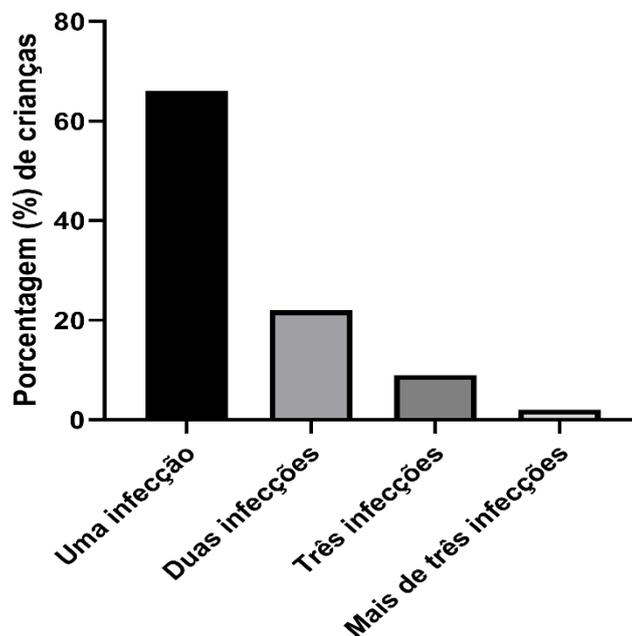
Descarga no sistema de esgoto encanado	172 (90,53)	55 (87,30)	117 (92,13)	0,301
Fossa séptica	12 (0,63)	5 (7,94)	7 (5,51)	0,536
Transportado para outro lugar	2 (1,05)	1 (1,59)	1 (0,79)	1,0

As variáveis foram apresentadas pela média e erro padrão da média (EPM), sendo utilizado o teste de *Shapiro-Wilk* como teste de normalidade, seguido do teste não-paramétrico de *Mann-Whitney*, ou o teste t como paramétrico. Nas variáveis qualitativas foi realizado o teste exato de *fisher* ou qui-quadrado entre os grupos. \*Valor de P considerado estatístico foi de 0,03.

## 5.2 Avaliação da detecção das infecções por *C. jejuni* e a distribuição por idade das crianças positivas para o patógeno.

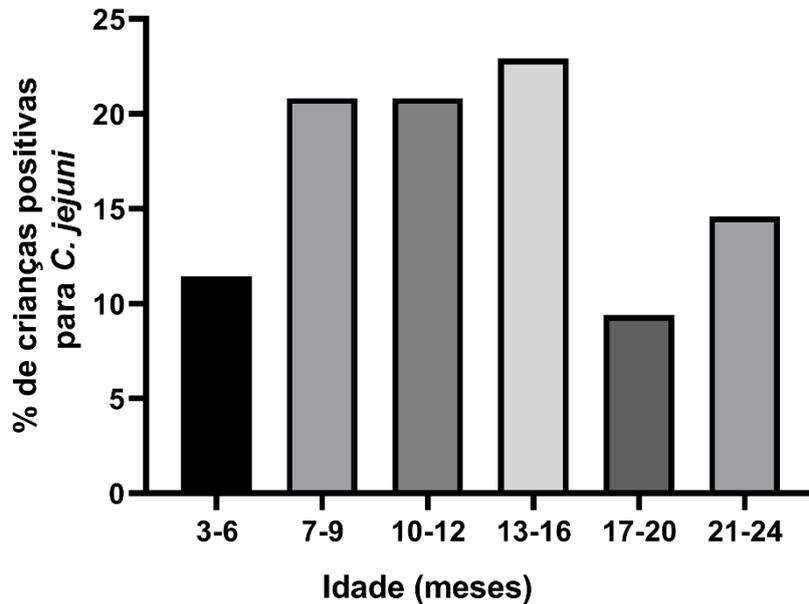
Ao todo, foram coletadas 1261 amostras das 63 crianças do grupo caso durante os 24 meses de estudo, dentre essas amostras, 7,61% (96/1261) foram diagnosticadas como positivas para *C. jejuni*, onde 33,33% (21/63) das crianças apresentaram mais de uma amostra positiva para o patógeno durante esse período. Dentre estas, uma criança (1/63 – 1,59%) apresentou 9 amostras com detecção subsequentes do microrganismo. A distribuição do número de infecções causadas por *C. jejuni* pode ser observado na **Figura 11**.

**Figura 11:** Porcentagem de crianças com uma ou mais infecções detectadas para *C. jejuni*.



Em relação a faixa etária, o maior número de amostras positivas foi entre meses 13 e 16 de idade das crianças (22,92% - 22/96), enquanto isso, a menor faixa etária de infecção ficou entre os meses 17 e 20 meses de idade das crianças (9,38% - 9/96). A distribuição das amostras positivas entre as faixas etárias das crianças pode ser observada na **Figura 12**.

**Figura 12:** Faixa etária de amostras positivas para *C. jejuni* ao longo dos 24 meses de idade das crianças do grupo caso.



### 5.3 Avaliação dos dados antropométricos

Os dados antropométricos coletados no recrutamento das crianças foram analisados. Dentre eles, a média de peso ao nascimento das crianças foi em 3,43kg no grupo caso, e 3,31kg no grupo controle ( $P = 0,170$ ; IC 95% 0,296 – 0,053), não apresentando diferença estatística entre os grupos. O mesmo se repete em relação ao comprimento ( $P = 0,552$ ; IC 95% 0,115 – 1,265) e a circunferência da cabeça ( $P = 0,310$ ; IC 95% 0,554 – 3,668). A avaliação dos dados antropométricos foi realizada através da avaliação dos scores Z de crescimento WHZ, WAZ e HAZ das crianças durante o período de estudo. Os valores apresentados se referem aos dados coletados nos meses 3, 6, 9, 15 e 24 meses de idade das crianças. De acordo com os resultados, não houve diferença estatística entre os grupos caso e controle durante os períodos de análise dos dados (**Tabela 6**).

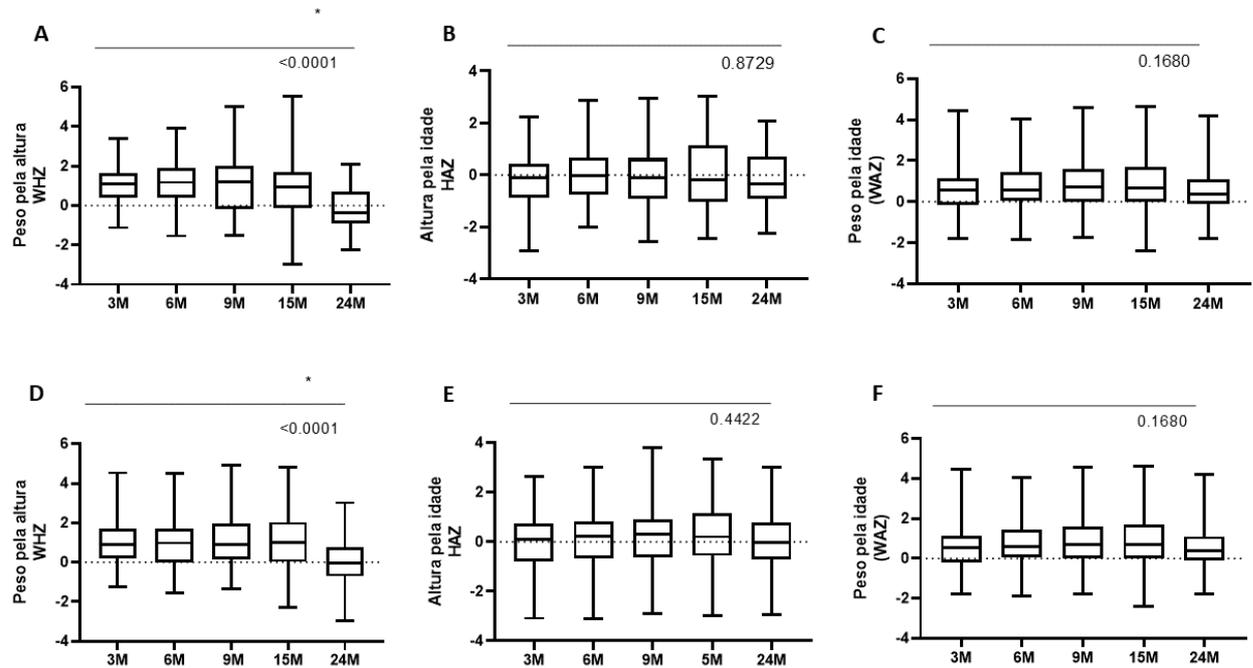
**Tabela 6:** Dados antropométricos e scores Z de crescimento das crianças com o diagnóstico positivo para *C. jejuni* (caso) e diagnóstico negativo para *C. jejuni* (controle) até 24 meses de idade.

<b>Dados antropométricos</b>				
	<b>Total N = 213 Média ± EPM</b>	<b>Caso N = 63 Média ± EPM</b>	<b>Controle N = 150 Média ± EPM</b>	<b>P Valor</b>
Peso ao nascimento	3,34 ± 0,40	3,43 ± 0,081	3,31 ± 0,046	0,170
Comprimento	49,50 ± 0,157	49,35 ± 0,301	49,56 ± 0,185	0,552
Circunferência da cabeça	35,09 ± 0,098	35,25 ± 0,196	35,03 ± 0,112	0,310
<b>Scores Z (meses)</b>	<b>Total N = 198 Média ± DPM</b>	<b>Caso N = 63 Média ± DPM</b>	<b>Controle N = 135 Média ± DPM</b>	<b>P Valor</b>
<b>WHZ (3)</b>	101,53 ± 33,087	102,23 ± 35,554	100,93 ± 31,118	0,837
<b>WHZ (6)</b>	0,998 ± 1,080	1,106 ± 1,014	0,946 ± 1,109	0,335
<b>WHZ (9)</b>	1,012 ± 1,222	1,096 ± 1,203	0,969 ± 1,234	0,503
<b>WHZ (15)</b>	1,098 ± 1,348	1,115 ± 1,410	1,089 ± 1,320	0,901
<b>WHZ (24)</b>	0,973 ± 1,503	0,920 ± 1,572	1,006 ± 1,465	0,723
<b>HAZ (3)</b>	- 0,013 ± 1,084	- 0,099 ± 1,097	0,052 ± 1,076	0,406
<b>HAZ (6)</b>	- 0,127 ± 1,137	- 0,146 ± 1,051	- 0,118 ± 1,179	0,875
<b>HAZ (9)</b>	0,083 ± 1,088	0,057 ± 1,094	0,096 ± 1,089	0,818
<b>HAZ (15)</b>	0,988 ± 1,124	- 0,010 ± 1,169	0,158 ± 1,100	0,339
<b>HAZ (24)</b>	0,123 ± 1,185	0,046 ± 1,163	0,171 ± 1,201	0,512
<b>WAZ (3)</b>	- 0,013 ± 1,084	- 0,099 ± 1,097	0,052 ± 1,076	0,406
<b>WAZ (6)</b>	0,572 ± 1,068	0,646 ± 0,995	0,538 ± 1,102	0,509
<b>WAZ (9)</b>	0,744 ± 1,157	0,793 ± 1,202	0,718 ± 1,137	0,676
<b>WAZ (15)</b>	0,839 ± 1,268	0,791 ± 1,314	0,865 ± 1,247	0,712
<b>WAZ (24)</b>	0,463 ± 1,365	0,717 ± 1,430	0,838 ± 1,329	0,582

As variáveis foram apresentadas pela média e desvio padrão da média (DPM), sendo utilizado o teste de *Shapiro-Wilk* como teste de normalidade, seguido do teste não-paramétrico de *Mann-Whitney*, ou o teste t como paramétrico.

A análise temporal dos scores Z de crescimento dentro de cada grupo apresentaram diferença estatística no WHZ tanto no grupo caso ( $P < 0,0001$ ) (**Figura 13.A**), como no grupo controle ( $P < 0,0001$ ) (**Figura 13.D**). Essa diferença não foi observada no HAZ ( $P = 0,307$  no grupo caso;  $P = 0,937$  no grupo controle) (**Figura 13.B; 13.E**), nem no score WAZ ( $P = 0,331$  no grupo caso;  $P = 0,168$  no grupo controle) (**Figura 13.C; 13.F**).

**Figura 13:** Análise temporal dos Z scores de crescimento nas crianças com o diagnóstico positivo para *C. jejuni* (caso) e diagnóstico negativo para *C. jejuni* (controle) entre os meses 3 e 24 de idade.

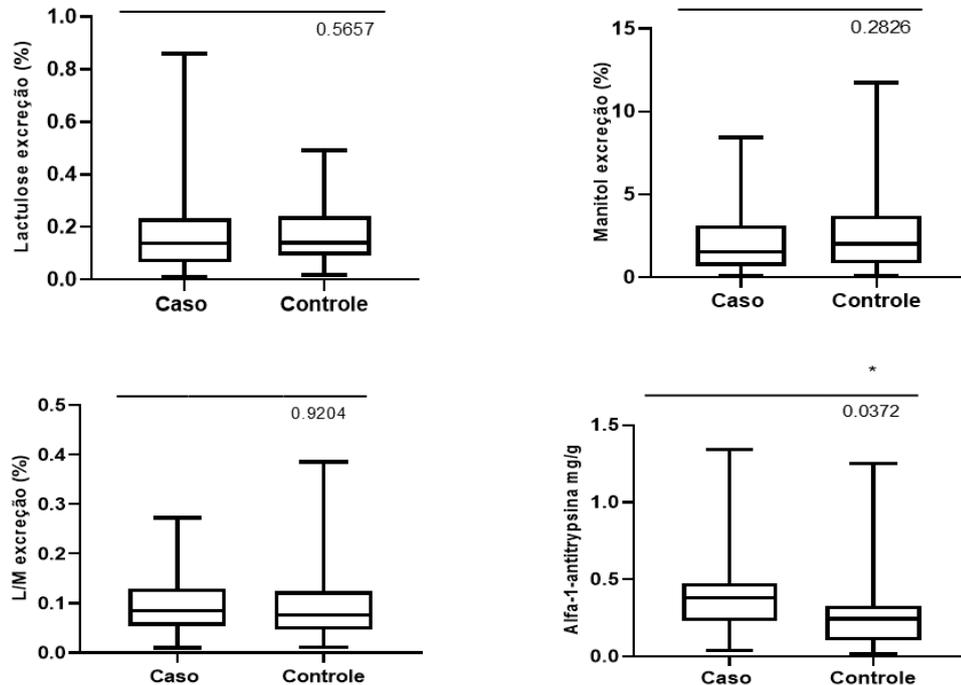


WHZ – peso pela altura; HAZ – altura pela idade; WAZ – peso pela idade; M – meses. Os valores da figura estão representados pela mediana e intervalo interquartil da transcrição relativa entre os meses de análise dos escores-Z de crescimento WHZ, HAZ e WAZ. Sendo realizado o teste de ANOVA, seguido de pós teste de Tukey, e os valores considerados estatísticos foram os de  $*P < 0,0001$ .

#### 5.4 Avaliação dos biomarcadores de permeabilidade e inflamação intestinal

Dos 3 meses até os 15 meses de idade das crianças foi avaliado a integridade da barreira intestinal utilizando o teste L/M e o biomarcador AAT. Os resultados apresentados não mostraram alteração da integridade da barreira através da avaliação da lactulose ( $P = 0,567$ ; IC 95% -0,2509 - 0,007929), manitol ( $P = 0,283$ ; IC 95% -0,4108 - 1,397) e da razão L/M ( $P = 0,920$ ; IC 95% -0,02715 - 0,02453). No entanto, houve alteração em relação a excreção do AAT ( $P = 0,037$ ; IC 95% -0,2509 - 0,007929) no grupo positivo para *C. jejuni* (Figura 14).

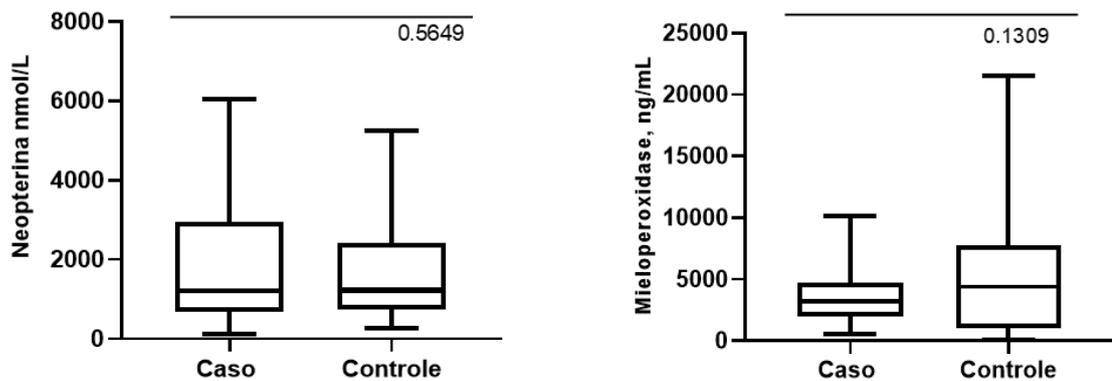
**Figura 14:** Resultados dos biomarcadores de integridade da barreira intestinal nos grupos com diagnóstico positivo para *C. jejuni* (caso) e diagnóstico negativo para *C. jejuni* (controle) durante os 15 meses de idade das crianças.



Os valores da figura estão representados pela mediana e intervalo interquartil, sendo utilizado o teste de *Shapiro-Wilk* como teste de normalidade, seguido do teste não-paramétrico de *Mann-Whitney*, ou o teste t como paramétrico. \* O valor considerado estatístico foi de  $P = 0,037$ .

Em relação aos biomarcadores de inflamação, foram analisados os biomarcadores NEO e MPO nas crianças do estudo. Os resultados apresentados não mostraram alteração na NEO ( $P = 0,5649$ ; IC 95% -936,6 - 516,0), da mesma forma na MPO ( $P = 0,1309$ ; IC 95% -570,3 - 4298) entre os grupos do estudo (**Figura 15**).

**Figura 15:** Resultados dos biomarcadores de inflamação nos grupos com diagnóstico positivo para *C. jejuni* (caso) e diagnóstico negativo para *C. jejuni* (controle) durante os 15 meses de idade das crianças.



Os valores da figura estão representados pela mediana e intervalo interquartil, sendo utilizado o teste de *Shapiro-Wilk* como teste de normalidade, seguido do teste não-paramétrico de *Mann-Whitney*, ou o teste t como paramétrico.

### 5.5 Avaliação do perfil de genes de virulência das crianças com amostras positivas para *C. jejuni*.

Foi realizado a pesquisa de 20 genes relacionados a virulência de *C. jejuni*, apenas na primeira amostra positiva para *C. jejuni* diagnosticada nas crianças. Dentre os genes, *cheW*, relacionado a quimiotaxia do microrganismo, foi o mais prevalente (84,13% - 53/63), seguido do gene *cdtA* (82,54% - 52/63), relacionado a toxina citoletal distensora. O gene *pVir*, relacionado a invasão do microrganismo, foi o único que não teve prevalência dentre os genes estudados (0% - 0/63). A prevalência de todos os genes de virulência estudados pode ser observada na **Tabela 7**.

**Tabela 7:** Prevalência dos genes de virulência de *C. jejuni* entre as amostras das crianças positivas para o microrganismo.

Gene	Nº de amostras positivas	Porcentagem (%)
<i>cheW</i>	53/63	84,13
<i>cdtA</i>	52/63	82,54
<i>cdtC</i>	50/63	79,36
<i>cfrA</i>	50/63	79,36
<i>cheR</i>	50/63	79,36
<i>flgE</i>	50/63	79,36
<i>iamA</i>	50/63	79,36
<i>jlpA</i>	48/63	76,19
<i>ceuE</i>	46/63	73,01
<i>cheA</i>	46/63	73,01
<i>fur</i>	42/63	66,66
<i>sodB</i>	40/63	63,49
<i>racR</i>	39/63	61,90
<i>katA</i>	28/63	44,44
<i>flaA</i>	16/63	25,39
<i>cdtB</i>	13/63	20,63
<i>pldA</i>	9/63	14,28
<i>dnaJ</i>	3/63	4,76
<i>ciaB</i>	1/63	1,58
<i>pVir</i>	0/63	0,0

#### 5.5.1 Análise da regressão logística multivariada entre os genes de virulência de *C. jejuni* com os scores Z de crescimento nos 24 meses de idade das crianças.

Foi realizado a análise da regressão logística multivariada entre os genes de virulência avaliados nas amostras positivas para *C. jejuni* e os scores Z de crescimento, utilizando como indicadores o sexo da criança e o peso ao nascimento. Diante disso, os resultados apresentados não mostraram correlação entre os genes de virulência e a alteração nos scores WHZ, HAZ e WAZ das crianças do estudo. Os resultados das correlações podem ser observados na **Tabela 8**.

**Tabela 8:** Análise da regressão logística multivariada entre o score WHZ de crescimento e os genes de virulência de *C. jejuni*.

Genes	WHZ			HAZ			WAZ		
	IC (95%)	OR	P valor	IC (95%)	OR	P valor	IC (95%)	OR	P valor
<i>ciaB</i>	0,093 - 2345,935	14,736	0,298	0,087 - 2516,594	14,783	0,304	0,027 - 134,738	1,902	0,768
<i>dnaJ</i>	0,03 - 2,562	0,087	0,157	0,002 - 1,533	0,050	0,086	0,006 - 2,612	0,125	0,180
<i>racR</i>	0,065 - 4,950	0,569	0,609	0,079 - 5,626	0,665	0,708	0,020 - 2,318	0,213	0,204
<i>flaA</i>	0,337 - 8,124	1,654	0,536	0,451 - 10,424	2,167	0,334	0,149 - 4,054	0,778	0,766
<i>jlpA</i>	0,115 - 321,378	6,070	0,373	0,149 - 754,585	10,608	0,278	0,078 - 229,482	4,129	0,480
<i>ceuE</i>	0,002 - 1,912	0,059	0,111	0,003 - 3,924	0,110	0,226	0,030 - 12,173	0,608	0,745
<i>sodB</i>	0,221 - 10,095	1,493	0,681	0,227 - 10,357	1,535	0,660	0,654 - 44,212	5,377	0,118
<i>cfrA</i>	0,078 - 15,030	1,081	0,954	0,047 - 14,651	0,826	0,986	0,038 - 7,424	0,528	0,636
<i>fur</i>	0,123 - 47,399	2,416	0,561	0,091 - 24,964	1,503	0,776	0,019 - 5,530	0,325	0,437
<i>flgE</i>	0,028 - 9,185	0,507	0,646	0,013 - 3,238	0,208	0,262	0,049 - 9,271	0,674	0,768
<i>cheW</i>	0,003 - 6797,587	4,335	0,696	0,000 - 428,905	0,278	0,732	0,004 - 7927,553	5,912	0,629
<i>cdtC</i>	0,008 - 71,364	0,764	0,907	0,018 - 155,992	1,670	0,825	0,007 - 32,285	0,485	0,735
<i>cdtB</i>	0,032 - 2,674	0,290	0,275	0,058 - 4,375	0,503	0,534	0,470 - 48,956	4,797	0,186
<i>cdtA</i>	0,160 - 1850,689	17,213	0,233	0,086 - 2201,630	13,791	0,311	0,142 - 752,380	10,336	0,286
<i>iamA</i>	0,012 - 87,793	1,019	0,993	0,019 - 72,987	1,178	0,938	0,001 - 228,729	0,461	0,804
<i>pldA</i>	0,345 - 46,899	4,023	0,267	0,306 - 32,343	3,148	0,335	0,565 - 72,304	6,394	0,134
<i>cheA</i>	0,620 - 83,169	7,180	0,115	0,185 - 11,599	1,465	0,717	0,138 - 13,729	1,376	0,786
<i>katA</i>	0,148 - 2,738	0,636	0,544	0,299 - 4,387	1,145	0,844	0,204 - 3,855	0,887	0,873
<i>cheR</i>	0,002 - 38,076	0,288	0,618	0,004 - 51,836	0,438	0,734	0,001 - 510,623	0,735	0,926

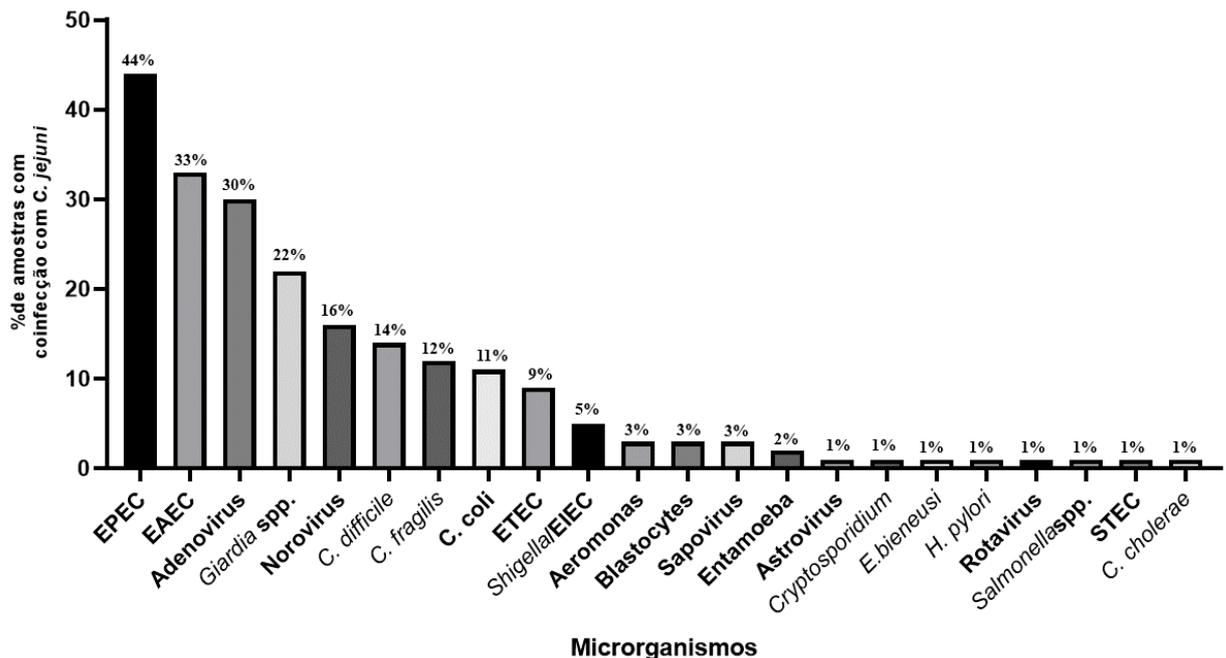
IC: intervalo de confiança; OR: Odds ratios.

## 5.6 Avaliação da coinfeção entre outros microrganismos e *C. jejuni*.

Com diagnóstico realizado através da plataforma em tempo real ensaio TAC, foi possível o diagnóstico de 28 enteropatógenos no estudo, além de *C. jejuni/C.coli*. O patógeno com maior prevalência com coinfeção com *C. jejuni* foi a *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) (44,44% - 28/63), seguida da *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) (31,80% - 20/63). Coinfeção entre *C. jejuni* e *C. coli* também pôde ser observado com o diagnóstico por

PCR convencional para as duas espécies (**Tabela 2**). Assim, 11% das amostras (7/63) positivas para *C. jejuni* tiveram a presença de *C. coli* concomitantemente. A porcentagem de coinfeccção de outros enteropatógenos com *C. jejuni* pode ser observado na **Figura 16**.

**Figura 16:** Porcentagem de amostras que apresentaram coinfeccção entre *C. jejuni* e outros enteropatógenos.

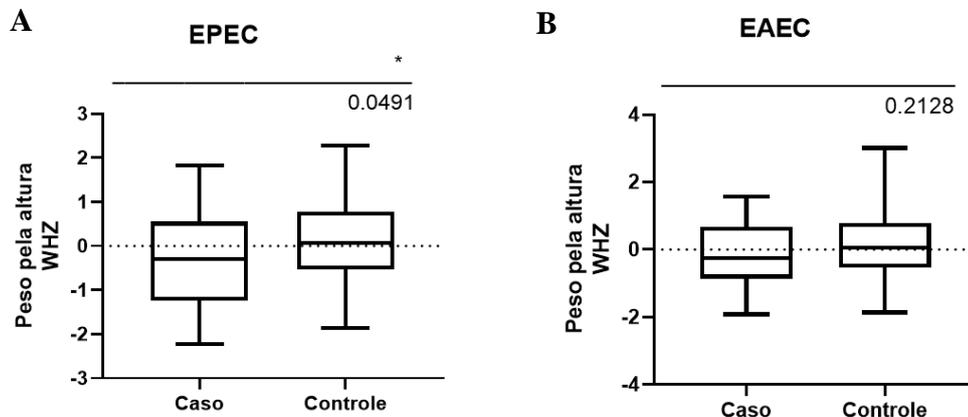


EPEC: *Escherichia coli* enteropatógena; EAEC: *Escherichia coli* enteroagregativa; ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigênica; EIEC: *Escherichia coli* enteroinvasiva; STEC: *Escherichia coli* produtora da toxina Shiga.

### 5.6.1 Avaliação do escore Z de crescimento WHZ com amostras das crianças que apresentaram coinfeccção com *C. jejuni*.

Foi realizado a avaliação da coinfeccção entre as amostras das crianças que tiveram a presença dos dois patógenos que mais apresentaram coinfeccção com *C. jejuni*, que no presente estudo foram EPEC (28/63) e EAEC (20/63), respectivamente, em relação a avaliação do escore Z WHZ. Os resultados mostraram que as crianças que tiveram amostras que apresentaram coinfeccção entre *C. jejuni* e EPEC (caso) apresentaram redução no WHZ ( $P = 0,0491$ ; IC 95% 0,001733 - 0,8458) em comparação com as crianças que não apresentaram infecção por esses patógenos (controle) (**Figura 17.A**). Já em relação a coinfeccção por EAEC, não houve a associação entre a presença da coinfeccção entre EAEC e *C. jejuni*, com a redução do WHZ das crianças ( $P = 0,2128$ ; IC 95% -0,1730 - 0,7666) (**Figura 17.B**). Não houve correlação em relação a coinfeccção entre EPEC e EAEC concomitantemente ( $P = 0,845$ ).

**Figura 17:** Resultados da avaliação do escore Z de crescimento WHZ entre o grupo que apresentaram coinfeção entre EPEC e *C. jejuni* (caso) e entre EAEC com *C. jejuni* (caso) e o grupo que não apresentou coinfeção entre os patógenos (controle).

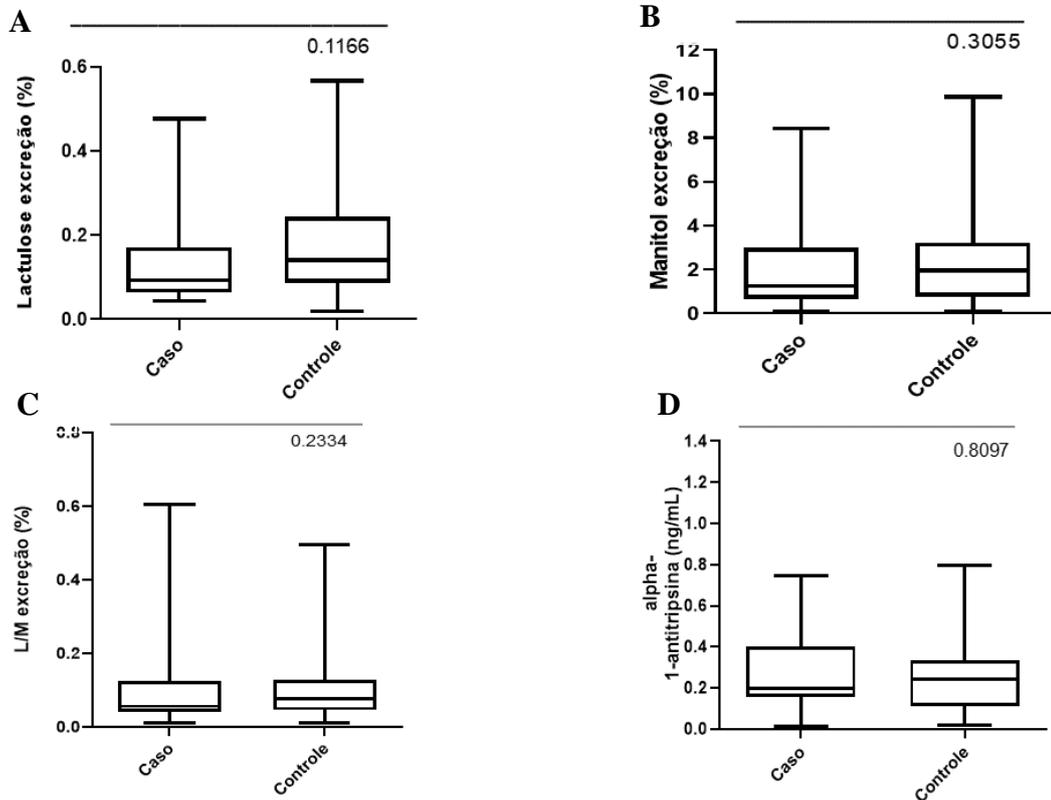


Os valores da figura estão representados pela mediana e intervalo interquartil, sendo utilizado o teste de *Shapiro-Wilk* como teste de normalidade, seguido do teste não-paramétrico de *Mann-Whitney*, ou o teste t como paramétrico. \* O valor considerado estatístico foi de 0,0491

### 5.6.2 Avaliação dos biomarcadores de permeabilidade intestinal e inflamação com amostras das crianças que apresentaram coinfeção com *C. jejuni*.

A avaliação dos biomarcadores ocorreu também entre os dois microrganismos mais presentes nas amostras com coinfeção por *C. jejuni*, EPEC e EAEC. Os resultados mostraram que a coinfeção entre EPEC e *C. jejuni* não apresentou alteração em relação ao teste de lactulose ( $P = 0,116$ ; IC 95%  $-0,02012 - 0,07977$ ) (**Figura 18.A**), manitol ( $P = 0,305$ ; IC 95%  $-0,5836 - 1,333$ ) (**Figura 18.B**) e em relação a razão L/M ( $P = 0,233$ ;  $-0,03243 - 0,04742$ ) (**Figura 18.C**), além da AAT ( $P = 0,809$ ; IC 95%  $-0,1083 - 0,1205$ ) (**Figura 18.D**).

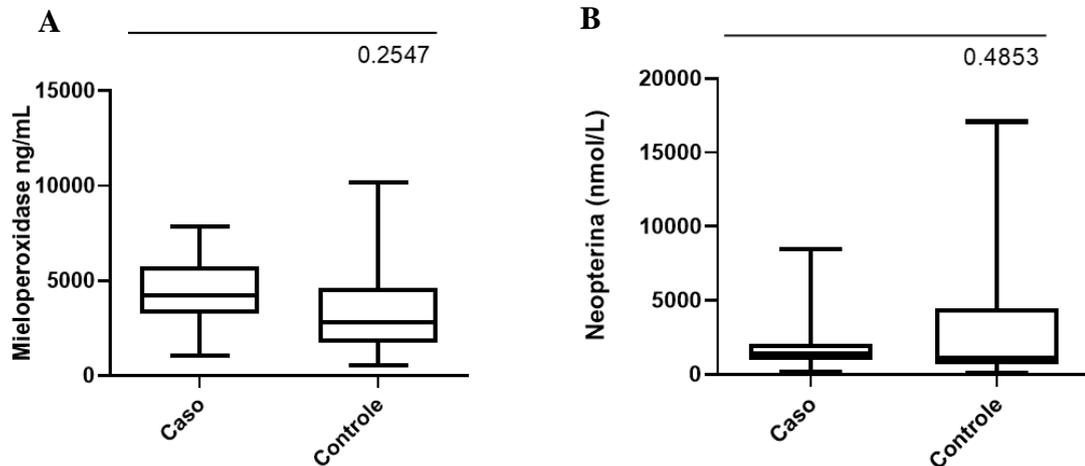
**Figura 18:** Resultados dos biomarcadores de avaliação da permeabilidade intestinal entre o grupo que apresentou coinfeção entre EPEC e *C. jejuni* (caso) e o grupo que não apresentou coinfeção com EPEC e *C. jejuni* (controle).



Os valores da figura estão representados pela mediana e intervalo interquartil, sendo utilizado o teste de *Shapiro-Wilk* como teste de normalidade, seguido do teste não-paramétrico de *Mann-Whitney*, ou o teste t como paramétrico.

Em relação aos resultados sobre os biomarcadores de inflamação, também não houve alteração em relação a coinfeção com EPEC em relação ao MPO ( $P = 0,254$ ; IC 95% -2709 - 747,0) (**Figura 19.B**), e a NEO ( $P = 0,485$ ; IC 95% -1968 - 4027) (**Figura 19.A**).

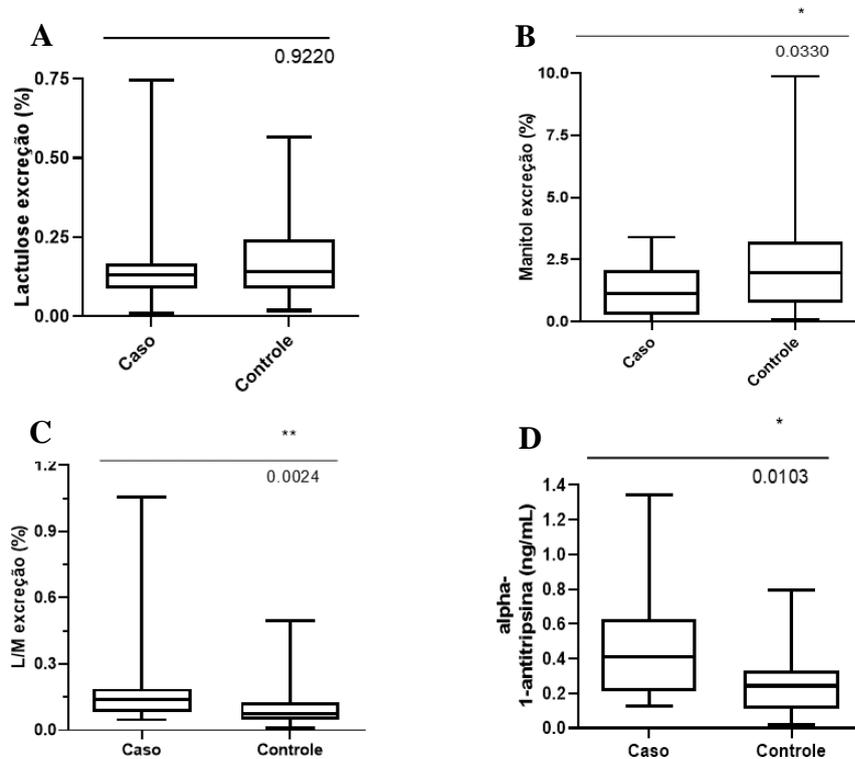
**Figura 19:** Resultados dos biomarcadores de inflamação entre o grupo que apresentou coinfeção entre EPEC e *C. jejuni* (caso) e o grupo que não apresentou coinfeção entre EPEC e *C. jejuni* (controle).



Os valores da figura estão representados pela mediana e intervalo interquartil, sendo utilizado o teste de *Shapiro-Wilk* como teste de normalidade, seguido do teste não-paramétrico de *Mann-Whitney*, ou o teste t como paramétrico.

A avaliação dos biomarcadores de coinfeção entre EAEC e *C. jejuni* não apresentou alteração na avaliação da lactulose ( $P = 0,922$ ; IC 95%  $-0,06612 - 0,05988$ ) (**Figura 20.A**), mas houve alteração em relação a avaliação do manitol no grupo que não apresentou coinfeção ( $P = 0,033$ ; IC 95%  $0,09534 - 2,221$ ) (**Figura 20.B**). Além disso, houve alteração em relação a razão L/M no grupo que apresentou coinfeção ( $P = 0,0024$ ; IC 95%  $-0,1639 - 0,03634$ ) (**Figura 20.C**), além de alteração no AAT ( $P = 0,0103$ ; IC  $= -0,3850 - 0,05389$ ) (**Figura 20.D**).

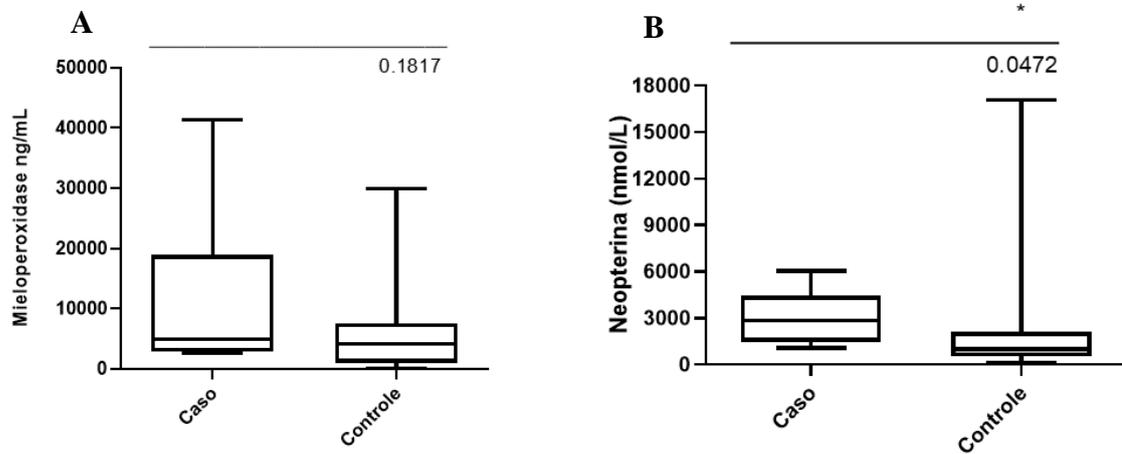
**Figura 20:** Resultados dos biomarcadores de avaliação da integridade intestinal entre o grupo que apresentou coinfeção entre EAEC e *C. jejuni* (caso) e o grupo que não apresentou coinfeção entre EAEC e *C. jejuni* (controle).



Os valores da figura estão representados pela mediana e intervalo interquartil, sendo utilizado o teste de *Shapiro-Wilk* como teste de normalidade, seguido do teste não-paramétrico de *Mann-Whitney*, ou o teste t como paramétrico. \* O valor considerado estatístico foram de 0,0330; 0,0024; 0,0103.

Em relação aos resultados sobre os biomarcadores de inflamação, não houve alteração em relação a coinfeção com EAEC em relação ao MPO ( $P = 0,181$ ; IC 95% - 11564-1059) (**Figura 21.A**), mas houve alteração em relação a NEO ( $P = 0,047$ ; IC 95% -4002 - 2626) (**Figura 21.B**).

**Figura 21:** Resultados dos biomarcadores de inflamação entre o grupo que apresentou coinfeção entre EAEC e *C. jejuni* (caso) e o grupo que não apresentou coinfeção entre EAEC e *C. jejuni* (controle).



Os valores da figura estão representados pela mediana e intervalo interquartil, sendo utilizado o teste de *Shapiro-Wilk* como teste de normalidade, seguido do teste não-paramétrico de *Mann-Whitney*, ou o teste t como paramétrico. \* O valor considerado estatístico foi de 0,0472.

## 6 DISCUSSÃO

*Campylobacter* spp. continuam sendo uma das principais causas de infecções gastrointestinais causadas por bactéria no mundo (EFSA, 2017; WHO, 2017; CDC, 2019). Infecções por este microrganismo já foram associados com disenteria, diarreia e desnutrição (PLATTS-MILL et al., 2014; AMOUR et al., 2016; FRANÇOIS et al., 2018). Recentemente casos de infecções assintomáticas vêm ganhando atenção pelo fato de que espécies, como *C. jejuni* e *C. coli*, estarem associadas à inflamação e déficit no crescimento de crianças em países em desenvolvimento, podendo ser um dos patógenos envolvidos na DEA (LEE et al., 2013; PLATTS-MILLS et al., 2015; AMOUR et al., 2016; GEORGE et al., 2017; HAQUE et al., 2019). Contudo, mecanismos envolvidos nesta associação continuam indeterminados (ROGAWSKI et al.; 2018; HAQUE et al., 2019).

Este presente estudo fez, em parte, uso do estudo coorte do projeto longitudinal multicêntrico MAL-ED (MAL-ED, 2014). A partir desse estudo, como já descrito no item 4.1, foi idealizado nossa pesquisa no formato *Nested* caso-controle. Dessa forma, foi analisado a prevalência de infecções causadas por *C. jejuni*, além de fatores socioeconômicos, sanitários, scores de crescimento, genes de virulência, biomarcadores de permeabilidade intestinal e inflamação, além da influência de coinfeções, que podem estar envolvidas em infecções subclínicas causadas pelo patógeno em crianças até 24 meses de idade que residiram em comunidades na periferia da cidade de Fortaleza – CE, Brasil, no período do estudo MAL-ED.

Assim, dentro da população estudada, foi encontrado uma prevalência de 27,03% de crianças que apresentaram pelo menos uma infecção pelo patógeno durante esse período de 24 meses de idade. Essa prevalência foi superior a outros estudos realizados na cidade de Fortaleza. O estudo realizado por QUETZ e colaboradores (2012), apresentou uma prevalência de *C. jejuni* em 9,6% de crianças com diarreia, e 7,2 % em crianças sem diarreia. O estudo caso-controle do projeto MAL-ED realizado também na cidade de Fortaleza - CE, com crianças nutridas e desnutridas, infecções causadas por *C. jejuni* apresentaram uma prevalência de 9,71% na população estudada (VERAS et al., 2018). Na análise inicial do projeto MAL-ED, sendo o diagnóstico realizado por ELISA, *Campylobacter* spp. foi o patógeno mais prevalente dentre 29 enteropatógenos estudados (PLATTS-MILLS et al., 2015). Com a reanálise, utilizando a plataforma de ensaio TAC, infecções causadas por *C. jejuni* / *C. coli* foram a sexta mais prevalente em crianças até 12 meses de idade, e a oitava mais prevalente em crianças entre 12 e 24 meses de idade, também entre 29 enteropatógenos diagnosticados (PLATTS-MILLS et al., 2018).

A partir da aplicação de questionários, informações sobre amamentação das crianças, fatores socioeconômicos, sanitários, além de informações sobre a mãe ou cuidador da criança, puderam ser coletadas. Assim, foi possível observar que a maioria das crianças foram alimentadas pelo colostro materno (98,12%), e que a amamentação exclusiva até os seis meses de idade das crianças ocorreu em uma baixa porcentagem nessa população (7,98%). Assim, as crianças que não tiveram essa alimentação exclusiva por leite materno podem ter sido mais susceptíveis à infecções por *C. jejuni* ( $P < 0,0001$ ).

A recomendação da OMS é a exclusiva amamentação por seis meses, e posteriormente iniciar a introdução de alimentos complementares após esse período, enquanto a mãe continua a amamentação concomitantemente na criança até os 24 meses de idade (WHO, 2013). Alguns estudos sugerem que a amamentação por tempo prolongado protege as crianças de infecções por *Campylobacter* spp., pois além do fortalecimento da resposta imune, reduz o contato com alimentos e água contaminada, diminuindo o contato das crianças com ambientes insalubres através da interação mais próxima com a mãe (RUIZ-PALACIOS et al., 1990; AMOUR et al., 2016; YU et al., 2016). Amour e colaboradores (2016) mostraram que a amamentação exclusiva até o primeiro mês de idade das crianças já reduziu a incidência de infecções por espécies de *Campylobacter* dentro da população participante do MAL-ED. Outro estudo realizado por Haque e colaboradores (2019) mostrou que a falta de amamentação foi um forte fator de risco para infecções por *C. jejuni* / *C. coli*.

A avaliação sobre algumas características da mãe/cuidador das crianças também foi feita. Uma delas foi em relação a idade da mãe, onde a média entre os grupos ficou em torno de 24,63 anos de idade, a média de anos de estudo da mãe/cuidador das crianças foi de 9,26 anos entre os grupos do estudo, e essas variáveis não apresentaram diferenças estatística ( $P = 0,369$ ;  $P = 0,827$ , respectivamente). Mas a idade da primeira gestação apresentou diferença estatísticas entre os grupos caso e controle ( $P = 0,041$ ), demonstraram que mães que tiveram uma gravidez mais precoce, as crianças seriam mais susceptíveis a adquirir infecção por *C. jejuni*.

Idade e baixa escolaridade materna ( $< 6$  anos) já foram associados com infecções causadas por *Campylobacter* spp. em crianças (AMOUR et al., 2016; HAQUE et al., 2019). Dentre as análises já realizadas no estudo MAL-ED, nosso estudo foi o primeiro a relatar a associação entre a gravidez precoce e a infecção causada por *Campylobacter* nessas crianças. Esse fato poderia ter sido atribuído à higienização da mãe/cuidador, onde foi relatado no estudo que apenas 41,58% das mães ou cuidadores possuíam o hábito de lavar as mãos após higienizar

as crianças, apesar de não ter sido observado diferença estatística entre os grupos deste estudo, apenas uma tendência ( $P = 0,061$ ), havia visto que essa diferença poderia ter sido evidente se 18,45% dos entrevistados houvessem respondido esse questionamento. O mesmo poderia ser refletido a cerca dos dados relacionados com foi a lavagem das mãos antes do preparo dos alimentos, pois 36,31% dos entrevistados relataram ter esse hábito, e a lavagem das mãos após o uso do banheiro, que obteve a menor porcentagem, com 33,68% dos entrevistados relatando ter esse hábito.

Apesar de não ter havido diferença estatística entre os grupos nos questionamentos sobre higiene pessoal, o índice de ter menos de 50% dos entrevistados possuindo adequadamente esse hábito é preocupante, pois *C. jejuni* tem como principal via de transmissão o consumo de alimentos mal processados, e o manejo inadequado de alimentos, ou a falta de lavagem de mão após o uso do banheiro, que podem ser vias de transmissão bastante viáveis para este microrganismo (BRONOWSKI et al., 2014; KAAKOUSH et al., 2015; MUGHINI-GRAS et al., 2021).

Os fatores socioeconômicos e sanitários abordados foram avaliados em relação às condições de moradia, fornecimento e fontes de tratamento de água, e acesso ao banheiro. Assim, em relação às condições de moradia, as famílias estavam vivendo cerca de 2,46 anos no imóvel que residiam, com uma média de quartos menor que dois por residência (1,73 quartos), e cerca de quase cinco pessoas em média vivendo nas moradias (4,78 pessoas). Além disso, foi relatado que na maioria das residências ocorria com frequência a interrupção do fornecimento de água (98,39%), e que a fonte de água mais comum para uso e cozimento de alimentos foi por canalização na residência (63,11% e 96,84%, respectivamente). Em relação ao tratamento da água, o uso de filtros, barro ou cerâmica, não foi o suficiente para proteger contra infecções pelo patógeno em estudo ( $P = 0,03$ ).

Ensaio clínicos randomizados recentemente empregados que visaram reduzir doenças entéricas através do manejo adequado da água, boas práticas de higiene e saneamento básico, foram bem sucedidos (LUBY et al., 2018; NULL et al., 2018). Assim, esses fatores já foram documentados como alternativas imprescindíveis para o combate de infecções entéricas. Além disso, alguns estudos já sugeriram a necessidade de incorporar melhorias na infraestrutura doméstica para reduzir a contaminação por microrganismos (PRENDERGAST et al., 2019; PICKERING et al., 2019; SCHIAFFINO et al., 2021). Desta forma, as famílias participantes do estudo não apresentaram maiores riscos para adquirir infecções por *C. jejuni* a partir das

condições de moradia, e nem do fornecimento de água, mas o uso de filtros como forma de tratamento da água ainda se mostrou um fator de risco para a infecção.

O uso de filtros de barro ou cerâmica para o tratamento de água é uma alternativa de baixo custo econômico, além de ter um baixo impacto ao meio ambiente, por diminuir o uso de resíduos plásticos, e o uso de energia elétrica. Estudo realizado por Hill e colaboradores (2020) mostrou que o uso de filtros de cerâmica não foi o suficiente para prevenir infecções entéricas, apesar de que seu uso reduziu a prevalência de diarreia em estudos realizados na Bolívia (CLASEN et al.; 2004) e no Camboja (BROWN et al., 2008). As crianças deste estudo não apresentaram sintomatologia. Então fazer esta correlação entre a utilização do uso do filtro para diminuir a incidência de diarreia ficou limitado.

Os filtros comercialmente vendidos utilizam velas de cerâmica que apresentam boa ação para reter micro e macro partículas em suspensão. No entanto, compostos químicos e a maioria dos microrganismos apresentam dimensões menores que 1,0  $\mu\text{m}$  e podem transitar livremente por entre os poros da vela. *Campylobacter* spp., por exemplo, tem em média 0,2 a 0,8  $\mu\text{m}$ , podendo assim passar facilmente por essa barreira (PURCHAS & SUTHERLAND, 2002; FERNÁNDEZ, 2008).

As crianças participantes desse estudo, originalmente, fizeram parte de um estudo coorte multicêntrico (MAL-ED), e o acompanhamento dessas crianças, com coletas regulares de amostras fecais, tornou possível identificar a presença de mais de uma amostra fecal positiva para *C. jejuni* em 33,33% das crianças participantes nesse estudo *Nested* caso-controle. Infecções por espécies de *Campylobacter* podem acontecer mais de uma vez durante a vida do ser humano, pois o corpo humano não adquire anticorpos de memória para o microrganismo (YOUNG, 2007, BURNHAM et al., 2018). Assim, umas das crianças desse estudo apresentou até nove amostras fecais positivas para o microrganismo em meses susceptível. Esse fato pode estar ligado a colonização do microrganismo que acontece predominantemente nas camadas do epitélio intestinal inferior, principalmente o jejuno. O trato intestinal inferior possui nichos ideais para a colonização, pois naturalmente abrigam um suprimento abundante de nutrientes e fontes de carbono que ajudam no metabolismo e crescimento do microrganismo. Além disso, a microbiota intestinal nesses locais é propensa a contribuir com metabólitos que influenciam a expressão de fatores de colonização de *C. jejuni*, fazendo com que a bactéria se comporte de forma comensal no hospedeiro (HOFREUTER et al., 2014; LUETHY et al., 2017).

A idade que as crianças apresentaram um maior número de amostras positivas para o patógeno foi entre 13 e 16 meses de idade, com 22,92% de amostras positivas. Esse dado corrobora com estudo caso-controle do projeto MAL-ED realizado na cidade de Fortaleza – CE, onde as crianças que apresentaram infecção para *C. jejuni* tinham em média mais de 12 meses de idade (VERAS et al., 2018). Além disso, estudo realizado por Lee e colaboradores (2013), com amostras de crianças assintomáticas, também relatou que infecções no segundo ano de vida das crianças foram mais comuns.

Outra mensuração realizada nesse trabalho foi a avaliação do crescimento das crianças do estudo a partir das medidas antropométricas coletadas no recrutamento das crianças, além de scores Z de crescimento WHZ, WAZ e HAZ. Os dados antropométricos são usados para definir o estado nutricional e o crescimento das crianças, onde a OMS clássica a desnutrição de acordo com a gravidade, que é definida clinicamente por um valor de score Z < - 1,0 desvio padrão (DP), como desnutrição leve; < -2,0 DP como desnutrição moderada; e < - 3,0 DP como desnutrição severa (WHO, 2006; 2017).

Assim, os índices antropométricos são utilizados para definir os diferentes tipos de desnutrição, onde a desnutrição aguda, ou baixo peso (do inglês, *wasting*) é definida com o índice de baixo peso para altura (WHZ); a desnutrição crônica ou nanismo (do inglês, *stunting*) é definida como o índice de baixa altura para a idade (HAZ); e a subnutrição é definida com o índice de baixo peso para a idade (WAZ) (ACF, 2010; WHO, 2017).

A partir da avaliação desses dados nos grupos de estudo, foi possível determinar que as crianças não tiveram diferença na mensuração das médias antropométricas, e nem dos scores Z entre os dois grupos avaliados. Mas com a avaliação temporal entre cada grupo, de forma individual, o escore WHZ apresentou diferença estatística dentro dos dois grupos ( $P < 0,0001$ ). Esse achado pode ser atribuído a características da própria população estudada, onde a partir de um estudo coorte, que avaliou crianças desnutridas em comunidades também na cidade de Fortaleza – CE, foi possível relatar a prevalência média de crianças que apresentaram quadro de desnutrição aguda (WHZ), no qual 30% das crianças apresentaram desnutrição crônica e quase metade destas apresentaram acesso à nutrição multideficiente (PSAKI et al., 2012).

Apesar dos dados avaliados não terem apresentado associação entre o microrganismo e o déficit no crescimento das crianças nesse estudo, alguns trabalhos já apresentaram essa associação. Temos como exemplo um estudo caso-controle realizado também na cidade de Fortaleza – CE, onde as crianças do grupo caso eram identificados com a presença de diarreia.

A presença de *C. jejuni* / *C. coli* indicou associação com a diminuição dos scores WAZ e WHZ (QUETZ et al., 2010). Outro estudo na cidade de Fortaleza – CE, com crianças desnutridas (WAZ < - 2 DP), infecções ocasionadas por *C. jejuni* foram associadas com os casos de desnutrição (VERAS et al., 2018) Amour e colaboradores (2016) relataram que a segunda metade do primeiro ano de vida das crianças parece ser o período mais crítico para infecções por *Campylobacter* spp. e apresentarem associadas com déficits no crescimento. Este achado foi baseado nas evidências do estudo MAL-ED, que mostrou que infecções subclínicas provocadas por enteropatógenos foi mais fortemente associada a déficits de crescimento do que os casos com a presença de diarreia (ROGAWSKI et al., 2018).

Para avaliar a integridade da barreira intestinal e a presença de inflamação, biomarcadores foram empregados. Para a barreira intestinal, os testes relacionados a mensuração da lactulose, manitol e da razão L/M não mostraram diferença entre os grupos do estudo, caracterizando que essas crianças com infecção para *C. jejuni* aparentemente não tiveram perda da integridade da mucosa intestinal, identificada através da lactulose, e nem perda da área absorptiva, identificada pelo manitol. No entanto, as crianças com infecção para o patógeno apresentaram aumento na excreção da AAT (P = 0,0372). AAT é um marcador de ruptura mais severa da barreira intestinal, e embora seja um ensaio pouco sensível de ruptura estrutural da barreira intestinal, a proteína é altamente resistente a degradação enzimática. Assim, esta proteína é utilizada como biomarcador endógeno de perda proteica pelo tubo digestivo, sendo um biomarcador que já foi associado com destruição do epitélio intestinal em estudos anteriores (RAHAMAN et al., 1983; SOENDERGAARD et al., 2015; GUERRANT et al., 2016).

Nos resultados para MPO e NEO, que estão relacionados com a presença de inflamação, também não apresentaram diferença entre os grupos do estudo. A inflamação intestinal também pode interromper a função da barreira intestinal em um ciclo vicioso, e MPO e NEO são dois biomarcadores promissores para a detecção de inflamação intestinal. Além disso, o aumento de ambos nas amostras fecais já foi associado com diminuição do HAZ em crianças (GUERRANT et al., 2016; PRATA et al., 2016).

Relacionamos neste projeto a análise de genes da prevalência dos virulência relacionados com a motilidade, quimiotaxia, adesão, invasão, produção de toxinas, resposta ao estresse oxidativo e regulação na captação de ferro. Para esta avaliação foi utilizado a primeira amostra positiva das crianças para *C. jejuni*. Dentre os 20 genes de virulência pesquisados, o gene *cheW*, relacionado a quimiotaxia bacteriana, foi o mais prevalente (84,13%). Essa alta

prevalência também foi encontrada em estudo realizado por Koolman e colaboradores (2015), em diferentes isolados de *C. jejuni*, onde o gene teve prevalência de 95,83%. Estudo caso-controle do projeto MAL-ED realizado com crianças desnutridas, o gene também apresentou alta prevalência (87,9%) (VERAS et al., 2018). O gene faz parte do mecanismo de quimiotaxia da bactéria, sendo um fator importante, junto com a motilidade, para a sobrevivência bacteriana (Korolik, 2019).

Genes que já foram associados a infecções mais severas provocadas por *C. jejuni* tiveram baixa prevalência dentre os identificados nesse estudo. Um dos exemplos é o gene *pVir*, relacionado ao plasmídeo regulador do sistema de secreção do tipo IV (BACON et al., 2002), que não teve prevalência nesse estudo. A presença do gene já foi associada com casos de disenteria em pacientes com *C. jejuni* (TRACZ et al., 2005). Outro gene com baixa prevalência foi o *ciaB* (1,58%). Este gene regula a proteína CiaB, que é capaz de provocar a destruição dos microtúbulos, promovendo a invasão bacteriana e, permitindo assim a mobilidade do patógeno dentro da célula do hospedeiro (RIVERA-AMIL, et al. 2001). O gene teve prevalência bem superior em outros estudos com pacientes que apresentaram sintomatologia, como o de Redondo e colaboradores (2019) com amostras diarreicas, onde o gene teve prevalência de 80% nas amostras positivas para *C. jejuni*. Outro estudo realizado por Ghorbanalizadgan e colaboradores (2014), com crianças hospitalizadas que apresentaram diarreia aguda, o gene apresentou prevalência de 100% nas amostras de fezes positivas para o patógeno. Além disso, outro exemplo foi o trabalho realizado na cidade de Fortaleza – CE, com crianças com diarreia moderada a severa, onde o gene teve prevalência de 95% nas amostras (QUETZ et al.; 2012).

O gene *dnaJ*, responsável pela sobrevivência bacteriana ao choque térmico, teve apenas 4,76% de prevalência nesse estudo, sendo mais um exemplo de gene que teve alta prevalência em trabalhos realizados com paciente que tiveram a presença de diarreia (QUETZ et al., 2012; KOOLMAN et al., 2015; REDONDO et al., 2019). E outro gene já relacionado com o aumento da virulência do microrganismo, o *cdtB*, também teve baixa prevalência (20,63%). *cdtB* faz parte da proteína citoletal distensora, sendo a parte ativa da proteína, que penetra na célula, quebrando o DNA da célula do hospedeiro, fazendo com que ocorra a parada do ciclo celular, e por consequência, a morte da célula por apoptose. O gene obteve prevalência de 95% em cepas de *C. jejuni* de pacientes com diarreia moderada a severa. Mas uma baixa prevalência foi observada em amostras de crianças desnutridas (15,2%), onde sua ausência foi associada a infecção subclínica ocasionada por *C. jejuni*. (VERAS et al., 2018).

Assim, a mudança de perfil de prevalência entre os genes que mais acarretam sintomatologia causada por *C. jejuni* em humano, pode explicar o fato das crianças desse estudo não apresentarem sintomatologia clínica mesmo infectadas pelo patógeno.

A análise entre a associação dos genes de virulência com os escores *Z* de crescimento foi realizada com o intuito definir um padrão de genes que pudessem estar relacionado com a diminuição de algum dos escores *Z* nas crianças que tiveram amostra positiva para *C. jejuni*. De acordo com a análise multivariada realizada, não houve associação entre essas variáveis, apenas uma tendência entre o gene *dnaJ* e o escore *Z* HAZ ( $P = 0,086$ ). Essa avaliação foi realizada levando como base estudo caso-controle do projeto MAL-ED realizado na cidade de Fortaleza - CE, onde a associação entre a presença do gene *flgE*, relacionado com a motilidade, e a ausência do gene *cdtB*, relacionado a toxina citoletal distensora, foi associado com a diminuição do WAZ  $< -2$  (VERAS et al., 2018).

Essa análise foi possível utilizando como ferramenta estatística o programa *CART analysis*, que tem sua função baseada na formação de árvores de classificação e regressão para associar diferentes variáveis (ZHOU e MCARDLE, 2015). O emprego dessa análise não foi possível nesse estudo pois não foi possível a obtenção do programa para esse fim. Como alternativa, foi realizado a análise multivariada por regressão logística, mas o número amostral pequeno prejudicou a análise.

Como a plataforma de PCR em tempo real TAC diagnosticou 29 enteropatógenos, foi possível realizar a análise da associação de copatógenos com infecções por *C. jejuni*. Assim, 22 enteropatógenos tiveram pelo menos uma amostra associada com *C. jejuni*, onde EPEC foi o agente mais prevalente nessa associação (44,44%), seguida de EAEC (33%). Esse perfil foi compatível com a análise de coinfeção, utilizando também a plataforma TAC como diagnóstico, realizado no estudo caso-controle do MAL-ED no Brasil, onde EPEC foi o também o patógeno mais prevalente, com 58%. Em adição, EAEC foi mais uma vez o segundo patógeno mais prevalente, com 56% (VERAS et al., 2018). Estudo realizado por Santos e colaboradores (2019), *Campylobacter* spp. foi o quarto copatógeno mais prevalente, sendo associado aos casos de diarreia na população infantil do semiárido brasileiro. Já no estudo realizado por Lima e colaboradores (2017), *Campylobacter* spp. foi o copatógeno mais prevalente, e na análise com três ou mais patógenos associados até os seis meses de idade das crianças. Em nosso estudo a análise com a associação de dois ou mais patógenos foi realizada, mas não obtivemos influencia dentro da população estudada.

O diagnóstico para definir as amostras que foram positivas apenas para *C. jejuni* e *C. coli* foi realizado através de PCR convencional, pois a plataforma TAC realizou o diagnóstico concomitante das duas espécies (PLATTS-MILLS et al., 2018). Assim, foi possível encontrar a presença de *C. coli* em 11% das amostras positivas para *C. jejuni*. Coinfecção entre duas ou mais espécies de *Campylobacter* aparentemente não é comum, onde, na maioria das vezes, apenas uma espécie do microrganismo é diagnosticada (RICHARDSON et al., 2011). Estudo caso-controle realizado por Quetz e colaboradores (2010), foi encontrado a detecção da coinfecção entre *C. jejuni* e *C. coli* em 2,4% das amostras do estudo. Além disso, uma baixa prevalência dessa coinfecção (1,8%) foi encontrada em estudo realizado por Bhadra e colaboradores (1992), na Índia. A baixa prevalência da associação entre espécies de *Campylobacter* provavelmente ocorre pelo fato da pesquisa de outras espécies de *Campylobacter*, além de *C. jejuni* e *C. coli* não ser muito empregada, utilizando, principalmente, o diagnóstico por PCR como ferramenta (PLATTS-MILLS et al., 2014).

A partir dos resultados da coinfecção, foi possível realizar a análise entre a interação de copatógenos com *C. jejuni* e a influência dessa interação sobre os Z-escores e os biomarcadores de permeabilidade intestinal e inflamação. As análises foram realizadas utilizando os dois patógenos mais prevalentes, EPEC e EAEC, por conta do número amostral. Assim, em relação ao Z-escore, a coinfecção entre EPEC e *C. jejuni* foi associado com a diminuição do escore Z WHZ nas crianças ( $P = 0,0491$ ). Em adição, a coinfecção entre EAEC e *C. jejuni* mostrou influência em relação com a permeabilidade intestinal, apresentando a diminuição da excreção de manitol ( $P = 0,033$ ), aumento da razão L/M ( $P = 0,0024$ ), e aumento da excreção de AAT ( $0,0103$ ). Além disso, EAEC com *C. jejuni* também apresentaram aumento na inflamação através da NEO ( $P = 0,047$ ).

*Campylobacter* spp. e EPEC foram patógenos associados com o déficit no crescimento de crianças até os 24 meses de idade de todos os países que participaram do estudo MAL-ED, incluindo crianças que apresentaram sintomatologia (MAL-ED, 2017). Além disso, essa associação já foi relacionada aos casos de diarreia em estudo caso-controle, tanto na análise univariada, como na multivariada (SANTOS et al., 2019).

*Campylobacter* spp. foi o copatógeno mais prevalente em amostras positivas para EAEC nas crianças participantes do estudo MAL-ED até os seis meses de idade. Essa interação teve associação com aumento da inflamação intestinal, através da análise de MPO nas amostras fecais. Além disso, EAEC, nessa mesma população, apresentou alteração na razão L/M, aumento no nível de excreção de AAT, além do aumento do nível de NEO nas amostras fecais

(LIMA et al., 2017). Essa interação entre *C. jejuni* com copatógenos, e a presença de déficit no crescimento, inflamação e alteração na permeabilidade intestinal, sugerem que essas crianças possam ter a disfunção entérico ambiental (DEA).

A DEA, que está vinculada ao impacto de infecções entéricas frequentes e numerosas no intestino, resultando em um estado de ativação imune persistente e permeabilidade alterada, foi proposto como uma chave determinante no déficit do crescimento em crianças de populações de baixa e média renda (KOSEK et al., 2017; MAL-ED, 2017). Múltiplos mecanismos fisiológicos, pelos quais os enteropatógenos podem interromper o funcionamento do intestino, já foram identificados, embora a consequência a longo prazo em ambientes onde a exposição a enteropatógenos é intensa e contínua, são mal compreendidos (GUERRANT et al., 1999; BERKES et al.; 2003; BROW et al.; 2015; PLATTS-MILLS et al., 2015). Populações de baixa e média renda também estão sujeitos a outras causadas de falha de crescimento, incluindo ingestão alimentar inadequada e frequente exposição às doenças, que podem influenciar os biomarcadores da DEA, além dos relacionados ao crescimento dessas crianças (KOSEK et al., 2017)

Biomarcadores não invasivos, que caracterizam os aspectos fisiológicos e a integridade do intestino estão sendo utilizados para a caracterização da DEA. O teste de lactulose e manitol é um dos mais utilizados para identificar danos na barreira intestinal, dano esse observado na coinfeção entre *C. jejuni* e EAEC. A alteração na diminuição da excreção de manitol, além de aumento na razão L/M, caracterizou a ocorrência do dano na barreira intestinal, onde esse dano resultou na perda de áreas de absorção, caracterizado pela baixa excreção de manitol (DENNO et al., 2014). Além disso, foi caracterizado dano também através do aumento nos níveis de AAT. Esse achado também foi encontrado na análise dos biomarcadores apenas com *C. jejuni*, onde a coinfeção entre EAEC e *C. jejuni* também pode ter influenciado nesse resultado inicial. Além disso, o aumento do perfil inflamatório, associado com o aumento da resposta imune celular, com a intensa ativação de células T ou macrófagos (HOFFMANN et al., 2003), foi caracterizado pelo aumento da NEO nesse grupo com coinfeção.

Os resultados de coinfeção mostraram que as crianças do estudo que apresentaram infecção subclínica podem apresentar DEA, caracterizada através da infecção por múltiplos enteropatógenos, diminuição de um dos escores Z de crescimento, além da alteração na barreira intestinal e presença de inflamação. Essa caracterização pode estar relacionada apenas com a presença de EPEC ou EAEC, sem a influência de *C. jejuni*, mas estudos apenas com esses

patógenos, nessa mesma população, devem ser realizados para que assim essa hipótese possa ser comprovada.

O estudo teve algumas limitações, uma delas foi o baixo número amostral em algumas variáveis, que impossibilitou a análise de uma regressão multivariada mais robusta; além disso, a pesquisa de outros biomarcadores, como de translocação bacteriana, inflamação sistêmica, além de biomarcadores metabólicos, por exemplo, poderiam ajudar em uma melhor caracterização da DEA, além da identificação de uma ligação mais forte entre as interações dos enteropatógenos com o déficit no crescimento dessas crianças.

## 7 PERSPECTIVAS

A partir dos resultados gerados por esse estudo na análise das amostras do coorte MAL-ED no Brasil, será realizado o mesmo desenho experimental nas amostras positivas para *C. jejuni/C. coli* dos 8 países participantes do MAL-ED. Dessa forma, as variáveis terão um número amostral maior, e assim será possível comprovar os dados gerados nesse estudo através de análises multivariadas em todos os países participantes.

## 8 CONCLUSÃO

*C. jejuni* teve alta prevalência em infecções subclínicas nas crianças com até 24 meses de idade que são residentes em comunidades da periferia da cidade de Fortaleza – CE.

Dentre os fatores de riscos determinantes para infecções, a falta de uma amamentação exclusiva, até os 6 meses de idade das crianças, foi o que se mostrou mais fortemente associado a infecções causadas por *C. jejuni*.

A infecção subclínica causada por *C. jejuni* não influenciou no déficit de crescimento na população do estudo.

Não houve a presença de inflamação intestinal causada pelo microrganismo, mas foi observado dano na barreira intestinal através da avaliação do biomarcador AAT.

Os genes de virulência que estão mais associados a severidade de infecções por *C. jejuni* foram encontrados em uma baixa prevalência nesse estudo, podendo assim caracterizar a presença da infecção subclínica. Além disso, nenhum gene foi relacionado com a diminuição de algum score de crescimento.

A presença de copatógenos se mostrou crucial para a alteração de variáveis relacionadas ao déficit de crescimento no estudo, alteração na barreira intestinal, além de inflamação. Essa análise aponta que danos mais severos, que possam caracterizar a presença de DEA, só acontece se *C. jejuni* estiver associado a outro enteropatógeno nessa população estudada. Além disso, esse estudo reforça a importância da infecção por EAEC e EPEC em infecções subclínicas em crianças.

## REFERENCIAS

- ACF INTERNATIONAL. **Taking Action Nutrition for Survival, Growth & Development.** White Paper, p. 1–52, 2010.
- ALLOS, B. M.; et al. *Campylobacter* species. **Antimicrobe**, 2010. [www.antimicrobe.org/new/b91.asp](http://www.antimicrobe.org/new/b91.asp). Acessado em 22 de abril de 2020.
- ATAK, J. M.; KELLY, D. J. Oxidative stress in *Campylobacter jejuni*: responses, resistance and regulation. **Future Microbiol.**, v. 4, n. 6, p. 677-90, 2009.
- BACON, D. J.; et al. DNA sequence and mutational analysis of the pVir plasmid of *Campylobacter jejuni* 81-176. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 6242– 6250, 2002.
- BAFFONI, L., et al. Evidence of *Campylobacter jejuni* reduction in broilers with early synbiotic administration. **International Journal of Food Microbiology**, v. 251, p. 41–47, 2017.
- BANG, D. D.; et al. PCR detection of seven virulence and toxin genes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from Danish pigs and cattle and cytolethal distending toxin production of the isolates. **J Appl Microbiol.**, v. 94, p. 1003–1014, 2003.
- BELTINGER, J.; et al. Disruption of colonic barrier function and induction of mediator release by strains of *Campylobacter jejuni* that invade epithelial cells. **World J Gastroenterol.**, v. 14, p. 7345–7352, 2008.
- BERTHENET, E.; et al. Source attribution of *Campylobacter jejuni* shows variable importance of chicken and ruminants reservoirs in non-invasive and invasive French clinical isolates. **Scientific Reports**, v. 9, n. 8098, 2019.
- BESSEDE, E.; et al. Evaluation of the diagnostic accuracy of two immunochromatographic tests detecting *Campylobacter* in stools and their role in *Campylobacter* infection diagnosis. **J Clin Microbiol.**, v. 56, n. 4, 2018.
- BESSÈDE, E.; et al. New methods for detection of campylobacters in stool samples in comparison to culture. **J. Clin. Microbiol.**, v. 49, n. 3, p. 941-944, 2011.
- BLASER, M. J. Epidemiologic and clinical features of *Campylobacter jejuni* infections. **J Infect Dis**, n.176 (Suppl 2), p. 103–5, 1997.
- BOEHM, M.; et al. Rapid paracellular transmigration of *Campylobacter jejuni* across polarized epithelial cells without affecting TER: role of proteolytic-active HtrA cleaving E-cadherin but not fibronectin. **Gut Pathog.**, v. 4, n. 3, 2012.
- BOLINGER, H.; KATHARIOU S. The Current State of Macrolide Resistance in *Campylobacter* spp.: Trends and Impacts of Resistance Mechanisms. **Appl Environ Microbiol.**, v. 83, n.12, 2017.
- BOLTON, D.J. *Campylobacter* virulence and survival factors. **Food Microbiol.**, v. 48, p. 99–108, 2015.
- BRÁS, A. M.; et al. A novel *Campylobacter jejuni* two-component regulatory system important for temperature-dependent growth and colonization. **J Bacteriol.**, v. 181, v. 10, 3298-302, 1999.

- BROWN, J.; et al. Local drinking water filters reduce diarrheal disease in Cambodia: a randomized, controlled trial of the ceramic water purifier. **AmJ Trop Med Hyg**, n. 79, p. 394–400, 2008.
- BULLMAN, S.; et al. Molecular- based detection of non-culturable and emerging campylobacteria in patients presenting with gastroenteritis. **Epidemiol. Infect.**, v. 140, p. 684–688., 2012.
- BURNHAM, P. M.; HENDRIXSON, D.R. *Campylobacter jejuni*: collective components promoting a successful enteric lifestyle. **Nat Rev Microbiol.**, v. 16, n. 9, p. 551-565, 2018.
- BUSS, J.E.; et al. *Campylobacter* culture fails to correctly detect *Campylobacter* in 30% of positive patient stool specimens compared to non-cultural methods. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v. 38, n. 6, p. 1087-1093, 2019.
- CAMPBELL, D.; et al. Growth faltering in rural Gambian infants is associated with impaired small intestinal barrier function, leading to endotoxemia and systemic inflammation. **The Journal of nutrition**, v. 133, n. 5, p. 1332–1338, 2003.
- CAPLAN, M. J.; SEO-MAYER, P.; ZHANG, L. Epithelial junctions and polarity: complexes and kinases. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.**, v. 17, n. 5, p. 506-512, 2008.
- CARVALHO, A. C. T.; et al. Molecular characterization of invasive and noninvasive *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates. **J Clin Microbiol.**, v. 39, p. 1353–1359, 2001.
- Center for Disease Control and Prevention. 2019. **Food safety**. <https://www.cdc.gov/campylobacter/faq.html>. [acessado em 12 de março de 2020 ].
- CHOI, W.; et al. Contributions of intestinal epithelial barriers to health and disease. **Exp Cell Res.**, v. 358, n. 1, p. 71-77, 2017.
- CLASEN, T.F.; et al. Reducing diarrhea through the use of household-based ceramic water filters: a randomized, controlled trial in rural Bolivia. **Am J Trop Med Hyg**, v. 70, p. 651–657, 2004.
- COSTA, D.; IRAOLA, G. Pathogenomics of emerging *Campylobacter* species. **Clin Microbiol Rev**, v. 32, p. 72-118, 2019.
- DAMBORG P.; et al. Occurrence of *Campylobacter jejuni* in pets living with human patients infected with *C. jejuni*. **J Clin Microbiol**, v. 42, p.1363-4, 2004.
- DAVIS, K. R.; et al. *Campylobacter jejuni* Infections Associated with Raw Milk Consumption - Utah, 2014. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep.**, v. 65, n. 12, 2016.
- DAVIS, L.; DIRITA, V. Growth and laboratory maintenance of *Campylobacter jejuni*. **Current Protoc. Microbiol.**, v. 10, n. 1, 1–7, 2017.
- DAY, C.J.; et al: Variation of chemosensory receptor content of *Campylobacter jejuni* strains and modulation of receptor gene expression under different in vivo and in vitro growth conditions. **BMC Microbiol.**, v. 12; n. 128, 2012.
- DE ZOETE M.R.; et al. Reconstitution of a functional Toll-like receptor 5 binding site in *Campylobacter jejuni* flagellin. **J Biol Chem.**, v. 285, n. 16, p. 12149 – 12158, 2010.
- DE ZOETE, M.R.; VAN PUTTEN, J.P.; WAGENAAR, J.A. Vaccination of chickens against *Campylobacter*. **Vaccine**, v. 25, n. 30, p. 5548–5557, 2007.

- DEARLOVE, B. L. Rapid host switching in generalist *Campylobacter* strains erodes the signal for tracing human infections. **ISME J.**, v. 10, p. 721–729, 2016
- DENNO, D.M.; et al. Use of the lactulose to mannitol ratio to evaluate childhood environmental enteric dysfunction: a systematic review. **Clin Infect Dis.**, v. 59, p. 213-219, 2014.
- DIRIBA K.; et al. Prevalence and associated factor of *Campylobacter* species among less than 5-year-old children in Ethiopia: a systematic review and meta-analysis. **Eur J Med Res.**, v. 26, n. 2, 2021.
- EFSA - European Food Safety Authority. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. **EFSA J.**, v. 13, 2015.
- EFSA - The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. **EFSA J.**, v. 15, p. 1–228, 2017.
- EPPS, S.; et al. Foodborne *Campylobacter*: Infections. Metabolism, Pathogenesis and Reservoirs. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 10, p. 6292–6304, 2013.
- EVERS, E. G.; Transmission of ESBL-Producing *Escherichia coli* and *Campylobacter* from Poultry Farms to Humans Through Flies. **Risk Anal.**, v. 36, n. 2, p. 215-27, 2016.
- FACCIOLÀ, A., et al. *Campylobacter*: from microbiology to prevention. **J Prev Med Hyg.**, v. 58, n. 2, p. 79-92, 2017.
- FARRE, R.; VICARIO, M. Abnormal Barrier Function in Gastrointestinal Disorders. **Handb. Exp. Pharmacol.**, v. 239, p. 193–217, 2017.
- FERNÁNDEZ, H. Família Campylobacteraceae. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia.**, ed. 5, p. 357-362. São Paulo: Atheneu, 2008.
- FERRERO, R. L.; LEE, A. Motility of *Campylobacter jejuni* in a viscous environment: comparison with conventional rod-shaped bacteria. **J. Gen. Microbiol.**, v. 134, p. 53–59, 1988.
- FITZGERALD, C. *Campylobacter*. **Clin Lab Med.**, v. 35, p. 289–298, 2015.
- FITZGERALD, C.; et al. *Campylobacter* diagnostics study working group. Multicenter evaluation of clinical diagnostic methods for detection and isolation of *Campylobacter* spp. from stool. **J Clin Microbiol.**, v. 54, e.5, p. 1209-1215, 2016.
- FLEMING, S. C.; et al. Rapid and simultaneous determination of lactulose and manitol in urine, by HPLC with pulsed amperometry detection for use in studies of intestinal permeability. **Clin. Chem.**, v. 36, p. 797-799, 1990.
- FRANÇOIS, R.; et al. The other *Campylobacters*: Not innocent bystanders in endemic diarrhea and dysentery in children in low-income settings. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 12, n. 2, 2018.
- FRIIS, L.M.; KEELAN, M.; TAYLOR, D.E. *Campylobacter jejuni* drives MyD88-independent interleukin-6 secretion via Toll-like receptor 2. **Infect. Immun.**, v. 77, n. 4, p. 1553-1560, 2009.
- GEE; B.; et al. Public Health Laboratory Service (Midlands) Bacterial Methods Evaluation Group. Effect of incubation temperature on the isolation of thermophilic species of *Campylobacter* from faeces. **Commun Dis Public Health/PHLS**, v. 5, n. 4, p. 282-4, 2002.
- GEORGE, C.; et al. Enteric infections in young children are associated with environmental enteropathy and impaired growth. **Trop Med Int Heal.**, v. 12, n. 10, p. 3218–3221, 2017.

- GHORBANALIZADGAN, M.; et al. A molecular survey of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* virulence and diversity. **Iran Biomed J.**, v. 18, n. 3, p. 158-64, 2014.
- GRZYBOWSKA-CHLEBOWCZYK, U.; et al. Clinical course of *Campylobacter* infections in children. **Pediatrics Polska**, v. 88, p. 329-334, 2013.
- GUERRANT, R.L.; et al. Campylobacteriosis in man: pathogenic mechanisms and review of 91 bloodstream infections. **Am J Med**, v. 65, p. 584–592, 1978.
- GUERRANT, R. L.; et al. Production of a Unique Cytotoxin by *Campylobacter jejuni*. **Infection and Immunity**, v. 55, n. 10, p. 2526-2530, 1987.
- GUERRANT, R.L.; et al. The impoverished gut - a triple burden of diarrhoea, stunting and chronic disease. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 10, n. 4, p. 220–9, 2013.
- GUERRY, P. *Campylobacter* flagella: not just for motility. **Trends Microbiol.**, v. 15, p. 456-461, 2007.
- GWENYTH, O. L; et al. Infant nutritional status, feeding practices, enteropathogen exposure, socioeconomic status, and illness are associated with gut barrier function as assessed by the lactulose mannitol test in the mal-ed birth cohort. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 97, n. 1, p. 281-290, 2017.
- HAMEED, A. Human Immunity Against *Campylobacter* Infection. **Immune Netw.**, v. 19, n. 6, e 38, 2019.
- HANSSON, I.; et al. Knowledge gaps in control of *Campylobacter* for prevention of campylobacteriosis. **Transbound. Emerg. Dis.**, v. 65, p. 30–48, 2018.
- HAQUE, M.A.; et al. Determinants of *Campylobacter* infection and association with growth and enteric inflammation in children under 2 years of age in low-resource settings. **Sci Rep.**, v. 9, n. 1, 2019.
- HARTLEY-TASSELL, L.E.; et al. Identification and characterization of the aspartate chemosensory receptor of *Campylobacter jejuni*. **Mol Microbiol**, v. 75, p. 710-730, 2010.
- HAVELAAR, A.H.; et al. Immunity to *Campylobacter*: its role in risk assessment and epidemiology. **Crit Rev Microbiol.**, v. 35, p. 1–22, 2009.
- HENDRIXSON, D. R.; DIRITA, V. J. Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in commensal colonization of the chick gastrointestinal tract. **Mol. Microbiol.**, v. 52, p. 471–484, 2004.
- HENDRIXSON, D.R. A phase-variable mechanism controlling the *Campylobacter jejuni* FlgR response regulator influences commensalism. **Mol. Microbiol.**, v. 61, p. 1646–1659, 2006.
- HERMANS, D.; et al. Poultry as a host for the zoonotic pathogen *Campylobacter jejuni*. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, v.12, n. 2; p. 89–98, 2012.
- HOFFMANN, G.; et al. Potential role of immune system activation-associated production of neopterin derivatives in humans. **Inflamm Res.**, v. 52, p. 313 - 321, 2003.
- HOFREUTER, D. Defining the metabolic requirements for the growth and colonization capacity of *Campylobacter jejuni*. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, v. 4, n. 137, 2014.
- HOLMES, K.; et al. *Campylobacter jejuni* gene expression in response to iron limitation and the role of Fur. **Microbiology**, v. 151, p. 243-57, 2005.

- IGWARAN A.; OKOH A. I. Human campylobacteriosis: A public health concern of global importance. **Heliyon**, v. 5, e. 02814, 2019.
- IWAMOTO, M.; et al. Bacterial enteric infections detected by culture-independent diagnostic tests. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep.**, v. 64, e. 9, p. 252-257, 2015.
- JAGANNATHAN, A.; et al. Motility in *Campylobacter*. **Molecular and Cellular Biology**. Horizon Bioscience, Norfolk, p. 331–347, 2005.
- JIN, S.; et al. JlpA of *Campylobacter jejuni* interacts with surface-exposed heat shock protein 90 alpha and triggers signalling pathways leading to the activation of NF-kappa B and p38 MAP kinase in epithelial cells. **Cell Microbiol.**, v. 5, p. 165–174, 2003.
- JIN, S.; et al. JlpA, a novel surface-exposed lipoprotein specific to *Campylobacter jejuni*, mediates adherence to host epithelial cells. **Mol. Microbiol.**, v. 39, p. 1225–1236, 2001.
- JINADASA, R.N.; et al. Cytolethal distending toxin: a conserved bacterial genotoxin that blocks cell cycle, leading to apoptosis of a broad range of mammalian cell lineages. **Microbiology**, v. 157, p. 1851-1875, 2011.
- KAAKOUSH, N. O.; et al. Global Epidemiology of *Campylobacter* Infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 687-720, 2015.
- KALISCHUK, L.D.; LEGGETT, F.; INGLIS, G.D. *Campylobacter jejuni* induces transcytosis of commensal bacteria across the intestinal epithelium through M-like cells. **Gut Pathog.**; v. 2, n. 14, 2010.
- KARCZEWSKI, J.; et al. Regulation of human epithelial tight junction proteins by *Lactobacillus plantarum* in vivo and protective effects on the epithelial barrier. **AJP-Gastrointest Liver Physiol** , v.298 , p.851-59 , 2010.
- KEUSCH, G.T.; et al. Implications of acquired environmental enteric dysfunction for growth and stunting in infants and children living in low- and middle-income countries. **Food Nutr Bull.**, v. 34, p. 357- 364.18, 2013.
- KLANČNIK, A.; et al. Adhesion of *Campylobacter jejuni* Is Increased in Association with Foodborne Bacteria. **Microorganisms**, v. 8, n. 2, 2020.
- KONKEL, M. E.; et al. Bacterial secreted proteins are required for the internalization of *Campylobacter jejuni* into cultured mammalian cells. **Mol. Microbiol.**, v. 32, p. 691-701, 1999.
- KONKEL, M. E.; et al. Characterization of thermal stress response of *Campylobacter jejuni*. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 362–366, 1998.
- KONKEL, M. E.; et al. Identification and molecular cloning of a gene encoding a fibronectin-binding protein (CadF) from *Campylobacter jejuni*. **Mol Microbiol.**, v. 24, p. 953– 963, 1997
- KONKEL, M. E.; et al. Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is dependent on a functional flagellar export apparatus. **J Bacteriol.**, v. 186, p. 3296–3303, 2004.
- KONKEL, M.E. The pathogenesis of *Campylobacter jejuni*-mediated enteritis. **Curr Issues Intest Microbiol.**, v. 2, p. 55–71, 2001.
- KOOLMAN, L.; et al. Distribution of virulence-associated genes in a selection of *Campylobacter* isolates. **Foodborne Pathog Dis.**, v. 12, n. 5, p. 424-32, 2015.

- KOROLIK, V. The role of chemotaxis during *Campylobacter jejuni* colonization and pathogenesis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 47, p. 32–37, 2019.
- KOROLIK, V.; KETLEY, J.M: Chemosensory signal transduction pathway of *Campylobacter jejuni*. **In *Campylobacter***, e. 3 .ASM Press; p. 351-366, 2008.
- KOSEK, M, et al Assessment of environmental enteropathy in the MAL-ED cohort study: theoretical and analytic framework. **Clin Infect Dis.**, v. 59, p. 239-247, 2014.
- KOSEK, M.; et al. Fecal markers of intestinal inflammation and permeability associated with the subsequent acquisition of linear growth deficits in infants. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 88, n. 2, p. 390-396, 2013.
- KOSEK, M.; et al; Causal pathways from enteropathogens to environmental enteropathy: Findings from the MAL-ED birth cohort study. **EBioMedicine**, v. 18, p. 109-117, 2017.
- KOTLOFF, K.L.; et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. **Lancet**, v.382, n. 9888, p. 209-222, 2013.
- KRUTKIEWICZ, A.; KLIMUSZKO, D. Genotyping and PCR detection of potential virulence genes in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from different sources in Poland. **Folia Microbiol (Praha)**, v. 55, n. 2, p. 167-75, 2010.
- KUHN, K. G.; et al. Sexual Contact as Risk Factor for *Campylobacter* Infection, Denmark. **Emerg Infect Dis.**, v. 27, n. 4, p. 1133-1140, 2021.
- KUWABARA, S.; YUKI, N. Axonal Guillain-Barre syndrome: concepts and controversies. **Lancet Neurol.**, v. 12, n. 12, p. 1180–1188, 2013.
- LAI, C. K.; et al. Molecular mechanisms and potential clinical applications of *Campylobacter jejuni* Cytotolethal Distending Toxin. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, p. 1-9. 2016.
- LAMB-ROSTESKI, J. M.; et al. Epidermal growth factor inhibits *Campylobacter jejuni* induced claudin-4 disruption, loss of epithelial barrier function, and *Escherichia coli* translocation. **Infect Immun.**, v. 76, p. 3390–3398, 2008.
- LARA-TEJERO, M.; GALAN, J. E. A bacterial toxin that controls cell cycle progression as a deoxyribonuclease I-like protein. **Science**, v. 290, p. 354–357, 2000.
- LARA-TEJERO, M.; GALAN, J. E. CdtA, CdtB, and CdtC form a tripartite complex that is required for cytolethal distending toxin activity. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 4358–4365, 2001.
- LASTOVICA, A. Emerging *Campylobacter* spp.: the tip of the iceberg. **Clin. Microbiol. Newsletter.**, v. 28, p. 49–56, 2006.
- LEE, G.; et al. Symptomatic and asymptomatic *Campylobacter* infections associated with reduced growth in Peruvian children. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 7, n.1, 2013.
- LEE, S.H.; BUTLER, S.M.; CAMILLI, A. Selection for *in vivo* regulators of bacterial virulence. **Proc Natl Acad Sci**, v. 98, p. 6889- 6894, 2001.
- LERTSETHTAKARN, P., OTTEMANN, K.M., HENDRIXSON, D.R. Motility and chemotaxis in *Campylobacter* and *Helicobacter*. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 65, p. 389–410, 2011.

- LIMA A.A.M.; et al. Geography, population, demography, socioeconomic, anthropometry, and environmental status in the MAL-ED cohort and case-control study Sites in Fortaleza, Ceará, Brazil. **Clin Infect Dis.**, v. 59, Suppl 4, p. 287-294, 2014.
- LIMA, A.A.M.; et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* Subclinical Infection and Coinfections and Impaired Child Growth in the MAL-ED Cohort Study. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.**, v. 66, n. 2, p. 325-333, 2018.
- LINNANKOSKI, J.; et al. Paracellular porosity and pore size of the human intestinal epithelium in tissue and cell culture models. **J Pharm Sci**, v. 99, p. 4215–4227, 2010.
- LIU, J.; et al. A laboratory-developed TaqMan Array Card for simultaneous detection of 19 enteropathogens. **Journal of clinical microbiology**, v. 51, n. 2, p. 472– 80. 2013.
- LIU, J.; et al. Optimization of Quantitative PCR Methods for Enteropathogen Detection. **PLoS One**, v. 11, n. 6, e. 0158199, 2016.
- LIU, J.; et al. Use of quantitative molecular diagnostic methods to identify causes of diarrhoea in children: a reanalysis of the GEMS case-control study. **Lancet**, v. 388, p. 1291-301, 2016.
- LOUIS-AUGUSTE J; KELLY P. Tropical enteropathies. **Curr Gastroenterol Rep.** v. 19, p. 29-37, 2017.
- LUBY, S.P.; et al. Effects of water quality, sanitation, handwashing, and nutritional interventions on diarrhoea and child growth in rural Bangladesh: a cluster randomised controlled trial. **Lancet Glob Health**, v. 6, p. 302–e315, 2018.
- LUETHY, P. M.; et al. Microbiota- derived short- chain fatty acids modulate expression of *Campylobacter jejuni* determinants required for commensalism and virulence. **mBio**, v. 8, e 00407–00417, 2017.
- MAHFUZ, M.; et al. Bangladesh Environmental Enteric Dysfunction (BEED) study: protocol for a community-based intervention study to validate non-invasive biomarkers of environmental enteric dysfunction. **BMJ Open.**, v. 7, e 017768, 2017.
- MAL-ED Network Investigators. Relationship between growth and illness, enteropathogens and dietary intakes in the first 2 years of life: findings from the MAL-ED birth cohort study. **BMJ Glob Health**, v. 2, e. 000370, 2017.
- MAL-ED Network Investigators. The MAL-ED study: a multinational and multidisciplinary approach to understand the relationship between enteric pathogens, malnutrition, gut physiology, physical growth, cognitive development, and immune responses in infants and children up to 2 years of age in resource-poor environments. **Clin Infect Dis.**, v. 59 (suppl 4): p. 193–206, 2014.
- MAN, S. M. The clinical importance of emerging *Campylobacter* species. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 8, p. 669–685. 2011.
- MARCHANT, J.; WREN, B.; KETLEY, J. Exploiting genome sequence: predictions for mechanisms of *Campylobacter* chemotaxis. **Trends in Microbiol.**, v. 10, p. 155-159, 2002.
- MARDER, E. P.; et al. Incidence and trends of infections with pathogens transmitted commonly through food and the effect of increasing use of culture- independent diagnostic tests on surveillance - foodborne diseases active surveillance network, 10 U. S. Sites, 2013–2016. **MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.**, n. 66, p. 397–403, 2017.

- MARON, D.F.; SMITH, T.J.; NACHMAN, K.E. Restrictions on antimicrobial use in food animal production: an international regulatory and economic survey. **Glob. Health**, n. 9, v. 1, n. 48, 2013.
- MARSHALL, J.K. Post-infectious irritable bowel syndrome following water contamination. **Kidney Int., Suppl.**, n. 112, p. 42–3, 2009.
- MASANTA, W.O.; et al. Modification of intestinal microbiota and its consequences for innate immune response in the pathogenesis of campylobacteriosis. **Clin Dev Immunol**; v. 2013, p. 1-10, 2013.
- MAUE, A. C.; POLY, F.; GUERRY, P. A capsule conjugate vaccine approach to prevent diarrheal disease caused by *Campylobacter jejuni*. **Hum Vaccin Immunother.**, v. 10, 2014.
- MBUYA, M.N.; HUMPHREY, J.H. Preventing environmental enteric dysfunction through improved water, sanitation and hygiene: an opportunity for stunting reduction in developing countries. **Matern Child Nutr.**, v.12 (suppl 1), p. 106–20, 2015.
- MONTEIRO, M. A.; et al. Capsule polysaccharide conjugate vaccine against diarrheal disease caused by *Campylobacter jejuni*. **Infect Immun.**, v. 77, p. 1128–1136, 2009.
- MOORE, J. E. et al. *Campylobacter*. **Vet. Res.** 36, 351–382, 2005.
- MUGHINI-GRAS, L.; et al. Sources and transmission routes of campylobacteriosis: A combined analysis of genome and exposure data. **J Infect.**, v. 82, n. 2, p. 216-226, 2021.
- MURRAY, C. J.; et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study. **Lancet**, p. 2197–2223, 2010.
- NEWELL, D.G., et al. *Campylobacter* epidemiology-sources and routes of transmission for human infection. **Camp. Featu. Detect. Prevent. Foodbor. Dis.** 85–110, 2017.
- NEWMAN, A.; LAMBERT, J.R. *Campylobacter jejuni* causing flare-up in inflammatory bowel disease. **Lancet**, v. 2, n. 919, 1980.
- NOVIK, V.; HOFREUTER, D.; GALAN, J. E. Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in its interaction with epithelial cells. **Infect Immun.**, v. 78, p. 3540–3553, 2010.
- NULL, C. et al.; Effects of water quality, sanitation, handwashing, and nutritional interventions on diarrhoea and child growth in rural Kenya: a cluster-randomised controlled trial. **Lancet Glob Health**, v. 6, p. 316–e329, 2018.
- O’HARA, J. R.; BURET, A. G. Mechanisms of intestinal tight junctional disruption during infection. **Front Biosci.**, v. 13, p. 7008–7021, 2008.
- OH, E.; MCMULLEN, L.; JEON, B. Impact of oxidative stress defense on bacterial survival and morphological change in *Campylobacter jejuni* under aerobic conditions. **Front Microbiol.**, v. 6, n. 29, 2015.
- ON, S. L. W. Isolation, identification and subtyping of *Campylobacter*: Where to from here? **J. Microbiol. Meth.**, v. 95, n. 1, p. 3-7, 2013.
- OWINO, V.; et al. Environmental enteric dysfunction and growth failure / stunting in global child health. **Pediatrics.**, v. 138, e20160641, 2016.

- PAL, M. *Campylobacter jejuni*: an emerging foodborne pathogen of global significance. **J. Exp. Food Chem.**, n. 3; v. 3, p. 1–4, 2017.
- PICKERING, A.J.; et al. The WASH Benefits and SHINE trials: interpretation of WASH intervention effects on linear growth and diarrhoea. **Lancet Glob Health**, v. 7, p. 1139–1146, 2019.
- PICKETT, C. L.; et al. Cloning, sequencing, and expression of the *Escherichia coli* cytolethal distending toxin genes. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 1046–1051, 1994.
- PICKETT, C. L.; WHITEHOUSE, C. A. The cytolethal distending toxin family. **Trends Microbiol.**, v. 7, p. 292-297, 1999.
- PLATTS-MILLS, J. A. et al. Association between enteropathogens and malnutrition in children aged 6–23 mo in Bangladesh: a case-control study. *The American journal of clinical nutrition* 105, 1132–1138 (2017).
- PLATTS-MILLS, J.; et al. Use of quantitative molecular diagnostic methods to assess the aetiology, burden, and clinical characteristics of diarrhea in children in low-resource settings: a reanalysis of the MAL-ED cohort study. **Lancet Glob Health.**, v. 6, n. 12, p. 1309-1318, 2018.
- PLATTS-MILLS, J.A.; et al. *Campylobacter* detection and significance in stool by culture, enzyme immunoassay, or PCR in developing country settings. **J. Clin. Microbiol.**, v. 52, n. 4, 2014.
- PLATTS-MILLS, J.A.; et al. Pathogen-specific burdens of community diarrhea in developing countries: a multisite birth cohort study (MAL-ED). **Lancet Glob Health**, v. 3, n. 9, p. 564-575, 2015.
- POLY, F.; et al. Update on *Campylobacter* vaccine development. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 15, n. 6, 1389–1400, 2019.
- POPE, J.E.; et al. *Campylobacter* reactive arthritis: a system at review. **Semin Arthritis Rheum**, n. 37, v. 1, p. 48–55, 2007.
- POST, D. E. **Food-borne pathogens**. Basingstoke: Unipath, 33 p. (Monograph, n. 3: *Campylobacter*), 1995.
- PRATA, M.M.G.; et al. Comparisons between myeloperoxidase, lactoferrin, calprotectin and lipocalin-2, as fecal biomarkers of intestinal inflammation in malnourished children. **J Transl Sci.**, v. 2, n. 2, p. 134 - 139, 2016.
- PRENDERGAST, A.J.; et al. Assessment of environmental enteric dysfunction in the SHINE trial: methods and challenges. **Clin Infect Dis.**, v. 61, p. 726 - 732, 2015.
- PRENDERGAST, A.J.; et al. Putting the “A” into WASH: a call for integrated management of water, animals, sanitation, and hygiene. **Lancet Planet Health**, v. 3, e 336–337, 2019.
- PSAKI, S. et al. Household food access and child malnutrition: results from the eight-country MAL-ED study. **Population Health Metrics**, v. 10, n. 1, p. 24, 2012.
- PSAKI, S.R.; et al. Measuring socioeconomic status in multicountry studies: results from the eight-country MAL-ED study. **Popul Health Metr.**, v. 12, n. 8, 2014.
- PUMTANG-ON, P.; et al. A Systematic Review of *Campylobacter jejuni* Vaccine Candidates for Chickens. **Microorganisms**, v. 9, n. 2, e. 397, 2021.

PURCHAS, D.B. **Sutherland, Handbook of filter media**, e. 2, Elsevier Sci. Inc., Oxford, UK, 572p, 2002.

QUETZ, J. S.; et al. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in children from communities in Northeastern Brazil: molecular detection and relation to nutritional status. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v. 67, p. 220-227, 2010.

QUETZ, J. S.; et al. *Campylobacter jejuni* infection and virulence-associated genes in children with moderate to severe diarrhoea admitted to emergency rooms in northeastern Brazil. **J Med Microbiol.**, v. 61, n. 4, p. 507-13, 2012.

RAHAMAN, M.M. Direct Nutrient Loss and Diarrhea. In: Scrimshaw LCaN, editor. *Diarrhea and Malnutrition: Interactions, Mechanisms, and Interventions*. Edited by Chen LC and Scrimshaw NS: **Plenum Press**; p. 155 – 160, 1983.

RAO, M. R.; et al. Pathogenicity and convalescent excretion of *Campylobacter* in rural Egyptian children. **Am J Epidemiol.**, v. 154, p. 166–173, 2001.

REDONDO, N.; et al. Molecular characterization of *Campylobacter* causing human clinical infection using whole-genome sequencing: Virulence, antimicrobial resistance and phylogeny in Ireland. **PLoS One**, v. 14, n.7, e 0219088, 2019.

RICHARD, S.; et al. Disease surveillance methods used in the 8-site MAL-ED cohort study. **Clin Infect Dis.**, v. 59, s. 4, p 220-4, 2014.

RIDDLE, M. S. The chronic gastrointestinal consequences associated with *Campylobacter*. **Curr Gastroenterol Rep.**, v. 14, p. 395–405, 2012.

RIDDLE, M.S.; GUERRY, P. Status of vaccine research and development for *Campylobacter jejuni*. **Vaccine**, v. 34, p. 2903–2906, 2016.

RIVERA-AMILL, V.; et al. Secretion of the virulence associated *Campylobacter* invasion antigens from *Campylobacter jejuni* requires a stimulatory signal. **J Infect Dis.**, v. 183, p. 1607-1616, 2001.

ROGAWSKI, E.T.; et al. Use of quantitative molecular diagnostic methods to investigate the effect of enteropathogen infections on linear growth in children in low-resource settings: longitudinal analysis of results from the MAL-ED cohort study. **Lancet Glob Health.**, v. 6, n. 12, p. 1319-1328, 2018.

ROSNER, B.M., et al. A combined case-control and molecular source attribution study of human *Campylobacter* infections in Germany, 2011-2014. **Sci. Rep.**, v. 7, p. 1–12, 2017.

ROUHANI, S.; et al. Gut microbiota features associated with *Campylobacter* burden and postnatal linear growth deficits in a Peruvian birth cohort. **Clin Infect Dis.**, v. 71, n. 4, p. 1000-1007, 2020.

RUBIN, D.C. Intestinal morphogenesis. **Curr Opin Gastroenterol.**, v. 23, n. 2, p. 111-4, 2007.

RUIZ-PALACIOS, G.M.; Protection of breast-fed infants against *Campylobacter* diarrhea by antibodies in human milk. **J Pediatr.**, v. 116, p. 707–713, 1990.

SALVO-ROMERO, E.; et al. The intestinal barrier function and its involvement in digestive disease. **Rev Esp Enferm Dig.**, v. 107, e. 11, p. 686-96, 2015.

- SANTOS, A.K.S.; et al. Virulence-related genes and coenteropathogens associated with clinical outcomes of enteropathogenic *Escherichia coli* infections in children from the Brazilian Semiarid Region: a Case-Control study of diarrhea. **J Clin Microbiol.**, v. 57, e. 01777-18, 2019.
- SCHIAFFINO F.; et al. Antibiotic Resistance of *Campylobacter* Species in a Pediatric Cohort Study. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 63, n. 2, 2019.
- SCHIAFFINO, F.; et al. Associations among Household Animal Ownership, Infrastructure, and Hygiene Characteristics with Source Attribution of Household Fecal Contamination in Peri-Urban Communities of Iquitos, Peru. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 104, n.1, p. 372–381, 2021.
- SCHNEE, A. E.; PETRI, W.A.J. *Campylobacter jejuni* and associated immune mechanisms: Short-term effects and long-term implications for infants in low-income countries. **Current Opinion in Infectious Disease**, v. 30, p. 322–328, 2017.
- SENOK. A. C.; BOTTA, G.A. *Campylobacter* enteritis in the Arabian Gulf. **J. Infect. Dev. Ctries.**, v. 3, n. 2, p. 74-82, 2009.
- SHANE, A.L.; et al. Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guidelines for the diagnosis and management of infectious diarrhea. **Clin Infect Dis.**, v. 65, p. 45–80, 2017.
- SHER, A.A; et al. Epidemiological trends of foodborne *Campylobacter* outbreaks in the United States of America, 1998-2016. **Food Microbiol.**, v. 97:103751, 2021.
- SIERRA-ARGUELLO, Y. M.; et al. Fluoroquinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* isolated from broiler slaughterhouses in southern Brazil. **Avian Pathol.**, v. 45, n. 1, p. 66-72, 2016.
- SINGH, A.; A. I. MALLICK. Role of putative virulence traits of *Campylobacter jejuni* in regulating differential host immune responses. **J Microbiol.**, v. 57, n. 4, p 298–309, 2019.
- SKARP, C. P. A.; et al. Campylobacteriosis: the role of poultry meat. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 22, p. 103–109, 2016.
- SKIRROW, M. B. John Mc Fadyean and the centenary of the first isolation of *Campylobacter* species. **Clin. Infect.Dis**, v. 43, p. 1213–1217, 2006.
- SKIRROW, M.B.; BLASER, M.J. Clinical aspects of *Campylobacter* infection. ed. 2. Washington, DC: **ASM Press**; 2000.
- SMIBERT, R.M. The genus *Campylobacter*. **Annu Rev Microbiol**, v. 32, p. 673–709, 1978.
- SMITH, J. L.; FRATAMICO, P. M. Fluoroquinolone resistance in *Campylobacter*. **J Food Prot.**, v. 73, p. 1141–1152, 2010.
- SMITH, T.; TAYLOR, M.S. Some morphological and biological characters of the Spirilla (*Vibrio Fetus*, n. sp.) associated with disease of the fetal membranes in cattle. **J Exp Med** v. 30, p. 299 –311, 1919.
- SOENDERGAARD, C.; et al. Alpha-1 antitrypsin and granulocyte colony-stimulating factor as serum biomarkers of disease severity in ulcerative colitis. **Inflammatory bowel diseases**, v. 21, n. 5, p. 1077 - 1088, 2015.
- STAHL, M.; et al. A. A novel mouse model of *Campylobacter jejuni* gastroenteritis reveals key pro-inflammatory and tissue protective roles for Toll-like receptor signaling during infection. **PLoS Pathog.**, v. 10, e. 7, 2014.

- STEELE, T. W., et al. DNA relatedness and biochemical features of *Campylobacter* spp. isolated in central and South Australia. **J. Clin. Microbiol.**, v. 22, p. 71–74, 1985.
- STINTZI, A. Gene expression profile of *Campylobacter jejuni* in response to growth temperature variation. **J. Bacteriol.**, v. 185, n. 6, p. 2009-2016, 2003.
- STORZ, G.; IMLAY, J. A. Oxidative stress. **Current Opinions in Microbiology**, v. 2, p. 188-194, 1999.
- TABOADA, E. N.; et al. Current methods for molecular typing of *Campylobacter* species. **Journal of Microbiological Methods**. v. 95, p. 24–31, 2013.
- TAYLOR, E. V.; et al. Common source outbreaks of *Campylobacter* infection in the USA, 1997-2008. *Epidemiol Infect.*, v. 141, n. 5, p. 987-96, 2013.
- TERNHAG, A.; et al. A meta-analysis on the effects of antibiotic treatment on duration of symptoms caused by infection with *Campylobacter* species. **Clin Infect Dis**. v. 44, p. 696 – 700, 2007.
- TORRES, I.C.M.; et al. Potential clinical use of azithromycin against gastroenteritis-causing pathogens other than *Campylobacter*. **New Microbiologica**, v. 43, n. 4, p. 198-200, 2020.
- TRACZ, D.M.; et al. pVir and bloody diarrhea in *Campylobacter jejuni* enteritis. **Emerg Infect Dis.**, v. 11, n. 6, p. 838–843, 2005.
- VAN DER STEL, A. X.; et al. The *Campylobacter jejuni* RacRS system regulates fumarate utilization in a low oxygen environment. **Environ Microbiol.**, v. 17, n. 4, p. 1049-64, 2015.
- VAN PUTTEN, J.P.; et al. Molecular mechanisms of *Campylobacter* infection. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 337, p. 197-229, 2009.
- VAN VLIET, A.H.M.; KETLEY, J.M. Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. **J. Appl. Microbiol.**, n. 90, v. 45–56, 2001.
- VERAS, H. N.; et al. Combination of different methods for detection of *Campylobacter* spp. in young children with moderate to severe diarrhea. **Journal of Microbiological Methods**, v. 128, p. 7-9, 2016.
- VERAS, H.N.; et al. *Campylobacter jejuni* virulence genes and immune-inflammatory biomarkers association with growth impairment in children from Northeastern Brazil. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v. 37, n. 10, p. 2011-2020, 2018.
- VÉRON, M.; CHATELAIN, R. Taxonomic study of the genus *Campylobacter* Sebald and Véron and designation of the neotype strain for the type species, *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and Véron. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 23, p. 122–134, 1973.
- WAGENAAR, J.A.; et al. Preventing *Campylobacter* at the source: why is it so difficult? **Clin Infect Dis.**; v. 57, p. 1600–1606, 2013.
- WATSON, R. O.; GALAN, J. E. *Campylobacter jejuni* survives within epithelial cells by avoiding delivery to lysosomes. **PLoS Pathog.**, v. 4, n. 14, 2008.
- WHITEHOUSE, C. A.; et al. *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin causes a G2-phase cell cycle block. **Infect Immun.**, v. 66, p. 1934–1940, 1998.
- WHITEHOUSE, C.A.; et al. Antimicrobial Resistance in *Campylobacter* Species: Mechanisms and Genomic Epidemiology. **Adv Appl Microbiol.**, v. 103, p. 1-47, 2018.

WHO - World Health Organization, Department of Maternal N Child and Adolescent Health. **WHO recommendations on postnatal care of the mother and newborn**, 2013 Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190086/>. Acessado em 10/03/2021.

WHO, **Fact sheet *Campylobacter***. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/en/>. , 2017. Acessado em 10/03/2021.

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

WHO. Child Growth Standards. **Acta Paediatr**, v. 95, p. 1-302, 2006.

WINE, E.; et al. *Campylobacter jejuni* mediated disruption of polarized epithelial monolayers is cell-type specific, time dependent, and correlates with bacterial invasion. **Pediatr Res.**, v. 64, p. 599– 604, 2008.

WYSOK, B.; WOJTACKA, J. Detection of virulence genes determining the ability to adhere and invade in *Campylobacter* spp. from cattle and swine in Poland. **Microbial Pathogenesis**, v. 115, p. 257–263, 2018.

YOUNG, K. T.; et al. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 5, p. 665–679, 2007.

YU, Z.T. The human milk oligosaccharide 2=-fucosyllactose quenches *Campylobacter jejuni*-induced inflammation in human epithelial cells HEp-2 and HT-29 and in mouse intestinal mucosa. **J Nutr.**, v. 146, p. 1980 –1990, 2016.

ZAUTNER, A. E.; et al. Chemotaxis in *Campylobacter jejuni*. **Eur J Microbiol Immunol.**, v. 2, p. 24–31, 2012.

ZHOU, Y.; MCARDLE, J. J. Rationale and Applications of Survival Tree and Survival Ensemble Methods. **Phycometrika**, v. 80, p. 811–833, 2015.

## APÊNDICES

## APÊNDICE A: TCLE

<b>Infecção Entérica e Desnutrição</b>			<b>Local do Estudo: Brasil</b>
<b>Estudo CASO-CONTROLE</b>			
TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO PARA PESQUISA INTERNACIONAL			
IRB-HSR < # >	Versão #3	28Mai2010	Página 1 de 3

Nome Participante: Criança \_\_\_\_\_ PID #

Mãe: \_\_\_\_\_ PID #

## -- CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAR DE UM ESTUDO DE PESQUISA --

**De Que Trata Este Estudo**

Doutores da Universidade Federal do Ceará, no Brasil, Universidade da Virginia, Universidade de Washington e Universidade John Hopking, nos EUA estão tentando aprender sobre as causas de desnutrição em crianças pequenas em nossos países. Desnutrição é uma doença onde há uma quantidade inadequada de absorção dos nutrientes da comida que ingerimos. Isto tem várias causas. Uma causa é a falta de acesso adequado a comida. Em adição, desnutrição é associada a infecções intestinais que pode mudar a utilização dos nutrientes. É também possível que a genética torne algumas crianças mais suscetíveis a desnutrição que outras.

Genes são feitos de material conhecido como DNA. É herança de nossos pais e os homens podem carregar os genes de muitos micróbios amigos que moram em nosso corpo. Este esforço para aprender mais sobre as causas da desnutrição em crianças é um estudo de pesquisa.

Este projeto foi aprovado pelos comitês de ética em pesquisa nos países onde se fará o estudo, inclusive o Brasil.

A razão para este estudo de pesquisa é que a desnutrição é um grande problema em nosso país e a participação de sua criança neste estudo talvez conduza a novos caminhos de prevenção ou tratamento de desnutrição. Um possível benefício de sua participação pode ser melhorar a saúde de todos que moram em nosso país e em outros países.

Você está sendo convidado a participar deste estudo porque a participação de sua criança talvez nos ajude a identificar o que causa desnutrição em crianças durante os primeiros 2 anos de vida. Este é o tempo onde a desnutrição pode ser muito comum e pode conduzir a longo prazo inabilidade se não tratada apropriadamente.

Os pesquisadores deste estudo são: Dr. Aldo Lima (UFC-Brasil), Dr. Álvaro Madeiro (IPREDE-Brasil) e Dr. Richard Guerrant (UVa-EUA).

Este estudo será realizado em Fortaleza, Brasil.

**O Que Acontecerá Durante o Estudo?**

Se você aceitar que sua criança participe deste estudo nós faremos o seguinte:

- Avaliaremos sua criança no período de seleção e então depois de 3, 6, 9 e 12 meses (5 vezes) para:
  1. Medir sua altura, peso e circunferência da cabeça;
  2. Coletar informações sobre práticas de alimentação de sua criança.
- Avaliaremos sua criança no período de seleção e então depois de 6 meses (2 vezes) para:
  1. Coletar uma pequena amostra de saliva (equivalente a uma colher de chá) para isolar os genes da criança (DNA) na seleção apenas;
  2. Coletar uma pequena amostra de sangue (equivalente a uma colher de chá) para testar o nível de nutrientes no sangue;
  3. Entrevistar você (mãe) para perguntar sobre o ambiente familiar e sobre sua habilidade e modo para raciocinar e resolver problemas.
- Avaliaremos sua criança no período de seleção e então depois de 3 meses (2 vezes) para:
  1. Fazer sua criança beber uma solução de açúcar e coletar a urina dela 5 horas mais tarde;
  2. Coletar amostra de fezes para identificar e isolar micróbios e estudar os genes dos micróbios das fezes (DNA).
- Se sua criança for encaminhada a um centro de saúde, hospital ou médico, talvez possamos obter alguns resultados dos testes solicitados pelo médico.
- Abordaremos você (mãe) no início do estudo para medir sua altura e peso e coletar uma pequena amostra de saliva para isolar seu gene (DNA) e/ou sangue (equivalente a uma colher de chá) para determinar seu grupo sanguíneo. (Sua decisão em participar nesta parte do estudo é opcional e não afetará a participação de sua criança).

IRB-HSR  
 APPROVAL DATE 8/10/10  
 EXPIRATION DATE 8/9/11

Dr. Mônica Parente Monteiro  
 Coordenadora Adjunta do Comitê  
 de Ética em Pesquisa  
 COMEP/UFCE



<b>Infecção Entérica e Desnutrição</b>			<b>Local do Estudo: Brasil</b>
<b>Estudo CASO-CONTROLE</b>			
TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO PARA PESQUISA INTERNACIONAL			
IRB-HSR <# >	Versão #3	28Mai2010	Página 2 de 3

Armazenaremos a saliva, o sangue, urina, fezes e DNA de sua criança coletados como parte deste estudo em câmeras seguras de armazenamento, tais como congelador, que ficam localizados em salas que podem apenas serem acessados por algum membro de nossa equipe científica. Algumas dessas amostras coletadas poderão ser enviadas a um laboratório na Universidade da Virgínia (EUA) para testes especializados. Todas as amostras serão codificadas com número, assim não terá nenhuma identificação das informações (isto é: nome e endereço) e serão estocadas com as amostras ou resultados de seus testes. Se você mudar de idéia sobre manter estas amostras você poderá entrar em contato com a equipe e as amostras serão destruídas. Caso você concorde em participar deste estudo suas amostras ficarão estocadas e sob a responsabilidade do grupo de estudo durante os cinco anos de realização do estudo.

#### **Esta Pesquisa Poderá Ajudar-me?**

Os benefícios para você ao entrar neste estudo é que poderemos determinar a causa da desnutrição de sua criança e encaminhar-lhe para serviços de saúde locais para tratamento apropriado. Sua criança poderá ser beneficiada com a monitoração e a promoção do peso que deverá acontecer aos 0, 3, 6, 9 e 12m do estudo. O doutor e/ou o investigador informará sobre qualquer situação durante o estudo que tenha importância para realizar cuidados médicos.

#### **Esta Pesquisa Promove Algum Risco?**

Consideramos que toda pesquisa envolvendo seres humanos envolve risco, mesmo que seja mínimo. Algum dano eventual poderá ser imediato ou tardio, comprometendo o indivíduo ou a comunidade. Pode ser que você se sinta desconfortável ao responder o questionário e que você e/ou sua criança pode ter leve e temporária dor quando da coleta de sangue, além de poder surgir uma mancha roxa resultante do extravasamento de sangue para fora do vaso sanguíneo.

#### **Garantia em Caso de Danos**

Não está previsto indenização ou ressarcimento ao sujeito participante deste estudo, porém o pesquisador responsável assume a responsabilidade de fornecer a assistência integral necessária referente às complicações e danos decorrentes de algum risco previsto.

#### **Como Minha Privacidade Será Protegida?**

Registros do estudo que o identificam (Ex.: Nome e Endereço) serão mantidos confidenciais e fechados em um lugar seguro sob a responsabilidade do investigador principal local. Como registrado acima, as amostras de sua criança e os resultados dos testes serão codificados e armazenados separadamente para a análise pelos investigadores que estão trabalhando junto neste projeto nos diferentes locais do estudo. Assim asseguraremos que nenhum investigador nestes diferentes locais do estudo possa identificar sua criança como doadora destas amostras.

Outras pessoas que podem acessar os resultados dos seus testes e termo de consentimento são os comitês e agências nacionais e internacionais que cuidam desta pesquisa.

Como todos os testes serão feitos em todas as amostras coletadas as pessoas que manipularão estas amostras não saberão quem as doou porque elas serão codificadas.

Se você assinar este formulário, você dará permissão para divulgar a informação a todos os pesquisadores autorizados e ao comitê de segurança. Não existe data de validade para esta permissão. Esta informação, como toda informação gerada neste estudo, será codificada, impossibilitando alguém seguir você ou sua criança, ou seja, sua privacidade será protegida.

Em adição, também pedimos permissão para liberar informações sobre bactérias no intestino de sua criança. Isto será liberado somente com sua permissão e sem nenhuma informação sua ou de sua criança associado a ele.

#### **Eu Preciso Participar?**

Você não precisa participar deste estudo se não quiser. Isto significa participação voluntária. Cabe a você decidir em estar neste estudo de acordo com seu interesse. Se você não desejar participar deste estudo não assine este formulário.

Você pode interromper sua participação no estudo a qualquer hora. Se você decidir retirar sua criança do estudo entre em contato com as agentes de saúde ou com o pesquisador local para registrarmos sua saída. Também informe se você desejar que as amostras e de sua criança já coletadas sejam destruídas e os dados removidos do banco de dados.

<b>Infecção Entérica e Desnutrição</b>			<b>Local do Estudo: Brasil</b>
<b>Estudo CASO-CONTROLE</b>			
TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO PARA PESQUISA INTERNACIONAL			
IRB-HSR < # >	Versão #3	28Mai2010	Página 3 de 3

**Quem Eu Posso Contactar Para Questões Sobre Direitos Como Sujeito de Pesquisa?**

Comitê de Ética em Pesquisa da UFC (COMEPE), telefone: 3366.8338. Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo CEP: 60.430-270.

Dr. Aldo Lima, Unidade de Pesquisa Clínica, UFC (telefone: 3366.8437),

Dr. Álvaro Madeiro, IPREDE (telefone: 3218.4000)

**Assinatura**

Por favor, pergunte sobre todas as questões que você precisar para ter certeza de que você entendeu o estudo antes de assinar este formulário.

\_\_\_\_\_  
NOME DO PARTICIPANTE  
(ASSINATURA)

\_\_\_\_\_  
NOME DO PARTICIPANTE  
(LETRA DE FORMA)

\_\_\_\_\_  
DATA

\_\_\_\_\_  
QUEM OBTVEVE O CONSENTIMENTO  
(ASSINATURA)

\_\_\_\_\_  
QUEM OBTVEVE CONSENTIMENTO  
(LETRA DE FORMA)

\_\_\_\_\_  
DATA

Nota para as Agentes de Saúde: No caso de pessoas iletradas, o termo de consentimento será lido para você com a presença de uma testemunha (não vinculada ao estudo) e uma impressão digital (do dedo) será obtida no lugar da assinatura. A testemunha também precisa assinar este formulário.

\_\_\_\_\_  
NOME DA TESTEMUNHA  
(ASSINATURA)

\_\_\_\_\_  
NOME DA TESTEMUNHA  
(LETRA DE FORMA)

\_\_\_\_\_  
DATA

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



**ANEXOS****ANEXO A: REGISTRO CONEP 16701**

10/02/2010 14:27

CONEP

33153701

p. 1

036240



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

**PARECER Nº 029/10**

Registro CONEP 15701 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Registro no CEP – 246/09

Processo nº 25000.639836/2009-76

**Projeto de Pesquisa:** *“Etiologia, Fatores de Risco e Interações das Infecções Entéricas e Desnutrição e suas Conseqüências no Desenvolvimento e Saúde da Criança”*. Protocolo versão 01 data da capa de 05/03/2009, data do corpo do texto 26/08/2009; Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para o estudo CASE-CONTROL versão 2.1 de 15/04/2009, TCLE para o estudo COHORT versão 4 de 15/04/2009.

**Pesquisador Responsável:** Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima

**Instituição:** Universidade Federal do Ceará (CENTRO ÚNICO)

**CEP de origem:** Universidade Federal do Ceará

**Área Temática Especial:** Pesquisa com cooperação estrangeira

**Patrocinador:** Bill & Melinda Gates Foundation

**Sumário geral do protocolo**

A desnutrição é considerada um dos fatores de risco mais prevalentes para morbidade e mortalidade em crianças abaixo de cinco anos. Estima-se que 20% das crianças nos países em desenvolvimento são desnutridas e déficits nutricionais estão associados com mais da metade das causas de morte a nível mundial. A desnutrição na infância pode levar a déficits físicos e cognitivos e pode induzir déficits similares em gerações futuras com mães desnutridas que dão à luz crianças de baixo peso. Além disso, a desnutrição aumenta a susceptibilidade e a incidência de infecções e está associada com a diminuição da resposta às vacinas. O entendimento das relações complexas e sinérgicas entre infecções entéricas e a desnutrição é fundamental para planejar melhores estratégias de prevenção. Apesar dos grandes avanços terapêuticos, as infecções entéricas causadoras de diarreia permanecem como a causa primária de todas as mortes, estimada em 17-20% (até ~2.1 milhões de mortes) por ano em crianças abaixo de 5 anos de vida. Embora a mortalidade causada por patógenos entéricos tenha reduzido mundialmente nas últimas três décadas, estima-se que a taxa global da morbidade devido à diarreia tenha aumentando no mesmo período.

A origem da desnutrição infantil é complexa com uma variedade de fatores diretos e indiretos relacionados não apenas com a escassez de alimentos, incluindo aleitamento materno insuficiente e precário suporte de suplementos alimentares, mas também estados catabólicos devido às infecções, e a resposta inadequada do hospedeiro e de sua microbiota intestinal ao déficit calórico. Bactérias patogênicas, vírus e parasitas intestinais parecem comprometer o estado nutricional em duas maneiras distintas: 1) Os patógenos entéricos impedem a absorção de nutrientes, reduzindo a capacidade absorptiva do intestino, dessa forma, causando desnutrição protéica-energética e de micronutrientes; 2) As infecções entéricas podem também comprometer a barreira intestinal, resultando na permeabilidade aumentada de patógenos, endotoxinas e outras macromoléculas que podem resultar em estimulação crônica do sistema imune.

Tanto as deficiências de micronutrientes como a estimulação crônica imune podem comprometer o crescimento e aumentar a susceptibilidade de doenças

Cont. Parecer CONEP nº 029/2010

infeciosas. A microbiota intestinal alterada e patógenos podem reduzir a eficácia das vacinas ministradas por via oral.

Enquanto já se conhece que infecções entéricas podem induzir desnutrição, a literatura existente tratando de etiologias de enteropatógenos é limitada devido a amostragens pequenas, sítios geográficos restritos e qualidade dos testes diagnósticos. Apesar de que a maior parte da atenção do tratamento para diarreia aguda ocorreu através da rehidratação, ainda existem poucos estudos da morbidade e mortalidade devido às infecções entéricas crônicas e recorrentes, envolvendo microorganismos e parasitas, e sua contribuição para a morbidade global em crianças abaixo de 5 anos e as conseqüências e efeitos de longo-prazo na vida adulta.

Também não existem estudos sistemáticos que elucidaram as relações entre crescimento/desenvolvimento e microorganismos específicos, taxas de incidência numa faixa etária particular na infância, ou infecções combinadas. Além disso, não existem estudos demonstrando associações conclusivas desses fatores com indicadores intermediários, como disfunção intestinal, no qual presumivelmente associa infecções entéricas com crescimento e desenvolvimento. Também existe limitação na literatura avaliando a resposta às vacinas associada à infecção mista e o papel da suplementação de micronutrientes em países em desenvolvimento.

Esse projeto estabelecerá e coordenará uma rede multicêntrica em populações com elevada prevalência de desnutrição e infecções entéricas, num estudo compreensivo, utilizando protocolos comuns e bem organizados, para determinar fatores que influenciam o desenvolvimento e saúde infantil. A vigilância epidemiológica intensiva em crianças durante os primeiros anos críticos de vida, nos centros propostos, permitirá elucidar algumas dessas complexas inter-relações, possibilitando intervenção com melhor custo-benefício e com maior precisão.

A pesquisa de campo proposta ajudará a elucidar os fatores de risco para desnutrição e infecções entéricas nessas populações. Também existe a necessidade de expandir os achados para outros locais com presumidas altas taxas de morbidade devido às infecções entéricas, mas com falta de dados específicos.

Os principais objetivos desse projeto são: 1. Estabelecer uma rede coordenada de forma multicêntrica em países em desenvolvimento na Ásia, África e América do Sul; 2. Conduzir estudos epidemiológicos iniciais utilizando protocolos padronizados comuns e éticos, na melhor prática clínica, para aumentar a compreensão de fatores de risco para a desnutrição e doenças entéricas. Esse entendimento aumentará nosso conhecimento de seus efeitos no desenvolvimento e crescimento físico e cognitivo e a susceptibilidade às doenças e sua resposta às intervenções de saúde pública em crianças de países em desenvolvimento. 3. Estabelecer mecanismos que permitam novos projetos financiados que possam ser aplicados no desenvolvimento de políticas e intervenções de saúde pública. 4. Desenvolver ferramentas que permitam extrapolar os achados desses estudos para outras populações em que há quantificação precária da prevalência de doenças.

Estes objetivos serão alcançados através de três principais atividades: 1. Estabelecer uma estrutura administrativa para desenvolver e gerenciar uma rede multicêntrica em países em desenvolvimento para estudar a desnutrição e infecções entéricas; 2. Conduzir um estudo epidemiológico longitudinal prospectivo e de caso-controle para identificar os fatores associados com o risco às infecções entéricas, diarreia crônica, desnutrição, assim como comprometimento da função intestinal, resposta às vacinas e desenvolvimento e coletar dados fenotípicos e ambientais nos centros da pesquisa, permitir a integração de futuros estudos através das colaborações de pesquisa e atividades de pesquisa em parceria, designadas para reduzir a mortalidade infantil; 3. Desenvolver e ilustrar modelos temporais e geoespaciais, utilizando dados de fontes secundárias, assim como desse projeto, para estimar a

Cont. Parecer CONEP nº 029/2010

distribuição e sobrecarga da desnutrição e infecções entéricas, assim como, os benefícios atribuídos às várias intervenções.

A rede multicêntrica proposta aqui irá obter dados e amostras para avaliar a contribuição de cada um desses fatores para desnutrição e suas conseqüências. Espera-se não apenas encontrar associações a partir destes estudos observacionais, mas produzir novas hipóteses a serem testadas, e também providenciar uma infraestrutura colaborativa para apoiar financiamentos para descobertas científicas. A partir da estrutura de acordos, espera-se que essa rede forme uma ponte para estudos colaborativos em saúde e desenvolvimento infantil em áreas com menos recursos.

O protocolo propõe a nível internacional um estudo multicêntrico epidemiológico para esclarecer a relação entre as várias infecções intestinais, desnutrição e relação estatural em crianças desde o nascimento até a idade de 24 meses em países em desenvolvimento, incluindo a avaliação de dados geográficos, ambientais, sócio-culturais e diversidade de etiologias. Será conduzido na Ásia, América do Sul e África entre populações bem estabelecidas, utilizando uma agenda de pesquisa com ensaios para função intestinal, microbiologia, antropometria, nutrição, função cognitiva e imunogenicidade de vacinas orais, bem como vigilância em comunidade para doenças infecciosas. O estudo envolve a mistura de comunidades urbanas e rurais, com média e alta prevalência de infecções intestinais e baixa estatura, onde uma intervenção alvo possa ter um impacto significativo na redução de infecção intestinal e desnutrição.

O estudo assume os aspectos de estudo coorte longitudinal e estudo caso-controle. No estudo de coorte longitudinal o desenho do estudo coorte prospectivo e longitudinal permitirá capturar o tempo e a sequência dos episódios de diarreia e as ligações destes com a função intestinal, indicadores nutricionais e medidas de crescimento e desenvolvimento. Após assinatura do TCLE, mulheres grávidas serão seguidas regularmente e a partir do nascimento da criança a mesma será seguida por, no mínimo, 24 meses de idade. Nesse período será avaliada a função intestinal, microbiologia, estado nutricional, clínico e a função cognitiva das crianças. Cada local de estudo irá estudar cerca de 200 crianças no coorte. A vigilância ativa geral e para doenças infecciosas irá incluir visitas semanais (2x) nas casas para seguimento das crianças do estudo. Todos os locais proverão aos participantes, padrões regionais de cuidados para o tratamento de doenças comumente observadas.

O estudo caso controle será realizado no Brasil e Bangladesh. Casos e controles serão identificados em ambas comunidades e clínicas. O desenho do estudo seguirá cerca de 500 casos e 500 controles, pareados por idade e comunidade (em cada local), idade de 6 a 24 meses, seguidos no 1º, 3º, 6º e 12º meses. Cada local deve realizar um número ou frequência mínima de testes e avaliações, incluindo provas funcionais intestinais, medidas antropométricas, dosagens de micronutrientes, imunogenicidade vacinal e avaliação da função cognitiva tabelas fl 33, 34, e 35. Na admissão, as características familiares e o QI materno serão verificados.

#### Local de realização

Trata-se de um projeto internacional multicêntrico, com cooperação estrangeira, que no Brasil será realizado em um só centro. Além do Brasil, participarão do estudo: na América do Sul (Brasil e Peru), na África (África do Sul e Tanzânia) e na Ásia (Índia, Bangladesh, Paquistão e Nepal). Foi apresentado documento de aprovação do estudo nos EUA (páginas 07 e 17-22, numeração do CEP). Além disso, consta documento intitulado "Esclarecimento da não participação americana no estudo" (página 11, numeração do CEP) em que o pesquisador responsável informa que a Universidade de Virginia (EUA) será o centro de administração de uma parte do projeto, porém por não ser um país em desenvolvimento, as atividades do protocolo não serão realizadas em tal país. Na "Declaração de uso de destino do material biológico e dados coletados"

Cont. Parecer CONEP nº 029/2010

(página 13, numeração do CEP) o pesquisador responsável informa que os materiais biológicos e dados coletados serão utilizados de acordo com as orientações estabelecidas no presente projeto e que o "possível envio dos mesmos para o exterior seguirá os padrões exigidos pela Resolução CNS 347/2005".

Ao todo é previsto o recrutamento de 1200 sujeitos de pesquisa no estudo, todos no centro em tela. Foi apresentada "Declaração de infra-estrutura das instalações da UPC" (páginas 09-10, numeração do CEP), demonstrando que o centro em tela se encontra adequado para realização do estudo.

#### **Apresentação do protocolo**

A Folha de Rosto encontra-se preenchida e assinada.

Na "Declaração de Concordância com o Projeto" (página 12, numeração do CEP) o pesquisador responsável informa que o mesmo fez parte da equipe idealizadora do projeto e que está plenamente de acordo com o mesmo. Consta (p. 08, numeração do CEP) Declaração do Presidente do IPREDE (Instituto de Prevenção à Desnutrição e à Excepcionalidade) autorizando a realização da pesquisa na instituição, bem como Declaração de Infra-Estrutura das instalações da UPC (Unidade de Pesquisa Clínica da Universidade Federal do Ceará), declarando a sua adequação para a realização do estudo. Constam Declarações de Compromisso do pesquisador principal quanto ao cumprimento das Resoluções 196/96 e 340/2004 do CNS.

O orçamento financeiro (página 16, numeração do CEP) informa que o valor total previsto para o estudo em tela é de R\$ 2.551.197,95 .

O currículo do pesquisador responsável (páginas 108-132, numeração do CEP) demonstra que o mesmo se encontra apto para condução do estudo.

Foram apresentados dois modelos de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE): para participação no estudo COHORT (páginas 104-106, numeração do CEP) e para participação no estudo CASE-CONTROL (página 107, numeração do CEP), ambos redigidos em linguagem clara e objetiva e em formato conciso.

#### **Comentários/Considerações**

1. Nas páginas 105 e 107 dos TCLEs (numeração do CEP) encontramos a afirmativa: "Armazenaremos saliva e sangue de sua criança, urina fezes e DNA coletados como parte deste estudo em câmeras seguras de armazenamento, tais como congelador, que ficam localizados em salas que podem apenas serem acessados por algum membro de nossa equipe científica. Algumas dessas amostras coletadas poderão ser enviadas a um laboratório na Universidade da Virgínia(EUA) para testes genéticos de riscos ligados à diarreia e desnutrição. Todas as amostras serão codificadas com número, assim não terá nenhuma identificação das informações (isto é: nome e endereço) e serão estocadas com os resultados de seus testes. Se você mudar de idéia sobre manter suas amostras você poderá entrar em contato com a equipe e as suas amostras serão destruídas. Caso você concorde em participar deste estudo suas amostras ficarão estocadas e sob a responsabilidade do grupo de estudo durante os dez anos de realização do estudo". Solicita-se, portanto, esclarecimento sobre a formação de banco de materiais e, em caso afirmativo da constituição do banco, é necessário apresentar os documentos cabíveis requisitados pelas Resoluções CNS 340/2004 (pelos testes genéticos) e 347/2005, incluindo a definição de como se dará a autorização para uso do material armazenado após cinco anos, de acordo com as Resoluções supracitadas.
2. Nas mesmas páginas dos TCLEs (105 e 107, numeração do CEP), encontramos ainda a afirmativa: "Não existem riscos vinculados a este estudo". Solicita-se

Cont. Parecer CONEP nº 029/2010

adequação da mesma, uma vez que, conforme disposto na Resolução CNS 196/96 que preconiza, no seu item V: Considera-se que toda pesquisa envolvendo seres humanos envolve risco. O dano eventual poderá ser imediato ou tardio, comprometendo o indivíduo ou a comunidade. Solicita-se adequação do texto.

3. Solicita-se deixar explícito no TCLE a garantia ao sujeito de pesquisa sobre os direitos à indenização, conforme itens V.5, V.6 e V.7 da Resolução CNS 196/96.
4. Solicita-se a inclusão do endereço do CEP no tópico "Quem eu posso contactar para Questões sobre Direitos como Sujeito de Pesquisa?".

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se por aguardar o atendimento às questões acima para emissão de seu parecer final.

Situação: Protocolo com pendência.

De acordo com a Resolução CNS 196/96, as pendências devem ser respondidas exclusivamente pelo pesquisador responsável no prazo de 60 dias, a partir da data de envio do parecer pela CONEP. Após esse prazo o protocolo será arquivado. A resposta do pesquisador principal deve ser avaliada pelo CEP com a emissão de parecer consubstanciado e, se aprovada, deve ser encaminhada à CONEP. Solicita-se ainda que as respostas sejam enviadas de forma ordenada, conforme os itens de consideração deste parecer, e a indicação da localização das possíveis alterações no protocolo.

Brasília, 27 de janeiro de 2010.

  
Gyselle Saddi Tannous  
Coordenadora da CONEP/CNS/MS

*Não há mais pendência*

**ANEBO B: REGISTRO COMEPE Nº 246/09**

Universidade Federal do Ceará  
Comitê de Ética em Pesquisa

**Of. Nº 135/10**

Fortaleza, 28 de junho de 2010

**Protocolo COMEPE nº 246/ 09**

**Pesquisador responsável:** Aldo Ângelo Moreira Lima

**Deptº./Serviço:** Departamento de Fisiologia e Farmacologia/ UFC

**Título do Projeto:** "Etiologia, fatores de risco e interações das infecções entéricas e desnutrição e suas conseqüências no desenvolvimento e saúde da criança"

Levamos ao conhecimento de V.S<sup>a</sup>. 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 nº 196 de 10 de outubro de 1996 e complementares, aprovou na reunião do dia 24 de junho de 2010 as respostas apresentadas no projeto supracitado, pois atende as recomendações da CONEP.

Outrossim, informamos, que o pesquisador deve se comprometer a enviar o relatório parcial e final do referido projeto.

Atenciosamente,

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