

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**A TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA
DETECÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA EM *Campylobacter jejuni* E SUA
APLICAÇÃO NA ROTINA VETERINÁRIA**

Juliana Inês Herpich

Porto Alegre

2011/2

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**A TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA
DETECÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA EM *Campylobacter jejuni* E SUA
APLICAÇÃO NA ROTINA VETERINÁRIA**

Autor: Juliana Inês Herpich

**Trabalho apresentado
como requisito parcial para
graduação em Medicina
Veterinária**

**Orientador: Carlos Tadeu Pippi Salle
Co-orientador: Thales Quedi Furian**

**PORTO ALEGRE
2011/2**

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, e especialmente a Faculdade de Veterinária - FAVET, pelo comprometimento com o ensino de qualidade.

Aos professores pela dedicação, empenho e paciência durante as aulas do curso de graduação de Medicina Veterinária.

Ao Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) pela oportunidade de vivenciar a Medicina Veterinária na prática.

Ao CNPQ, pelo apoio financeiro e pela oportunidade de desenvolver habilidades científicas ao longo de quatro anos.

Aos Professores Hamilton Luiz de Souza Moraes e Vladimir Pinheiro do Nascimento e ao biólogo Silvio Luis da Silveira Rocha, pelos ensinamentos e conselhos dados ao longo dos cinco anos de estágio no CDPA.

Ao Professor Carlos Tadeu Pippi Salle, pela orientação na monografia e durante os cinco anos de estágio no CDPA, pelos ensinamentos, pela confiança e pela amizade, durante quase todo o curso de Medicina Veterinária.

Ao Médico Veterinário Thales Quedi Furian pela amizade, pelos conselhos e pela co-orientação na monografia.

Aos amigos que fiz durante a Faculdade, durante os cinco anos de CDPA, e a todos aqueles amigos de longa data, que mesmo com a distância se mantiveram companheiros e presentes! Vocês são peças fundamentais no meu crescimento profissional e pessoal!

Ao meu namorado Fabiano, pelo companheirismo e por todo o carinho e todo o amor dedicado durante esses anos. Obrigada por estar sempre presente e por me apoiar em todos esses momentos da vida!

Finalmente, mas não menos importante, à minha família, em especial à minha Mãe Marlise, ao meu Pai Levi e ao meu irmão Tiago. Obrigada por todo amor, por toda a paciência, por todo o carinho, por toda a dedicação e por toda a compreensão ao longo de toda a minha vida! Amo muito vocês!

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	<i>Campilobacter sp.</i>	13
2.1.1	Campilobacteriose nas Aves	14
2.1.2	<i>Campylobacter jejuni</i> e o seu potencial zoonótico	16
2.1.3	Campilobacteriose nos humanos	18
2.1.3.1	Complicações de Campilobacterioses	19
2.1.4	Medidas de Higiene para a prevenção de Campilobacteriose	20
2.2	FATORES DE VIRULÊNCIA DE <i>Campylobacter jejuni</i>	21
2.2.1	Adesão	21
2.2.2	Motilidade	24
2.2.3	Quimiotaxia	25
2.2.4	Invasão	26
2.2.5	Toxinas	28
2.3	BIOLOGIA MOLECULAR COMO FERRAMENTA DE DE DETECÇÃO DE <i>Campylobacter sp.</i>	30
2.3.1	Técnicas moleculares de extração e de tratamento de ácidos nucléicos	30
2.3.1.1	REA – Análise de Restrição por Endonucleases	30
2.3.1.2	Ribotipagem	31
2.3.1.3	PFGE	32
2.3.2	A técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)	32
2.3.2.1	Fatores que podem interferir nos resultados da PCR	34
2.3.3	Técnicas resultantes de modificações ou complementações na PCR	35
2.3.3.1	RT-PCR	35
2.3.3.2	Nested-PCR	35
2.3.3.3	PCR multiplex	35
2.3.3.4	PCR a partir de <i>primers</i> randômicos	36
2.3.3.5	PCR em Tempo Real	36
2.3.4	Uso das técnicas de Biologia Molecular em bactérias do	37

	Gênero <i>Campylobacter</i>	
2.4	REDES NEURAIS ARTIFICIAIS (RNA'S)	38
3	MATERIAL E MÉTODO	41
3.1	Local de Execução do Experimento	41
3.2	Amostras de DNA de <i>Campylobacter jejuni</i>	41
3.3	Pesquisa dos genes do complexo <i>cdt</i>: <i>cdtA</i>, <i>cdtB</i> e <i>cdtC</i> nas amostras	41
3.4	Pesquisa dos genes do complexo <i>cdt</i> nas amostras	44
3.4.1	<i>Primers</i>	41
3.4.2	Padronização dos protocolos	42
4	RESULTADOS	44
5	DISCUSSÃO	45
6	CONCLUSÃO	47
	REFERÊNCIAS	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sequência de <i>primers</i>	42
Tabela 2	Composição do mix	42
Tabela 3	Ciclos da PCR	43

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Visualização, através de luz UV, de gel de agarose à 2% corado com brometo de etídio. 44

LISTA DE SIGLAS

°C	Graus Celsius
%	Por Cento
'	Minuto
µm	Micrômetro
ASGAV	Associação Gaúcha de Avicultura
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CDPA	Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária
CDT	Citotoxina Letal Distensiva
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
GBS	Síndrome de Guillain-Barré
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
pb	Pares de bases
REA	Restriction endonuclease analysis – Análise de Restrição por Endonucleases
RNA	Ácido Ribonucleico
PFGE	Pulsed-field gel electrophoresis
UBABEF	União Brasileira de Avicultura
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
T _m	Temperatura de melting

RESUMO

A campilobacteriose é uma zoonose de distribuição mundial, que causa gastroenterite em humanos. As ocorrências de surtos alimentares causados por bactérias do gênero *Campylobacter* têm sido relacionadas ao consumo de produtos de origem animal, principalmente aos produtos de procedência avícola. As bactérias expressam genes que codificam fatores de virulência que propiciam a colonização e a ocorrência de eventos que subvertem a fisiologia do hospedeiro. Os genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* codificam a proteína *CDT* (*Cytolethal distending toxin*), considerada um dos principais fatores de virulência de *Campylobacter jejuni*, que contribui para o desenvolvimento de diarreia. Esse trabalho objetivou integrar os conhecimentos sobre esta bactéria emergente, descrever suas principais formas de virulência e verificar a presença dos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* em amostras de *C. jejuni* isoladas de cecos de aves, por meio da técnica de PCR. De todas as amostras, 100% (13/13) foram positivas para o gene *cdtA*, 84,6% (11/13) positivas para o gene *cdtB* e 92,3% (12/13) positivas para o gene *cdtC*. 84,6% das amostras foram positivas para os três genes. Foi possível verificar a presença dos genes de virulência *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* nas amostras estudadas, por meio da técnica de PCR. Os resultados encontrados estão de acordo com a literatura, que relata variações próximas a 100% na prevalência destes genes nas amostras pesquisadas; não obstante, é necessária a análise de um maior número de amostras para verificar a importância e o aparecimento destes genes nos isolados no Brasil. Além da presença dos genes, o presente trabalho também visou discutir sobre formas de interpretação da presença dos genes de virulência, por meio do emprego da inteligência artificial, mais especificamente, das redes neurais artificiais (RNA's).

ABSTRACT

Campylobacteriosis is a zoonosis of worldwide distribution that causes gastroenteritis in humans. The occurrence of food outbreaks caused by bacteria of the genus *Campylobacter* has been linked to consumption of animal products, especially those of poultry origin. This bacteria expresses genes that encode virulence factors that promote colonization and the occurrence of events that subvert host's physiology. Genes *cdtA*, *cdtB* and *cdtC* encode protein CDT (*Cytolethal distending toxin*), considered one of the major virulence factors of *Campylobacter jejuni*, which contributes to diarrhea occurrence. This study aimed to integrate the knowledge about this emerging bacteria, describe its main forms of virulence and verify (by using PCR technique) the presence of genes *cdtA*, *cdtB* and *cdtC* in samples of *C. jejuni* isolated from poultry caecal. From the samples, 100% (13/13) were positive for the gene *cdtA*, 84.6% (11/13) positive for the gene *cdtB* and 92, 3% (12/13) positive for the gene *cdtC*. 84.6% of samples were positive for all three genes. It was possible to verify the occurrence of virulence genes *cdtA*, *cdtB* and *cdtC* in the analyzed samples. These results are consistent with literature, that reports a variation close to 100% in the prevalence of these genes in the samples studied. Nevertheless, it is necessary an analysis of a larger sample to verify the occurrence and relevance of these genes in isolates in Brazil. Besides the presence of genes, this study also aimed at discussing ways of interpreting the presence of virulence genes through the use of artificial intelligence, more specifically, artificial neural networks (ANN).

1 INTRODUÇÃO

A avicultura é hoje um dos setores de maior importância econômica no mercado brasileiro, empregando mais de 4,5 milhões de pessoas, direta e indiretamente. Atualmente, o Brasil é o maior exportador e o terceiro maior produtor de carne de frango do mundo. Segundo o relatório da UBABEF 2010/2011, a produção de carne de frango, em 2010, apresentou um crescimento de 11,3%, em relação a 2009. Em 2011, estudos realizados pela mesma instituição indicam que a produção brasileira de frangos deverá atingir 13,08 milhões de toneladas (6,9 % a mais do que o total produzido em 2010). Com este desempenho o Brasil está cada vez próximo de superar a China e de se tornar o segundo maior produtor mundial de carne de frango (UBABEF, 2011).

O Rio Grande do Sul também é destaque na produção de aves, sendo responsável pela terceira maior produção de carne de frango brasileiro, somente atrás do Paraná e de Santa Catarina (UBABEF, 2011). O destaque da avicultura brasileira e gaúcha está relacionado ao clima favorável, às grandes quantidades de terra agricultáveis, que disponibilizam fácil acesso e ao baixo custo de matéria-prima para a fabricação de rações. Outros fatores importantes são os investimentos em tecnologias, a alta disponibilidade de mão-de-obra especializada e a produção integrada e cooperada do setor. Tal cenário leva o nosso produto ao topo das exportações por ser um alimento de ótima qualidade e bom preço, comparado aos concorrentes.

A sanidade e a inocuidade também são grandes atributos do frango produzido no Brasil. Os plantéis são na grande maioria de criações livres das principais doenças avícolas. No entanto, bactérias como *Campylobacter* não são detectadas como problema para avicultura no campo, sendo consideradas comensais no intestino das aves, uma vez que não causam grandes prejuízos aos padrões zootécnicos dos animais (BACK, 2010). Assim, durante o abate, pode ocorrer a contaminação da carne de frango, configurando um sério problema para a saúde pública, já que este agente, apesar de inócuo para as aves, nos humanos pode causar diarreias e outras complicações.

A campilobacteriose é uma zoonose de distribuição mundial, cujo principal representante é o *Campylobacter jejuni*. Estas bactérias são comensais do trato gastrointestinal de uma grande variedade de animais selvagens e domésticos (principalmente aves) (HUMPHREY, O'BRIEN & MADSEN, 2007). São organismos capazes de sobreviver em uma grande quantidade de ambientes (KEENER et al., 2004). A infecção nos humanos ocorre através da ingestão de carnes de aves cruas ou mal

cozidas, de leite não pasteurizado, do consumo de água e de alimentos de origem animal e vegetal contaminados, além do contato direto com animais portadores (KUMAR et al., 2001; SCARCELLI et al., 2005) A contaminação de carcaças de frangos em abatedouros é considerada o principal fator de risco para estas infecções (ROZYNEK et al., 2005).

A fim de manter o bom conceito do produto brasileiro, novas técnicas de identificação, de isolamento e de reconhecimento da patogenicidade de *Campylobacter sp.* devem ser pesquisadas e empregadas no país. A legislação brasileira ainda não contempla o controle de *C. jejuni* como agente infeccioso. Há apenas a citação deste microorganismo como patógeno na Portaria nº 451, de 19 de setembro de 1997, da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Não obstante, já existem no *Codex Alimentarius*, discussões acerca desse patógeno nos alimentos de origem animal, especialmente de origem avícola. Acredita-se, que, devido às exigências internacionais em termos de exportação, cada vez maiores, a presença de *C. jejuni* possa se tornar alvo de barreiras, conforme o exemplo da Salmonela. Os objetivos dessa monografia são integrar os conhecimentos acerca do patógeno *C. jejuni* e relatar suas principais formas de virulência. Além disso, visa caracterizar algumas amostras, por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), quanto à presença de genes que codificam a produção de toxinas do complexo CDT. Por fim, este trabalho pretende explicar sobre o uso de redes neurais artificiais em conjunto com os resultados obtidos através da PCR.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Campylobacter sp.*

O gênero *Campylobacter* constitui juntamente com os gêneros *Arcobacter*, *Dehalospirillum* e *Sulfurospirillum*, a família *Campylobacteraceae* (ESTEVEZ, et al., 2011; FERNANDEZ; 2008). Atualmente, compreende 18 espécies e seis subespécies, sendo quatro: *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* e *C. upsaliensis* conhecidas como termofílicas, ou seja, com capacidade de crescimento ideal a 42- 43°C (FERNANDEZ, 2008).

Campylobacters são bactérias não esporuladas e formadoras de colônias não hemolíticas e, frequentemente, não pigmentadas. Microscopicamente, são bastonetes curvos em forma de vírgula, "S", asa de gaivota ou espiral, gram-negativos, cujas dimensões variam entre 0,2 a 0,9 µm de largura por 0,5 a 5 µm de comprimento. Estes microorganismos são móveis por meio de flagelo em uma ou em ambas as extremidades e apresentam um movimento característico em "serrote" ou "saca-rolha", que pode ser observado em microscópio de contraste de fase ou de campo escuro (BUTZLER, 2004; KEENER et al., 2004; HUMPHREY, O'BRIEN & MADSEN, 2007).

Esta bactéria é incapaz de proliferar em presença do ar atmosférico, no entanto, também não cresce em meio anaeróbico, necessitando de condições de microaerofilia para o seu crescimento (5 a 7% de O₂, 10% de CO₂ e 85% de N₂). Em ágar sangue, as colônias são pequenas, medindo de um a três milímetros de diâmetro, lisas, translúcidas e não hemolíticas (VANDAMME & DE LEY, 1991; HOLT et al., 1994; BUTZLER, 2004; KEENER et al., 2004; HUMPHREY, O'BRIEN & MADSEN, 2007; KUANA, 2008). Já no ágar mCCDA (*Modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar, Oxoid*), meio considerado seletivo para *Campylobacter sp.*, as colônias são cinzas ou brancas, com formato irregular, arredondadas ou convexas (KONEMAN et al., 1992). Culturas mais velhas ou sob condições adversas de cultivo adquirem a forma cocóide ou corpos esféricos, que são associadas às bactérias viáveis, mas não cultiváveis. Esta ocorrência representa um estágio degenerativo do seu ciclo de vida, sem, contudo, levar à perda de seu poder infectante (FORSYTHE, 2002; SNELLING, et al., 2005).

A temperatura ideal de crescimento dos *Campylobacters* termofílicos é de 42°C em meios artificiais, sendo que a temperatura máxima de crescimento destes microorganismos é de aproximadamente 46°C e a mínima é de 30°C (HUMPHREY,

O'BRIEN & MADSEN, 2007). O pH para multiplicação dos *Campylobacters*, deve estar entre 4,9 (mínimo) e 9,5 (máximo), sendo ideal a faixa entre 6,5 a 7,5 (DAMAS & MARASSI, 2010). Além disto, crescem a uma concentração de cloreto de sódio de até 2%. Não produzem indol e não fermentam ou oxidam açúcares, obtendo energia a partir de aminoácidos ou componentes intermediários do ciclo do ácido carboxílico (ZHANG, 2008). São oxidase positivas e urease negativas. Podem ser catalase-positivas ou negativa, sendo as de maior importância do ponto de vista patogênico classificadas como catalase-positivas (JAY, 2000).

Campylobacters são capazes de sobreviver em uma grande quantidade de ambientes (KEENER et al., 2004). São sensíveis à dessecação, contudo podem resistir em ambientes úmidos por várias semanas (BACK, 2010). Também são sensíveis aos raios ultravioleta, à radiação gama e são rapidamente destruídos pelo calor, não sobrevivendo aos processos térmicos utilizados no preparo do alimento (FRANCO & LANDGRAF, 2005). São facilmente destruídos pela pasteurização ou pela cocção dos alimentos (ICMSF, 2005). À temperatura de geladeira (4°C), os microorganismos são inativados mais rapidamente que em temperatura ambiente. Além disto, são altamente sensíveis ao congelamento, que os inativa, no entanto, mesmo assim podem permitir sua viabilidade por várias semanas (FRANCO & LANDGRAF, 2005).

Mazieiro & Oliveira (2007) pesquisaram a prevalência de *Campylobacter termofilicos* em amostras de carne de frango frescas, refrigeradas a 4°C, por sete dias, e congeladas a -20°C, por 28 dias. Os autores encontraram uma prevalência de 93,3% em amostras frescas e 53,3% depois de refrigeração. 36,6% das amostras foram positivas para *Campylobacter* após 28 dias de congelamento a -20°C. Também Boufleur (2009) pesquisou a presença de *C. jejuni* por meio de isolamento e obteve 77,7% de positividade em amostras frescas de coração, 88,8% em amostras de fígado, 44,4% em amostras de moela, e 33,3% em amostras de drumete. Dentre todas as amostras frescas analisadas, 61,1% foram positivas para *C. jejuni*. Após o congelamento, em apenas 8,3% foi obtido o isolamento de *C. jejuni*, sendo duas amostras de fígado e uma de coração. Desta forma, Boufleur (2009) verificou que a bactéria sobrevive ao congelamento, apesar da sua redução progressiva, quando submetida aos processos térmicos.

2.1.1 Campilobacteriose nas Aves

Espécies aviárias, especialmente as domésticas são, frequentemente, infectadas por *Campylobacter* termofílicos, principalmente *C. jejuni* e *C. coli* (ZHANG, 2008). Bactérias do gênero *Campylobacter* encontram-se distribuídas mundialmente, em especial, nas regiões onde a criação comercial de frangos está estabelecida (SHANE & STERN, 2003), sendo a alta densidade um fator facilitador para a disseminação do agente entre as aves (ZHANG, 2008).

A transmissão de *Campylobacter* entre as aves ocorre principalmente por via horizontal, por meio do contato com ratos, aves selvagens, cascudinhos, moscas, cama, equipamentos, pessoas, água e equipamentos contaminados (BACK, 2010). Não há evidências de o *Campylobacter* possa ser transmitido por via vertical, nem que o ovo seja fonte de contaminação para o homem (BACK, 2010). Cerca de 2 a 4 dias após o início da eliminação bacteriana, 90-100% do lote torna-se infectado, devido à alta capacidade de transmissão horizontal do agente entre as aves. Após a infecção da ave, ela elimina a bactéria por várias semanas (SHANE & STERN, 2003).

As bactérias habitam o trato digestivo, sendo bem adaptadas aos hospedeiros aviários, que normalmente não apresentam sinais clínicos (ZHANG, 2008). *C. jejuni* coloniza principalmente as criptas profundas do ceco, sendo encontrado na camada de muco, perto das células epiteliais, onde números extremamente altos (até 10^{10} unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de intestino infectado) podem ser detectados (YOUNG, DAVIS & DIRITA, 2007). A alta incidência de *C. jejuni* em frangos pode ser reflexo da sua temperatura ótima de multiplicação, uma vez que o trato intestinal de aves tem temperatura superior à dos mamíferos, ou seja, cerca de 42° C (PARK, 2002).

Tanto em surtos naturais, como em condições experimentais, aves infectadas com mais de uma semana não apresentam sinais clínicos. Esses são observados somente quando pintinhos de um dia são inoculados com *Campylobacter*. Os pintos apresentam diarreia e prostração (BACK, 2010).

Os dados sobre prevalências da bactéria *Campylobacter* em plantéis brasileiros são bastante variáveis, assim como de outros países. Kuana (2008) analisou 22 lotes de frangos de corte com idade entre três e cinco semanas e observou 81,8% das amostras de conteúdos cecais positivos para o isolamento de *Campylobacter sp.* Gomes et al. (2006) isolaram *C. jejuni* de apenas 5,2%, das 404 amostras fecais de frangos provenientes de criações domésticas. Fonseca et al. (2007) detectaram *Campylobacter*

sp em 80% de amostras de pool de mecônio e em 54,55% das amostras de pool de fezes de matrizes.

Bouffleur (2009) avaliou a ocorrência de *C. jejuni* em granjas avícolas no estado do Rio Grande do Sul, correlacionando os índices de contaminação detectados com dados epidemiológicos obtidos através de entrevista com o responsável pela granja. Com este experimento, foram obtidas 52,5% das amostras positivas para *C. jejuni* e 11,07% das amostras foram identificadas como *Campylobacter sp.* Segundo Bouffleur (2009) a análise dos dados revelou existir influência dos índices de contaminação mais elevados com o número de aves alojadas, com o tempo de alojamento e de acordo com o sexo, sendo as fêmeas mais acometidas que os machos.

2.1.2 *Campylobacter jejuni* e o seu potencial zoonótico

Embora as espécies de *Campylobacter* termofílicas não sejam consideradas patógenos importantes nas aves, apresentam importância na segurança alimentar e em saúde pública (ZHANG, 2008), sendo o *C. jejuni* o principal responsável pelos casos de campilobacteriose em humanos, especialmente em crianças (CARVALHO et al., 2001). Assim, a pesquisa sobre a presença de *Campylobacter* potencialmente patogênico em animais domésticos e em alimentos de origem animal é fundamental para a segurança dos consumidores (WIECZOREK & OSEK, 2008).

São reconhecidas duas espécies de *Campylobacter jejuni* como unidades taxonômicas independentes. São elas a *Campylobacter jejuni subsp. jejuni* e a *subsp. doylei*. *Campylobacter jejuni subsp. doylei* tem sido isolada do terço inferior do estômago de pacientes com úlcera gástrica e gastrite crônica ativa, além de crianças com diarreia. Já *Campylobacter jejuni subsp. jejuni* apresenta a maior frequência de isolamento das espécies do gênero, e por isso, na maioria das vezes, é referida na literatura simplesmente como *Campylobacter jejuni* (FERNANDEZ, 2008).

Os alimentos de origem animal são considerados a principal fonte de infecção da campilobacteriose em humanos (ALTEKRUSE et al., 1999). Estima-se que 50-70% dos casos de campilobacteriose humana tenham origem alimentar e estejam relacionados ao consumo ou à manipulação de carne de frango crua contaminada (SHANE & STERN, 2003), sendo a contaminação de carcaças de frangos em abatedouros considerada o principal fator de risco para estas infecções (ROZYNEK, et al., 2005). A ingestão da

carne de frango contaminada crua, mal cozida ou recontaminada após o cozimento são as formas de transmissão mais comum em todo o mundo (KEENER et al., 2004).

Um grande número de bactérias pode estar presente no intestino das aves na ausência de lesões microscópicas e de sinais clínicos (BACK, 2010). Dessa forma, falhas no processo de evisceração, más condições de higiene e manipulação são pontos críticos na linha de abate para a contaminação de carcaças (CARVALHO, LIMA & PEREIRA, 2002). Talvez a forma mais importante para o alimento cárneo tornar-se veículo de infecção da campilobacteriose intestinal, seja através da transferência passiva do agente para outros alimentos durante o descongelamento e o processamento em locais comuns (SKIRROW, 1991). Neste aspecto, a carcaça de frango congelada assume importância capital, pois a água de degelo em contato com outros alimentos, principalmente os ingeridos *in natura*, poderia explicar a origem dos frequentes surtos (SCARCELLI & PIATTI, 2002).

Segundo o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*), a infecção por *Campylobacter* é a causa mais comum de diarreia bacteriana nos Estados Unidos (CDC, 2005), sendo *C. jejuni* responsável por 95% dos casos. Dentre as outras espécies termofílicas, *C. coli* é responsável por 4% e *C. lari* por cerca de 1%. *C. upsaliensis* tem sido relatado, principalmente, infectando crianças em países em desenvolvimento (NACHAMKIN & MISHU ALOOS, 2008).

Em 2008, a Rede de Vigilância de Doenças Transmitidas por Alimentos Active (FoodNet) estimou a incidência de 13 casos por 100.000 habitantes. Estima-se, ainda, que 2,4 milhões de pessoas são afetadas a cada ano, deste modo, o gênero é apontado como uma das principais causas de diarreia de origem bacteriana em todo o mundo, inclusive em países desenvolvidos (CDC, 2010). Nos Estados Unidos, segundo Bang, et al. (2001), estimou-se que há entre dois e oito milhões de casos, com 200 a 800 mortes por ano.

Na Dinamarca, 95% dos casos registrados de enterite bacteriana foram causados por *C. jejuni* (NIELSEN et al., 2000). No Japão, em 2007, *C. jejuni* foi responsável por 95% dos casos de intoxicação alimentar do país (ASAKURA et al, 2007). Na França, bactérias do gênero *Salmonella*, associadas às espécies de *Campylobacter* foram responsáveis por causar gastroenterites em 71 a 85% de todos os casos de infecções de origem alimentar no país em 2005 (VAILLANT, 2005).

C. jejuni é o agente causador de gastroenterite mais notificado na União Europeia (EFSA, 2009). Relatórios realizados pela *European Food Safety Authority*

(EFSA) mostraram cerca de 200 mil casos registrados em surtos de humanos decorrentes de *Campylobacter* - no ano de 2009 - em toda União Europeia, superando, em 4%, os dados encontrados em 2008.

No Brasil, a situação ainda é pouco conhecida, uma vez que a pesquisa de *Campylobacter sp.* não é conduzida como rotina em alimentos envolvidos em casos de toxinfecção alimentar (CARDOSO, 2009). No Brasil, Germano & Germano (2001) constataram que apenas 10% do número real de surtos de toxinfecções alimentares são confirmados, devido às deficiências dos serviços de vigilância epidemiológica e à falta de conscientização da população diante do problema.

Alguns autores têm relatado a presença de *Campylobacter sp.* em casos de diarreia aguda ou crônica e até em indivíduos assintomáticos no Brasil. Scarcelli et al. (2005) relataram que *C. jejuni* tem alcançado um índice de incidência próximo a 25,9%, sendo o segundo enteropatógeno bacteriano isolado de crianças menores de quatro anos de idade - no período de janeiro de 1998 a abril de 2001 - em São Paulo. Calzada et al. (1994) pesquisaram durante sete anos, também na cidade de São Paulo, amostras de fezes, obtendo o isolamento de 285 (3,7%) estirpes de *Campylobacter sp.* Em São Paulo, Palma et al. (1997) também observaram, que *Campylobacter spp.* foi o segundo agente mais isolado em casos de diarreia bacteriana em crianças, representando um percentual de 7,5% dos isolados. Na região Sul, Tosin & Machado (1995) relataram que 6,2% dos manipuladores de alimentos, principalmente nos indivíduos do sexo masculino eram portadores de *Campylobacter*.

2.1.3 Campilobacteriose nos humanos

A campilobacteriose normalmente é uma doença com manifestações gastrointestinais, que tende a manifestar uma melhora espontânea do quadro clínico do paciente (COCKER et al., 2002). A maioria dos casos de campilobacteriose ocorre de forma isolada, sendo incomum a ocorrência de surtos por *Campylobacter sp.* (SKIRROW et al, 1991). O homem adquire a infecção por via orofecal, pela ingestão de água e de alimentos contaminados, ou pelo contato com animais portadores (FERNANDEZ, 2008; KUMAR et al., 2001). A manipulação de filhotes de cães e gatos com diarreia causada por *Campylobacter sp.* pode ser uma forma de contágio, no entanto, apenas uma minoria dos casos de infecções ocorre por essa via. A principal forma de contágio ocorre através da ingestão de alimentos contaminados, especialmente

os de origem avícola. Um estudo de caso-controle nos Estados Unidos demonstrou que cerca de 50% dos casos de campilobacteriose humana tem origem veiculada pelo consumo de carne de frango (SKIRROW, 1991).

A infecção tem um período de incubação de um a dez dias, e a maioria das pessoas exibe sintomas clínicos por quatro dias (HUMPHREY, O'BRIEN & MADSEN, 2007). Os principais sintomas da campilobacteriose incluem desde diarreia aquosa, moderada e autolimitante até uma disenteria sanguinolenta, com presença de muco e células sanguíneas brancas, podendo ser acompanhada de dores de cabeça e abdominal, mialgias, febre, indisposição, náusea e vômitos (FERNANDEZ, 2008). Essas sintomatologias são semelhantes à causada por diversos outros microrganismos patogênicos entéricos (BUTZLER, 2004). Em comparação a outros enteropatógenos, *Campylobacter sp* possui uma baixa dose infectante de aproximadamente 500 organismos, enquanto outros microrganismos, como a *Salmonella* requerem doses maiores que 10^5 organismos (ANON, 1993). Esse fato, segundo Butzler (2004) pode representar um agravante para a manifestação tão alta da campilobacteriose em humanos.

As infecções por *Campylobacter jejuni* são geralmente autolimitantes, e dispensam tratamento antimicrobiano. No entanto, quando a terapêutica é indicada, o antimicrobiano de escolha é a eritromicina, especialmente em crianças. Em adultos, recomenda-se também a ciprofloxacina (FERNANDEZ, 2008).

2.1.3.1 Complicações de Campilobacterioses

Raramente a infecção por *Campylobacter spp.* resulta em consequências que permanecem por longo prazo (WHO, 2011). Não obstante, em alguns casos, podem ocorrer graves sequelas da infecção, como a Síndrome de Guillain-Barré (SGB). Outras patologias que podem estar associadas são a síndrome de Fisher, uma variante da Síndrome de Guillain-Barré, e a Síndrome de Reiter, responsável pela ocorrência de artrite reativa. Tais doenças aparentemente ocorrem devido a uma semelhança nos antígenos presentes em algumas cepas de *C. jejuni* com proteínas encontradas nos gangliosídeos neuronais de seres humanos (DORREL & WREN, 2007).

A SGB é uma doença que afeta o sistema nervoso periférico, causando desmielinização de neurônios e resultando em paralisia neuro-muscular. Trata-se da maior causa de paralisia flácida generalizada no mundo, com incidência anual de um a

quatro por 100.000 habitantes, e pico entre 20 e 40 anos de idade. Não existem dados epidemiológicos específicos para o Brasil (BRASIL, 2009).

A SGB é uma doença de caráter autoimune que acomete primordialmente a mielina da porção proximal dos nervos periféricos de forma aguda/subaguda. O mecanismo patogênico da síndrome resulta da similaridade entre oligossacarídeos dos lipopolissacarídeos de *C. jejuni* e o gangliosídeo GM1 da membrana dos neurônios periféricos, estimulando desta forma, a ocorrência de uma doença auto-imune (MOORE, 2005). Altekruze et al. (1999) estimam que ocorra um caso de SGB para cada mil casos de campilobacteriose. Estimam também que 20% dos casos de SGB ficam com alguma seqüela motora e 5% acabam morrendo, geralmente, devido a complicações de ordem respiratória.

Aproximadamente de 60% a 70% dos pacientes com SGB apresentaram alguma doença aguda de uma a três semanas antes dos sintomas aparecerem, sendo a infecção por *C. jejuni* a mais freqüente (32%). Outras associações podem ser citomegalovirus (13%), vírus Epstein Barr (10%) e outras infecções virais, tais como hepatite por vírus tipo A, B e C, influenza e HIV (BRASIL, 2009).

A maioria dos pacientes percebe inicialmente a doença através da sensação de parestesias nas extremidades distais dos membros inferiores e, em seguida, superiores. Fraqueza progressiva é o sinal mais perceptível ao paciente, ocorrendo geralmente nesta ordem: membros inferiores, braços, tronco, cabeça e pescoço. A intensidade pode variar desde fraqueza leve, que sequer motiva a busca por atendimento médico em nível primário, até a ocorrência de tetraplegia completa com necessidade de ventilação mecânica por paralisia de musculatura respiratória acessória (BRASIL, 2009).

Outra síndrome decorrente da infecção por *C. jejuni* é a síndrome de Reiter, ou artrite reativa, que se caracteriza por uma resposta autoimune, a qual provoca inflamação (artrite) em diferentes articulações em resposta à infecção pela bactéria. A inflamação é mais frequente em grandes articulações que suportam o peso, como as dos joelhos e a parte inferior das costas, mas outras articulações também podem ser acometidas (MURRAY, 2007).

2.1.4 Medidas de Higiene para a prevenção de Campilobacteriose

Devido à grande difusão do *Campylobacter* no meio ambiente, o tratamento dos animais, especialmente das aves, não traz benefícios, uma vez que a reinfecção pode

ocorrer logo após o seu término. Da mesma forma, manter lotes livres da infecção é uma tarefa árdua, mesmo com as melhores formas de biossegurança e de prevenção (BACK, 2010).

Assim, recomenda-se que o controle e a prevenção da campilobacteriose se dêem por meio da adoção de hábitos de higiene e de segurança alimentar. Segundo Damas & Marassi, é recomendado não beber água não-tratada, usar apenas utensílios limpos para preparar ou manusear alimentos cozidos e crus. Além disso, todos os utensílios utilizados para preparar carnes, aves ou frutos do mar crus, inclusive a mesa ou a bancada, devem ser lavados antes do contato com qualquer outro alimento. O armazenamento dos alimentos deve ser em temperatura abaixo de 5° C e alimentos cozidos dispostos acima de alimentos crus, evitando assim, principalmente que a água de degelo contamine outros alimentos. Outras medidas de higiene como lavar sempre as mãos com água e sabão antes de comer, antes de preparar alimentos, após ir ao banheiro, após trocar fraldas e após tocar em animais de estimação podem reduzir possíveis formas de contaminação, não só de *Campylobacter*, como também de outros enteropatógenos.

2.2 FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Campylobacter jejuni*

Campylobacters são reconhecidos como líderes no desenvolvimento de gastroenterites em humanos, não obstante, seus mecanismos de patogenicidade não estão muito bem elucidados (WIECZOREK & OSEK, 2008). Atualmente os fatores de virulência conhecidos têm sido relacionados à patogênese do *C. jejuni* em infecções humanas e animais (DATTA, NIWA & ITOH, 2003). Fatores de virulência são qualquer componente do microrganismo que seja necessário para provocar doença ou para potencializar a capacidade do agente no desenvolvimento de uma patologia (SCHAECHTER et al., 1999). Tais fatores podem ser componentes estruturais ou toxinas (FERNANDEZ, 2008), podendo estar relacionados à adesão à mucosa intestinal, à motilidade flagelo-mediada, à capacidade de invasão, à capacidade de produzir toxinas (WIECZOREK & OSEK, 2008) e à quimiotaxia (KETLEY, 1997).

2.2.1 Adesão

A adesão é uma estratégia que as bactérias utilizam para se fixar nas células e nos tecidos do organismo. É mediada por estruturas da superfície da célula bacteriana, definidas como adesinas, as quais somente funcionam com a interação de receptores existentes no organismo, sejam eles proteínas da matriz extracelular, ou estruturas da superfície da célula bacteriana (SIRCILLI & TRABULSI, 2008). A ligação de bactérias patogênicas às células fagocíticas foi sugerida como um determinante de virulência importante, pois previne a bactéria de ser sequestrada por mecanismos inespecíficos de defesa do organismo, tais como o peristaltismo e o escoamento de fluidos (BANG *et al.*, 2003).

As adesinas são representadas principalmente por fímbrias. *C. jejuni* não possui fímbrias, no entanto, elementos estruturais como algumas proteínas de membrana externa, o flagelo, e o LPS (lipopolissacarídeo) atuam como adesinas, permitindo a adesão da bactéria à célula epitelial e ao muco intestinal. Esta adesão pode ser inibida naturalmente pelo colostro, ou, experimentalmente, por anticorpos específicos antiflagelares (FERNANDEZ, 2008).

Ensaio de aderência *in vitro* têm sido utilizados extensivamente para caracterizar as interações de *C. jejuni* com células hospedeiras e para tentar identificar as proteínas bacterianas que mediam esta ligação. Apesar de *C. jejuni* ter capacidade de se ligar a células de origem humana (INT 407, HEP-2, HeLa, e 293) e de origem não humana (Vero, CHO-K1, e MDCK) com a mesma eficiência, a ligação de *C. jejuni* a células INT 407 (Henle, uma linha de células humanas epiteliais do intestino) e a células Caco-2 (uma linha celular humana do cólon) têm sido mais extensivamente estudadas já que estas células são tidas como mais representativas para os encontrados *in vivo* de *C. jejuni* (KONKEL, 2001).

Algumas adesinas de *C. jejuni* são *CadF* (*Campylobacter adhesion to fibronectin [Fn]*), *CapA* (*Campylobacter adhesion protein*), *JlpA* (*jejuni lipoprotein A*) (JIN *et al.*, 2001) e *PEB1* (*Protein Pei, Ellison and Blaser*) (PEI & BLASER, 1993; FLANAGAN *et al.*, 2009).

A proteína extramembrana *CadF* permite a adesão de *Campylobacter* às células eucarióticas, ligando-se especificamente à fibronectina, que ajuda na ligação de *C. jejuni* a células epiteliais intestinais (KONKEL *et al.*, 1999). *CadF* é necessário para a máxima ligação e invasão por *C. jejuni in vitro* (YOUNG, DAVIS & DIRITA, 2007),

tendo sido observado que gene *cadF* mutantes não são capazes de colonizar cecos de frangos (WIECZOREK & OSEK, 2008). Estudos têm demonstrado que *CadF* e seus produtos são conservados entre os isolados de *Campylobacter* (KONKEL *et al.*, 1999), sendo encontradas altas frequências do gene *cadF* entre os isolados pesquisados, de diferentes origens. Datta, Niwa & Itoh (2003) encontraram frequência de 100%, num total de 101 amostras de diferentes origens (amostras clínicas humanas, amostras de carne de frango, fezes de frangos de corte e fezes de bovinos). Rozynek *et al.* (2005) pesquisaram o gene *cadF* em frangos e em crianças com *C. jejuni* e *C. coli* e encontraram altas frequências do gene (de 98 a 100%), e assim, sugeriram que o mesmo parece ser essencial para a colonização em frangos e para a infecção humana. Outros autores como Konkel *et al.* (1999), Bang *et al.* (2003) e Wieczorek & Osek (2008) também relataram frequências de 100% para a presença de *cadF*.

O gene *capA* codifica uma lipoproteína de autotransporte relacionada com a adesão à célula *Caco-2* (HERMANS *et al.*, 2011). Sua deficiência pode diminuir a persistência da colonização. Foi observado que a inserção de um gene *capA*-mutante apresentou uma capacidade significativamente reduzida para associação e invasão de células *Caco-2* e que, portanto, não conseguiu colonizar e persistir em galinhas. Tal estudo indica que *capA* desempenha um papel na associação hospedeiro e colonização por *Campylobacter* (ASHGAR *et al.*, 2007).

A *JlpA* é uma lipoproteína de superfície exposta de *C. jejuni*, que facilita a ligação da bactéria às células epiteliais. Estudos indicam que a *JlpA* é essencial à ligação em células tumorais *HEp-2* (JIN *et al.*, 2001). Além disso, *JlpA* contribui para respostas pró-inflamatórias (YOUNG, DAVIS & DIRITA, 2007). O mecanismo de interação entre a adesina e a célula hospedeira envolve a resposta imunológica do hospedeiro. A adesina provoca uma via de sinalização que induz a resposta inflamatória nas células hospedeiras (JIN *et al.*, 2001). Isto indica que algumas das reações inflamatórias observadas durante a patogênese por *C. jejuni* podem estar relacionadas à adesão dependente de *JlpA* (YOUNG, DAVIS & DIRITA, 2007).

A adesina *PEBI*, também conhecida como fator de ligação celular, é uma proteína localizada no periplasma. Sua função está relacionada com a adesão à linhagem celular do tipo *HeLa* (PEI *et al.*, 1998). *PEBI* tem homologia com proteínas da membrana de outras bactérias gram-negativas, as quais têm função no transporte de aminoácidos. *PEBI* liga-se tanto ao aspartato, quanto ao glutamato com alta afinidade.

Mutantes deficientes em *PEBI* não podem crescer se estes aminoácidos são as principais fontes de carbono (KONKEL et al., 2001).

Os lipopolissacarídeos (LPS), também denominados endotoxinas, são constituintes da membrana externa da maioria das bactérias gram-negativas, incluindo *C. jejuni* (MORAN, 1997). O LPS é constituído de um lipídeo complexo (Lipídeo A) de oligossacarídeo (região do *core*), o qual é constituído de um oligossacarídeo de cadeia ramificada, dividido em uma região interna mais conservada e uma região externa mais variável (KONKEL et al., 2001) e de polissacarídeo chamado *antígeno O* ou antígeno somático (MADIGAN et al., 2010). A cadeia lateral do polissacarídeo é composta de açúcares que variam entre as espécies, sendo responsáveis pelas características antigênicas nas bactérias gram-negativas (ALTERTHUM, 2008).

Moléculas de LPS, sem o antígeno “O” são referidas como lipo-oligossacarídeos (LOS). Cepas de *C. jejuni* podem produzir LPS e/ou LOS (KONKEL et al., 2001). Os lipo-oligossacarídeos (LOS) de *Campylobacter* podem ser semelhantes às estruturas dos gangliosídeos neurais (POLY & GUERRY, 2008), e esse mimetismo molecular pode estar relacionado a distúrbios auto-imunes, incluindo síndrome de Guillain-Barré (SGB), uma neuropatia parálitica que ocorre em, aproximadamente, um em cada 1.000 casos de pacientes com campylobacteriose (YOUNG, DAVIS & DIRITA, 2007).

Outras moléculas propostas para atuarem como adesinas incluem as Proteínas de Membrana Externa Principais (MOMP, também chamado de OmpE), a P95, *pldA* e o flagelo. Estas moléculas são listadas como possíveis adesinas porque suas propriedades adesivas não são totalmente caracterizadas (KONKEL et al., 2001; HERMANS et al., 2011). A grande vantagem de a bactéria possuir múltiplas adesinas está no fato de que estas moléculas podem agir individualmente ou em conjunto ou em diferentes estágios da infecção e mostram que a adesão é um passo chave para o processo de colonização de *C. jejuni* (KONKEL et al., 2001).

2.2.2 Motilidade

A motilidade é um dos fatores mais importantes para determinar a patogenicidade de *C. jejuni*, sendo mediada principalmente pela presença de flagelo, que pode ser mono ou anfitriúo (WIECZOREK & OSEK, 2008). Os flagelos são muito finos e movimentam-se em velocidades elevadas, proporcionando o deslocamento das bactérias ao longo de distâncias muito superiores ao seu

comprimento. Os flagelos são formados por uma estrutura basal, um gancho e um longo filamento externo à membrana, sendo composto por um único tipo de proteína, chamada flagelina (ALTERTHUM, 2008). A flagelina é codificada pelos genes *flaA* e *flaB* (WIECZOREK & OSEK, 2008).

Flagelos e motilidade flagelar são vitais para muitos aspectos da biologia do *C. jejuni*, incluindo a colonização do hospedeiro, a virulência em modelos experimentais, a secreção e a invasão na célula hospedeira (YOUNG, DAVIS & DIRITA, 2007). *C. jejuni* é caracterizado pela sua rápida motilidade conferida por flagelos polares, que o ajudam a superar o peristaltismo intestinal e facilitam a sua travessia pela camada de muco. Mutantes de *C. jejuni* imóveis, com flagelo incompleto ou com ausência de flagelo não conseguem colonizar o trato gastrointestinal ou requerem grandes quantidades de inóculo, em relação às cepas móveis com flagelo completo (GUERRY, 2007; LODGE, 2007).

Muitos estudos têm sido realizados para a detecção de genes *flaA* e *flaB* e tem sido detectada maior presença do gene *flaA*, que do gene *flaB*, sugerindo que *flaA* seja essencial para a motilidade bacteriana (WIECZOREK & OSEK, 2008). Bang et al. (2001), Datta, Niwa & Itoh (2003) e Wieczorek & Osek (2008) são exemplos de pesquisadores que detectaram o gene *flaA* em 100% das amostras testadas, resultados que podem sugerir que o produto do gene *flaA* é necessário para a colonização bacteriana do trato digestivo dos animais e permite às bactérias aderirem à superfície das carcaças de aves contaminadas, conforme estudo relatado por Wieczorek & Osek (2008).

2.2.3 Quimiotaxia

A frequência das mudanças de direção que ocorrem durante a movimentação bacteriana em resposta a sinais extracelulares é regulada por uma alternância entre o sentido horário e o sentido anti-horário de rotação do flagelo. O resultado deste processo é chamado de quimiotaxia (YOUNG, DAVIS & DIRITA, 2007). Os mecanismos de quimiotaxia fazem o microrganismo se movimentar na direção ou no sentido oposto ao estímulo químico (KONKEL et al., 2001). A resposta quimiotática de *C. jejuni* é importante para direcionar o patógeno a locais específicos no trato intestinal que sejam favoráveis ao seu desenvolvimento e à sua multiplicação. Além disso, também é importante para o seu afastamento dos ambientes desfavoráveis (KONKEL et al., 2001).

A quimiotaxia, provavelmente, tem um papel importante tanto no estilo de vida comensal, quanto no patogênico (YOUNG, DAVIS & DIRITA, 2007).

C. jejuni exibe motilidade quimiotática para os aminoácidos que são encontrados em níveis elevados no trato gastrointestinal de pintinhos e para os componentes do muco (YOUNG, DAVIS & DIRITA, 2007). *C. jejuni* apresenta resposta quimiotática positiva para a mucina, uma glicoproteína de alto peso molecular, que contém L-fucose como o seu açúcar terminal. Além disso, também exibem uma resposta quimiotática positiva para os aminoácidos: L-aspartato, L-cisteína, L-glutamato e L-serina, L-asparagina, D-lactato, bem como os ácidos orgânicos intermediários do ciclo do ácido tricarbóxico (piruvato, succinato, fumarato, citrato, malato e cetogluturato) (KONKEL et al., 2001; HERMANS, et al., 2011)

Os sinais extracelulares, muitas vezes açúcares ou aminoácidos, são detectados pelos quimiorreceptores, que são chamados de Proteínas Quimiorreceptoras Aceitadores de Metil (MCPs- *Methylaccepting Chemotaxis Protein*), que normalmente contêm um domínio periplasmático que se liga ao sinal (KONKEL et al., 2001). Os genes *docB* (*determinant of chick colonization gene B*), *docC* (*determinant of chick colonization gene C*), *acfB* (*accessory colonization factor*) têm sido descritos como possíveis MCPs. Além disso, o genoma de *C. jejuni* contém genes que codificam supostas proteínas de adaptação: a *CheB* (*methylesterase*) e a *CheR* (*methyltransferase*), que estão envolvidas em uma via quimiotática dependente de metilação. Outros genes também têm sido associados à quimiotaxia em *C. jejuni*, incluindo os genes *cetA* e *cetB* e os genes reguladores *CheY*, os quais codificam uma resposta regulatória capaz de controlar a rotação flagelar (HERMANS, et al., 2011).

2.2.4 Invasão

Muitas bactérias têm a capacidade de aderir e invadir diferentes células do organismo no início do processo infeccioso. Essa invasão ocorre basicamente através da fagocitose (SIRCILLI & TRABULSI, 2008), ou mais especificamente, por meio da endocitose. A endocitose inicia com a sinalização na superfície da célula hospedeira, que é reconhecida pelos receptores presentes na membrana celular. Estes receptores estão associados às proteínas citoplasmáticas, que formam uma depressão na membrana externa, a qual aumenta e evolui para vacúolos citoplasmáticos quando os receptores estão ligados aos microrganismos. (LEVIN, 2007). O vacúolo formado migra até a

lâmina própria e então *C.jejuni* é liberado juntamente com o conteúdo da célula epitelial, desencadeando um processo inflamatório (KONKEL et al, 2001; LEVIN, 2007).

A capacidade de *C. jejuni* em invadir a célula hospedeira envolve tanto fatores bacterianos, quanto fatores da célula hospedeira, no entanto, ainda não estão completamente elucidados (FERNANDEZ, 2008). Vários fatores têm sido associados à adesão de *C. jejuni* às células hospedeiras, entre eles podem ser citados a cápsula bacteriana, o plasmídeo pVir, a proteína *CiaB*, *gene iam*.

A cápsula de *C. jejuni* é um polissacarídeo altamente variável e importante para a sororesistência, a adesão e a invasão de células epiteliais, a colonização em pintinhos e a virulência em modelos experimentais (YOUNG, DAVIS & DIRITA, 2007). É composta por repetidos polissacarídeos, e desempenha um importante papel na patogênese de *C. jejuni*, já que protege o agente das defesas do organismo hospedeiro (KONKEL, et al., 2001). Genes ligados à formação da cápsula incluem o *kpsM* (*capsular polysaccharide transporter gene M*), *pglH* (*probable glycosyltransferase*) e *cj1496c* (*glycoprotein with unknown function*). A mutação no gene *kpsM*, e consequente perda de um glicano de alto peso molecular e, portanto, ausência de uma cápsula, não permite, ou permite em números reduzidos, a colonização da bactéria em frangos (HERMANS, et al., 2011).

Muitos dos genes ligados à invasão por *Campylobacter* são inseridos no plasmídeo pVir, como por exemplo, o gene *virB11*, que codifica a proteína IV do sistema de secreção. Cepas com mutação na seqüência *virB11* tem muito mais baixa adesão e capacidade de penetração *in vitro* em comparação com as cepas originais, bem como menor patogenicidade *in vivo* (WIECZOREK & OSEK, 2008). Vários estudos têm observado a presença do gene *virB11* em amostras de *Campylobacter* e têm sido encontrados percentuais de positividade entre 1,8 e 20,8% (BANG, et al., 2001; DATTA, NIWA & ITOH, 2003; SCHMIDT-OTT et al., 2005; WIECZOREK & OSEK, 2008). As razões dessa discrepância de prevalência e o verdadeiro papel desse gene em *Campylobacter* ainda não estão totalmente elucidados. Wieczorek & Osek (2008) sugerem que as diferenças geográficas, a progressão da doença em cada paciente, ou as diferenças de *primers* utilizados e diferentes condições de amplificação do gene aplicados na identificação de *virB11* pelos diferentes autores possam interferir nos resultados e explicar possíveis diferenças.

C. jejuni secreta uma proteína chamada *CiaB* (*Campylobacter invasion antigens B*), que é necessária para a invasão de células epiteliais. Em estudos *in vitro*, mutantes que não apresentam *CiaB* têm níveis reduzidos de colonização, o que implica que a invasão de células pode ser um fator subestimado na colonização do pintinho (YOUNG, DAVIS & DIRITA, 2007). A secreção desta proteína requer um estímulo ambiental como, por exemplo, a presença de sais biliares no ambiente, componentes da célula hospedeira (RIVERA-AMILL et al., 2001). Datta, Niwa & Itoh (2003) pesquisaram o *CiaB* em amostras clínicas humanas, amostras de carne de frango, fezes de frangos de corte e fezes de bovinos e encontraram frequências variando entre 84,6 e 100%.

O gene *iam* (*invasion-associated marker*) também tem sido associado ao processo de invasão de *Campylobacter* (CARVALHO et al., 2001). Carvalho et al. (2001) encontraram 85% das amostras positivas ao pesquisarem a presença do gene em isolados de crianças com diarreia, ao passo que, ao pesquisarem amostras de pacientes assintomáticos encontraram uma frequência de apenas 20%. Assim, sugeriram que o *locus* poderia ser utilizado como marcador de cepas invasivas de *Campylobacter*. Outro estudo, conduzido por Wieczorek & Osek (2008), detectou também a presença do marcador, revelando a frequência de 66% nas cepas investigadas. Este gene foi predominante em cepas de *C. coli*, assim como no estudo descrito anteriormente. *C. jejuni* apresentou a frequência de apenas 46,7% nas diferentes origens amostrais, sendo as carcaças de frango 32,7% positivas e as fezes 65% positivas para a presença do gene. Entretanto, Rozynek et al. (2005) encontraram a presença do mesmo gene em somente 20% dos isolados obtidos em pacientes com diarreia, sendo somente 1,6% positivos em amostras de *C. jejuni* e por isso, relatam que *iam* não pode ser considerado um marcador universal de severidade da infecção por *Campylobacter*.

2.2.5 Toxinas

As toxinas bacterianas têm sido definidas como substâncias que alteram o metabolismo normal das células do hospedeiro, causando efeitos prejudiciais ao mesmo (SCHMITT et al., 1999). Assim, toxinas produzidas por *Campylobacters* também são importantes fatores de virulência (WIECZOREK & OSEK, 2008). Dois grupos de toxinas são isoladas deste gênero bacteriano: enterotoxinas e citotoxinas. Existem cepas que apresentam, simultaneamente, a produção de ambas (KETLEY, 1997; WASSENAAR, 1997).

As enterotoxinas são proteínas secretadas com a capacidade de se ligar a um receptor celular, entrar na célula e elevar o AMP cíclico. Quando as enterotoxinas se ligam ao receptor celular, há o transporte para o interior da célula do hospedeiro, que, após a ativação proteolítica, desregula a enzima adenil ciclase, levando ao aumento dos níveis do AMP cíclico e da secreção celular, o que pode resultar em diarreia aquosa (WASSENAAR, 1997).

Atividades das enterotoxinas de *C. jejuni* têm sido detectadas em cultivos celulares como CHO (Célula de ovário de hamster chinês transformada) e Y-1 (célula de tumor de glândula adrenal de rato). Alguns trabalhos demonstram a produção de enterotoxina semelhante à toxina colérica, mas a sua real existência ainda não foi comprovada, uma vez que ainda não houve caracterização de genes que codificam a toxina cólera-like (BERESWILL & KIST, 2003).

A citotoxina mais bem caracterizada em *Campylobacter* é a toxina *Citoletal Distensiva (CDT)*, já detectada em várias amostras da bactéria em diversos lugares do mundo, inclusive no Brasil (PICKETT et al., 1996; PURDY et al., 2000; WASSENAAR, 1997; DATTA, NIWA & ITOH, 2003; WIECZOREK & OSEK, 2008; CARVALHO, 2008). A toxina *Citoletal Distensiva (CDT)* foi descrita, pela primeira vez, em 1988 por Johnson e Lior, e é um dos principais fatores de virulência de *C. jejuni*. *CDT* constitui uma família de toxinas proteicas, também produzidas por um grupo diversificado de outras espécies de bactérias (LARA-TEJERO & GALÁN, 2001), incluindo *E. coli*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus ducreyi* e *Helicobacter hepaticus* (YOUNG, DAVIS & DIRITA, 2007).

A *CDT* afeta as camadas das células epiteliais, causando distensão e morte em várias linhagens celulares, entre elas CHO, Vero, HeLa e HEp-2, devido ao acúmulo intracelular dos níveis de AMP cíclico (MARTINEZ et al., 2006). A atividade da *CDT* pode diferir ligeiramente, dependendo da linhagem celular afetada. O mecanismo patogênico relacionado à *CDT* age pela inibição da imunidade humoral e celular, via apoptose de células de resposta imune. Dessa forma, pode gerar necrose do epitélio celular e dos fibroblastos envolvidos na reparação de lesões produzidas por patógenos, resultando em lenta cicatrização e na indução dos sintomas da doença (SMITH & BAYLES, 2006). Portanto, interfere na divisão e diferenciação das células das criptas intestinais, contribuindo para o desenvolvimento de diarreia (PARK, 2002).

A atividade da toxina *CDT* em *Campylobacter jejuni* é codificada pelos genes do complexo *CDT*, que consistem em três genes adjacentes denominados *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*

(MARTINEZ et al., 2006). A presença dos três genes é requerida para a completa atividade da toxina (ASAKURA *et al.*, 2007). Smith & Bayles (2006) observaram que mutações nos genes *cdt*, que possam causar perda da função em alguma das três subunidades, impedem a célula bacteriana de induzir a citotoxicidade. Por outro lado, um estudo demonstrou que a presença dos genes *cdtB* e *cdtC* e a ausência do gene *cdtA*, apenas, tenham produzido menor citotoxicidade (LEE, et al., 2003).

A proteína produzida pelo gene *cdtB* potencializa o bloqueio do ciclo celular, e as proteínas dos genes *cdtA* e o *cdtC* funcionam como subunidades diméricas, que transportam a proteína do *cdtB* e a interiorizam na célula hospedeira (CARVALHO, 2009; ABUOUN et al., 2005).

CdtB é conhecido como o componente tóxico da holotoxina e tem localização nuclear. Acredita-se que ele atue como uma DNase, já que compartilha similaridade com a família de DNase I. *CdtB* localiza-se no núcleo das células do hospedeiro, onde causa danos ao DNA e, finalmente, a fosforilação da proteína histona H2AX. *CdtB* tem atividade DNase fraca *in vitro*, e os estudos que tentaram determinar se o dano ao DNA *in vivo* é um resultado direto ou indireto da atividade *CdtB* não obtiveram resultados significativos (YOUNG, DAVIS & DIRITA, 2007).

2.3 BIOLOGIA MOLECULAR COMO FERRAMENTA DE DETECÇÃO DE *Campylobacter sp.*

O estudo da biologia molecular representa hoje uma das áreas de maior potencial para a realização de pesquisas na área médica e veterinária, considerando-se não apenas sua grande relevância clínica e epidemiológica, mas também pela possibilidade de aplicação de ferramentas recentemente desenvolvidas a um número bastante amplo de doenças (PINHO, 2006). Muitas técnicas são descritas na biologia molecular e nas últimas décadas verificou-se o aumento significativo no desenvolvimento destas para a detecção, identificação e caracterização de bactérias patogênicas em alimentos. Gandra, et al. (2008), classificam as técnicas de biologia molecular em duas linhas, sendo a primeira fundamentada na extração e no tratamento de ácidos nucleicos e a segunda baseada na técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).

2.3.1 Técnicas moleculares de extração e de tratamento de ácidos nucleicos

As primeiras técnicas moleculares utilizadas, há mais de duas décadas, são fundamentadas na extração e no tratamento de ácidos nucleicos. Dentre estas, podem-se destacar a análise do perfil plasmidial, a análise de DNA cromossômico após digestão por enzima de restrição (*Restriction endonuclease analysis - REA*), a ribotipagem (*Ribotyping*) e a eletroforese em gel de campo pulsante (*pulsed-field gel electrophoresis - PFGE*) (GANDRA et al., 2008).

2.3.1.1 REA – Análise de Restrição por Endonucleases

A análise de DNA cromossômico, após digestão por enzima de restrição (*restriction endonuclease analysis - REA*), tem sido usada há vários anos como ferramenta epidemiológica para estudo de surtos de doenças de origem viral ou bacteriana (DESTRO, 1995; AARESTRUP, 2004). Este método envolve a comparação do número e do tamanho de fragmentos produzidos por digestão do DNA genômico com enzimas de restrição (MASLOW et al., 1993; SILVA, 2002). Assim, uma endonuclease de restrição corta enzimaticamente o DNA em uma sequência específica de reconhecimento de nucleotídeos, gerando dois ou vários fragmentos (SILVA, 2002). Estes fragmentos podem ser separados por tamanho, utilizando a eletroforese clássica em gel de agarose e seus padrões são determinados após coloração em gel de agarose com brometo de etídio e fotografia sob luz ultravioleta (DESTRO, 1995).

A vantagem da análise de restrição do DNA genômico é que, diferente do perfil plasmidial, ela é universalmente aplicável. Apresenta a desvantagem de poder gerar numerosos fragmentos de restrição de tamanhos muito próximos, às vezes, impossibilitando a análise (SILVA, 2002). O uso de técnicas de transferência de DNA para suportes como membranas de náilon ou nitrocelulose (*Southern Blotting*) e hibridização com sondas marcadas podem simplificar a análise dos fragmentos (SILVA, 2002).

2.3.1.2 Ribotipagem

Desde a sua primeira descrição por Grimont & Grimont (1986), a ribotipagem tem emergido como um importante método disponível para investigação

epidemiológica, utilizando o RNA ribossomal (rRNA) como sonda (UENO & JORGE, 2002). A ribotipagem está baseada na presença de três a cinco cópias dos genes ribossomais no DNA bacteriano. Estes genes contêm sequências altamente conservadas dentro dos gêneros ou famílias bacterianas (GANDRA et al., 2008) que podem hibridizar com genes do rRNA de qualquer espécie (UENO & JORGE, 2002). Na ribotipagem, as sequências dos genes 16S e 23S RNAr marcados são usados como sonda e cada fragmento do DNA contendo o gene ribossômico será destacado dos demais, originando menor número de bandas que podem ser mais facilmente comparadas (DESTRO, 1995).

2.3.1.3 PFGE

PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) é a sigla usada para indicar qualquer técnica de eletroforese apropriada para separar grandes fragmentos de DNA, por meio da reorientação do DNA em gel pela ação de campos elétricos alternados. Esta técnica é reconhecida como padrão ouro para identificação de linhagens bacterianas, fúngicas e de protozoários (MAGALHÃES et al., 2005). PFGE tornou-se uma das técnicas mais utilizadas para análise epidemiológica da maioria das bactérias patogênicas (AARESTRUP, 2006; RODRÍGUEZ-LÁZARO et al., 2007), pois permite comparar cepas bacterianas a fim de verificar similaridades ou diferenças entre elas.

A PFGE é um método derivado da eletroforese convencional em gel de agarose, sendo a principal diferença a mudança repetida da orientação do campo elétrico utilizado na migração do DNA. Esta mudança provoca o rearranjo da estrutura conformacional da molécula, permitindo a sua migração no gel (DESTRO, 1995). Quando ocorre troca na direção do campo elétrico, as moléculas de DNA são compelidas à reorientação, para se posicionarem de forma paralela ao campo de força, antes de migrarem para a direção do pólo positivo. Os fragmentos menores se reorientam com maior facilidade que os maiores, que demoram mais para se adaptarem à nova direção. O tempo entre as mudanças de orientação pelo campo elétrico é chamado tempo de pulso (*switch time*) (MAGALHÃES et al., 2005).

2.3.2 A técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

A genética molecular evoluiu por meio da PCR, a qual permite a rápida clonagem e a análise do DNA (KOCH & MICHELSEN DE ANDRADE, 2008). Trata-se de uma técnica bastante flexível, a qual permite uma série de modificações que possibilitam o seu emprego na análise de uma grande variedade de amostras (CASTELANI & DUARTE, 2011). O surgimento da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), nos meados dos anos 80, revolucionou completamente o diagnóstico laboratorial, tornando-o mais ágil, sensível e específico (ROCHA, 2008).

A técnica de PCR foi descrita pela primeira vez em 1985, por Saiki et al. Logo após, Mullis et al. (1987) aperfeiçoaram-na introduzindo o conceito de *primer* ou iniciador e o uso de uma enzima termoestável (*taq* DNA Polimerase), a qual é isolada de uma bactéria que vive em fontes termais, conhecida como *Thermus aquaticus*. Esta enzima possui a propriedade de se manter estável em temperaturas altas facilitando a realização da técnica.

A PCR é uma técnica altamente sensível, por meio da qual, pequenas quantidades de sequências de DNA ou RNA específicas podem ser enzimaticamente amplificadas até que sejam obtidas milhões de cópias da sequência alvo (KONEMAN et al., 2001). Caracteriza-se por reações *in vitro* de amplificação do DNA, em que ocorre uma replicação exponencial do DNA alvo na presença de oligonucleotídeos sintéticos (dNTP), *primers* e enzimas estáveis a elevadas temperaturas (HILLER, 2010). Para permitir tal amplificação seletiva, alguma informação prévia a respeito das sequências-alvo é necessária. Essa informação é utilizada para desenhar dois oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), os quais são específicos para a sequência-alvo e apresentam, em média, de 15 a 25 nucleotídeos de extensão (KOCH & MICHELSEN DE ANDRADE, 2008).

Os *primers* são adicionados ao DNA-molde desnaturado, ocorrendo assim a ligação específica às sequências de DNA complementares ao sítio-alvo, flanqueando e delimitando a região a ser analisada. Na presença de uma concentração adequada da DNA-polimerase termoestável e dos quatro desoxirribonucleosídeos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), é iniciada a síntese de novas fitas de DNA, que são complementares a cada uma das fitas de DNA do segmento-alvo (STRACHAN et al., 2002).

A amplificação ocorre durante repetidos ciclos de temperatura. Primeiramente, deve ocorrer a desnaturação do DNA, geralmente à temperatura de 94°C. A segunda etapa do processo consiste no anelamento dos *primers*, ou seja, na hibridização dos oligonucleotídeos às sequências-alvo em uma temperatura que varia entre 45°C e 70°C. Finalmente, à temperatura de 72°C, ocorre a extensão dos *primers* com a utilização dos quatro dNTPs da reação, ou seja, a síntese do DNA (MOLINA & TOBO, 2004). Esses ciclos são realizados em equipamentos chamados termocicladores (CASTELANI & DUARTE, 2011). Desta maneira, um fragmento de DNA com sequência idêntica à da sequência alvo a ser analisada é formada por várias vezes consecutivas, tornando-a majoritária na amostra. A PCR é uma reação em cadeia, porque as fitas de DNA recém-sintetizadas irão atuar como moldes para amplificação nos ciclos subsequentes (KOCH & MICHELSEN DE ANDRADE, 2008). O DNA amplificado pode ser separado e visualizado em géis de agarose ou poliacrilamida (MOLINA & TOBO, 2004) e utilizado para diversos fins, como, por exemplo, para o diagnóstico de doenças, identificação de bactérias, comparações de sequências-alvo.

2.3.2.1 Fatores que podem interferir nos resultados da PCR

Vários fatores podem alterar uma PCR, a iniciar pelo processo de extração do DNA molde. A extração pode ser realizada por diferentes métodos, como, por exemplo, pelo calor, por fenol-clorofórmio ou através de kits comerciais específicos. O método a ser escolhido deverá permitir a máxima eficácia da técnica, reduzindo concentrações de proteínas, de cálcio e de sais biliares, entre outros, presentes nas amostras, que podem reduzir a eficiência da PCR (ANDREATTI-FILHO et al., 2011).

Da mesma forma, a preparação da mistura de reação (mix) é um ponto crítico para o desenvolvimento da PCR, devendo ser iniciada pela pipetagem da água, seguida dos demais componentes. Como a PCR usa quantidades muito pequenas de reagentes, deve-se tomar cuidado para que haja a perfeita acoplagem da pipeta à ponteira a fim de que as quantidades de reagentes sejam fidedignas (ROCHA, 2008).

O desenho dos *primers*, a existência de áreas de homologia na sequência do DNA molde, a temperatura de anelamento, a concentração de nucleotídeos utilizada e, principalmente, a presença de inibidores (proteínas, Cálcio, sais biliares) podem interferir no resultado da PCR (ERLICH, 1989). O $MgCl_2$ (Cloreto de Magnésio) é um cofator indispensável para o funcionamento da enzima *Taq* polimerase, afetando o

sucesso e a especificidade da amplificação. A concentração final de $MgCl_2$ funcional para maioria das reações varia entre 1,5 mM e 2,0 mM. (SATSANGI, 1994).

A *Taq* polimerase é um reagente cuja concentração também é de fundamental importância. A sua falta pode amplificar fracamente o DNA alvo, gerando bandas de difícil visualização. Por outro lado o seu excesso facilita a amplificação de produtos inespecíficos (bandas espúrias) que acabam utilizando grandes quantidades de *primers* e enzimas dificultando assim a amplificação da região específica (HILLER, 2010). As concentrações mais eficientes estão em torno de 2U/25 μ L de reação (ROCHA, 2008).

A especificidade da PCR se dá através da escolha da região que será amplificada. O segmento de DNA alvo da PCR deve ser característico do respectivo organismo ou grupo de espécies selecionadas e o conhecimento da sequência de nucleotídeos é indispensável para o sucesso da reação (HE et al, 1994). Um desenho correto dos *primers* promove elevada especificidade e eficiência da reação, assim é fundamental que tenham porcentagem de bases nitrogenadas CG (citocinas e guaninas) entre 45 e 60% (HENEGARIU et al., 1997), para assegurar-nos temperaturas de *melting* maiores (T_m - temperatura na qual 50% das moléculas de DNA se encontra desnaturado) e anelamento adequadas à reação de PCR. (ZAHA, 1996). Para o rompimento de um par CG (citosina-guanina) são necessárias temperaturas mais elevadas, porque entre a ligação das bases C e G há três pontes de hidrogênio, enquanto entre A e T há apenas duas pontes. Portanto, o T_m é dependente da composição do DNA, de modo que aumento do conteúdo de G+C no DNA, gera um incremento na T_m .

2.3.3 Técnicas resultantes de modificações ou complementações na PCR

Entre as principais técnicas resultantes de modificações da reação em cadeia da polimerase, podemos citar o RT-PCR, nested PCR, multiplex PCR, PCR a partir de *primers* randômicos e PCR em tempo real. (MOLINA & TOBO, 2004)

2.3.3.1 RT-PCR

A técnica de RT-PCR (*Reverse Transcriptase PCR*) baseia-se na amplificação de DNA obtido por meio da transcrição reversa de RNA. Através da enzima Transcriptase Reversa (RT), o RNA é convertido em DNA complementar (DNAc), que posteriormente é amplificado por PCR. Esta metodologia pode ser utilizada na análise

de expressão de genes de virulência e/ou produção de toxinas em alimentos, pois amplifica o RNA viral (CASTELANI & DUARTE, 2011).

2.3.3.2 Nested-PCR

O nested-PCR emprega uma segunda etapa de amplificação com um par de *primers* internos aos utilizados na primeira etapa e visa aumentar a sensibilidade e especificidade do método (MOLINA & TOBO, 2004).

2.3.3.3 PCR multiplex

A PCR-multiplex é uma reação de amplificação desenhada para detectar múltiplas sequências-alvo em uma mesma amostra (MOLINA & TOBO, 2004). Trata-se de uma variação da PCR tradicional e tem sido empregada de maneira crescente nos últimos anos. Baseia-se na utilização de mais de um par de *primers* na mesma reação, o que torna possível a amplificação simultânea de mais de uma sequência de DNA e a identificação de mais de uma espécie bacteriana através da mesma PCR (CASTELANI & DUARTE, 2011).

2.3.3.4 PCR a partir de *primers* randômicos

PCR a partir de *primers* randômicos utiliza sequências curtas de oligonucleotídeos para amplificar regiões repetitivas do DNA genômico e é bastante empregado em estudos epidemiológicos (MOLINA & TOBO, 2004). É um método rápido que exige pequenas quantidades de DNA e é simples e sensível, possibilitando a análise rápida de um elevado número de estirpes. Pode ser utilizado com sucesso na diferenciação de estirpes que possuam grande heterogeneidade dentro dos *operons* do rRNA. Entretanto, o poder discriminatório deste método geralmente não é tão bom quanto o de REP-PCR e RAPD, devido essencialmente à pequena porção do genoma examinada (CASTELANI & DUARTE, 2011).

2.3.3.5 PCR em Tempo Real

A reação de PCR tradicional fornece características qualitativas, o que limita a técnica para estudos quantitativos (CASTELANI & DUARTE, 2011). A PCR em tempo real permite que a amplificação e a detecção ocorram simultaneamente em um sistema fechado, sendo necessário um termociclador que possua sistema de monitoramento de emissão de fluorescência. (MOLINA & TOBO, 2004). Durante a reação, o acúmulo de *amplicons* é detectado em "tempo real" para cada ciclo, por meio da excitação de fluorocromos que marcam sondas sequência específicas ou *primers* usados na reação. O uso de transcrição reversa associada a PCR em tempo real tornou a quantificação de mRNA mais simples e precisa. A PCR em tempo real requer uma plataforma de instrumentação que contém um termociclador acoplado a um sistema ótico para a excitação da fluorescência e captura da emissão, além de um computador para aquisição de resultados e análise final da reação (CASTELANI & DUARTE, 2011). Esta técnica é empregada para quantificação de amostras, como para testes de carga viral e monitoramento de doença residual mínima (MOLINA & TOBO, 2004)

2.3.4 Uso das técnicas de Biologia Molecular em bactérias do Gênero *Campylobacter*

Campylobacter sp. é uma bactéria cujo isolamento é demorado e complexo por envolver microorganismos fastidiosos que possuem lenta velocidade de multiplicação e necessitam de condições apropriadas às suas características metabólicas (OLIVEIRA et al., 2002). Esse micro-organismo é encontrado normalmente em baixas concentrações nos espécimes analisados (CARVALHO et al., 2002). Geralmente, as amostras para análise são altamente contaminadas (fezes, conteúdo cecal e da cloaca, jejuno, fígado, alimentos contaminados, humanos infectados), e isso torna o isolamento ainda mais difícil e demorado, já que a bactéria é altamente fastidiosa e apresenta crescimento inibido por contaminantes.

Os métodos convencionais para o isolamento em alimentos requerem um mínimo de quatro dias para obtenção de um resultado negativo, o que inclui etapas de pré-enriquecimento, enriquecimento e plaqueamento em ágar seletivo e cerca de sete dias para confirmação do resultado positivo através da identificação bioquímica (MOORE et al., 2005). Atualmente há necessidade de técnicas de detecção de infecções

que demandem menor tempo de resposta e maior precisão de diagnóstico, principalmente para monitorização da produção de alimentos. (SANTOS et al., 2001).

Assim, a rapidez na identificação de *Campylobacter sp.* através da detecção do material genético, em comparação aos métodos bacteriológicos, faz com que a técnica de PCR se torne uma alternativa prática aos laboratórios de diagnóstico. Este método elimina o tempo de incubação, isolamento e testes bioquímicos em micro-organismos de crescimento fastidioso, com poucas características bioquímicas para identificação, como é o caso das bactérias do gênero *Campylobacter* (ON & HARRINGTON, 2001; MORENO, 2001).

Entre as ferramentas da biologia molecular, destacam-se a reação em cadeia da polimerase (PCR), a ribotipagem, clonagem e análise de restrição (BARON, PETERSON & FINEGOLD, 1994). Técnicas de amplificação de ácidos nucleicos *in vitro* têm sido usadas como auxílio e podem tornar-se substitutas do processo de diagnóstico convencional (OLIVEIRA et al., 2002).

2.4 REDES NEURAIS ARTIFICIAIS (RNA'S)

Redes Neurais Artificiais (RNA's) são modelos de processamento de informação inspirados em uma estrutura natural: o cérebro humano. Estes modelos não pretendem replicar a operação do cérebro, apenas utilizam como inspiração fatores conhecidos sobre o seu funcionamento, visando obter melhores desempenhos na resolução de problemas para os quais métodos tradicionais de computação têm se mostrado inadequados (MENDES FILHO, CARVALHO & MATIAS, 1996). Constituem uma abordagem inerentemente não-linear, fornecendo mais precisão na modelagem de dados de padrões complexos. Existem vários tipos de redes, cada uma com diferentes objetivos, arquitetura e algoritmo de aprendizagem (SMITH & GUPTA, 2000).

As RNA's são ferramentas de Inteligência Artificial que possuem a capacidade de se adaptar e de aprender a realizar certa tarefa, ou comportamento, a partir de um conjunto de exemplos dados (OSÓRIO & BITTENCOURT, 2000). Trata-se de um sistema de neurônios ligados por conexões sinápticas, dividida em neurônios de entrada, neurônios internos ou ocultos e neurônios de saída. Os primeiros recebem estímulos do meio externo e os últimos fazem a comunicação com o exterior. Os "neurônios" internos são de suma importância na rede, uma vez que são responsáveis pela resolução de problemas linearmente não separáveis (KOVAC'S, 1996). Em outras palavras, pode-se

dizer que uma rede é composta por várias unidades de processamento, as quais são conectadas por canais de comunicação que estão associados a determinado peso. As unidades fazem operações apenas sobre seus dados locais, que são entradas recebidas pelas suas conexões (TATIBANA & KAETSU, 2004).

Arquiteturas neurais são tipicamente organizadas em camadas com unidades que podem estar conectadas às unidades da camada posterior. Usualmente as camadas são classificadas em três grupos: *Camada de Entrada*, onde os padrões são apresentados à rede; *Camada Intermediária ou Oculta*, onde é feita a maior parte do processamento através das conexões ponderadas. Camadas ocultas podem ser consideradas como extratoras de características; *Camada de Saída*, onde o resultado final é concluído e apresentado (TATIBANA & KAETSU, 2004).

O comportamento inteligente de uma RNA vem das interações entre as unidades de processamento da rede (TATIBANA & KAETSU, 2004). Dessa forma, a rede passa por um processo de treinamento a partir dos casos reais conhecidos, por meio dos quais é capaz de extrair regras básicas. À medida que o aprendizado ocorre, o erro entre a saída da rede e a saída desejada diminui. (FORSSTRÖRM & DALTON, 1995). Portanto, a fase de aprendizado deve ser rigorosa e verdadeira, a fim de se evitar modelos falsos. Todo o conhecimento de uma rede neural está armazenado nas sinapses, ou seja, nos pesos atribuídos às conexões entre os "neurônios". De 50 a 90% do total de dados devem ser separados para o treinamento da rede neural, dados estes escolhidos aleatoriamente, a fim de que a rede "aprenda" as regras e não "decore" exemplos. O restante dos dados só é apresentado à rede neural na fase de testes, a fim de que ela possa "deduzir" corretamente o inter-relacionamento entre os dados (TATIBANA & KAETSU, 2004).

As principais vantagens das análises com as redes neurais são o fato de realizarem análises de dados não lineares e multivariados, comuns em biologia, aliado ao fato de que os cálculos são realizados por "neurônios" individuais, permitindo a execução de análises mais complexas do que aquelas executadas por técnicas de estatística convencional. Além disso, as RNA's permitem a utilização de dados qualitativos e quantitativos no mesmo modelo, não sendo necessária a transformação de dados, muitas vezes, exigida para a estatística convencional (ROCHA, 2006).

As principais desvantagens das redes neurais incluem a não existência de regras que expressem o conhecimento aprendido ou uma equação. Além disso, para o bom

funcionamento da rede, quanto o maior número de dados, maior a precisão, assim, é necessário maior número de dados que na estatística convencional (ROCHA, 2006).

As RNA's têm sido amplamente utilizadas em diversas áreas do conhecimento. São aplicadas na área da economia com grande amplitude. As análises de risco para a concessão de crédito a pessoas físicas, em muitos bancos e financiadoras, têm sido calculadas com base na inteligência artificial (MENDES-FILHO, CARVALHO & MATIAS, 1996). Na área médica, as predições têm sido empregadas na classificação de arritmias cardíacas (ROGAL JUNIOR, 2008), no auxílio de diagnósticos mamográficos, (BAYS, 2005), entre muitos outros. Nas áreas mais básicas, a inteligência artificial já foi empregada no reconhecimento de padrões em solos (SANTOS COSTA & SOUZA FILHO, 2009) e na diferenciação morfológica de distintos tipos de bactérias a partir das imagens obtidas pela neutrografia, mostrando um bom desempenho quanto à percentagem de acertos (ZAGHETTO et al, 2004)

Na medicina veterinária a inteligência artificial tem sido empregada com alta eficácia na área da avicultura. Diversas pesquisas, envolvendo o gerenciamento da produção de reprodutoras pesadas (GUAHYBA, 2001), da produção de frangos de corte (REALI, 2004), de incubatório (SALLE, 2005), de matadouro-frigorífico (PINTO, 2006) obtiveram excelentes resultados. Por último, em 2011, seguindo essa mesma linha de aplicação das redes neurais, Spohr (2011) aplicou-as englobando todas as etapas de processamento, desde incubatório até abate e obteve índices altamente satisfatórios, conseguindo desvendar e obter respostas de grande valia para o cotidiano veterinário.

A inteligência artificial na área avícola também já foi utilizada para a classificação de patogenicidade de amostras de *Escherichia coli*. Rocha (2006) iniciou os avanços nas pesquisas e nas ferramentas utilizadas para a verificação de patogenicidade de *E.coli*, demonstrada através da grande importância da interação dos diversos fatores de virulência. Neste trabalho foram analisadas diversas propriedades apresentadas pelas bactérias e foram colhidas e averiguadas cepas de diferentes origens e tipos de leões. Foram desenvolvidas, através da análise dos genes de virulência, da motilidade e do índice de patogenicidade (IP), redes neurais para a realização de predições ou classificações de patogenicidade de cepas de *E. coli* sem a necessidade da utilização de animais.

Após, em 2010, Souza verificou a diferença significativa entre amostras oriundas de celulite e quadro respiratório em relação a amostras oriundas de cama, além

do fato de também existir a mesma relação entre o tipo e a quantidade de lesões formadas, conforme a origem do isolado. Souza obteve um banco de dados que permitiu a utilização de RNA's na construção de modelos que simulavam o teste de patogenicidade *in vivo*, sem o uso de animais, adotando como informações de entrada alguns dos principais fatores de virulência associados a amostras patogênicas, origem das amostras e o índice de patogenicidade obtidos. Os resultados quanto às predições corretas foram em torno de 80%, permitindo concluir que as redes podem ser uma alternativa para substituir testes de patogenicidade *in vivo* na classificação de amostras de *E.coli* de origem aviária. Os estudos relativos à patogenicidade da bactéria continuaram e atualmente, novos doutorandos do Centro de Diagnóstico e Pesquisa de Patologia Aviária têm seguido essa linha, aprimorando os parâmetros de entrada das redes neurais, adicionando variáveis que possam ser úteis às classificações e extrapolando essa metodologia para a medicina humana, por meio de testes de patogenicidade e ligações de *E. coli* de origem avícola e de origem de infecções urinárias. Dessa forma, notam-se as amplas possibilidades de uso para essas ferramentas, que associadas podem fornecer dados preciosos na prática veterinária.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Local de Execução do Experimento

O experimento foi realizado no Centro de Diagnóstico e Patologia Aviária-CDPA-UFRGS, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul- UFRGS. Todos os equipamentos utilizados para a execução deste trabalho são pertencentes ao CDPA-UFRGS.

3.2 Amostras de *Campylobacter jejuni*

Foram utilizadas 13 amostras de *Campylobacter jejuni* para a pesquisa dos genes de virulência do complexo CDT. As amostras foram oriundas de um experimento desenvolvido por Hiller (2010) para a identificação dos isolados através da técnica de multiplex PCR espécie-específica para detecção de *C. jejuni*. Foi utilizada a bactéria ATCC *Campylobacter jejuni* 29428 para controle positivo das reações. Utilizou-se um controle da reação, formado por todos os constituintes do mix da reação sem a adição do DNA extraído. Este controle permite a detecção de uma possível contaminação das amostras do PCR com DNA externo.

3.3 Extração do DNA das amostras

A extração foi realizada pelo método de termo-extração, conforme a técnica descrita por Borsoi (2008), a qual consiste no aquecimento e repetições de centrifugações de alíquotas do caldo da cultura bacteriana e lavagem da amostra. O sobrenadante do processo de aquecimento foi transferido para outro eppendorf e mantido a -20°C.

3.4 Pesquisa dos genes do complexo *cdt* nas amostras

3.4.1 Primers

Os *primers* ou oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram sintetizados pela empresa *Invitrogen*. A escolha foi baseada em trabalhos anteriores disponíveis na

literatura e as sequências selecionadas foram comparadas com as descritas no *Genbank*. As sequências dos *primers* utilizados encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 Sequência de *Primers*

<i>Primer</i>	Sequência
<i>cdtA forward</i>	5'CCTTGTGATGCAAGCAATC 3'
<i>cdtA reverse</i>	5'ACACTCCATTTGCTTTCTG 3'
<i>cdtB forward</i>	5'CAGAAAGCAAATGGAGTGTT 3'
<i>cdtB reverse</i>	5'AGCTAAAAGCGGTGGAGTAT 3'
<i>cdtC forward</i>	5'CGATGAGTTAAAACAAAAAGATA 3'
<i>cdtC reverse</i>	5'TTGGCATTATAGAAAATACAGTT 3'

(DATTA, NIWA & ITOH, 2003 e WIECZOREK & OSEK, 2008)

3.4.2 Padronização dos protocolos

Foram otimizados três protocolos de PCR individuais para cada gene pesquisado (*cdtA*, *cdtB* e *cdtC*) tendo como base os trabalhos de Datta, Niwa & Itoh (2003) e Wieczorek & Osek (2008). Os protocolos foram adaptados de acordo com as condições do laboratório.

Cada reação de amplificação consistiu no preparo de um mix de reagentes (Tabela 2) composto de água ultrapura, solução tampão, desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs), um par de primers específico do gene a ser pesquisado, Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$), enzima *Taq-Polimerase* e o DNA extraído. Foram testadas diferentes concentrações de Cloreto de Magnésio para os três diferentes protocolos, com base nas variações encontradas na literatura. Assim, para cada um dos três genes pesquisados testaram-se as seguintes concentrações: 1mM, 1,5mM e 2mM de $MgCl_2$. Na Tabela 2, constam os reagentes e seus volumes e concentrações utilizados na composição do *mix* para cada um dos genes, definidos após os resultados dos testes iniciais.

Tabela 2 Composição do *Mix*

Reagentes	<i>cdtA</i>	<i>cdtB</i>	<i>cdtC</i>
Água Milli-Q (μ L)	20,15	20,15	20,4

Tampão 10X (µL)	3	3	3
dNTP (2,5mmol)	2,4	2,4	2,4
MgCl ₂ (µL)	1,25 (2mM)	1,25(2mM)	1 (1,5mM)
Primer (20pmol) (µL)	1	1	1
Taq polimerase (1U) (µL)	0,2	0,2	0,2
DNA (µL)	1	1	1
Total (µL)	30	30	30

(Adaptado de DATTA, NIWA & ITOH, 2003 e WIECZOREK & OSEK, 2008)

As reações de amplificação foram realizadas no termociclador *Swift MaxPro Thermal Cycler – ESCO Technologies*. Os três protocolos iniciaram com a temperatura de desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos, seguidos de 30 ciclos com as temperaturas de desnaturação, anelamento dos *primers* e extensão descritas na Tabela 3. A temperatura de extensão final para todos os protocolos foi de 72° C por cinco minutos.

Tabela 3 Ciclos da PCR

Fase	Tempo	<i>cdtA</i>	<i>cdtB</i>	<i>cdtC</i>
Desnaturação	1'	94°C	94°C	94°C
Temperatura de anelamento	1'	49°C	51°C	47°C
Extensão	1'	72°C	72°C	72°C

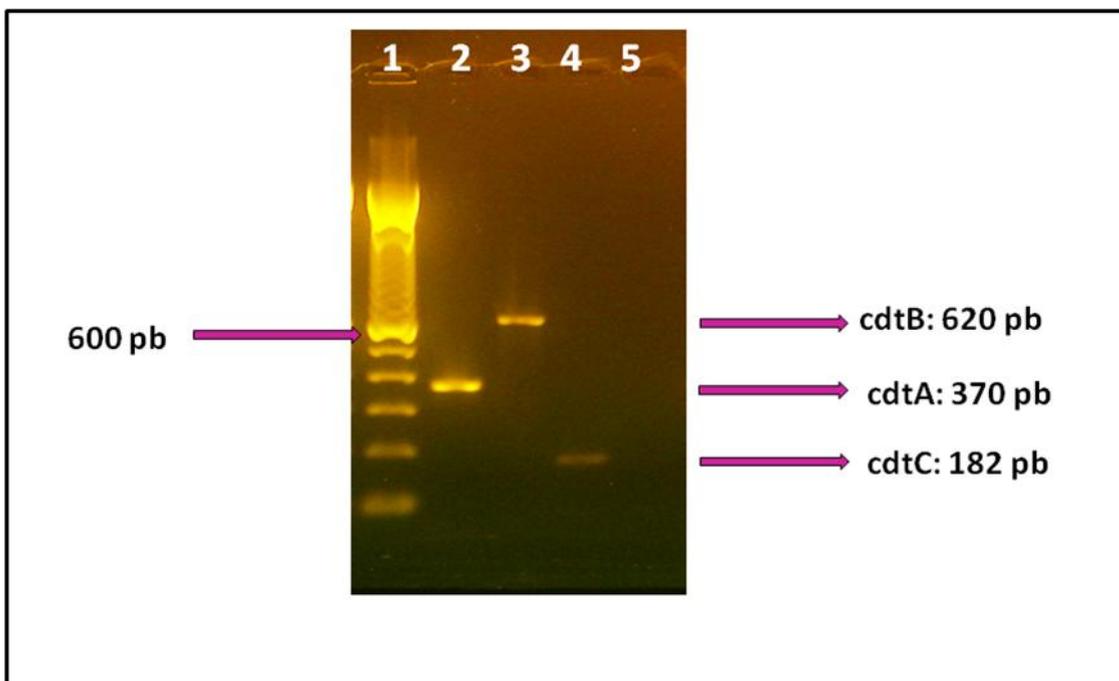
(DATTA, NIWA & ITOH, 2003)

Após a amplificação, os produtos do PCR (*amplicons*) foram submetidos à eletroforese realizada em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio. Os fragmentos do DNA amplificados foram visualizados em trans-iluminador ultravioleta (*Pharmacia LKB MacroVue*), onde se esperavam observar bandas de 370pb para o gene *cdtA*, 620pb para o gene *cdtB* e 182pb para o gene *cdtC*.

4 RESULTADOS

Os três protocolos de PCR adaptados foram capazes de detectar a presença dos genes de virulência nas amostras pesquisadas. Da mesma forma, todas as reações foram específicas aos genes selecionados, pois não ocorreu a amplificação das amostras utilizadas como controle negativo. A figura 1 apresenta uma foto do gel de agarose 2% corado com brometo de etídio com a presença de três amostras positivas, uma para cada gene estudado.

Figura 1: Visualização de gel de agarose à 2% corado com brometo de etídio, através de luz UV. 1-Marcador de peso molecular de 100pb. 2 amostra positiva para o gene *cdA*. 3: amostra positiva para o gene *cdtB*. 4: amostra positiva para o gene *cdtC*.5: controle negativo.



Das 13 amostras testadas, 100% (13/13) foram positivas para o gene *cdtA*, 84,6% (11/13) positivas para o gene *cdtB* e 92,3% (12/13) positivas para o gene *cdtC*. 84,6% foram positivas para os três genes.

5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com a literatura consultada, que relata frequências geralmente próximas a 100% para os três genes: *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*. Datta; Niwa; Itoh (2003) relataram a frequência de 100% para os genes nas amostras pesquisadas, que incluíram carne de frango, fezes de frango, fezes de bovinos e amostras clínicas de humanos. Da mesma forma, Rozynek et al. (2005) encontraram os genes em 100% dos isolados de carcaças de frangos. Wieczorek e Osek (2008) relataram, em amostras de fezes de aves, 87,5% positivos para *cdtA*, 75% para *cdtB* e 90% para *cdtC*. Martinez et al. (2006) pesquisaram a ocorrência dos genes *cdt* em estirpes de *Campylobacter jejuni* isolados de humanos e animais, e encontraram os três genes (*cdtA*, *cdtB* e *cdtC*) em 98% estirpes isoladas.

No Brasil, são escassos os estudos sobre *CDT* em amostras de *C. jejuni*. Thomé (2006) pesquisou, somente, o gene *cdtB* e relatou frequências de 100% em amostras de origem ambiental, 92% em amostras oriundas de humanos, 87% em amostras de origem animal e 85% em amostras de origem alimentar. Por outro lado, Carvalho (2010) ao pesquisar *C. jejuni*, em carcaças de aves, relatou todos os genes do complexo *CDT* em apenas 36,4% das amostras.

A toxina *CDT* interfere na divisão e diferenciação das células das criptas intestinais, contribuindo para o desenvolvimento da diarreia (WASSENAAR, 1997; PARK, 2002). *C. jejuni* já foi isolado de fezes diarréicas humanas, as quais apresentaram alta prevalência do complexo de genes *cdt* (WARDAK & SZYCH, 2006). Isso indica que estes genes são importantes fatores de virulência desta bactéria (VAN DEUN et al., 2007). Van Deun et al. (2007) afirmaram que a produção da toxina *CDT* está associada com as estirpes causadoras de enterites em humanos.

Os resultados encontrados no presente trabalho estão de acordo com a literatura, que relata variações próximas a 100% na prevalência destes genes nas amostras pesquisadas; não obstante, é necessária a análise de um maior número de amostras para verificar a importância e o aparecimento destes genes nos isolados no Brasil.

Sugere-se, a partir dos dados revisados nesta monografia e dos resultados obtidos, que sejam pesquisados mais genes de virulência, aliado a maiores dados de caracterização das bactérias, a fim de que se obtenha um banco de dados considerável que possa ser submetido à aplicação de RNA's. O uso dessa ferramenta, conforme visto anteriormente para a bactéria *E. coli*, pode ser capaz de auxiliar no diagnóstico, no

controle e na determinação da patogenicidade do micro-organismo, fornecendo ao profissional maior embasamento e segurança na tomada de uma decisão. O fato de *C. jejuni* ser uma bactéria altamente envolvida em surtos alimentares torna-a um forte alvo de futuras barreiras e empecilhos comerciais.

6 CONCLUSÃO

Esta monografia possibilitou inicialmente revisar as características do gênero *Campylobacter*, especialmente *C. jejuni*, que tem apresentado uma grande importância na ocorrência de gastroenterites em seres humanos no contexto mundial. Desta forma, destacou-se as características gerais - como as origens, os fatores necessários para o crescimento, as características químicas até os fatores de virulência e métodos de detecção deste micro-organismo.

Esse trabalho também pesquisou a presença dos genes de virulência *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*, por meio da técnica de PCR. Os resultados encontrados estão de acordo com a literatura, que relata variações próximas a 100% na prevalência destes genes em amostras pesquisadas. Não obstante, é necessária a análise de um maior número de amostras para verificar a importância e o aparecimento destes genes nos isolados no Rio Grande do Sul e de outros estados brasileiros.

Por último, sugere-se a utilização de uma nova forma de interpretar dados oriundos da bacteriologia, da biologia molecular e do campo por meio das redes neurais artificiais, ferramenta já empregada em outros trabalhos desenvolvidos no CDPA.

REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F.M. Monitoring of antimicrobial resistance among food animals: principles and limitations. **J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health**, Oxford, v. 51, p. 380-388, 2004.
- ABUOUN, M. et al.. *Cytolethal distending toxin (CDT) - negative Campylobacter jejuni* strains and anti-CDT neutralizing antibodies are induced during human infection but not during colonization in chickens. **Infection and Immunity**, United Kingdom, [online], v. 73, p. 3053-3062, 2005.
- ALTERTHUM, F. Morfologia e Estrutura da Célula Bacteriana. In: Trabulsi, L.; Alterthum, F. (Org.). **Microbiologia**. 5 ed. São paulo: Atheneu, v. 1, p. 7-20. 2008.
- ALTEKRUSE, S. F.; et al. *Campylobacter jejuni* – an emerging foodborn pathogen. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 5, n. 1, p. 28-35, Jan./Feb. 1999.
- ANDREATTI-FILHO, R.L. Comparação de métodos para extração de DNA na reação em cadeia da polimerase para detecção de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis em produtos avícolas **Jornal Ciência Animal Brasileira**, v. 12 n.1 p. 115-119, 2011
- ANON. Interim report on Campylobacter, Advisory Cammittee on the Microbiological Safety of Food, London, 1993.
- ASAKURA, M. et al. Comparative analysis of citolethal distending toxin (cdt) genes among Campylobacter jejuni, C. coli and C. fetus strains. **Microbial Pathogenesis**, London, v.42, n.5/6, p.174-183, 2007.
- ASHGAR, S.S., et al. *CapA*, an autotransporter protein of *Campylobacter jejuni* mediates association with human epithelial cells and colonization of the chicken gut. **Journal Bacteriology**. v. 189, p. 1856-1865, 2007.
- BACK, A. Campilobacteriose. **Manual de Doença das Aves**. 2 ed. Cascavel: Integração, p.119-122. 2010.
- BANG, D. D. et al. Prevalence of *cytolethal distending toxin (cdt)* genes and CDT production in *Campylobacter* spp. isolated from Danish broilers. **Journal of Medical Microbiology**, London, v.50, p.1087- 1094, 2001.
- 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 citolethal distending toxin production of the isolates. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, GB, v.94, p.1003- 1014, 2003.
- BARON, E.J.; PETERSON, L.R.; FINEGOLD, S.M. **Diagnostic microbiology**. 9.ed. St. Louis: Mosby, 958p, 1994.

BAYS, C. Aplicação de redes neurais artificiais no diagnóstico mamográfico. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Comunitária Regional de Chapecó. Orientador: Marcelo Moreno. 120 f. 2005.

BERESWILL, S. & KIST, M. Recent developments in *Campylobacter* pathogenesis. **Current Op. Infect. Dis.** 16: 487-491, 2003.

BORSOI, A., et al. Inoculation of newly hatched broiler chicks with two brazilian isolates of *Salmonella* Heidelberg strains with different virulence gene profile, antimicrobial resistance and pulsed field gel electrophoresis pattern to intestinal changes evaluation. **Poultry Science**, v.88, p.750-758, 2009.

BOUFLEUR, R. *Campylobacter jejuni* em frangos de corte e efeito do congelamento de carne e vísceras de frango sobre a contaminação. Mestrado em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Brasil. 2009.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas. Síndrome de Guillain-Barré.** Portaria SAS/MS n° 497, de 23 de dezembro de 2009.

BUTZLER, J. P. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. **Europ. Soc. Of Clin. Microbiol. and Infect. Dis.** v.10. p. 868-876. 2004.

CALZADA, C. T. et al. Biotype and Lior's serogroup of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated in São Paulo, Brazil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 25, p. 1-5, 1994.

CARDOSO, M. O que representam os suínos na transmissão de zoonoses para humanos? **Acta Scientiae Veterinariae.** v. 37 (Supl 1), p. s81-s89, 2009.

CARVALHO, A. C. et al.. Molecular characterization of invasive and non-invasive *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.39, n.4, p.1353-1359, 2001.

CARVALHO, A.C.F.B.; LIMA, V.H.C.; PEREIRA, G.T. Determinação dos principais pontos de risco de contaminação de frangos por *Campylobacter*, durante o abate industrial. **Revista Higiene Alimentar**, v.16., p.89-94, 2002.

CARVALHO, A. F. **Detecção dos genes da toxina citoletal distensiva (CDT) em estirpes de *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* isoladas de frangos de corte e hortaliças** [online]. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, São Paulo, 2009.

CARVALHO, A.F. et al. Detecção dos genes da toxina citoletal distensiva em estirpes de *Campylobacter jejuni* isoladas de carcaças de frangos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.5, p.1054-1061, 2010

CASTELANI, L.; DUARTE, K.M.R. Métodos moleculares em microbiologia de alimentos. **PUBVET**, Londrina, V. 5, N. 2, Ed. 149, Art. 1000, 2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION- CDC. **Emerging Infectious Diseases**, 2005. Disponível em: www.cdc.gov/eid. Acesso em: 15 de outubro de 2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION- CDC- **National Center for Zoonotic, Vector-Borne, and Enteric Diseases**. July, 2010. Disponível em: <http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/campylobacter/>. Acesso em: 13 de outubro de 2011.

COCKER, A. O. *et al.* Human campylobacteriosis in developing countries **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 8, n. 3, p. 237-242, May/Jun. 2002.

COX, N. A. *et al.* Identification of a New Source of Campylobacter Contamination in Poultry: Transmission from Breeder Hens to Broiler Chickens. **Avian Diseases**, v. 46, n.º. 3, p. 535-541, 2002.

DAMAS T. M. T. & MARASSI, M. A. E. *Campylobacter sp*: agente etiológico de doença de origem alimentar. **Revista Higiene alimentar**. v.24 n. (180/181) p.85-90, jan.-fev. 2010.

DATTA, S.; NIWA, H.; ITOH, K. Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler and bovine faeces. **Journal of Medical Microbiology**, v.52, p.345-348, 2003.

DESTRO, M.T. **Tese de Doutorado**: *Listeria monocytogenes* em camarão (*Penaeus brasiliensis*): marcadores sorológicos e genéticos no monitoramento de sua disseminação em uma unidade processadora de pescado. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1995.

DORREL, N.; WREN, B. W. The second century of *Campylobacter* research: recent advances, new opportunities and old problems. **Current Opinion in Infectious Diseases**, Philadelphia, v. 20, n.5, p. 514-518, Sept./Oct. 2007.

ERLICH, H.A. PCR technology: principles and applications for DNA amplifications. **Stockton Press**, NY, 1989.

ESCHERICH, T. Beitrage zur Kenntniss der Darmbakterien. III. Ueber das Vorkommen von Vibrionen im Darmcanal und den Stuhlgangen der Sauglinge. (The knowledge of intestinal bacteria. III. On the existence of vibrios in the intestines and feces of babies.) **Münchener Med Wochenschrift**. v. 33 p. 815–817, 1886.

ESTEVES, W.T.C.; FERREIRA, A.P; SICILLIANO, S. Potencial impacto na Saúde Pública por *Campylobacter spp*. Estudo de caso: curso interior do rio São João, RJ, Brasil. **Caderno de Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 1, p. 74-81. 2011.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Scientific Report of the Scientific Panel on Biological Hazards on the request from the Commission related

to *Campylobacter* in animals and foodstuffs, 2005. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/173.htm>. Acesso em: 27 dez 2011.

FLANAGAN, R. C. et al. Examination of *Campylobacter jejuni* putative adhesins leads to the identification of a new protein, designated FlpA, required for chicken colonization. **Infection and Immunity**, Washington, [online], v. 77, p. 2399–2407, 2009. Disponível em: <http://iai.asm.org/cgi/content/abstract/77/6/2399>. Acesso em: 28 ago 2011.

FERNANDEZ, H. Família Campylobacteraceae. In: Luiz Rachid Trabulsi; Flavio Alterthum. (Org.). **Microbiologia**. 5 ed. São paulo: Atheneu, v. 1, p. 357-362. 2008.

FONSECA, B. B. et al. *Campylobacter sp* em mecônio de pintainhos e em cloaca de reprodutoras de corte. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 23, n. 3, p. 128-132, May/Jun. 2007.

FORSSTRÖM, J. J.; DALTON, K. J.; Artificial neural networks for decision support in clinical medicine. **Annals of Medicine**, n.5, v.27, p.509-517, 1995.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Editora Artmed, 2002

FRANCO, B. D. G. M; LANDGRAF, M.F. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2003.

GANDRA, E. A. et al. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum Technology**. V. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.

HE, Q. et al. Primers are decisive for sensitivity of PCR. **BioTechniques**. n. 17, p. 82–87, 1994.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos. São Paulo: Varela, 629p. 2001.

GOMES, F.R.; CURCIO, B. . LADEIRA, S.R.L.; FERNÁNDEZ, H.; MEIRELES, M.C.A. *Campylobacter jejuni* occurrence in chicken fecal samples from small Properties in Pelotas, southern of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.375-378, 2006

GRIMONT, F.; GRIMONT, P.A.D. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction pattern as potential taxonomic tools. **Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.**, Paris, v. 137B, p. 165-175, 1986.

GUAHYBA A.S. **Tese doutorado**: Utilização de inteligência artificial (redes neurais artificiais) no gerenciamento de reprodutoras pesadas. Porto alegre: UFRGS, Faculdade de veterinária, PPGCV, 2001.

GUERRY, P. *Campylobacter* flagella: not just for motility. Review. Trends in **Microbiology**, vol. 15, N.10, 2007.

- GANDRA, E. A. et al. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum Technology**. V. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.
- HE, Q. et al. Primers are decisive for sensitivity of PCR. **BioTechniques**. Notick, n. 17, p. 82–87, 1994.
- HENEGARIU et al. Multiplex PCR Critical Parameters and step-by-step protocol. **BioTechniques**, Notick, v.23, n. 3, p. 504-511, 1997.
- HERMANS et al., Review: Colonization factors of *Campylobacter jejuni* in the chicken gut. **Veterinary Research**, v.42, n.82, 2011.
- HILLER, C.C. Desenvolvimento de ensaio de multiplex-pcr para identificação de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* (Monografia), Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.
- HOLT, J. G. et al. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9 ed. Baltimore: Williams e Wilkins, 789p. 1994.
- HUMPHREY, T.; O'BRIEN, S.; MADSEN, M. Campylobacter as a zoonotic pathogens: A food production perspective. **International Journal of Food Microbiology**. v.117, p. 237- 257, 2007.
- INTERNATIONAL COMMITTEE ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOOD - ICMSF. **Microbial ecology of food commodities**. 2. ed. New York, 2005.
- JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. 6ª edição. Zaragoza, Espanha: 2000.
- JIN, S.; JOE, A.; LYNETT, J.; HANI, E. K.; SHERMAN, P.; CHAN, V. L.JlpA, a novel surface-exposed lipoproteinspecific to *Campylobacter jejuni*, mediates adherence to host epithelial cells. **Molecular Microbiology**, Ontario, [online], v. 39, p. 1225–1236, 2001
- KEENER, K.M.; BASHOR, M.P.; CURTIS, P.A.; SHELDON, B.W.; KATHARIOU, S. Comprehensive Review of *Campylobacter* and Poultry Processing. **Comprehensive reviews in food science and food safety**. vol. 3, 2004.
- KETLEY, J. M. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. **Microbiology**, vol. 143, n. 1, p. 5-21, 1997.
- KOCH, A.; MICHELSON DE ANDRADE, F. A utilização de técnicas de biologia molecular na genética forense: uma revisão. Revista brasileira de análises clínicas. v. 40, n.1, p.17-23, 2008.
- KONEMAN, E. W. *et al.* **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. 4th ed. J.B. Lippincot Company. Philadelphia, 1154 p. 1992.

KONKEL *et al* Identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* based on the *cadF* virulence gene and its product. **Journal Clinical of Microbiology**. v.37, p. 510–517. 1999.

KONKEL, M. E., et al. The Pathogenesis of *Campylobacter jejuni* - Mediated Enteritis. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, p. 55-71, 2001.

KOVÁCS, Z. L. Redes Neurais Artificiais: Fundamentos e Aplicações: um texto básico. 2ª edição, São Paulo: Edição acadêmica, 174p., 1996.

KUANA, S.L. Occurrence and characterization of *Campylobacter* in Brazilian production and processing of broilers. **Avian Diseases**. v. 9, n. 2, p. 480-486, 2008.

KUMAR, A. et al. Occurrence of *Campylobacter jejuni* in vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.67, n.1/2, p.153-155, 2001.

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

LEE, R. B., HASSANE, D. C., COTTLE, D. L. & PICKETT, C. L. Interactions of *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin subunits *CdtA* and *CdtC* with *HeLa* cells. **Infectious Immunology**. V. 71, p. 4883 – 4890, 2003.

LEVIN, R.E. *Campylobacter jejuni*: a review of its characteristics, pathogenicity, ecology, distribution, subspecies characterization and molecular methods of detection. **Food Biotechnology**, v.21, p.271–347, 2007

LODGE, K. A Molecular Investigation of *Campylobacter jejuni* Pathogenesis. [online], 2007. **School of Applied Sciences University**, Australia, 2007.

MADIGAN, M.T. et al., Princípios de Genética Bacteriana. In: _____ (Ed.). **Microbiologia de Brock**. 12.ed. Porto Alegre: Artmed, p.278-309. 2010.

MAGALHÃES, V.D., et al. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia uma revisão técnica. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 64, n. 2, p. 155-161, 2005.

MASLOW, J.N. et al. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. **Clinical Infectious Diseases**. New York, v. 17, p. 1543-1564, 1993.

MARTINEZ, I. et al. Detection of *cdtA*, *cdtB*, and *cdtC* genes in *Campylobacter jejuni* by multiplex PCR. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, DE, v.296, n.1, p.45-48, 2006.

MAZIERO, M. T.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Effect of refrigeration and frozen storage on the *Campylobacter jejuni* recovery from naturally contaminated broiler carcasses. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 41, p. 501-505. 2010. ISSN 1517-8382.

- MENDES FILHO E. F., CARVALHO A. P. L.F., MATIAS A. B. Utilização de Redes Neurais Artificiais na Análise de Crédito de Pessoas Físicas. **Simpósio Brasileiro de Redes Neurais**, Recife, 1996.
- MOLINA, A.L.; TOBO, P.R. Série – Biologia molecular atualização. Parte 2 – Uso de Técnicas de biologia molecular para diagnóstico. **Einstein**. v.2, n. 2 p.139, 2004.
- MOORE, J. E.; CORCORAN, D.; DOOLEY, J. S. G. Campylobacter. **Veterinary Research**. Les Ulis, v. 36, p. 351-382, 2005.
- MORAN, A. P. Structure and Conserved Characteristics of *Campylobacter jejuni* Lipopolysaccharides. **The Journal of Infectious Diseases**. V. 176, n. 2, p.115–21, 1997;
- MORENO, Y. et al. Direct detection of thermotolerant Campylobacters in chicken products by PCR and in situ hybridization. **Revista de Microbiologia**, v.152, p.577-582, 2001.
- MURRAY, P.R. et al. **Manual of Clinical Microbiology**, 9 ed, Washington, 2007.
- NACHAMKIN, I.; MISHU ALOOS, B. *Campylobacter* species and Guillian-Barre syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 11, p. 555-557, 1998.
- NIELSEN, E. M. et al. Evaluation of phenotypic and genotypic methods for subtyping *Campylobacter jejuni* isolates from humans, poultry, and cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.38, n.10, p.3800-3810, 2000.
- OLIVEIRA, S.D. et al. Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR. **Veterinary Microbiology**, v.87, p.25-35, 2002.
- ON, S.L.W.; HARRINGTON, C.S. Evaluation of numerical analysis of PFGE DNA profiles for differentiating *Campylobacter fetus* subspecies by comparison with phenotypic, PCR and 16S rDNA sequencing methods. **Journal of Applied Microbiology**, v.90, p.285-293. 2001.
- OSÓRIO, F.; BITTENCOURT, J. R. *Sistemas inteligentes baseados em RNAs aplicados ao processamento de imagens*. In: Workshop de Inteligência Artificial, Santa Cruz do Sul: UNISC, 2000.
- PALMA, D. et al. Acute diarrhea: stoolwater loss in hospitalized infants and its correlation with etiologic agents and lactose content in the diet. **Arquivos de Gastroenterologia**, São Paulo, v.34, p.186-195, 1997.
- PARK, P. The physiology of Campylobacter species and its relevance to their role as foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, [online], vol. 74, p. 177-188, 2002.
- PEI, Z.; BLASER, M.J. PEB1, the major cell-binding factor of *Campylobacter jejuni*, is a homolog of the binding component in Gram-negative nutrient transport systems. **J Biol Chem** **268**: 18717–18725, 1993.

PEI, Z. et al. Mutation in the *peb1A* locus of *Campylobacter jejuni* reduces interactions with epithelial cells and intestinal colonization of mice. **Infection and Immunity**, Nashville, [online], v. 66, p. 938–943, 1998.

PICKETT, C. L. et al. Prevalence of cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter* sp. *cdtB* genes. **Infectious Immunology**. V.64, n°. 6, p. 2070-2078, 1996.

PINHO MSL. Pesquisa em Biologia Molecular: como fazer? **Revista brasileira de Coloproctologia**, LUGAR, v. 26, n.3, p. 331-336, 2006

POLY, F.; GUERRY, P. Pathogenesis of *Campylobacter*. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 24, n. 1, p. 27-31, 2008.

PURDY, D. et al. Characterization of cytolethal distending toxin (CDT) mutants of *Campylobacter jejuni*. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 49, p. 473-479, 2000.

REALI E.H. **Dissertação de Mestrado**. Utilização de inteligência artificial (redes neurais artificiais) no gerenciamento da produção de frangos de corte. 2004. - UFRGS-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, 2004.

RIVERA-AMILL, V. et al. Secretion of the virulence associated *Campylobacter* invasion antigens from *Campylobacter jejuni* requires a stimulatory signal. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 183, p. 1607–1616, 2001.

ROCHA, A. C. G. P. **Tese de Doutorado**: Utilização de Inteligência artificial (redes neurais artificiais) para classificação de patogenicidade de amostras de *Escherichia coli* isoladas de frangos de corte. Porto Alegre: UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, PPGCV, 2006.

ROCHA, S. L. S. **Tese de Mestrado**: Perfil genético de amostras de *E.coli* isoladas de granjas avícolas do RS através do *multiplex-pcr*. Porto Alegre: UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, PPGCV, 2008.

RODRÍGUEZ-LÁZARO, D. et al. Trends in analytical methodology in food safety and quality: monitoring microorganisms and genetically modified organisms. **Trends Food Sci. Tech.**, Amsterdam, v. 18, p. 306-319, 2007.

ROGAL JUNIOR S. **Dissertação de Mestrado**: Detecção e Classificação de Arritmias Cardíacas utilizando Redes Neurais Artificiais Auto Organizáveis. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. PPGIa -. 2008.

ROZYNEK, E. et al. Prevalence of potential virulence markers in Polish *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates obtained from hospitalized children and from chicken carcasses. **Journal of Medical Microbiology**, London, v.54, p.615-619, 2005.

SALLE, F. O. **Tese de Mestrado**: Utilização de inteligência artificial (redes neurais artificiais) no gerenciamento do incubatório de uma empresa avícola do sul do Brasil. Porto Alegre: UFRGS- Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Veterinária, 2005.

SAIKI, R., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K., HORN, G., AND ERLICH, H. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**. n. 230, p. 1350-54, 1985.

SANTOS COSTA, F. H; SOUZA FILHO C. R. **Aplicação de Redes Neurais Artificiais para Reconhecimento de Padrões em Solos**. Anais XIV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, INPE, p. 5177-5183. Natal, Brasil, 2009

SANTOS, L.R. et al. Identificação de Salmonella através da reação em cadeia pela polimerase (PCR). **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v.29, p.87-92, 2001.

SATSANGI, J. et al. Effect of heparin on polymerase chain reaction. **Lancet**. n. 343, pg. 1509–1510, 1994.

SCARCELLI, E. P.; PIATTI, RM. Patógenos emergentes relacionados à contaminação de alimentos de origem animal, **Revista Biológico**. v. 64 n° 2, São Paulo, jul/dez. 2002.

SCARCELLI, E. et al. Molecular subtyping of *Campylobacter jejuni subsp. jejuni* strains isolated from different animal species in the state of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.36, n.4, p.378-382, 2005.

SCHAECHTER, M. et al. **Mechanisms of microbial disease**. 3th edition, Ed. Lippincott, Williams & Wilkins, 1999.

SCHMITT, C. K., MEYSICK, K. C., O'BRIEN, A. D. Bacterial toxins: Friends or Foes? **Emerging Infectious Diseases**. V.5, n°. 2, p. 224-234, 1999.

SCHMIDT-OTT R., et al. Identification and characterization of a major subgroup of conjugative *Campylobacter jejuni* plasmids. **J Infect** 2005, **50**, 12-21.

SEBALD, M.; VÉRON, M. Teneur en bases de l'ADN et classification des vibrions. **Annales de L'Institut Pasteur**. v. 105, p. 897–910, 1963.

SHANE, S.M.; STERN, N.J. *Campylobacter* Infection. In.: SAIF, Y.M. **Diseases of poultry**. 11ªed. Ames: Iowa State Press. Cap.17, p.615-625. 2003.

SILVA, Marise Sobreira Bezerra da - **A análise das regiões espaçadoras intergênicas do rRNA 16S-23S em diferentes gêneros bacterianos**. (Tese de Doutorado — Universidade Federal de Pernambuco). Recife, 2002.

- SIRCILLI, M.P., TRABULSI, L.R. Fatores de virulência I: Adesão, Invasão e Sideróforos. In: Luiz Rachid Trabulsi; Flavio Alterthum. (Org.). **Microbiologia**. 5 ed. São paulo: Atheneu, 2008, v. 1, p. 143-148.
- SKIRROW, M. B. Epidemiology of *Campylobacter enteritis*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.12, p.9-16, 1991.
- SMITH, J. L.; BAYLES, D. O. The contribution of *cytolethal distending toxin* to bacterial pathogenesis. **Critical Reviews in Microbiology**, Pennsylvania, [online] v.32, n.4, p.227-248, 2006.
- SMITH, K. A.; GUPTA, J. N. D. *Neural networks in business: techniques and applications for the operations researcher*. Computers & Operations Research, p. 1023- 1044, 2000.
- SNELLING, W. J., MATSUDA, M., MOORE, J.E., DOOLEY, J. S. G. Under the Microscope: *Campylobacter jejuni*. **Lett. Appl. Microbiol.** 41: 297-302, 2005.
- SOUZA, G. F.. **Tese de Mestrado**: Estabelecimento de uma nova metodologia para o cálculo do índice de patogenicidade em amostras de *Escherichia coli* provenientes da produção de frangos de corte. Porto Alegre: UFRGS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária. 2006.
- SPOHR, A. **Tese mestrado**: Gerenciamento através de redes neurais artificiais das atividades de produção de reprodutoras pesadas e do frango de corte, de um incubatório e de um abatedouro avícola. Porto alegre: UFRGS, Faculdade de veterinária, PPGCV, 2011.
- STRACHAN, T. et al.. **Genética Molecular Humana**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed. 576p. 2002
- TATIBANA & KAETSU, disponível em www.din.uem.br/ia/neurais, 2004.
- THOMÉ, J.D.S. **Tese de Mestrado**: Citotoxinas e hemolisinas produzidas por *Campylobacter jejuni* isolados de diferentes origens . Unicamp- Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. Campinas, SP: [s.n.], 2006.
- TOSIN, I.; MACHADO, R. A. Occurrence of *Campylobacter* spp among food handlers in hospital kitchens in urban areas of the southern region of Brazil. **Revista da Saúde Pública**, São Paulo, v.29, p.472-477, 1995.
- WARDAK, S.; SZYCH, J. Prevalence of pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* isolated from humans in Poland between 2003-2005. **Med. Dosw. Mikrobiol.** v.58, p.217-222, 2006.
- WASSENAAR, T. M. Toxin production by *Campylobacter* spp. **Clin. Microbiology Review**. V.10, n°. 3, p. 466-476, 1997.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION- WHO. **Water-related diseases**. 2011. Disponível em:

http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/campylobacteriosis/en/ Acesso em 23 de agosto de 2011.

WIECZOREK, K.; OSEK, J. Identification of virulence genes in *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolates by PCR. **Bull Vet Inst Pulawy** v. 52, p. 211-216, 2008

VAILLANT V. et al. Foodborne Infections in France. **Foodborne Pathogens and Disease**, France, p. 221- 232, 2005.

VAN DEUN, K.; HAESEBROUCK, F.; HEYNDRICKX, M. et al.. Virulence properties of *Campylobacter jejuni* isolates of poultry and human origin. **J. Med. Microbiol**, v.56, p.1284-1289, 2007

VANDAMME, P. & DEL LEY, J. Proposal for a new family, *Campylobacteraceae*. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Washington, v.41, p.451-455, 1991.

YOUNG, K.T.; DAVIS, L.M.; DIRITA, V.J. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**. v. 5, n. 9, p. 665-679, 2007.

ZAHA, A. **Biologia Molecular Básica**. 1. ed. Porto Alegre: Mercado Aberto, 336p. (Série Ciência XXI). 1996.

ZHANG, Q. *Campylobacteriosis*. In: SAIF, Y.M. (Ed.). **Diseases of Poultry**. 12 ed. Iowa: Brackwell Publishing, p.675-690. 2008.

ZAGHETTO, A., et al. Identificação De Bactérias Utilizando Redes Neurais Artificiais. In: Congresso Brasileiro de Automática, 2004, Gramado. Anais do Congresso Brasileiro de Automática - CBA 2004, 2004. v. 1. p. 1-6.

UBABEF – União Brasileira de Avicultura. **Relatório Anual 2010/2011**. São Paulo: UBABEF, 2011.

UENO, M.; JORGE, A.O.C. Comparação de técnicas moleculares de análise de DNA cromossomal de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina. **Revista Biociências** (Taubaté), Taubaté - SP, v. 8, n. 2, p. 43-50, 2002.