

**Caracterização de isolados de  
*Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* obtidos de cecos de frangos, em Portugal, no âmbito de um estudo comunitário de prevalência**

Genotipagem e elucidação dos determinantes associados ao crescimento em biofilme

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre na área de Sistemas de Prevenção e Controlo Alimentar

**Ana Cláudia Nunes Carreira**

**Orientador:**

Doutora Mónica Sofia Vieira Cunha

**Caracterização de isolados de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* obtidos de cecos de frangos, em Portugal, no âmbito de um estudo comunitário de prevalência**

Genotipagem e elucidação dos determinantes associados ao crescimento em biofilme

**RESUMO**

A Campilobacteriose é a zoonose mais notificada em países desenvolvidos, sendo *Campylobacter jejuni* o agente etiológico mais frequente e o consumo da carne de aves um importante factor de risco.

A análise dos polimorfismos dos fragmentos de restrição do gene *flaA* de 112 isolados de *C. coli* e 67 de *C. jejuni*, obtidos de frangos de abate, em Portugal, durante o estudo nacional de prevalência de *Campylobacter* (Decisão da Comissão 2007/516/EC), gerou 11 perfis de restrição com *Hinfl* (índice de diversidade Simpson;  $D=0,62$ ) e 48 perfis com *Ddel* ( $D=0,89$ ), evidenciando elevada variabilidade genética e ampla distribuição geográfica dos genótipos prevalentes.

A comparação dos biofilmes formados por isolados de *C. jejuni* e *C. coli* em poliestireno, vidro e aço inoxidável, sugeriu, ainda, que o crescimento em biofilme poderá promover a sobrevivência destas bactérias em diferentes superfícies e condições de stresse ambiental, favorecendo a persistência ao longo da cadeia de processamento alimentar.

**Characterization of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates  
obtained from broilers caeca, in Portugal, in the framework of a  
prevalence community study**

Genotyping and elucidation of biofilm growth associated determinants

**ABSTRACT**

Campylobacteriosis is the most notified zoonosis in developed countries, *Campylobacter jejuni* being the most frequent etiological agent and poultry meat consumption representing an important risk factor.

Restriction fragment length polymorphism analysis of the *flaA* gene (*flaA*-RFLP) of 112 *C. coli* and 67 *C. jejuni* isolates, obtained in Portugal from a nationwide survey of *Campylobacter* prevalence in broilers at slaughter (in the framework of the Commission Decision 2007/516/EC), yielded 11 *flaA*-RFLP patterns using *HinfI* (Simpson diversity index,  $D=0.62$ ) and 48 *flaA*-RFLP patterns with *DdeI* ( $D=0.89$ ), evidencing the high genetic variability of the isolates and the wide geographical distribution of the prevalent genotypes.

The comparison of the biofilms formed by *C. jejuni* and *C. coli* isolates in polystyrene, glass and steel suggested that biofilm associated growth may promote bacterial survival on different surfaces and environmental stress conditions, favoring persistence throughout the food processing chain.

## **PALAVRAS-CHAVE**

- *Campylobacter jejuni*
- *Campylobacter coli*
- *flaA*-RFLP
- Biofilmes
- Adaptação ao stresse ambiental

## **KEY-WORDS**

- *Campylobacter jejuni*
- *Campylobacter coli*
- *flaA*-RFLP
- Biofilms
- Adaptation to environmental stress

## AGRADECIMENTOS

O trabalho experimental que esteve na base da escrita da presente dissertação decorreu no laboratório de bacteriologia do INRB-LNIV. Começo por dirigir os meus primeiros agradecimentos à equipa de trabalho do laboratório que com a sua simpatia contribui para uma fácil adaptação inicial e um agradável percurso ao longo do período de estágio.

Agradeço, especialmente, à Doutora Mónica Cunha, minha orientadora, por ter proporcionado todas as condições necessárias para a realização do presente trabalho. Pela partilha de conhecimento, pelo estímulo e pelas críticas construtivas, fundamentais para o progresso do meu desempenho no decurso do trabalho e para a minha formação científica. Agradeço também a amizade e todos os momentos dispendidos para me apoiar.

À Dra. Lurdes Clemente, que para além de se ter demonstrado sempre disponível para ajudar, foi gentilmente respondendo a todas as questões relacionadas com o estudo de prevalência, de que resultaram os isolados estudados no presente trabalho.

À Dra. Ana Canto e à Dra. Maria José Barahona, pela pronta assistência sempre que solicitada.

À Doutora Ana Botelho pelo interesse e estímulo transmitidos.

Ao Doutor Patrick Freire, pelo contributo na parte inicial do trabalho experimental em questões técnico-científicas que foram surgindo.

À D. Leonor, pela simpatia e apoio prestado a nível da preparação dos materiais utilizados nos ensaios.

À D. Conceição e D. Ana, pela boa disposição e pela preciosa ajuda na preparação dos meios de cultura.

À Doutora Teresa Rocha e outros técnicos do INRB-LNIV pelo valioso contributo no isolamento e classificação dos isolados de *Campylobacter* spp. estudados no presente trabalho.

Aos engenheiros Luís Matos e Sónia Aleixo, da empresa *Interaves, S.A.*, pelo acompanhamento na visita guiada ao matadouro e pela disponibilidade na resposta a questões que foram surgindo.

Ao Diogo Mendonça e ao José Matos do INRB-INIA pelo contributo na sequenciação dos produtos de amplificação do gene *flaA* de alguns dos isolados em estudo.

À Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT). O trabalho presente nesta dissertação foi parcialmente financiado pela FCT, no âmbito do projecto nacional (PTDC/CVT/117794/2010), com enquadramento no Projecto 3599 – Promover a Produção Científica e Desenvolvimento Tecnológico e a Constituição de Redes Temáticas.

Aos colegas Filipa, Sofia, Marcos, Pedro, Ana Sofia, Ricardo, Cláudia, Susana, Inês, Hugo e Maria, pelos momentos de boa disposição e pelo companheirismo. Um agradecimento especial à Maria pela ajuda e disponibilidade na etapa final da realização deste trabalho.

Finalmente, um enorme agradecimento aos meus pais, avós, irmãos e namorado pelo apoio incondicional, pelo carinho, incentivo e paciência em todos os momentos.

## ABREVIATURAS

$\mu_c$  Taxa específica máxima de crescimento

$\mu\text{g}$  Micrograma

$\mu\text{L}$  Microlitro

$\mu\text{M}$  Micromolar

$\times g$  Unidade de medida da força centrífuga

**A** Adenina

**A<sub>260nm</sub>** Absorvância a 260 nanómetros

**A<sub>280nm</sub>** Absorvância a 280 nanómetros

**A<sub>600nm</sub>** Absorvância a 600 nanómetros

**A<sub>570nm</sub>** Absorvância a 570 nanómetros

**A<sub>595nm</sub>** Absorvância a 595 nanómetros

**AFLP** *Amplified Fragment Length Polymorphism*

**ATP** 5'-Trifosfato de adenosina

**AVEC** *Association of Poultry Processors and Poultry Trade in the EU countries*

**BB** *Brucella Broth*

**BHI** *Bacto Heart Infusion Broth*

**BSA** *Bovine Serum albumin*

**C** Citosina

**CCUG** *Culture Collection, University of Göteborg*

**CDT** *Cytolethal Distending Toxin*

**CLSI** *The Clinical Laboratory Standard Institute*

**cm** Centímetro

**cm<sup>3</sup>** Centímetro cúbico

**CMI** Concentração Mínima Inibitória

**dATP** 2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato

**dCTP** 2'-desoxicitidina 5'-trifosfato

**dGTP** 2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato

**DGV** Direcção Geral de Veterinária

**DNA** *Deoxyribonucleic acid*

**dNTP** Mistura de 5'-trifosfato de desoxirribonucleótidos

**dTTP** 2'-desoxitimidina 5'-trifosfato

**EDTA** *Ethylenediamine tetraacetic acid*

**EFSA** *European Food Safety Authority*

**ET** *Electrophoretic type*

**g** Grama

**G** Guanina

**GTPase** *Guanosine triphosphatase*

**h** Hora

**HACCP** *Hazard Analysis of Critical Control Points*

**HL** *Heat-labile*

**HS** *Heat-stable*

**INIA** Instituto Nacional de Investigação Agrária

**INRB** Instituto Nacional de Recursos Biológicos

**Kb** Kilobase (10<sup>3</sup> pares de bases)

**Kg** Quilograma

**L** Litro

**LB** *Luria-Bertani Broth*

**LNIV** Laboratório Nacional de Investigação Veterinária

**LNR** Laboratório Nacional de Referência

**LOS** Lipooligossacáridos

**LR** Local de reconhecimento

**m** Massa

**m<sup>2</sup>** Metros quadrados

**M** Molar

**MATH** *Microbial Adhesion To Hydrocarbon*

**Mb** Megabase (10<sup>6</sup> pares de bases)

**mCCD** *Modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate*

**mg** Miligrama

**MHB** *Mueller-Hinton Broth*

**mL** Mililitro

**MLEE** *Multilocus Enzyme Electrophoresis*

**MLST** *Multilocus Sequence Typing*

**mm** Milímetro

**mM** Milimolar

**NCBI** *National Center for Biotechnology Information*

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

**ng** Nanograma

**nm** Nanómetro

**NR** Não reprodutível

**OMS** Organização Mundial de Saúde

**ORF** *Open Reading Frame*

**Pb** Par de bases

**PBS** *Phosphate Buffered Saline*

**PCR** *Polymerase Chain Reaction*

**PFGE** *Pulsed Field Gel Electrophoresis*

**pH** Simétrico do logaritmo decimal da concentração hidrogeniônica

**pmol** Picomol

**RAPD** *Random amplification of polymorphic DNA*

**rDNA** *Ribosomal Deoxyribonucleic acid*

**RFLP** *Restriction Fragment Length Polymorphism*

**RNase** *Ribonuclease*

**ROS** *Reactive Oxygen Species*

**RPM** Rotações por minuto

**rRNA** *Ribosomal Ribonucleic acid*

**s** Segundo

**SDS** *Sodium dodecyl sulfate*

**SGB** Síndrome de Guillain-Barré

**SMF** Síndrome de Miller Fisher

**SPE** Substratos poliméricos extracelulares

**ST** *Sequence type*

**T** Timina

**TBE** Tris/Borato/EDTA

**TE** Tris/EDTA

**TSB** *Trypticase Soya Broth*

**UE** União Europeia

**UFC** Unidades Formadoras de Colónias

**UPGMA** *Unweighted-Pair Group Method using Arithmetic Averages*

**UPTC** *Urease-Positive Thermophilic Campylobacter*

**v** Volume

# ÍNDICE

RESUMO .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>PALAVRAS-CHAVE/KEY WORDS</b> .....	iii
AGRADECIMENTOS .....	iv
ABREVIATURAS .....	vi
ÍNDICE.....	xi

<b>INTRODUÇÃO, ORGANIZAÇÃO E OBJECTIVOS DA DISSERTAÇÃO</b> .....	1
--	---

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	3
----------------------------------	---

<b>1.1. Género <i>Campylobacter</i></b> .....	3
---	---

1.1.1. Taxonomia e filogenia .....	3
------------------------------------	---

1.1.1.1. Resenha histórica .....	3
----------------------------------	---

1.1.1.2. Considerações taxonómicas à luz do actual conhecimento .....	4
---	---

<b>1.2. Características gerais</b> .....	8
--	---

1.2.1. Morfologia .....	8
-------------------------	---

1.2.2. Requisitos de crescimento .....	9
--	---

1.2.3. Organização do genoma.....	9
-----------------------------------	---

1.2.4. Metabolismo energético .....	10
-------------------------------------	----

1.2.5. Ecologia e principais reservatórios.....	11
---	----

<b>1.3. <i>Campylobacter</i> spp. na cadeia de processamento alimentar</b> .....	13
--	----

1.3.1. Prevalência de <i>Campylobacter</i> spp. em bandos e carcaças de frangos na União Europeia .....	15
1.3.1.1. Factores de risco associados à colonização de frangos/contaminação de carcaças por <i>Campylobacter</i> spp. ....	18
1.3.1.2. Análise de factores de risco/medidas de controlo .....	20
1.3.2. Mecanismos de sobrevivência: a capacidade de formação de biofilmes .....	22
<b>1.4. Campilobacteriose em Humanos .....</b>	<b>26</b>
1.4.1. Principais vias de transmissão .....	26
1.4.2. Epidemiologia .....	27
1.4.3. Factores de virulência e possível (eis) mecanismo (s) de infecção .....	29
1.4.4. Manifestações da doença .....	32
<b>1.5. Métodos de isolamento e caracterização de bactérias do género <i>Campylobacter</i> .....</b>	<b>33</b>
1.5.1. Isolamento convencional .....	33
1.5.2. Abordagens moleculares usadas na detecção directa de <i>Campylobacter</i> spp. em produtos alimentares .....	33
1.5.3. Caracterização fenotípica dos isolados .....	34
1.5.4. Caracterização genotípica dos isolados .....	38
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>41</b>
<b>2.1. Microrganismos em estudo: Origem e Isolamento .....</b>	<b>41</b>
<b>2.2. Manutenção das culturas .....</b>	<b>48</b>
<b>2.3. Condições de crescimento das culturas .....</b>	<b>48</b>
2.3.1. Crescimento em meio sólido .....	48
2.3.2. Preparação de pré-inóculos para o crescimento em meio líquido .....	49

<b>2.4. Extracção e purificação do DNA total dos isolados de <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i></b> .....	<b>50</b>
2.4.1. Extracção Fenol/Clorofórmio .....	50
2.4.2. Extracção por fervura .....	51
2.4.3. Extracção com sistema comercial .....	52
2.4.3.1. Extracção de DNA por recurso ao sistema <i>High Pure PCR Template Preparation</i> da Roche .....	52
2.4.3.2. Extracção de DNA por recurso ao sistema <i>Gentra Puregene Yeast/Bact</i> da Quiagen .....	53
<b>2.5. Genotipagem dos isolados</b> .....	<b>54</b>
2.5.1. Genotipagem dos isolados baseada na análise dos polimorfismos dos fragmentos de restrição do gene <i>flaA</i> ( <i>flaA</i> -RFLP).....	54
2.5.1.1. Reacção de polimerização em cadeia para a amplificação do gene <i>flaA</i> .....	54
2.5.1.2. Detecção dos produtos de amplificação do gene <i>flaA</i> .....	55
2.5.1.3. Sequenciação dos produtos de amplificação do gene <i>flaA</i> .....	55
2.5.1.4. Recuperação de fragmentos de DNA de um gel de agarose .....	56
2.5.1.4.1. Recuperação de DNA a partir de bandas do gel por recurso ao sistema comercial <i>GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification</i> da Amersham Biosciences.....	56
2.5.1.4.2. Recuperação de DNA a partir de bandas do gel por recurso ao sistema comercial <i>illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification</i> da GE Healthcare .....	57
2.5.1.5. Restrição dos produtos de amplificação do gene <i>flaA</i> .....	57
2.5.1.6. Análise dos perfis <i>flaA</i> -RFLP obtidos .....	58
2.5.1.7. Análise do poder discriminatório da técnica <i>flaA</i> -RFLP .....	58
2.5.2. Análise dos polimorfismos dos macrofragmentos de restrição separados por electroforese de campo pulsado .....	59
2.5.2.1. Preparação do DNA total .....	59
2.5.2.2. Restrição do DNA total .....	60

2.5.2.3. Separação dos fragmentos de restrição por electroforese de campo pulsado ....	60
<b>2.6. Caracterização de isolados de <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> quanto à sua capacidade de formação de biofilmes em superfícies abióticas .....</b>	<b>61</b>
2.6.1. Ensaio preliminares para selecção das condições que promovem o crescimento em biofilme de <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> .....	61
2.6.1.1. Estudo do efeito do meio de cultura .....	62
2.6.1.2. Estudo do efeito da temperatura .....	62
2.6.1.3. Estudo do efeito da atmosfera .....	62
2.6.1.4. Estudo do efeito do período de incubação .....	62
2.6.1.5. Estudo do efeito da agitação .....	62
2.6.1.6. Preparação dos ensaios em diferentes superfícies .....	62
2.6.1.6.1. Microplacas de poliestireno .....	62
2.6.1.6.2. Lâminas de vidro e aço inoxidável .....	63
2.6.1.7. Quantificação dos biofilmes formados .....	64
2.6.1.7.1. Quantificação dos biofilmes formados em microplaca de poliestireno .....	64
2.6.1.7.2. Quantificação dos biofilmes formados em lâminas de vidro e aço inoxidável...	65
2.6.2. Caracterização das curvas de crescimento e determinação da taxa específica máxima de crescimento.....	65
2.6.3. Determinação do número de Unidades Formadoras de Colónias (UFCs) .....	66
2.6.4. Ensaio de formação de biofilmes .....	68
2.6.4.1. Crescimento dos isolados em biofilme utilizando, para o efeito, microplacas de poliestireno.....	68
2.6.4.2. Crescimento dos isolados em biofilme utilizando, para o efeito, lâminas de vidro ou de aço inoxidável .....	69
2.6.5. Ensaio de mobilidade: <i>Swimming</i> e <i>Swarming</i> .....	69

2.6.6. Determinação da hidrofobicidade da superfície celular.....	70
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>71</b>
<b>3.1. Caracterização genotípica de isolados de <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> obtidos a partir de cecos de frangos provenientes de várias regiões de Portugal Continental.....</b>	<b>71</b>
3.1.1. Âmbito do estudo realizado .....	71
3.1.2. Caracterização da subpopulação de isolados de <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> examinados ..	72
3.1.3. Genotipagem baseada na análise dos polimorfismos dos fragmentos de restrição do gene <i>flaA</i> ( <i>flaA</i> -RFLP).....	74
3.1.3.1. Amplificação do gene <i>flaA</i> .....	74
3.1.3.2. Sequenciação dos produtos de amplificação do gene <i>flaA</i> .....	76
3.1.3.3. Interpretação dos polimorfismos dos fragmentos de restrição do gene <i>flaA</i> gerados pelas endonucleases <i>HinfI</i> e <i>DdeI</i> .....	79
3.1.3.4. Diversidade e frequência dos perfis de restrição do gene <i>flaA</i> .....	81
3.1.3.5. Análise fenética dos isolados em estudo com base nos polimorfismos identificados no gene <i>flaA</i> .....	91
3.1.3.6. Distribuição geográfica dos perfis <i>flaA</i> -RFLP .....	93
3.1.3.7. Distribuição temporal dos perfis <i>flaA</i> -RFLP considerando isolados provenientes da mesma exploração .....	96
3.1.4. Genotipagem dos isolados baseada na análise dos polimorfismos dos macrofragmentos de restrição separados por electroforese de campo pulsado.....	98
<b>3.2. Estudo da formação de biofilme como possível mecanismo de persistência de <i>Campylobacter</i> na cadeia de processamento alimentar .....</b>	<b>100</b>
3.2.1. Âmbito do estudo realizado .....	100
3.2.2. Selecção dos isolados e condições experimentais utilizadas para avaliação da capacidade de formação de biofilmes .....	101
3.2.2.1. Ensaio preliminares para a selecção das condições que promovem o crescimento em biofilme de <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> .....	106

3.2.2.1.1. Avaliação da capacidade de formação de biofilmes em poliestireno e aerobiose.....	110
3.2.2.1.2. Avaliação da capacidade de formação de biofilmes em poliestireno e microaerofilia .....	114
3.2.2.1.3. Avaliação da capacidade de formação de biofilmes em vidro e aço, em microaerofíia .....	116
3.2.3. Avaliação do crescimento em biofilme como resposta ao stresse ambiental.....	119
3.2.3.1. Determinação das taxas específicas de crescimento dos isolados em estudo....	120
3.2.3.2. Dimensão dos biofilmes formados em microplacas de poliestireno .....	123
3.2.3.3. Dimensão dos biofilmes formados em lâminas de vidro e aço inoxidável .....	128
3.2.3.4. Comparação da mobilidade dos isolados como determinante na formação de biofilmes.....	132
<b>4. DISCUSSÃO FINAL E PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>135</b>
<b>4.1. Importância, para Portugal, do estudo de genotipagem de isolados de <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> com origem em cecos de frangos.....</b>	<b>136</b>
<b>4.2. Importância do crescimento em biofilme como possível mecanismo de persistência de isolados de <i>C. jejuni</i> e <i>C.coli</i> na cadeia de processamento alimentar .....</b>	<b>141</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>145</b>

## INTRODUÇÃO, ORGANIZAÇÃO E OBJECTIVOS DA DISSERTAÇÃO

Alguns dos microrganismos pertencentes ao género *Campylobacter*, particularmente *Campylobacter jejuni*, são, actualmente, considerados responsáveis pela grande maioria das infecções entéricas zoonóticas que ocorrem à escala mundial (FAO/WHO, 2009). A incidência de campilobacteriose humana, bem como a morbilidade e possíveis sequelas associadas, contribuem para um considerável impacto destes microrganismos, não só a nível social mas também económico. No entanto, esse impacto tem, por vezes, sido subestimado, devido à maior importância atribuída a outros agentes patogénicos que, tradicionalmente, se consideram associados a surtos de doenças de origem alimentar, como por exemplo *Salmonella* spp. (EFSA, 2011).

A epidemiologia das infecções humanas causadas por *Campylobacter* não é, ainda, muito clara. Acresce que, apesar de ubíquos na Natureza, os microrganismos incluídos no género *Campylobacter* apresentam necessidades de crescimento muito particulares. Apesar da sua aparente susceptibilidade *in vitro*, as bactérias do género *Campylobacter* conseguem resistir à exposição a variadas condições de stresse ambiental e de, ainda assim, causar doença em humanos. É, assim, essencial elucidar os mecanismos utilizados por estas bactérias para sobreviver ao longo da cadeia de produção/processamento de alimentos e reunir evidências que permitam responder a algumas questões cruciais que, certamente, contribuirão para uma melhor prevenção e controlo da campilobacteriose:

- De entre o leque alargado de possíveis reservatórios, quais os que efectivamente contribuem para a transmissão de *Campylobacter* spp. ao Homem?
- Existe uma associação regular entre os genótipos de estirpes isoladas a partir de diferentes hospedeiros/matrizes?
- Uma estirpe com o mesmo genótipo pode apresentar uma variação do potencial patogénico em diferentes hospedeiros?
- Quais os mecanismos subjacentes à capacidade de sobrevivência de *Campylobacter* spp. em condições ambientais hostis?

O presente trabalho teve como primeiro objectivo caracterizar a nível genotípico um conjunto de isolados de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* que são as espécies que, maioritariamente se relacionam com os casos de campilobacteriose humana. Estes isolados foram obtidos de cecos de frangos, em 2008, no âmbito da Decisão da Comissão 2007/516/EC,

adoptada com base em estudos dos quais resultaram, entre outros, dados relativos à incidência da campilobacteriose humana em diversos Estados-Membro, e à importância da carne de frango como factor de risco predominante na transmissão do agente patogénico ao Homem. Em Portugal, o estudo de prevalência de *Campylobacter* spp. em bandos e carcaças de frangos foi realizado pela Direcção Geral de Veterinária, com o apoio laboratorial do Laboratório Nacional de Referência, INRB-LNIV.

O segundo objectivo da presente dissertação consistiu em avaliar, para um conjunto restrito dos isolados de campo genotipados, seleccionados com base no seu fenótipo de resistência à ciprofloxacina e eritromicina, a capacidade de formação de biofilmes como um dos possíveis mecanismos responsáveis pela sua persistência na cadeia de produção alimentar. Os ensaios tiveram lugar em diferentes superfícies abióticas e condições ambientais com o objectivo de se aferir quais as condições que propiciam o crescimento em biofilme e visando abrir caminho para, em futuros trabalhos, se identificar os determinantes moleculares envolvidos nas etapas essenciais à formação de biofilmes em *C. jejuni* e *C. coli*.

No que diz respeito à organização da dissertação, é apresentada, em primeiro lugar, uma síntese das principais características dos microrganismos pertencentes ao género *Campylobacter* consideradas relevantes no contexto do presente estudo, abordando-se também aspectos relacionados com a sua capacidade de sobrevivência em ambiente desfavorável, nomeadamente na cadeia de processamento alimentar. É detalhado o seu impacto na Saúde Pública e são também apresentados os principais métodos usados na sua caracterização fenotípica e molecular. Em seguida, são descritos os aspectos metodológicos considerados no desenvolvimento experimental do trabalho. Sucede-se o capítulo onde se descrevem e discutem os resultados obtidos relativamente à caracterização genotípica e fenotípica (crescimento em biofilme) dos isolados. Por fim, as evidências obtidas neste trabalho, bem como as limitações das metodologias usadas, são, no capítulo da discussão final, interpretadas e discutidas à luz do seu significado biológico e epidemiológico, sugerindo-se novas questões e abordagens a serem desenvolvidas em trabalhos futuros.

## 1. Introdução Geral

### 1.1. Género *Campylobacter*

#### 1.1.1. Taxonomia e filogenia

##### 1.1.1.1. Resenha histórica

Os microrganismos pertencentes ao género *Campylobacter* foram, durante muito tempo, incluídos equivocadamente no género *Vibrio* (On, 2005). Até 1973, as descrições de algumas formas vibríóides que hoje se consideram pertencer ao género *Campylobacter* estavam essencialmente associadas a problemas reprodutivos em bovinos e ovinos, sendo que a primeira referência conhecida nesse âmbito resultou do trabalho de McFadyean e Stockman. Em 1913, estes dois médicos veterinários referiram o isolamento frequente de uma bactéria desconhecida, de forma vibríóide, semelhante a *Vibrio*, a partir de fetos abortados de ovelhas (McFadyean & Stockman, 1913 citado por Butzler, 2004). Mais tarde, em 1919, depois de investigar abortos infecciosos em bovinos, Smith isolou uma forma bacilar espirilada e assumiu tratar-se da bactéria anteriormente referida por McFadyean e Stockman, propondo, juntamente com Taylor, chamar-lhe *Vibrio fetus* (Smith & Taylor, 1919 citado por Butzler, 2004).

Em 1931, Jones e Little atribuíram a enterite de bovinos a uma bactéria vibríóide, à qual chamaram *Vibrio jejuni* (Jones & Little, 1931 citado por Wassenaar & Newell, 2006) e, em 1944, uma bactéria semelhante (*Vibrio coli*) foi associada por Doyle à disenteria em suínos (Doyle, 1948 citado por Wassenaar & Newell, 2006).

Só a partir de meados dos anos 40 se começa a associar *Campylobacter* a infecções humanas (Levy, 1946 citado por Wassenaar & Newell, 2006; Vinzent *et al.*, 1947 e King, 1957 citados por Butzler, 2004), existindo, no entanto, evidências do seu envolvimento em enterites humanas há mais de 100 anos. De facto, em 1886, já Escherich tinha observado microscopicamente organismos com morfologia espiral, não cultiváveis, isolados a partir de fezes de crianças que morreram de disenteria, na altura denominada de *cholera infantum* (Percival *et al.*, 2004; Wassenaar & Newell, 2006). De acordo com a literatura, pensa-se que esta terá sido a primeira observação de microrganismos pertencentes ao género *Campylobacter* (Kist, 1986).

Em 1957, num dos seus estudos, King descreveu o isolamento de microrganismos a partir de humanos infectados que, apesar de semelhantes a outros vibríóides, possuíam características bioquímicas e antigénicas particulares e, para diferenciá-los, denominou-os *related Vibrio* (King, 1957 citado por Butzler, 2004).

Constata-se, assim, que a taxonomia das bactérias do género *Campylobacter* foi, durante muito tempo, pouco clara, o que se deve, essencialmente, ao facto de as classificações taxonómicas serem, até meados dos anos 60, baseadas sobretudo na avaliação de características fenotípicas, tais como a morfologia celular, requisitos para o crescimento, testes bioquímicos e testes imunológicos (On, 2005). Até 1963, o género *Vibrio* incluía bactérias que apresentavam morfologia curva/espiral semelhantes à do agente responsável pela cólera mas, já na altura, se denotava uma grande variabilidade dentro do género (On, 2005). Em 1963, Sebald & Véron demonstram que *V. fetus* e *V. bubulus* eram consideravelmente diferentes de outras espécies incluídas no género *Vibrio*, devido ao seu metabolismo não fermentativo e baixo conteúdo G+C do DNA genómico, propondo, pela primeira vez, a criação do género *Campylobacter* (Sebald & Véron, 1963 citado por On, 2005). Desde essa altura, a taxonomia de *Campylobacter* modificou-se, mas só dez anos mais tarde, com o estudo taxonómico detalhado de Véron & Chatelain (1973), se conseguiu uma maior aceitação do género entre os membros da comunidade científica.

Devido ao atraso e dificuldade em se reestruturar a taxonomia de *Campylobacter spp.*, a sua prevalência e relevância em infecções humanas mantiveram-se, durante décadas, pouco esclarecidas. Até ao final dos anos 60 apenas tinham sido reportados na literatura doze casos de infecção por *Campylobacter spp. (related Vibrio)* em humanos (revisto por Dekeyser *et al.*, 1972 e Butzler, 2004), no entanto, nos seus estudos, King (King, 1957; King, 1962 citados por Butzler, 2004) sugeriu que esta doença infecciosa não seria tão escassa como poderia parecer, o que mais tarde se veio comprovar. As infecções por bactérias do género *Campylobacter* só começaram a receber o devido interesse no seio da comunidade científica após os estudos de Butzler *et al.* (1973) e Skirrow (1977), os quais sugeriam uma associação frequente de *Campylobacter spp.* a casos de diarreia em humanos. Outro dos factores que contribuíram para este interesse tardio relaciona-se com a dificuldade de isolamento destes microrganismos. Até à década de 70, o diagnóstico era feito a partir da análise do sangue de pacientes presumivelmente infectados. O passo crucial para o diagnóstico destas bactérias resultou do trabalho de Dekeyser e colaboradores, através do qual se conseguiram os primeiros isolamentos de *Campylobacter spp.* a partir de amostras fecais humanas (Dekeyser *et al.*, 1972). Como consequência, nos anos seguintes, foram descritas várias espécies de *Campylobacter*, sendo referido o seu isolamento a partir de uma grande variedade de fontes.

#### **1.1.1.2. Considerações taxonómicas à luz do actual conhecimento**

Até ao presente momento (Outubro de 2011), encontram-se descritas 32 espécies e 13 subespécies de *Campylobacter* (Tabela 1.1). No entanto, a realização de estudos comparativos

(p.e. hibridações DNA-DNA, análise de padrões proteicos, comparação de sequências de RNA), levou ao reposicionamento de várias espécies inicialmente classificadas no género *Campylobacter* (*Campylobacter pylori*, *Campylobacter nitrofigilis*, *Campylobacter cinaedi*, *Campylobacter fennelliae*, *Campylobacter butzleri*, *Campylobacter cryaerophilus*, *Campylobacter mustelae*) que passaram a ser incluídas em grupos de bactérias filogeneticamente relacionadas, nomeadamente nos géneros *Arcobacter* (*Arcobacter cryaerophilus*, *Arcobacter nitrofigilis*, *Arcobacter butzleri*) e *Helicobacter* (*Helicobacter pylori*, *Helicobacter fennelliae*, *Helicobacter cinaedi*, *Helicobacter mustelae*) (On, 2005; Wassenaar & Newell, 2006).

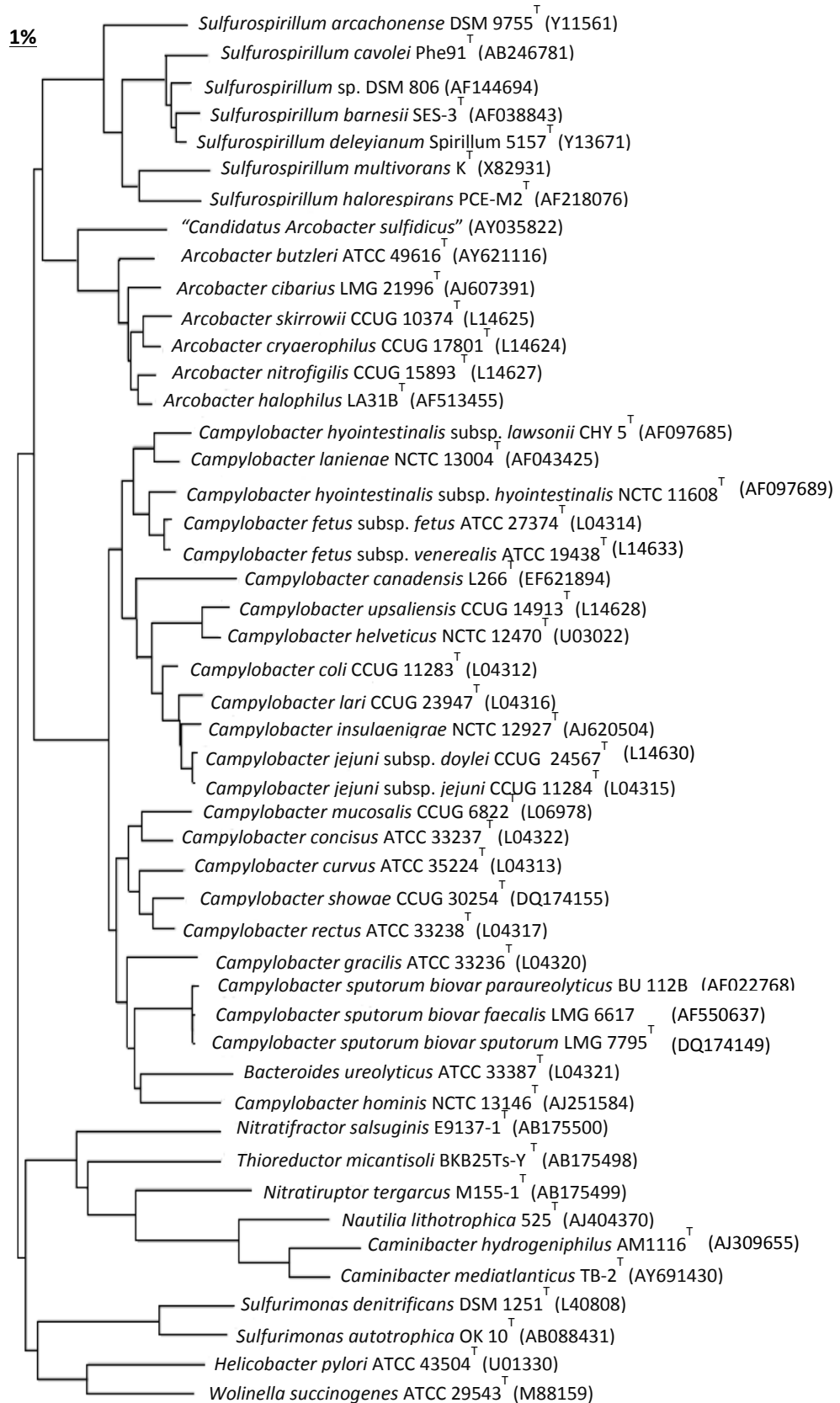
Considerando que as espécies *Campylobacter coli* e *Campylobacter hyoilei* são sinónimas (Vandamme *et al.*, 1997; Vandamme & On, 2001), estão, até ao presente, englobadas no género *Campylobacter* 24 espécies, das quais quatro se dividem em duas subespécies (*Campylobacter fetus* subsp. *fetus*, *C. fetus* subsp. *venerealis*, *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *C. hyointestinalis* subsp. *lawsonii*, *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni*, *C. jejuni* subsp. *doylei*, *Campylobacter lari* subsp. *concheus*, *C. lari* subsp. *lari*). Para a espécie *Campylobacter sputorum*, existem três biovares descritos (*C. sputorum* bv. *sputorum*, *C. sputorum* bv. *faecalis*, *C. sputorum* bv. *paraureolyticus*).

**Tabela 1.1** - Lista de espécies e subespécies descritas para o género *Campylobacter*, de acordo com Euzéby “List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature”. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/c/campylobacter.html#r>. Consultado a 29 de Outubro de 2011.

<b>Espécie/Subespécie</b>	<b>Referência (s)</b>
<i>Campylobacter avium</i>	Rossi <i>et al.</i> , 2009
<i>Campylobacter butzleri</i>	Kiehlbauch <i>et al.</i> , 1991
<i>Campylobacter canadensis</i>	Inglis <i>et al.</i> , 2007
<i>Campylobacter cinaedi</i>	Totten <i>et al.</i> , 1988
<i>Campylobacter coli</i>	(Doyle, 1948) Véron & Chatelain, 1973; Skerman, 1980
<i>Campylobacter concisus</i>	Tanner <i>et al.</i> , 1981
<i>Campylobacter cryaerophilus</i>	Neill <i>et al.</i> , 1985
<i>Campylobacter cuniculorum</i>	Zanoni <i>et al.</i> , 2009
<i>Campylobacter curvus</i>	(Tanner <i>et al.</i> , 1984) Vandamme <i>et al.</i> , 1991
<i>Campylobacter fennelliae</i>	Totten <i>et al.</i> , 1988
<i>Campylobacter fetus</i>	(Smith & Taylor, 1919) Sebald & Véron, 1963; Skerman, 1980
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	(Smith & Taylor, 1919) Sebald & Véron, 1963
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	(Florent, 1959) Véron & Chatelain, 1973; Skerman, 1980
<i>Campylobacter gracilis</i>	(Tanner <i>et al.</i> , 1981) Vandamme <i>et al.</i> , 1995

Espécie/Subespécie	Referência (s)
<i>Campylobacter helveticus</i>	Stanley <i>et al.</i> , 1993
<i>Campylobacter hominis</i>	Lawson <i>et al.</i> , 2001
<i>Campylobacter hyoilei</i>	Alderton <i>et al.</i> , 1995
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	Gebhart <i>et al.</i> , 1985; On <i>et al.</i> , 1995
<i>Campylobacter hyointestinalis</i> subsp. <i>hyointestinalis</i>	Gebhart <i>et al.</i> , 1985; On <i>et al.</i> , 1995
<i>Campylobacter hyointestinalis</i> subsp. <i>lawsonii</i>	On <i>et al.</i> , 1995
<i>Campylobacter insulaenigrae</i>	Foster <i>et al.</i> , 2004
<i>Campylobacter jejuni</i>	(Jones <i>et al.</i> , 1931) Véron & Chatelain, 1973; Skerman, 1980
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	Steele & Owen, 1988; Vandamme & On, 2001
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	(Jones <i>et al.</i> , 1931) Véron & Chatelain, 1973; Howey <i>et al.</i> , 1990
<i>Campylobacter lanienae</i>	Logan <i>et al.</i> , 2000
<i>Campylobacter lari</i>	Benjamin <i>et al.</i> , 1984
<i>Campylobacter lari</i> subsp. <i>concheus</i>	Debruyne <i>et al.</i> , 2009
<i>Campylobacter lari</i> subsp. <i>lari</i>	Benjamin <i>et al.</i> , 1984; Debruyne <i>et al.</i> , 2009
<i>Campylobacter mucosalis</i>	(Lawson <i>et al.</i> , 1981) Roop <i>et al.</i> , 1985
<i>Campylobacter mustelae</i>	(Fox <i>et al.</i> , 1988) Fox <i>et al.</i> , 1989
<i>Campylobacter nitrofigilis</i>	McClung <i>et al.</i> , 1983
<i>Campylobacter peloridis</i>	Debruyne <i>et al.</i> , 2009
<i>Campylobacter pylori</i>	Marshall <i>et al.</i> , 1985
<i>Campylobacter pylori</i> subsp. <i>mustelae</i>	Fox <i>et al.</i> , 1988
<i>Campylobacter pylori</i> subsp. <i>pylori</i>	Marshall <i>et al.</i> , 1985; Fox <i>et al.</i> , 1988
<i>Campylobacter rectus</i>	(Tanner <i>et al.</i> , 1981) Vandamme <i>et al.</i> , 1991
<i>Campylobacter showae</i>	Etoh <i>et al.</i> , 1993
<i>Campylobacter sputorum</i>	(Prévot, 1940) Véron & Chatelain, 1973; Roop <i>et al.</i> , 1986; On <i>et al.</i> , 1998; Vandamme & On, 2001
<i>Campylobacter sputorum</i> subsp. <i>bubulus</i>	(Florent, 1953) Véron & Chatelain, 1973; Skerman, 1980
<i>Campylobacter sputorum</i> subsp. <i>mucosalis</i>	Lawson <i>et al.</i> , 1981
<i>Campylobacter sputorum</i> subsp. <i>sputorum</i>	(Prévot, 1940) Véron & Chatelain, 1973; Roop <i>et al.</i> , 1986
<i>Campylobacter subantarcticus</i>	Debruyne <i>et al.</i> , 2010
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	Sandstedt & Ursing, 1991
<i>Campylobacter ureolyticus</i>	(Jackson & Goodman, 1978) Vandamme <i>et al.</i> , 2010
<i>Campylobacter volucris</i>	Debruyne <i>et al.</i> , 2010

Os gêneros *Campylobacter*, *Arcobacter* e *Sulfurospirillum* formam a família *Campylobacteraceae*. Estes gêneros formam ainda um grupo filogeneticamente diverso referido por superfamília rRNA VI ou Epsilonbacteria (On, 2005). Na Figura 1.1 está representada uma árvore filogenética da família *Campylobacteraceae* e de bactérias relacionadas, construída com base na similaridade das respectivas sequências nucleotídicas do gene rDNA 16S.



**Figura 1.1** - Árvore filogenética da família *Campylobacteraceae* e de bactérias relacionadas, construída com base na percentagem de similaridade do gene rDNA 16S. Retirado de Debruyne *et al.* (2008).

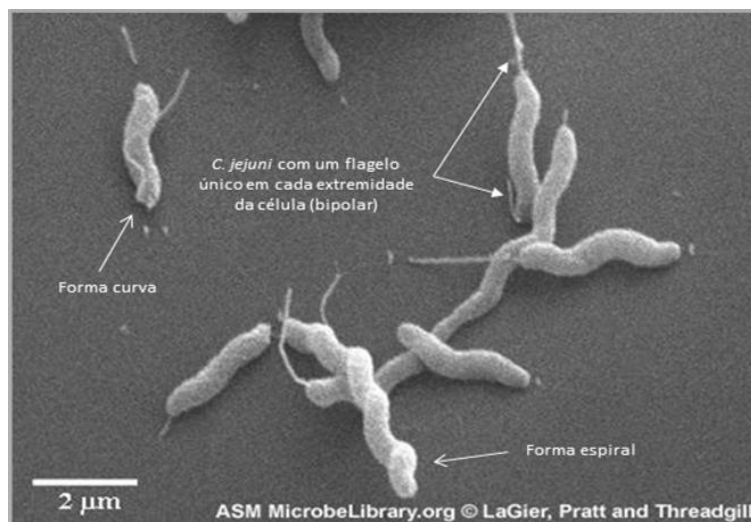
## 1.2. Características gerais

As bactérias pertencentes ao género *Campylobacter* são de Gram negativo, não esporulantes, inserindo-se na subdivisão Epsilon do grupo das proteobactérias (Wassenaar & Newell, 2006).

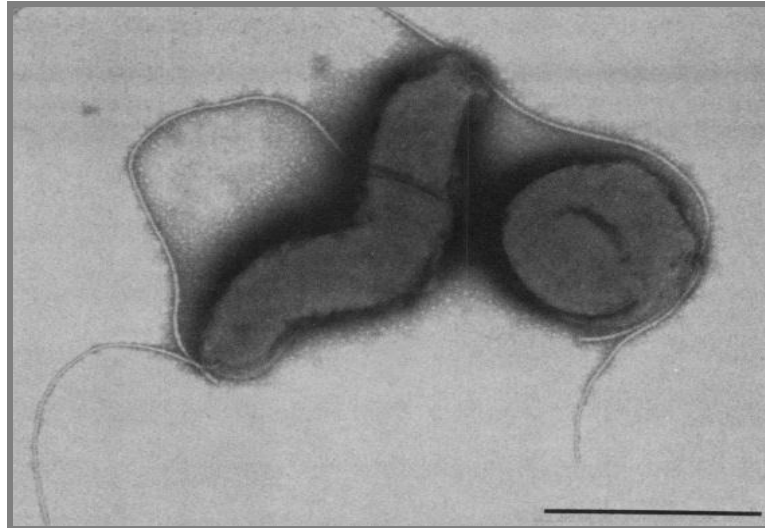
### 1.2.1. Morfologia

Em termos morfológicos, estas bactérias são caracterizadas por formas bacilares delgadas (0,2 – 0,8  $\mu\text{m}$  de espessura) e pequenas (0,5 - 5,0  $\mu\text{m}$ ) que assumem estruturas curvas ou helicoidais (Fig. 1.2). Em culturas envelhecidas ou expostas a situações de stresse ambiental, as células podem assumir uma forma esférica ou cocoide (Fig. 1.3) (Park, 2002; Snelling *et al.*, 2005; Wassenaar & Newell, 2006; Humphrey *et al.*, 2007). Geralmente, estes microrganismos possuem uma mobilidade do tipo “saca – rolhas” impulsionada por um flagelo polar numa ou em ambas as extremidades das suas células (Figs. 1.2 e 1.3). As únicas exceções são, *Campylobacter gracilis* que não é móvel e *Campylobacter showae* que possui múltiplos flagelos (Wassenaar & Newell, 2006; Silva *et al.*, 2011).

A morfologia das colónias de *Campylobacter* pode variar em meio sólido. Em mCCD agar, as colónias características de *Campylobacter* apresentam, normalmente, uma coloração acinzentada, muitas vezes com um brilho metálico, são achatadas, com aspecto húmido e tendência para se espalhar (que diminui com a utilização de superfícies de agar mais secas). Ao microscópio óptico, são observados bastonetes com morfologia curva/espiral (ISO10272-1:2006).



**Figura 1.2** - Micrografia de varrimento electrónico de *C. jejuni*. Adaptação de imagem disponível em: <http://archive.microbelibrary.org/ASMOOnly/Details.asp?ID=2734>. Consultado a 30 de Outubro de 2011.



**Figura 1.3** - Micrografia de transmissão electrónica de células de *C. jejuni*, mostrando uma célula com forma espiralada vibrióide e outra com forma cocoide. A barra representa 0,5 µm. Retirado de NG Lai-King *et al.* (1985).

### 1.2.2. Requisitos de crescimento

As bactérias pertencentes ao género *Campylobacter* são geralmente microaerofílicas, o que significa que, para crescerem, necessitam de um ambiente atmosférico específico, constituído por, aproximadamente, 10% de CO<sub>2</sub> e 5% de O<sub>2</sub> (Wassenaar & Newell, 2006; Humphrey *et al.*, 2007). Algumas também conseguem crescer em condições anaeróbias (*C. gracilis*, *C. hyointestinalis*, *C. showae* e *C. sputorum* bv. *fecalis*) e outras (*Campylobacter consisus*, *C. mucosalis*, *C. rectus*, *C. curvus*, *C. showae* e *C. gracilis*) usam H<sub>2</sub> e/ou fumarato como aceitador(es) final(is) de electrões. (Wassenaar & Newell, 2006).

No que diz respeito à temperatura de crescimento, estes microrganismos são classificados como termofílicos, uma vez que, em laboratório, apenas conseguem crescer numa gama estreita de temperaturas que pode variar entre 30°C e, aproximadamente, 46°C. A temperatura óptima de crescimento está compreendida de 37°C a 42°C (Humphrey *et al.*, 2007).

### 1.2.3. Organização do genoma

Em 2000, foi publicada a primeira sequência completa do genoma da estirpe *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 (Parkhill *et al.*, 2000). Esta data marcou a entrada da investigação em *Campylobacter* na era pós-genómica, contribuindo para aprofundar o conhecimento do género *Campylobacter* que, à data, era baseado puramente em dados microbiológicos e epidemiológicos. A estirpe *C. jejuni* NCTC 11168 possui um cromossoma

circular de aproximadamente 1,64 Mb, com um baixo conteúdo G+C (30,6%), que presumivelmente codifica 1654 proteínas (Parkhill *et al.*, 2000). Por comparação com os mecanismos que se conhecem para outros microrganismos patogénicos, os dados emergentes da sequenciação do genoma revelaram poucos meios através dos quais o microrganismo pudesse gerar diversidade genética. Não existe evidência da existência de transposões, sequências de inserção, sequências associadas a fagos, existindo muito poucas repetições. Foram, no entanto, encontradas regiões hipervariáveis (sequências homopoliméricas, constituídas maioritariamente por citosina ou guanina), responsáveis pela síntese de lipooligossacáridos, polissacáridos extracelulares e pela modificação flagelar (Parkhill *et al.*, 2000).

Apesar dos dados retirados da análise *in silico* do genoma de *C. jejuni* NCTC 11168 não indicarem sinais de contribuição para a diversidade genética, sabe-se que este microrganismo é naturalmente competente, podendo ocorrer uma elevada taxa de recombinação. A genotipagem de isolados por MLST tem revelado que a troca horizontal de material genético intra e inter-espécie é comum, tendo sido proposto que a população de *C. jejuni* apresenta uma fraca estrutura clonal (Dingle *et al.*, 2001). Os rearranjos do seu genoma resultantes da elevada plasticidade genética, devida essencialmente a recombinações intramoleculares de grandes sequências genómicas, também parecem contribuir para a diversidade genética dos isolados (Wassenaar & Blaser, 1999; de Boer *et al.*, 2002). A utilização de outros métodos moleculares de tipagem, nomeadamente, ribotipagem, PFGE, *microarrays* de DNA e metodologias baseadas na técnica de PCR (p.e. AFLP, RAPD) tem também confirmado a diversidade genética dos isolados de *Campylobacter* (Wassenaar & Newell, 2000; Dorrell *et al.*, 2001; Fitzgerald *et al.*, 2005; Klena & Konkel, 2005).

#### **1.2.4. Metabolismo energético**

As bactérias do género *Campylobacter* são consideradas assacarolíticas, não conseguindo metabolizar hidratos de carbono, o que se explica pela ausência no genoma de um gene codificante da enzima 6-fosfofrutocinase que cataliza uma das reacções chave da glicólise (Parkhill *et al.*, 2000). No entanto, a sequenciação do genoma da estirpe *C. jejuni* NCTC 11168 permitiu verificar a existência de outros genes que codificam para enzimas da via comum da glicólise (Embden-Meyerhof), nomeadamente a enzima frutose-1,6-bifosfatase, o que sugere que esta via pode funcionar na gluconeogénese (Kelly, 2005). Assim, *C. jejuni* necessita de realizar a gluconeogénese para gerar polissacáridos derivados da glucose, podendo incorporar produtos finais da glicólise, como o piruvato, no ciclo do ácido cítrico através de reacções anapleróticas (Gaynor *et al.*, 2004; Kelly, 2005).

Com base na análise da sequência do genoma de *C. jejuni* NCTC 11168, verifica-se ainda que o número de sistemas de transporte de hidratos de carbono é reduzido, predominando os sistemas para transporte de aminoácidos e ácidos orgânicos (Kelly, 2005). Pensa-se, então, que o metabolismo energético destes microrganismos esteja dependente da disponibilidade de aminoácidos livres ou cetoácidos libertados pelo hospedeiro ou pela flora microbiana intestinal (Lee & Newell, 2006 citado por Hofreuter *et al.*, 2008).

O ciclo do ácido cítrico gera compostos que são utilizados no metabolismo de aminoácidos, fornecendo simultaneamente uma fonte de energia através da geração de intermediários que são utilizados na cadeia de transporte electrónico. A análise do genoma sequenciado de *C. jejuni* indica a capacidade de realização de um ciclo do ácido cítrico completo, no entanto, para além da informação resultante da análise da sequência genómica e de alguns estudos de actividade enzimática, pouco se sabe acerca do ciclo do ácido cítrico neste microrganismo (Parkhill *et al.*, 2000; Gaynor *et al.*, 2004; Kelly, 2005). Sabe-se ainda que *C. jejuni* apresenta uma cadeia respiratória altamente complexa, com uma grande variedade de dadores e aceptadores de electrões, que lhe permitirá a realização de respiração aeróbia e anaeróbia (Kelly, 2005). Esta propriedade estará, muito provavelmente, na base da capacidade de colonização dos tractos gastrointestinais de vários hospedeiros e da resistência a condições variadas de stresse ambiental (Kelly, 2005).

### 1.2.5. Ecologia e principais reservatórios

A mucosa intestinal de várias aves e mamíferos selvagens e domésticos constitui o principal *habitat* das espécies pertencentes ao género *Campylobacter*. Apesar dos seus requisitos de crescimento incomuns, estes microrganismos são, no entanto, considerados ubíquos na Natureza, podendo ser encontrados nos mais variados nichos ecológicos (Wassenaar & Newell, 2006). Em alguns casos, poderá verificar-se associação espécie/hospedeiro (Tabela 1.2).

**Tabela 1.2** - Lista de espécies pertencentes ao género *Campylobacter* e associação com reservatório/origem e o desenvolvimento de doença. Adaptado de Humphrey *et al.* (2007).

Espécie	Reservatório(s) Conhecido(s)	Associação a doença em:	
		Humanos	Animais
<i>C. coli</i>	Suínos, Aves (incluindo as de produção), Bovinos, Ovinos	Gastroenterite, Septicémia	Gastroenterite
<i>C. concisus</i>	Homem	Doença periodontal, Gastroenterite	Nenhuma até ao momento

Espécie	Reservatório(s) Conhecido(s)	Associação a doença em:	
		Humanos	Animais
<i>C. curvus</i>	Homem	Doença periodontal, Gastroenterite	Nenhuma até ao momento
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	Bovinos, Ovinos	Septicémia, Gastroenterite, Aborto, Meningite	Abortos espontâneos em bovinos e ovinos
<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	Bovinos	Septicémia	Infertilidade infecciosa em bovinos
<i>C. gracilis</i>	Homem	Doença periodontal, Empiema, Abscessos	Nenhuma até ao momento
<i>C. helveticus</i>	Cães, gatos	Nenhuma até ao momento	Gastroenterite canina e felina
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>hyointestinalis</i>	Suíños, Bovinos, Hamsters, Veados	Gastroenterite	Enterite bovina e suína
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>lawsonii</i>	Suíños	Nenhuma até ao momento	Desconhecida
<i>C. hyoilei</i>	Suíños	Nenhuma até ao momento	Enterite proliferativa em suínos
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	Homem	Gastroenterite, Gastrite, Septicémia	Nenhuma até ao momento
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	Frangos de produção, Suínos, Bovinos, Ovinos, Cães, Gatos, Água, Aves, Vison-Americano, Coelhoos, Insectos	Gastroenterite, Septicémia, Meningite, Aborto, Proctite, Síndrome de Guillain-Barré (GBS)	Gastroenterite, Hepatite aviária
<i>C. lari</i>	Aves (incluindo as de produção), Água, Cães, Macacos, Cavalos, Focas	Gastroenterite, Septicémia	Gastroenterite aviária
<i>C. mucosalis</i>	Suíños	Nenhuma até ao momento	Enterite necrótica e lleite em suínos
<i>C. rectus</i>	Homem	Doença periodontal	Nenhuma até ao momento
<i>C. showae</i>	Homem	Doença periodontal	Nenhuma até ao momento
<i>C. sputorum</i> bv. <i>sputorum</i>	Homem, Bovinos, Suínos	Abscessos, Gastroenterite	Nenhuma até ao momento
<i>C. sputorum</i> bv. <i>faecalis</i>	Ovinos, Touros	Nenhuma até ao momento	Nenhuma até ao momento
<i>C. upsaliensis</i>	Cães, Gatos	Gastroenterite, Septicémia, Abscessos	Gastroenterite canina e felina
<i>C. insulaenigrae</i>	Focas, Golfinhos	Nenhuma até ao momento	Nenhuma até ao momento
<i>C. lanienae</i>	Bovinos, Suínos, Humanos	Nenhuma até ao momento	Nenhuma até ao momento
<i>C. hominis</i>	Humanos	Gastroenterite em indivíduos imunocomprimidos	N. a.

N. a. - não aplicável.

As espécies do género *Campylobacter* já foram associadas a vários tipos de aves marinhas (p.e. gaivotas) e corvídeos (p.e. corvos, gaios). Estes microrganismos são frequentemente detectados em fontes de água natural, em estuários e em ambientes

marinhos, o que poderá explicar o facto de as aves que se alimentam em ambientes aquáticos possuírem uma maior carga microbiana por comparação com aves que se alimentam, essencialmente, de matéria vegetal (Miller & Mandrell, 2005). A existência de *Campylobacter* spp. no ecossistema aquático constitui, inevitavelmente, uma das principais, senão a principal, via de dispersão destes microrganismos no meio ambiente.

*Campylobacter* spp. tem também sido isolado de primatas, ungulados, felinos e caninos selvagens, ursos, pandas, furões, ouriços, texugos, existindo também numa grande variedade de roedores (Park, 2002; Miller & Mandrell, 2005). Existem também descrições de *Campylobacter* associadas ao exoesqueleto de insectos (Altekruse *et al.*, 1999). A presença de aves e roedores colonizados por *Campylobacter* em explorações pecuárias inicia um ciclo de transmissão horizontal entre as espécies selvagens e domésticas (Miller & Mandrell, 2005). Para além dos mamíferos e aves selvagens, *Campylobacter* spp. consegue colonizar o tracto gastrointestinal de vários tipos de animais domésticos, não só os animais destinados à produção de alimento (p.e. aves, suínos, bovinos, ovinos) mas também animais de estimação (p.e. cães, gatos, hamsters). Na grande maioria dos casos, esta colonização é assintomática (Miller & Mandrell, 2005). Não obstante o leque alargado de possíveis reservatórios atrás mencionados, *Campylobacter* tem sido maioritariamente associado às aves de produção (p.e. frangos, perus, patos). Estes microrganismos colonizam a camada mucosa do epitélio intestinal, essencialmente no ceco, no intestino grosso e na cloaca estando, normalmente, aí confinados (Park, 2002). Nos seus estudos, Shreeve e colaboradores (2000) analisaram o conteúdo cecal de frangos, verificando que com níveis de, pelo menos,  $10^{10}$  UFCs por grama de conteúdo cecal, a colonização deste tipo de hospedeiro se mantém assintomática.

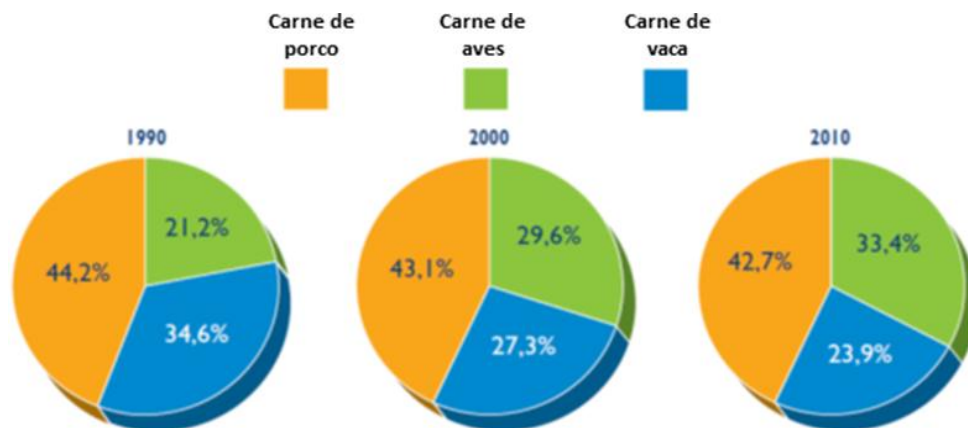
Em contraste, *Campylobacter* é considerado um agente patogénico zoonótico em humanos, conduzindo, na maioria dos casos de colonização acidental, ao desenvolvimento de doença (Wassenaar & Blaser, 1999; Janssen *et al.*, 2008).

### **1.3. *Campylobacter* spp. na cadeia de processamento alimentar**

*Campylobacter* spp. pode ser isolado numa grande variedade de alimentos, entre os quais carnes (frango, porco, vaca), leite, frutas e vegetais (principalmente, saladas embaladas) (Zhao *et al.*, 2001; Humphrey *et al.*, 2007; Hussain *et al.*, 2007; Heuvelink *et al.*, 2009; Verhoeff-Bakkenes *et al.*, 2011). O facto destes microrganismos persistirem ao longo da cadeia de processamento alimentar é notável, dada a especificidade dos requisitos necessários ao seu crescimento, os quais fariam supor que, à primeira vista, *Campylobacter* fosse mais frágil do que os restantes microrganismos patogénicos entéricos.

De todas as espécies pertencentes ao género *Campylobacter*, a espécie *C. jejuni* tem sido associada à grande maioria dos casos de campilobacteriose humana (90%), seguida da espécie *C. coli*. Sabe-se que o reservatório preferencial destas espécies corresponde ao tracto gastrointestinal de aves e que a manipulação e consumo de carne de frango se sobrepõem como factores de risco importantes na transmissão do agente patogénico ao Homem devido à maior taxa de consumo deste alimento (Wingstrand *et al.*, 2006; Humphrey *et al.*, 2007; EFSA, 2010b; Dasti *et al.*, 2010; Silva *et al.* 2011).

De acordo com o relatório anual da AVEC (2011), o preço relativamente baixo e competitivo da carne de aves, por comparação com outros tipos de carne, as qualidades nutricionais, e a ausência relativa de obstáculos culturais e religiosos ao seu consumo, são factores que, cumulativamente contribuem para as elevadas taxas de consumo associadas. O sector da carne tem-se ajustado nos últimos anos aos desequilíbrios de oferta e procura no sector alimentar, tendo-se verificado que a oferta de carne de aves é a que permite uma melhor resposta ao aumento da procura. Em termos da “pegada” de carbono e utilização de terreno por quilo de produto, os estudos demonstram que, por comparação com outras espécies produtoras de carne (p.e. porco), a produção de aves necessita de apenas metade do terreno (m<sup>2</sup>/kg), tendo uma menor emissão de CO<sub>2</sub> associada. Por estas razões, tem-se verificado uma tendência para a mudança do padrão mundial de produção de carne, registando-se um aumento da produção de carne de aves em detrimento das carnes de porco e de vaca (Fig. 1.4) (AVEC, 2011).



**Figura 1.4** - Alteração do padrão mundial de produção de carne ao longo de duas décadas. Adaptado de AVEC (2011).

Em particular, na UE, tem-se verificado ao longo dos últimos anos um aumento gradual do consumo de carne, verificando-se uma mudança da preferência, no passado, de carne de bovinos e ovinos para, no presente, a carne de aves (Deviner, 2003). A avaliar pelos dados da

AVEC e as tendências de consumo, estima-se que a carne de aves terá cada vez maior facilidade em afirmar-se no mercado.

### 1.3.1. Prevalência de *Campylobacter* spp. em bandos e carcaças de frangos na União Europeia

Em 2008, realizou-se um estudo de prevalência de *Campylobacter* spp. em bandos de frangos e de prevalência de *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp. em carcaças de frangos (EFSA, 2010a). Este trabalho contou com a participação de 26 Estados-Membro da UE (com a excepção da Grécia) e dois países não pertencentes à UE (Suíça e Noruega). Em todos os países participantes, verificou-se a detecção de *Campylobacter* spp., quer a partir dos bandos de frangos [análise de amostras preparadas a partir do conteúdo cecal de 10 frangos provenientes da mesma exploração (selecção aleatória a partir de um mesmo lote para abate)], quer a partir das carcaças. No total dos países em análise, verificou-se uma prevalência de 71,2% nos bandos de frangos e de 75,8% em carcaças contaminadas. Esta prevalência variou consideravelmente entre os diferentes países, tendo-se registado valores compreendidos entre 2,0%, na Estónia, e de 100%, no Luxemburgo, para as amostras de conteúdo cecal (Fig. 1.5). Nas carcaças, os valores de prevalência variaram entre um mínimo de 4,9%, na Estónia, e um máximo de 100%, no Luxemburgo (Fig. 1.6) (EFSA, 2010a). Em Portugal, os valores registados foram de 82,0% para o conteúdo cecal e 70,2% para carcaças contaminadas (EFSA, 2010a).

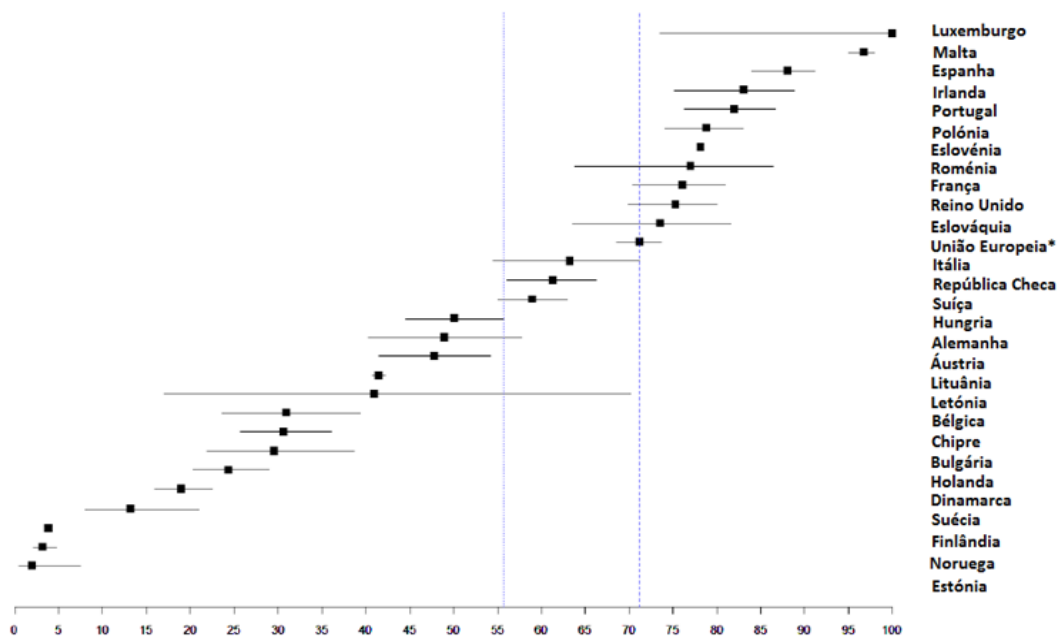
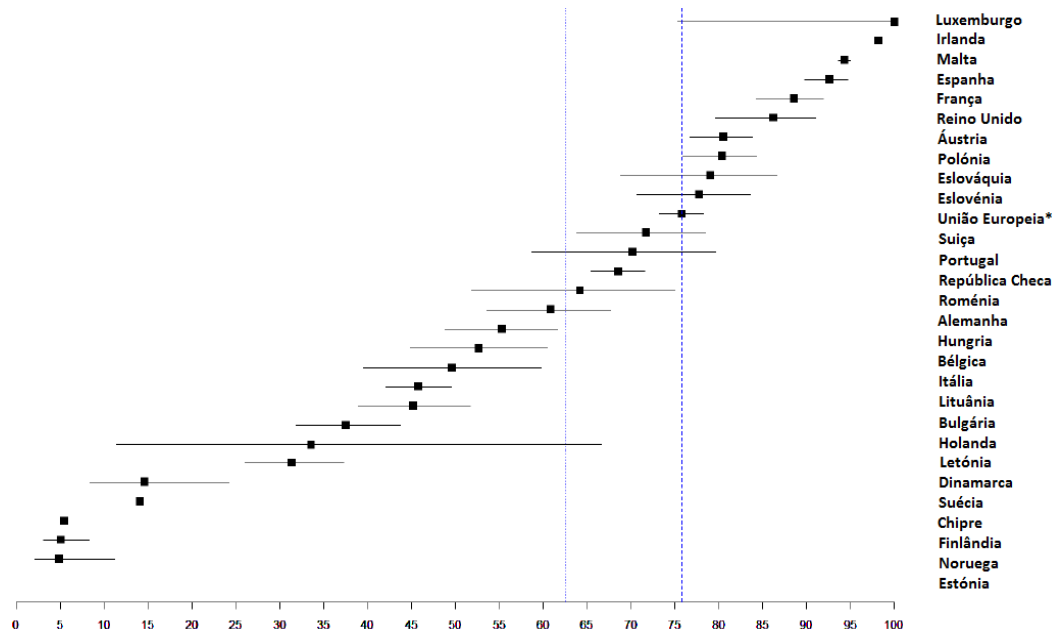


Figura 1.5 – Legenda na página 16.

**Figura 1.5** - Prevalência de lotes de frangos colonizados por *Campylobacter* spp., por país e ao nível da UE (linha tracejada). A mediana da prevalência ao nível da União Europeia é de 57,1% e é representada pela linha pontilhada. As linhas horizontais indicam os intervalos de confiança 95% da prevalência. \*A Grécia não participou no estudo, tendo participado ainda dois países que não pertencem à UE (Suíça e Noruega). Adaptado de EFSA (2010a).



**Figura 1.6** - Prevalência de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango contaminadas, por país e ao nível da UE (linha tracejada). A mediana da prevalência ao nível da UE é de 62,5% e é representada pela linha pontilhada. As linhas horizontais indicam os intervalos de confiança 95% da prevalência. \*A Grécia não participou no estudo, tendo participado ainda dois países que não pertencem à UE (Suíça e Noruega). Adaptado de EFSA (2010a).

Em todos os países participantes, isolou-se *C. jejuni* das amostras do conteúdo cecal com uma prevalência média de 40,6%, enquanto que a prevalência média de *C. coli* foi de 31,9%; as exceções foram a Estónia, Finlândia, Suécia e Noruega onde esta espécie não foi detectada em cecos. No que diz respeito à análise das carcaças, *C. jejuni* também foi detectado na totalidade dos países, com uma prevalência média de 51,0%; a espécie *C. coli* foi isolada de carcaças na maioria dos países, com uma prevalência de 35,5%, com a exceção dos países anteriormente referidos onde também não foi detectada. Os resultados apresentados demonstram uma maior prevalência de isolamento da espécie *C. jejuni* relativamente à espécie *C. coli* (Tabelas 1.3 e 1.4), estando em concordância com o que tem vindo a ser demonstrado na literatura (Jørgensen *et al.*, 2002; Pepe *et al.*, 2009). No entanto, em alguns países, também se verificou a situação inversa, com a predominância do isolamento da espécie

*C. coli* nos bandos de frangos (amostras cecais) (Bulgária, Hungria, Itália, Luxemburgo, Malta, Portugal e Espanha) e nas carcaças (Bulgária, Irlanda, Itália, Luxemburgo, Malta, Espanha). Na Tabela 1.5 encontra-se listada a distribuição de espécies identificadas em Portugal.

**Tabela 1.3** - Frequência das espécies de *Campylobacter* isoladas a partir dos lotes de frangos (análise do conteúdo cecal) na UE\* em 2008. Adaptado de EFSA (2010a).

Espécies de <i>Campylobacter</i> detectadas nos lotes de frangos	Número de lotes positivos	Percentagem de lotes nos quais se detectaram espécies de <i>Campylobacter</i> <sup>a</sup> (N=5.255 <sup>b</sup> )	Número de países nos quais se detectaram espécies de <i>Campylobacter</i>
<i>C. jejuni</i>	3.193	60,8	28
<i>C. coli</i>	2.180	41,5	24
Outras espécies <i>Campylobacter</i> spp. (não identificadas)	72	1,4	8
<i>C. lari</i>	12	0,2	5

\* Participação de 26 Estados-Membro da UE, com a excepção da Grécia e a inclusão de dois países que não pertencem à UE (Suíça e Noruega).

<sup>a</sup> Percentagem de lotes de frangos que foram positivos para cada espécie de *Campylobacter*.

<sup>b</sup> Número total de lotes de frangos, incluindo todos os lotes a partir dos quais se isolou, pelo menos, uma espécie de *Campylobacter*.

**Tabela 1.4** - Frequência das espécies de *Campylobacter* obtidas a partir de carcaças de frango contaminadas na UE\* em 2008. Adaptado de EFSA (2010a).

Espécies de <i>Campylobacter</i> detectadas nas carcaças de frango	Número de carcaças	Percentagem de carcaças nas quais se detectaram espécies de <i>Campylobacter</i> <sup>a</sup> (N=5.255 <sup>b</sup> )	Número de países nos quais se detectaram espécies de <i>Campylobacter</i>
<i>C. jejuni</i>	3.775	67,9	28
<i>C. coli</i>	2.191	39,4	24
Outras espécies <i>Campylobacter</i> spp. (não identificadas)	49	0,9	9
<i>C. lari</i>	15	0,3	7

\* Participação de 26 Estados-Membro da UE, com a excepção da Grécia e incluindo dois países que não pertencem à UE (Suíça e Noruega).

<sup>a</sup> Percentagem de carcaças de frango que foram positivas para cada espécie de *Campylobacter*.

<sup>b</sup> Número total de carcaças de frango, incluindo todas as carcaças a partir das quais se isolou, pelo menos, uma espécie de *Campylobacter*.

**Tabela 1.5** - Frequência das espécies de *Campylobacter* obtidas a partir de carcaças contaminadas e lotes de frangos colonizados (amostras cecais) em Portugal em 2008. Adaptado de EFSA (2010a).

<b>Espécies de <i>Campylobacter</i> detectadas</b>	<b>Percentagem de lotes de frangos nos quais se detectaram espécies de <i>Campylobacter</i><sup>a</sup> (N=349<sup>c</sup>)</b>	<b>Percentagem de carcaças nas quais se detectaram espécies de <i>Campylobacter</i><sup>b</sup> (N=262<sup>d</sup>)</b>
<i>C. coli</i>	61,6	53,8
<i>C. jejuni</i>	28,4	67,2
Outras espécies de <i>Campylobacter</i>	11,2	3,4

<sup>a</sup> Percentagem de lotes de frango que foram positivos para cada espécie de *Campylobacter*.

<sup>b</sup> Percentagem de carcaças de frango que foram positivas para cada espécie de *Campylobacter*.

<sup>c</sup> Número total de lotes de frango, incluindo todos os lotes a partir dos quais se isolou, pelo menos, uma espécie de *Campylobacter*.

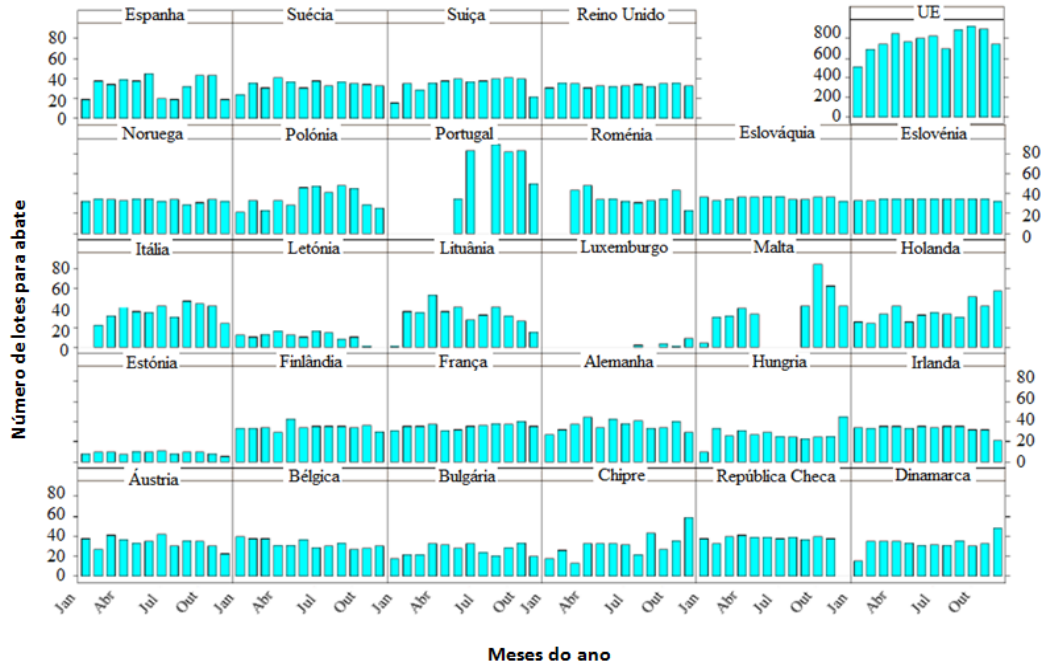
<sup>d</sup> Número total de carcaças de frango, incluindo todas as carcaças a partir das quais se isolou, pelo menos, uma espécie de *Campylobacter*.

### **1.3.1.1. Factores de risco associados à colonização de frangos/contaminação de carcaças por *Campylobacter* spp.**

Relativamente ao estudo de prevalência de *Campylobacter* spp. em bandos de frangos e em carcaças realizado, em 2008, na UE (EFSA, 2010a), as principais conclusões foram:

Existe uma forte associação entre a contaminação de carcaças provenientes de lotes de frangos colonizados. A probabilidade de as carcaças provenientes de lotes de frangos colonizados por *Campylobacter* spp. estarem contaminadas é cerca de 30 vezes maior, demonstrando também níveis de contaminação mais elevados. O risco de contaminação das carcaças ou de colonização dos lotes de frangos aumenta com o aumento da idade das aves que constituem o lote para abate (EFSA, 2010b).

Avaliando a variável “trimestre de amostragem” indicada neste estudo, verificou-se que, para as amostragens realizadas no segundo, terceiro e quarto trimestres do ano, a probabilidade de os lotes de frangos analisados estarem colonizados por *Campylobacter* spp. foi superior comparativamente ao primeiro trimestre (EFSA, 2010b). No entanto, há que ressaltar que a amostragem não foi realizada em todos os meses do ano em alguns países (p.e Portugal, Roménia, Itália e Luxemburgo não iniciaram o estudo logo em Janeiro) e que, nos países em que a amostragem foi efectivamente realizada em todos os meses, essa amostragem (número de lotes analisados) nem sempre foi equitativa (Fig. 1.7).



**Figura 1.7** - Distribuição do número total dos lotes de frangos testados por mês de amostragem, por país e na EU\*, em 2008. Adaptado de EFSA (2010a).

\* Participação de 26 Estados-Membro da UE, com a excepção da Grécia, e inclusão de dois países que não pertencem à UE (Suíça e Noruega).

A constituição dos lotes de frangos a partir de bandos previamente desbastados está associada a um maior risco de colonização dos frangos (EFSA, 2010b).

Considerando o factor “período (hora) de amostragem durante o dia”, a probabilidade de se encontrarem carcaças contaminadas foi superior quando a amostragem foi realizada mais tarde (EFSA, 2010b).

A probabilidade de detecção de *Campylobacter*, tanto nos lotes de frangos como nas carcaças, aumenta quanto menor for o período que medeia entre a amostragem e a análise laboratorial (EFSA, 2010b).

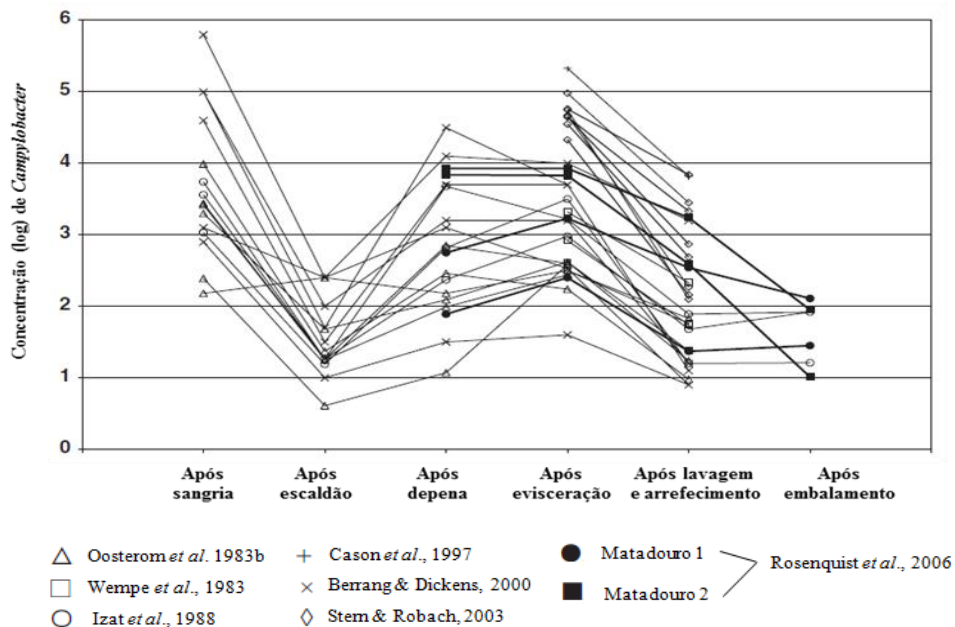
Para os países com maiores níveis de carcaças contaminadas, verificou-se que as carcaças provenientes de lotes de frangos produzidos em modo biológico estão mais sujeitas a maiores níveis de contaminação (EFSA, 2010b). Há que considerar, no entanto, que os diferentes tipos de produção não foram representados de modo equivalente. A grande maioria dos lotes de frangos analisados (91,7%) tiveram origem num modo de produção convencional (produção intensiva), tendo a amostragem da produção ao ar livre sido muito menos representativa (6% de produção livre padrão e 1% de produção biológica). Para 1,3% dos lotes analisados, o tipo de produção dos frangos manteve-se desconhecido (EFSA, 2010b).

O risco de contaminação das carcaças variou significativamente entre países e entre matadouros do mesmo país, o que significa que alguns matadouros conseguem ser mais eficazes na prevenção e controlo da contaminação (EFSA, 2010b).

**1.3.1.2. Análise de factores de risco/medidas de controlo**

No matadouro, o nível de contaminação das carcaças vai sofrendo alterações ao longo da cadeia de processamento (Fig. 1.8), tornando-se essencial identificar os pontos críticos de controlo e factores de risco associados que contribuem para a contaminação. Num estudo recente (Hue *et al.*, 2010), foram propostos quatro parâmetros que devem ser considerados como importantes factores de risco:

- A logística de abate: os primeiros lotes de abates apresentam menor nível de contaminação;
- A temperatura da sala de evisceração: temperaturas superiores a 15°C contribuem para um maior nível de contaminação;
- O processo de evisceração: a visibilidade de marcas de sujidade após a evisceração está associada a um maior nível de contaminação das carcaças;
- O desbaste do bando na exploração, precedente ao transporte para o matadouro, também contribui para níveis mais elevados de contaminação.



**Figura 1.8** - Compilação de resultados relativos à influência de algumas operações de processamento no matadouro ao nível de contaminação de carcaças de frangos por *Campylobacter* spp. Adaptado de Rosenquist *et al.* (2006).

Segundo Rosenquist e colaboradores (2003), uma redução de cerca de 100 vezes do nível de contaminação das carcaças pode resultar numa redução significativa do número de casos de campilobacteriose humana (até cerca de 30 vezes). No matadouro, a aplicação dos princípios HACCP é essencial. O controlo de temperatura, a aplicação correcta de medidas de higienização e desinfecção de superfícies, a manutenção do equipamento, o aumento da concentração de cloro na água utilizada para o processamento e a minimização do contacto das carcaças com as superfícies, são medidas essenciais para o controlo e redução dos níveis de contaminação das carcaças (Humphrey *et al.*, 2007; Hue *et al.*, 2010). Para além destas medidas, ainda existe a possibilidade de tratamento directo da carne contaminada (p.e. tratamento químico, irradiação), no entanto, esta prática não tem tido aceitação por parte do consumidor (Anónimo, 2005).

Devido às dificuldades sentidas na redução da contaminação das carcaças de frango nos matadouros, a compreensão dos factores de risco associados à contaminação dos animais na exploração torna-se também essencial, de modo a que se possam tomar medidas preventivas adequadas que contribuam para a diminuição da prevalência de *Campylobacter* spp. logo ao nível da produção primária (Herman *et al.*, 2003). Os estudos têm demonstrado que, até cerca das duas, três semanas, a grande maioria dos frangos não está colonizada com *Campylobacter*. As razões deste desfasamento no que diz respeito à idade de colonização dos frangos, não são, neste momento, conhecidas, mas alguns factores como a presença de anticorpos maternos, administração de alimento suplementado com antibióticos, o estado de desenvolvimento do intestino e a microflora intestinal parecem ter influência. A partir da colonização da primeira ave do bando, a propagação do microrganismo para as restantes aves é rápida, acontecendo, essencialmente, por via fecal-oral (Lin, 2009).

De acordo com a literatura, a prevalência de *Campylobacter* spp. em bandos de frangos pode variar com diversos factores. Pensa-se que o ambiente externo ao aviário seja a fonte mais importante de *Campylobacter* spp., dada a sua ampla distribuição na Natureza, existindo a possibilidade de transmissão horizontal a partir de diversas fontes naturais (Humphrey *et al.*, 2007). A presença de animais de estimação nas explorações (p.e. cães) deve ser evitada, uma vez que estes animais podem ser hospedeiros do microrganismo (Humphrey *et al.*, 2007). O factor sazonalidade pode ser importante, tendo-se verificado que a colonização de frangos atinge um pico nos meses mais quentes (Julho e Agosto) (Barrios *et al.*, 2006). A idade (aves mais velhas) e o tamanho do bando (maior número de aves) contribuem também para o número de casos positivos (Barrios *et al.*, 2006). O tipo de ventilação pode ainda interferir, verificando-se uma maior prevalência de *Campylobacter* spp. nos bandos criados em explorações que adoptam um sistema de ventilação vertical (Barrios *et al.*, 2006). No que diz

respeito ao tipo de produção, tem-se verificado um maior número de casos positivos em explorações que adoptam o tipo de produção biológica ou ao ar livre (Nather *et al.*, 2009). O sistema de distribuição da água parece interferir, tendo-se verificado uma prevalência superior em explorações que utilizam sistemas de abeberamento do estilo pipeta com casoleta recuperadora de água (que propicia a contaminação da água) (Nather *et al.*, 2009). O tipo de medidas de biosegurança aplicadas na exploração e no transporte dos bandos para os matadouros também são importantes factores a ponderar (Anónimo, 2005; Ridley *et al.*, 2011). Para além dos factores considerados, a possibilidade de transmissão vertical de *Campylobacter* a partir da linhagem parental também tem sido sugerida (Humphrey *et al.*, 2007).

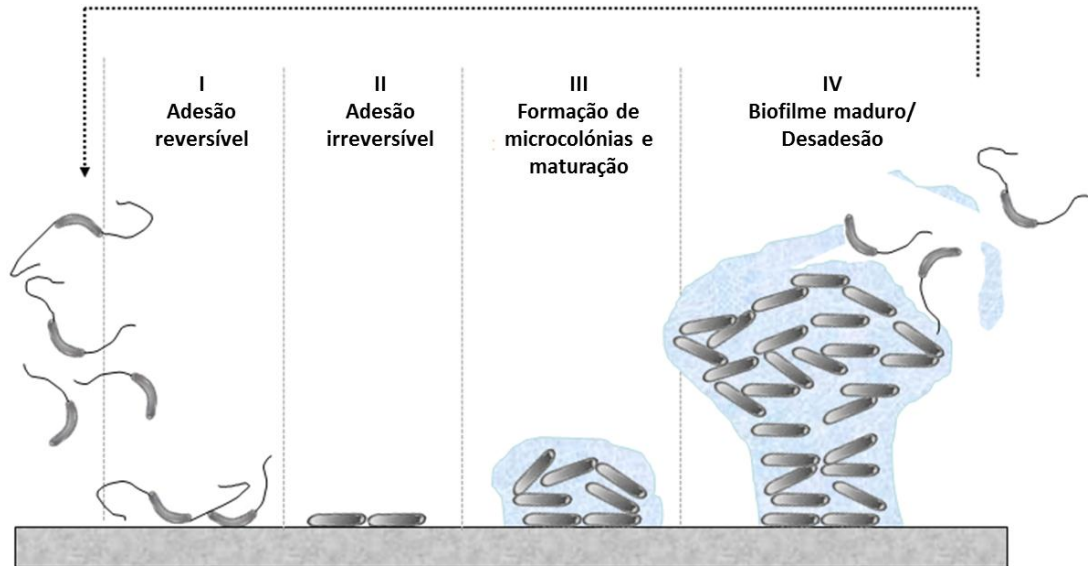
Ao nível da exploração, são actualmente propostas três medidas essenciais de controlo: (i) medidas de biosegurança, no sentido de reduzir a exposição ambiental, (ii) o aumento da resistência do hospedeiro (ave) (p.e. vacinação, selecção genética); (iii) a utilização de antimicrobianos alternativos (p.e. terapia bacteriofágica e tratamento com bacteriocinas). Até ao presente momento, apenas é prática comum a aplicação da primeira medida (Lin, 2009).

### **1.3.2. Mecanismos de sobrevivência: a capacidade de formação de biofilmes**

Apesar das condições altamente específicas para o crescimento de *Campylobacter spp.* em laboratório, é evidente que este microrganismos se conseguem adaptar a uma grande diversidade de condições hostis. A espécie *C. jejuni* já foi isolada a partir de vários pontos da cadeia alimentar, no entanto, ainda se desconhecem os mecanismos responsáveis pela sua capacidade de sobrevivência e persistência ao longo das várias etapas do processamento industrial dos alimentos, o qual apresenta condições tão adversas, como a exposição a temperaturas muito baixas e/ou altas, marcadamente fora da gama óptima de crescimento, a concentrações atmosféricas de oxigénio, tóxicas dada a sua natureza microaerofílica, condições de stresses oxidativo e hiposmótico, à ausência de nutrientes e desidratação (Park, 2005; Jackson *et al.*, 2009). Existem evidências preliminares de que a estratégia de crescimento em biofilmes poderá contribuir para a sobrevivência destes microrganismos em ambientes externos ao hospedeiro, tal como se verifica para outros géneros bacterianos (Murphy *et al.*, 2006).

Um biofilme corresponde a uma comunidade sésil de microrganismos, constituída por uma ou mais espécies, aderente a uma superfície sólida (biótica ou abiótica), e embebidos numa matriz polimérica. De modo geral, o processo de formação do biofilme consiste, numa primeira fase, à adesão a uma superfície sólida, seguindo-se a formação de microcolónias e a

produção de substratos poliméricos extracelulares (SPE). Depois, ocorre a maturação do biofilme, na qual as microcolónias se diferenciam em macrocolónias e se forma uma estrutura tridimensional, podendo, finalmente, existir desadesão de células que irão colonizar novas superfícies (Fig. 1.9) (Chmielewski & Frank, 2003).



**Figura 1.9** - Representação esquemática das várias etapas de desenvolvimento de um biofilme. Adaptado de Ghigo (2003).

A adesão à superfície pode ser um processo passivo ou dependente da mobilidade celular. O processo passivo de adesão estará dependente da gravidade, de difusão e da dinâmica de fluídos, por outro lado, na adesão activa, a superfície celular apresenta um papel fundamental, uma vez que, as estruturas extracelulares da superfície bacteriana (p.e. flagelo, pili, proteínas de adesão, cápsula) influenciam a adesão (Kumar & Anand, 1998 citado por Chmielewski & Frank, 2003). A ligação das bactérias à superfície ocorre em duas fases: adesão reversível seguida de adesão irreversível (Mittelman, 1998 citado por Chmielewski & Frank, 2003). Na adesão reversível, as bactérias estabelecem uma fraca interacção com a superfície, envolvendo essencialmente forças de van der Waals, forças electrostáticas e interacções hidrofóbicas. Nesta fase, os microrganismos ainda podem ser facilmente removidos através da aplicação fraca de tensão de corte. A adesão irreversível consiste no ancoramento e/ou produção de polímeros extracelulares. O ancoramento de estruturas da superfície celular à superfície sólida consiste, essencialmente, em forças do tipo interacção dipolo-dipolo, ligações de hidrogénio, forças hidrofóbicas e ligações iónicas covalentes (revisto por Chmielewski & Frank, 2003). Neste caso, a remoção das células já é bastante mais difícil, envolvendo a aplicação de uma tensão de corte mais intensa (p.e. raspagem) ou a quebra das forças de

ligação através da aplicação de detergentes, enzimas, desinfetantes, e/ou calor (Chmielewski & Frank, 2003).

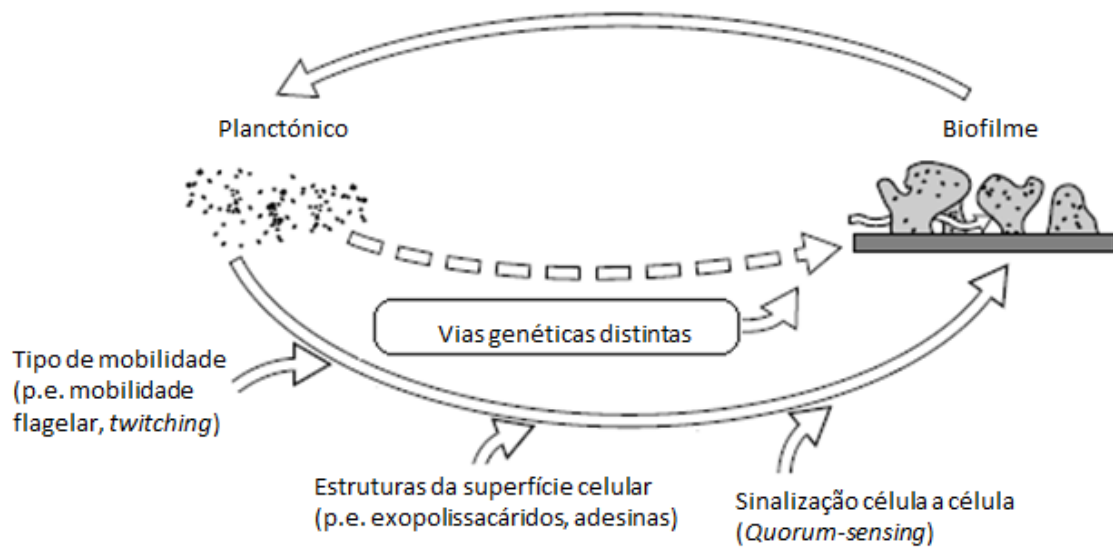
Após a ligação irreversível à superfície, segue-se a formação de microcolónias que resulta da agregação e crescimento das bactérias acompanhada da produção de SPE (que pode ser constituído por polissacáridos, DNA extracelular e proteínas). A comunicação célula a célula (*quorum-sensing*) tem sido sugerida como um dos fenómenos responsáveis pelo recrutamento de células em estado planctónico para a vida em comunidade (Miller & Bassler, 2001). Existindo condições favoráveis ao crescimento e aglomeração celular, o biofilme continua com processo de maturação através do desenvolvimento de uma estrutura organizada. Um biofilme em fase de maturação pode consistir numa monocamada celular (as células aderem à superfície individualmente) ou numa multicamada celular (são formados *clusters* de células). Em termos arquitectónicos, os biofilmes podem ser divididos em duas classes: (1) os que apresentam uma topologia irregular, com estruturas semelhantes a cogumelos separadas por espaços que, muito provavelmente, funcionarão como canais de água e nutrientes, e (2) os que apresentam uma topologia plana formada por camadas compactas do tipo folha que revestem a superfície (Karatan & Watnick, 2009). Factores como a composição do meio de cultura, o tipo de mobilidade, a presença de surfactantes e efeitos de *quorum - sensing* estarão na origem da diferenciação para um dos dois tipos de estrutura (Karatan & Watnick, 2009). Após o passo de maturação, em que o biofilme cresceu em tamanho, as bactérias localizadas nas camadas mais externas podem não conseguir aceder aos nutrientes, podendo também estar mais expostas ao stresse ambiental; deste modo, a sua permanência no biofilme deixa de ser favorável. Nesse caso, existem evidências de que as bactérias respondem às condições ambientais desfavoráveis através do retorno ao estado planctónico (desadesão do biofilme) (Karatan & Watnick, 2009).

Os mecanismos moleculares envolvidos nas diferentes etapas de formação de um biofilme não estão completamente elucidados. A investigação dedicada ao estudo do processo de formação de biofilmes e determinantes genéticos associados tem sido especialmente focada em *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *E. coli* e *V. cholerae*. Estes microrganismos tornaram-se proeminentes modelos para a pesquisa nesta área, tendo-se descoberto alguns determinantes moleculares envolvidos na formação de biofilme nestas espécies (revisto por Davey & O'Toole, 2000). Em *P. aeruginosa*, vários estudos têm sugerido que a capacidade de formação de biofilme nesta espécie estará dependente dos *pili* tipo IV (envolvidos na mobilidade associada à superfície, denominada de *twitching*) (O'Toole & Kolter, 1998 citado por Davey & O'Toole, 2000), da disponibilidade de nutrientes (O'Toole *et al.*, 2000 citado por Davey & O'Toole, 2000), da biosíntese de alginato e de *quorum-sensing* (Davies & Geesey,

1995 citado por Davey & O'Toole, 2000). Relativamente à desadesão das bactérias do biofilme, pensa-se que a enzima alginato liase seja capaz de degradar o alginato, promovendo a disrupção da estrutura (Boyd & Chakrabarty, 1994 citado por Karatan & Watnick, 2009).

Apesar de tudo, já foi sugerido que o processo de formação do biofilme de um determinado microrganismo poderá variar de acordo com as condições nutricionais e ambientais presentes e que os diferentes modelos propostos para a formação de biofilmes deverão ser considerados tendo por base essas condições (Klausen *et al.*, 2003).

De modo geral, são vários os determinantes que podem intervir na formação de um biofilme bacteriano, estando estes representados na Figura 1.10.



**Figura 1.10** - Resumo de componentes/características importantes para a formação de um biofilme. Adaptado de Pratt & Kolter (1999).

Para *Campylobacter* spp., só recentemente se iniciou investigação nesta área, nomeadamente na identificação dos determinantes moleculares. Um estudo recente mostrou que a espécie *C. jejuni* é capaz de formar três tipos de biofilmes monoespécie em cultura líquida: (1) adesão a uma superfície de vidro, (2) formação de agregados flutuantes e (3) formação de película na interface líquido-ar (Joshua *et al.*, 2006). O complexo flagelar parece desempenhar um papel fundamental na adesão inicial de *C. jejuni* a superfícies sólidas, e também nas interacções célula a célula necessárias para a formação de películas, uma vez que mutantes aflagelados (*flhA*) perdem a capacidade de se ligar a uma matriz sólida (filtro de fibra de vidro) e de formar uma película na interface líquido-ar. A inactivação insercional dos genes que afectam o filamento flagelar (*fliA*, *flaA*, *flaB*, *flaG*) e a expressão de adesinas celulares (*flaC*) também resultam numa queda de formação de película na interface líquido-ar

(Kalmokoff *et al.*, 2006). Para além de proteínas envolvidas na mobilidade [flagelinas (FlaA, FlaB), proteínas do filamento cap (FliD), proteínas do corpo basal (FlgG, FlgG2) e proteínas quimiostáticas (*CheA*)], também se tem demonstrado que proteínas envolvidas na adesão celular (Peb1, FlaC) e no stress geral (GroEL, GroES) e oxidativo (Tpx, Ahp) apresentam um nível de expressão aumentado em células formadoras de biofilmes, por comparação com células planctónicas (Kalmokoff *et al.*, 2006).

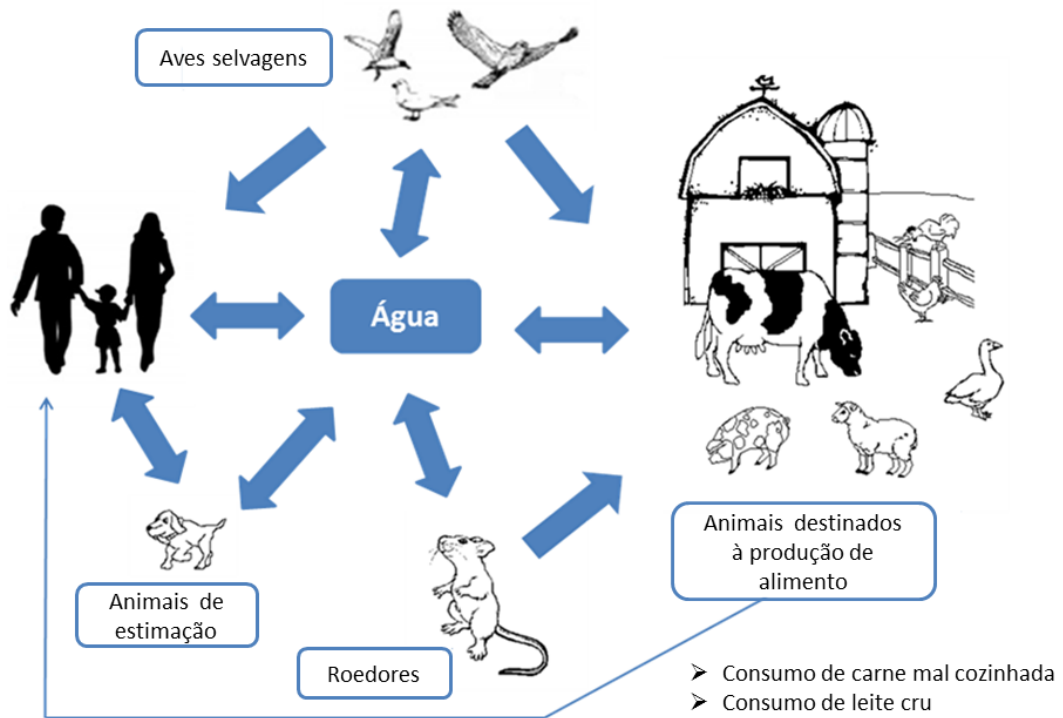
Um outro estudo mostrou que uma estirpe de *C. jejuni* com mutação no gene *luxS* é deficiente na produção da molécula AI-2 envolvida no processo de sinalização *quorum-sensing*. Este tipo de mutante demonstra uma reduzida capacidade de formação de biofilme em microplaca de poliestireno por comparação com a estirpe selvagem (Reeser *et al.*, 2007), sugerindo que a comunicação intercelular possa ser um processo determinante na formação de biofilmes.

#### **1.4. Campilobacteriose em Humanos**

O nome campilobacteriose foi atribuído para descrever um conjunto de doenças infecciosas causadas por membros do género *Campylobacter*. A grande maioria das infecções humanas (cerca de 90%) é causada pela espécie *C. jejuni*, seguindo-se a espécie *C. coli*, a qual é responsável por 5-10% dos casos (Miller & Mandrell, 2005; Wilson *et al.*, 2008). Estima-se que a dose necessária para a infecção seja muito baixa, variando, presumivelmente, entre 500 a 800 Unidades Formadoras de Colónias (UFC) (Janssen *et al.*, 2008).

##### **1.4.1. Principais vias de transmissão**

Estão identificados vários factores de risco para a transmissão de *Campylobacter* spp. ao Homem, tais como o consumo de alimentos contaminados, nomeadamente, carnes mal cozinhadas (especialmente a carne de frango), leite não pasteurizado e saladas de vegetais; o consumo de água não tratada [água da chuva, água existente em poços e o contacto com água de recreio (p.e. rio, lago)], o contacto com animais de estimação colonizados (p.e. cães e gatos) e determinadas susceptibilidades clínicas individuais (p.e. reduzida acidez gástrica devido à utilização de inibidores de bombas de prótons). As viagens ao estrangeiro, sobretudo a países com baixos níveis de higiene sanitária, têm também sido indicadas como um factor de risco importante (Miller & Mandrell, 2005; Humphrey *et al.*, 2007). Na Figura 1.11 são representadas algumas das possíveis vias de infecção do Homem por *Campylobacter* spp. Apesar de pouco relevante em termos epidemiológicos, a infecção cruzada entre indivíduos também pode ocorrer (Dasti *et al.*, 2010).

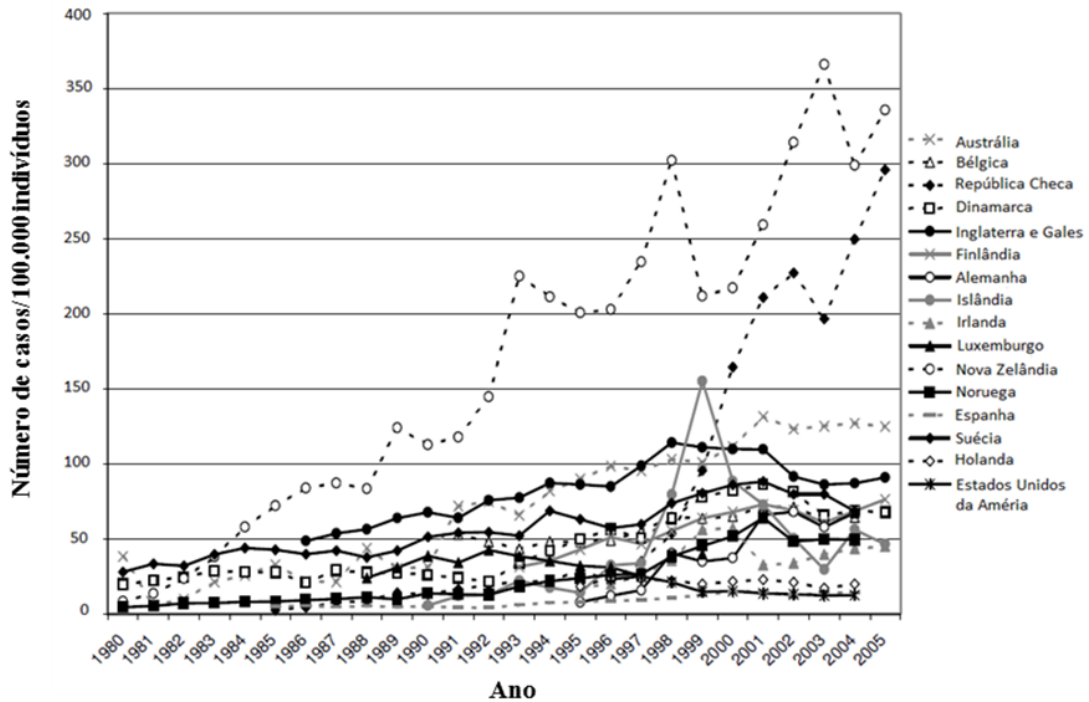


**Figura 1.11** - Possíveis vias de infecção humana por *Campylobacter* spp. Adaptado de Dasti *et al.* (2010).

#### 1.4.2. Epidemiologia

Apesar de se tratar de uma doença de elevada importância a nível de Saúde Pública, a epidemiologia da campilobacteriose humana tem-se revelado complexa, havendo ainda muito por esclarecer, nomeadamente em alguns países como Portugal onde os estudos epidemiológicos são muito escassos.

Do que se sabe, a incidência geral da campilobacteriose nas populações de países desenvolvidos e em vias de desenvolvimento é semelhante, rondando 5 a 20% (FAO/WHO, 2009). A taxa de infecções humanas por *Campylobacter* tem aumentado nos últimos anos (Fig. 1.12), com o número de casos a exceder, muitas das vezes, os casos de salmonelose e sigelose (Altekruse *et al.*, 1999; EFSA, 2011). Estes dados, associados ao espectro alargado de possíveis cenários clínicos, têm reforçado a necessidade de se clarificar a epidemiologia desta doença, de modo a que se possam tomar medidas de controlo eficazes e de minimização do impacto sócio-económico associado na população mundial (Silva *et al.*, 2011).



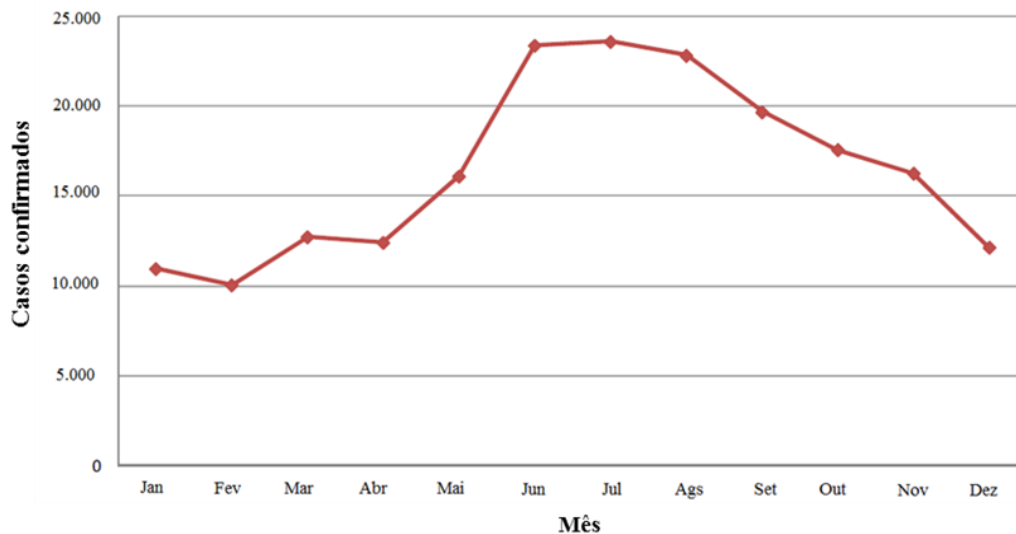
**Figura 1.12** - Número de casos de infecção humana causados por *C. jejuni/C. coli*, registados por cada 100.000 indivíduos. Os dados apresentados são os que estavam disponíveis até Junho de 2006. Adaptado de FAO/WHO (2009).

De acordo com a revisão efectuada por Humphrey e colaboradores (2007), a OMS estima que a campilobacteriose afectará anualmente cerca de 1% da população da Europa Ocidental. Segundo os dados da EFSA, a campilobacteriose continua a ser a doença zoonótica mais reportada na União Europeia (UE), e apesar de sub-notificada, registou-se um aumento de 4% no número de casos reportados em 2009 (198.252 casos notificados na totalidade de 25 Estados-Membro), relativamente a 2008 (EFSA, 2011). Apesar de Portugal ter contribuído para o estudo de prevalência de *Campylobacter* em cecos e carcaças de frangos, realizado a nível europeu, e de ser ter verificado uma taxa de prevalência elevada (com predominância da espécie *C. coli*) (EFSA, 2011), não se conhece, até ao momento, no nosso País, um sistema de vigilância para a campilobacteriose humana, faltando informação acerca da incidência desta doença na população.

Em países em desenvolvimento, o isolamento de *Campylobacter* spp. a partir de amostras de fezes de crianças com diarreia é bastante frequente. Apesar de, geralmente, não existirem sistemas de vigilância a nível nacional, estima-se, com base em estudos de controlo realizados noutros países, que cerca de 40.000-60.000 casos de campilobacteriose ocorram por cada 100.000 crianças com idade inferior a 5 anos. Já nos países desenvolvidos, essa relação será de 300 por cada 100.000 crianças (Coker *et al.*, 2002). Considerando a população

global desses países, a incidência de campilobacteriose não difere muito entre países em vias de desenvolvimento e países desenvolvidos (FAO/WHO, 2009), tal como já mencionado neste trabalho. Do que se sabe, nos países em desenvolvimento, a infecção por *Campylobacter* parece ser assintomática em indivíduos adultos, manifestando-se a doença essencialmente em crianças com idade inferior a 5 anos, enquanto que, nos países desenvolvidos, a manifestação de doença ocorre tanto em crianças como em adultos, com predominância em crianças com idades inferiores a 5 anos e jovens com idades entre os 15 e 29 anos (Coker *et al.*, 2002; Turkington & Ashby, 2007).

Uma característica proeminente da epidemiologia de *Campylobacter* é a sua sazonalidade. Nos países desenvolvidos, os picos de incidência ocorrem no final da Primavera ou durante o Verão (Fig. 1.13), havendo uma tendência para a incidência diminuir nos outros períodos do ano (Coker *et al.*, 2002; Humphrey *et al.*, 2007; EFSA, 2011). Por outro lado, nos países em desenvolvimento, a infecção por *Campylobacter* parece não ter uma base sazonal, o que se poderá dever à ausência de variações extremas de temperatura, mas também à falta de implementação de sistemas de vigilância e diagnóstico eficazes (Coker *et al.*, 2002).



**Figura 1.13** - Número de casos de campilobacteriose humana reportados na UE (todos os Estados-Membro excepto Grécia, Letónia, Portugal e Roménia), em 2009. Adaptado de EFSA (2011).

#### 1.4.3. Factores de virulência e possível (eis) mecanismo (s) de infecção

Após a entrada por via oral no organismo humano, *Campylobacter* segue o percurso normal no tracto gastrointestinal, podendo a carga microbiana ficar drasticamente reduzida após contacto com o ambiente ácido do estômago. As bactérias sobreviventes continuam o

trajecto até ao intestino, colonizando o jejuno, o íleo e o cólon. Os indivíduos infectados podem permanecer como portadores assintomáticos ou manifestar doença (Konkel *et al.*, 2001; Janssen *et al.*, 2008).

Os mecanismos exactos a partir dos quais *C. jejuni* consegue induzir doença em humanos ainda permanecem pouco conhecidos, no entanto, com base em manifestações clínicas observadas em pacientes, foram sugeridos dois possíveis mecanismos de infecção: (i) adesão intestinal seguida da produção de toxinas (ii) invasão bacteriana e replicação dentro da mucosa intestinal (Hu & Kopecko, 1999).

Do que se sabe, crê-se que a capacidade que *Campylobacter* tem para causar doença estará dependente de múltiplos factores de virulência, incluindo a mobilidade, a adesão e invasão de tecidos, e a produção de toxinas (Wassenaar, 1997; Monteville & Konkel, 2002).

A mobilidade de *Campylobacter* conferida pelo(s) flagelo(s) polar(es) (um flagelo numa ou em ambas as extremidades da célula) tem sido associada à capacidade de colonização do intestino. Num estudo de infecção experimental de frangos realizado por Nachamkin e colaboradores (1993a), envolvendo a administração por via oral de uma estirpe de *Campylobacter* selvagem flagelada e de dois mutantes, um sem flagelo e outro com flagelo incompleto, verificou-se que apenas a estirpe selvagem detentora de flagelo intacto conseguia colonizar com sucesso o ceco dos frangos infectados. A importância do flagelo nos processos de adesão e invasão tem também sido evidenciada em estudos em que se verificou que defeitos na glicosilação da proteína constituinte (flagelina) levam a uma diminuição na capacidade de realização desses processos. Em *Campylobacter*, o locus genético da flagelina é constituído pelos genes *flaA* e *flaB*, organizados em *tandem*. Os dois genes são bastante semelhantes na sua sequência nucleotídica, diferindo apenas em 5%, pelo que se sugere que tenha existido um processo de duplicação genética (Meinersmann & Hiett, 2000). Mutantes do gene *flaA* apresentam mobilidade significativamente reduzida, apresentando um flagelo incompleto, enquanto que mutantes do gene *flaB* possuem mobilidade pouco alterada (flagelo quase normal), revelando-se, no entanto, um decréscimo do potencial patogénico neste último caso (Jagannathan & Penn, 2005).

Num estudo realizado *in vitro*, verificou-se que o processo de internalização de mutantes aflagelados de *C. jejuni* pelas células hospedeiras é reduzido (Wassenaar & Blaser, 1999). Para além do flagelo, tem-se demonstrado que os mecanismos de quimiotaxia estão envolvidos na capacidade de *Campylobacter* aderir e invadir células do epitélio intestinal (Snelling *et al.*, 2005; Dasti *et al.*, 2010). Vários genes ortólogos de quimiotaxinas (*cheA*, *cheW*, *cheV*, *cheY*, *cheR* e *cheB*) foram encontrados na sequência do genoma de *C. jejuni*, entre os

quais *cheY* que, ao possuir um papel central na rotação flagelar, demonstrou ser crucial para a virulência de *Campylobacter* (Hendrixson & DiRita, 2004; Dasti *et al.*, 2010).

No que diz respeito à existência de estruturas de adesão celular na superfície bacteriana que permitam a ligação às células do hospedeiro, tem-se verificado que só sob condições específicas de crescimento (p.e. na presença de sais biliares) poderão ser observadas estruturas semelhantes a *pili* (Doig *et al.*, 1996; Wassenaar & Newell, 2006). Por outro lado, os lipopolissacáridos e lipooligossacáridos, constituintes da membrana celular, a proteína CadF da membrana externa que se liga à fibronectina, a proteína de ligação PEB1 e a lipoproteína JlpA expostas na superfície celular, têm sido associadas à capacidade de adesão do microrganismo a receptores específicos das células hospedeiras (Wassenaar & Blaser, 1999; Snelling *et al.*, 2005; Wassenaar & Newell, 2006). O mecanismo de invasão de *C. jejuni* parece ainda estar dependente dos microtubulos e filamentos de actina das células epiteliais do intestino do hospedeiro (Kopecko *et al.*, 2001; Biswas *et al.*, 2003). A proteína CadF interage com as células do hospedeiro, ligando-se especificamente à fibronectina das células epiteliais; simultaneamente, activa uma cadeia de sinalização celular que leva à activação das GTPases Rac1 e Cdc42, induzindo desta forma a sua própria internalização (Krause-Gruszczynska *et al.*, 2007a, citado por Dasti *et al.*, 2010). Como alternativa, a invasão pode ocorrer através de um processo de translocação em que existe a disrupção das junções apertadas entre células (Dasti *et al.*, 2010).

A produção de toxinas tem também sido considerada uma importante característica na patogenia de *Campylobacter*, no entanto, o processo de caracterização destes compostos encontra-se ainda em desenvolvimento, existindo alguma incerteza no que diz respeito ao seu número, modo de actuação e especificidade. Os estudos realizados têm demonstrado que a produção de toxinas por *Campylobacter* varia consoante a estirpe, dependendo também das condições utilizadas na cultura dos microrganismos *in vitro* (Levin, 2007). Estão identificadas algumas classes de toxinas (Wassenaar, 1997), sendo que, de todas, a toxina CDT tem sido a mais estudada. Esta toxina interfere com a divisão celular *in vitro* de células HeLa, conduzindo à morte celular e tem sido, por isso, considerada um importante factor de virulência. Apesar disso, ainda não existe uma ligação directa entre a expressão da toxina CDT e o desenvolvimento de doença (Wassenaar & Newell, 2006). Pensa-se que o seu papel esteja relacionado com a modulação da resposta imune do hospedeiro através da produção de interleucina 8 que, por sua vez, leva ao recrutamento e acumulação de células dendríticas, macrófagos e neutrófilos para o local da infecção, induzindo, deste modo, a inflamação do intestino (Dasti *et al.*, 2010).

#### 1.4.4. Manifestações da doença

Os microrganismos pertencentes ao género *Campylobacter*, para além de possuírem um espectro alargado de hospedeiros, possuem diferentes comportamentos na relação estabelecida com cada um deles, o que resulta num espectro de doenças que pode variar desde a colonização assintomática, ao desenvolvimento de enterite e, menos frequentemente, a complicações envolvendo o sistema nervoso central. Acresce que a diversidade de cenários clínicos possíveis depende do estado imunitário do hospedeiro, dos factores de virulência produzidos pela estirpe infectante nas condições ambientais presentes no hospedeiro, e da existência de outras infecções em simultâneo (Young & Mansfield, 2005).

O período de incubação de *Campylobacter* no organismo humano pode variar entre 2 a 10 dias, sendo mais extenso que os períodos de incubação da maioria dos outros agentes patogénicos intestinais (Turkington & Ashby, 2007). A manifestação de doença, que começa em média após 4 dias de incubação, pode ser ligeira ou severa com sintomas que incluem diarreia aquosa (por vezes hemorrágica), dor abdominal, febre, dor de cabeça e náuseas. Em 30% dos casos, a doença manifesta-se inicialmente com uma sintomatologia semelhante à da gripe, com febre, dores de cabeça, vertigens e mialgias, o que sugere a ocorrência de uma resposta imunitária no local de infecção (Humphrey *et al.*, 2007; Janssen *et al.*, 2008).

Normalmente, a campilobacteriose é uma doença autolimitada e um período de descanso, com acompanhamento do estado de hidratação do paciente, é suficiente para a recuperação. O tratamento com antibióticos é raramente indicado para situações de infecção ligeira. Os antibióticos, apesar de contribuírem para a redução do período de excreção fecal do microrganismo, não têm um impacto muito acentuado na duração dos sintomas da doença. Para além disso, têm sido encontradas estirpes de *Campylobacter* com elevada resistência aos antibióticos utilizados para tratamento de campilobacteriose, nomeadamente macrólidos e fluoroquinolonas, sendo que os pacientes infectados com estirpes resistentes apresentam manifestações mais graves da doença (Helms *et al.*, 2005 citado por Humphrey *et al.*, 2007). Esta evidência reforça a necessidade de minimização e controlo da utilização deste tipo de antimicrobianos, quer em pessoas quer em animais, de modo a evitar o aparecimento de estirpes multirresistentes (Humphrey *et al.*, 2007; Janssen *et al.*, 2008).

Em indivíduos imunocompetentes, a doença é normalmente restrita ao intestino, no entanto, já têm sido descritos casos de bacteremia. Ocasionalmente, a passagem através da mucosa intestinal e a migração para espaços extraintestinais através do sistema linfático pode resultar em doença sistémica (Janssen *et al.*, 2008). Apesar das complicações resultantes desta doença serem raras, algumas infecções com *Campylobacter jejuni* têm sido associadas a casos de colite recorrente, colecistite aguda e, ainda, de meningite. Existem também estudos que

sugerem que a infecção com *C. jejuni* é um factor de risco para o desenvolvimento de artrite reactiva, das síndromes de Guillain-Barré e Miller-Fisher e da síndrome hemolítica-urémica, (Yuki, 1999; Turkington & Ashby, 2007; Dasti *et al.*, 2010).

A taxa de mortalidade estimada é de um caso por cada 1.000, afectando essencialmente indivíduos imunodeprimidos (Turkington & Ashby, 2007).

## **1.5. Métodos de isolamento e caracterização de bactérias do género *Campylobacter***

O isolamento e caracterização de agentes patogénicos são fundamentais para a compreensão da epidemiologia das doenças infecciosas. Recorrendo-se a metodologias adequadas para esse efeito, consegue-se obter informação essencial ao rastreio das doenças e à prevenção e controlo de potenciais surtos.

### **1.5.1. Isolamento convencional**

Os microrganismos pertencentes ao género *Campylobacter* podem ser isolados a partir de vários tipos de amostras (p.e. fecais, alimentares, ambientais). Normalmente, o isolamento destes microrganismos está dependente de alguns factores, como o método de amostragem, o meio de cultura, a utilização de suplementos nutricionais, a utilização de antibióticos selectivos, a temperatura (37°C - 42°C) e atmosfera de crescimento (microaerofília). Os dados sugerem que o meio de cultura *Bolton Broth*, utilizado na metodologia de isolamento proposta na ISO10272-1:2006 é o que fornece taxas mais elevadas de isolamento (Bolton *et al.*, 1997; Baylis *et al.*, 2000; Jørgensen *et al.*, 2002; Humphrey *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2011). O isolamento a partir de amostras alimentares e ambientais, onde à partida podem estar presentes microrganismos que já foram expostos a situações de stresse, normalmente requer procedimento de pré-enriquecimento antes da cultura em meio selectivo (Wassenaar & Newell, 2006).

### **1.5.2. Abordagens moleculares usadas na detecção directa de *Campylobacter* spp. em produtos alimentares**

A reacção de polimerização em cadeia (PCR) tem sido aplicada na detecção de *Campylobacter* spp. devido à sua elevada sensibilidade e rapidez; de um modo geral, a técnica de PCR é mais rápida que os métodos convencionais de cultura (até 6 dias), conseguindo-se resultados em 1-2 dias; para além disso, esta técnica confere a vantagem de se poderem detectar células viáveis não cultiváveis. No entanto, esta técnica pode apresentar algumas

limitações, dependendo do tipo de amostra testada. Relativamente aos produtos alimentares, é, normalmente, necessário fazer-se um pré-enriquecimento da amostra devido à baixa concentração bacteriana, o que aumenta o período da análise para obtenção de resultados. Por outro lado, as amostras podem conter compostos que interferem com a reacção de polimerização em cadeia, existindo a necessidade de procedimento de purificação para os remover (Miller & Mandrell, 2005; Wassenaar & Newell, 2006). Apesar de existirem alguns inconvenientes associados à técnica de PCR, têm-se vindo a desenvolver várias metodologias com base nesta técnica, capazes de detectar poucas células de *Campylobacter*, em amostras alimentares (Miller & Mandrell, 2005; Silva *et al.*, 2011).

### 1.5.3. Caracterização fenotípica dos isolados

Apesar de se poder efectuar uma caracterização de *Campylobacter* spp. com base em determinadas características bioquímicas (p.e. produção de catalase e oxidase, ausência de produção da urease, hidrólise do hipurato e do indoxil acetato), existem evidências de variabilidade das estirpes nestas propriedades, o que leva à ocorrência de várias excepções, dificultando este tipo de caracterização e limitando a classificação (On, 1996). Acresce que os resultados obtidos a partir deste tipo de abordagem variam de acordo com a metodologia utilizada e, uma vez que não existe padronização, a interpretação dos dados acaba por ser subjectiva. A informação existente relativa à compilação deste tipo de dados (de que é exemplo a Tabela 1.6) deve, por isso, ser assimilada de forma cuidada, de modo a evitar falsos positivos/negativos (Wassenaar & Newell, 2006). Com base na identificação bioquímica, *C. jejuni* pode ser diferenciado das restantes espécies do género através da sua capacidade de hidrolisar o hipurato. No entanto, já foram identificadas estirpes de *C. jejuni* que apresentam um resultado negativo para este teste (Totten *et al.*, 1987), o que faz com que uma diferenciação apropriada relativamente às outras espécies de *Campylobacter*, em particular *C. coli*, não se deva basear unicamente em testes bioquímicos.

Para além da identificação bioquímica, a caracterização fenotípica de *Campylobacter* spp. também se pode basear na detecção de determinados componentes da superfície celular [nomeadamente usando a propriedade antigénica de hidratos de carbono ou proteínas (serotipagem)], na avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos, em requisitos metabólicos, na sensibilidade a bacteriófagos e em perfis proteicos/ácidos gordos (Klena & Konkel, 2005). A subtipagem de isolados de *C. jejuni* teve por base o desenvolvimento de dois esquemas de serotipagem no início dos anos 80, nomeadamente, os esquemas de serotipagem de Penner [*heat-stable* (HS) *serotyping scheme*] e Lior [*heat-labile* (HL) *serotyping scheme*]. A aplicação destas técnicas foi bastante útil na investigação de surtos e na identificação de possíveis fontes

de contaminação humana (Fitzgerald *et al.*, 2005). Apesar da sua utilidade se encontrar bem demonstrada, ambas as técnicas apresentam algumas desvantagens que inviabilizaram a sua utilização na análise de rotina e em estudos epidemiológicos, nomeadamente a existência de um elevado número de estirpes não tipáveis, o elevado tempo de execução e os requisitos técnicos necessários (Wassenaar & Newell, 2000).

De um modo geral, as abordagens de caracterização fenotípica para diferenciação inter- e intra-espécie de isolados de *Campylobacter* spp. podem apresentar desvantagens ao nível do poder discriminatório, da reprodutibilidade, dos recursos necessários e do tempo de execução, o que tem tornado desaconselhável a sua utilização em estudos epidemiológicos globais e de longa duração (Wassenaar & Newell, 2000; Klena & Konkel, 2005).

**Tabela 1.6** - Testes fenotípicos vulgarmente utilizados para diferenciar espécies do género *Campylobacter* spp. e a espécie *Bacteroides ureolyticus* que, recentemente, se propôs integrar o género *Campylobacter* (Vandamme *et al.*, 2010). Os números entre parêntesis representam o número de isolados testados. São apresentados os resultados esperados para cada espécie, expressos em percentagem de isolados com resultado positivo para o teste em questão, de acordo com a informação constante no estudo de On (2005).

	Oxidase	Catalase	Hidrólise do indoxil acetato	Hidrólise do hipurato	Redução do nitrato	Urease	Crescimento em meio mínimo	Crescimento em meio composto por 1% de glicina	Crescimento a 42°C	Resistência ao ácido nalidíxico
<i>C. coli</i> (18)	100	100	100	0	100	0	100	94	100	0
<i>C. concisus</i> (21)	57	0	0	0	14	0	0	24	76	71
<i>C. curvus</i> (5)	100	0	60	20	100	0	80	100	60	100
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> (17)	100	100	0	0	100	0	71	100	70	94
<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> (29)	100	93	0	0	100	0	90	7	0	69
<i>C. gracilis</i> (7)	0	29	71	0	86	0	29	100	71	57
<i>C. helveticus</i> (9)	100	0	100	0	100	0	0	44	100	0
<i>C. hominis</i> (5)	100	0	0	0	100	0	0	100	0	20
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>hyointestinalis</i> (17)	100	100	0	0	100	0	65	100	100	100
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>lawsonii</i> (9)	100	100	0	0	100	0	66	22	100	100
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i> (10)	100	70	100	100	0	0	0	20	0	0
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> (22)	100	100	100	91	100	0	10	91	100	0
<i>C. lanienae</i> (5)	100	100	0	0	100	0	0	80	100	80

	Oxidase	Catalase	Hidrólise do indoxil acetato	Hidrólise do hipurato	Redução do nitrato	Urease	Crescimento em meio mínimo	Crescimento em meio composto por 1% de glicina	Crescimento a 42°C	Resistência ao ácido nalidíxico
<i>C. lari</i> (14)	100	100	7	0	100	64†	0	100	100	29‡
<i>C. mucosalis</i> (10)	100	0	0	0	10	0	0	50	100	80
<i>C. retus</i> (5)	100	20	100	0	100	0	0	100	20	80
<i>C. showae</i> (2)	50	100	50	0	100	0	50	50	50	0
<i>C. sputorum</i> (40)	100	Dependente do biovar*	0	0	97	Dependente do biovar*	NR	100	97	82
<i>C. upsaliensis</i> (9)	100	0	100	0	100	0	0	100	89	0
<i>Bacteroides ureolyticus</i> (10)	100	20	10	0	100	100	30	100	60	0

\* Estirpes catalase e urease negativas, biovar *sputorum*; Estirpes catalase positivas, biovar *fecalis*; Estirpes urease positivas, biovar *paraureolyticus*

† As estirpes positivas para o teste da urease formam o grupo de *Campylobacter* termofílico urease positivo (*Urease-Positive Thermophilic Campylobacter* – UPTC)

NR – teste não reprodutível

‡Reacção fraca

#### 1.5.4. Caracterização genotípica dos isolados

A utilização de técnicas moleculares para a caracterização genotípica de microrganismos baseia-se na comparação de sequências nucleotídicas, considerando-se que dois isolados são tanto mais distintos quanto maior for a desigualdade das suas sequências genómicas.

Têm sido várias as metodologias propostas para a tipagem/subtipagem de isolados de *Campylobacter*. As metodologias podem basear-se na avaliação da presença/ausência de um determinado gene, por recurso à técnica de polimerização em cadeia, ou na avaliação da semelhança/diferença da sequência do gene obtida por sequenciação ou emergente da análise dos fragmentos de restrição do gene amplificado por PCR (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – RFLP). Este tipo de abordagem, com base num único gene, pode, no entanto, limitar estudos epidemiológicos mais vastos, considerando a possibilidade de recombinação inter- e intra-genómica (Harrington *et al.*, 1997; de Boer *et al.*, 2002).

A análise dos macrofragmentos resultantes da restrição do genoma com uma determinada enzima de restrição, cuja separação é feita utilizando a técnica de PFGE, RFLP-PFGE, tem sido muito utilizada na genotipagem de *Campylobacter* spp., mas a possibilidade de ocorrência de alterações no genoma devido a recombinações e mutações, pode influenciar a interpretação dos resultados devido à perda/ganho de um local de restrição (Klena & Konkel, 2005).

Uma outra abordagem baseada na análise do genoma consiste na metodologia AFLP. Nesta abordagem, o DNA cromossomal é restringido por duas enzimas de restrição, uma com um local de reconhecimento (LR) de 4 pb, e outra com um LR de 6 pb. Os oligonucleótidos iniciadores utilizados para a amplificação por PCR dos produtos digeridos são marcados por fluorescência e os produtos resultantes da amplificação são analisados em géis de poliacrilamida desnaturantes (Wassenaar & Newell, 2000; Klena & Konkel, 2005).

A técnica MLST baseia-se em diferenças na sequência nucleotídica de vários genes essenciais (normalmente, sete) denominados *housekeeping genes*. Todas as sequências únicas identificadas são assinaladas com um número por ordem de descoberta e todos os alelos presentes em cada *locus* são combinados num perfil alélico designado de *sequence type* (ST). Isolados relacionados apresentam STs idênticos ou STs que diferem nos alelos de poucos *loci*; isolados não relacionados possuem STs não relacionados (Klena & Konkel, 2005).

A técnica MLEE constitui uma alternativa à metodologia anteriormente referida e baseia-se, não na análise directa da sequência nucleotídica, mas na caracterização da migração electroforética de enzimas. As mutações não neutras que ocorrem no genoma caracterizam-se

pela expressão diferenciada de aminoácidos que podem alterar a mobilidade electroforética da proteína final. Para formar um *electrophoretic type* (ET), utilizam-se de 9 a 11 enzimas. Cada ET representa combinações de alelos das diferentes enzimas testadas. Os ETs são depois utilizados em comparações que permitem inferir a relação genética entre isolados. Uma das desvantagens da utilização desta técnica recai no facto de não serem consideradas mutações neutras/sinónimas, pelo que a técnica MLST acaba por ser preferível nesse sentido (Klena & Konkel, 2005).

A tecnologia de *microarrays* de DNA, em que cada ORF representando as várias regiões do genoma ou uma região de interesse num cromossoma é amplificada por PCR utilizando oligonucleótidos iniciadores específicos, tem sido utilizada experimentalmente, não só para a identificação rápida das espécies de *Campylobacter*, como para a sua tipagem com base em genomas completos (hibridação do DNA genómico de um isolado com o *microarray* de DNA construído com base na sequência do genoma da estirpe *C. jejuni* NCTC 11168) (Klena & Konkel, 2005). No entanto, dado o seu elevado custo e necessidade de utilização de equipamento dispendioso, esta técnica não é, ainda, utilizada rotineiramente.

Para além das metodologias referidas, existem ainda outras técnicas que têm sido utilizadas na genotipagem de *Campylobacter* spp. como, por exemplo, a técnica de ribotipagem que se baseia na detecção de genes ribossomais (rDNA) através da técnica de *Southern blot* e a análise RAPD em que se desenvolvem sequências oligonucleotídicas iniciadoras degeneradas e arbitrárias para amplificar ao acaso sequências de DNA (Wassenaar & Newell, 2000).

As diferentes metodologias de caracterização genotípica anteriormente referidas diferem na sua sensibilidade, poder discriminatório, disponibilidade, reprodutibilidade, rapidez, facilidade de execução e custo, devendo a sua selecção ser efectuada em função do tipo de estudo. A caracterização de *Campylobacter* em estudos epidemiológicos deve resultar de abordagens combinadas em que a utilização da metodologia baseada em genes específicos (p.e. *flaA*-RFLP) se complementa com RFLP-PFGE, AFLP, MLST, e *microarrays* de DNA. Considerando que os perfis resultantes da metodologia RFLP-PFGE também podem ser afectados por mutações (p.e. inserções, eliminações, mutações pontuais em genes considerados não essenciais) (de Boer *et al.*, 2002), a utilização das metodologias AFLP, MLST e *microarrays* de DNA é considerada mais indicada para distinguir epidemiológica e filogeneticamente isolados de *Campylobacter* (Wassenaar & Newell, 2000; Klena & Konkel, 2005), sobretudo em estudos epidemiológicos de distribuição geográfica alargada e/ou de longa duração.

Em suma, apesar dos métodos genotípicos possuírem maior poder discriminatório do que os métodos fenotípicos, a combinação das duas abordagens poderá contribuir para o aumento do poder discriminatório e para uma caracterização mais completa dos isolados.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Microrganismos em estudo: Origem e Isolamento

No presente trabalho, estudaram-se 200 isolados (seleccionados aleatoriamente, a partir de um grupo de 353 isolados), dos quais 129 pertencentes à espécie *Campylobacter coli* e 71 pertencentes à espécie *Campylobacter jejuni*. Os isolados foram obtidos no Instituto Nacional de Recursos Biológicos - Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (INRB-LNIV) no âmbito de um estudo de natureza comunitária (Decisão da Comissão 2007/516/CE), visando: (I) a determinação da prevalência de *Campylobacter* spp. em bandos de frangos e caracterização da respectiva resistência antimicrobiana; (II) a determinação da prevalência de *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp. em carcaças de frangos, nos Estados-Membro.

Com o intuito de enquadrar a origem dos isolados caracterizados nesta dissertação, segue-se uma breve exposição dos procedimentos adoptados relativamente à colheita, manuseamento e análise das amostras para a detecção de *Campylobacter* spp. em bandos de frangos, apesar dessas metodologias terem sido realizadas fora do âmbito deste trabalho.

Em Portugal, a autoridade competente responsável pelo supervisionamento e realização da amostragem efectuada no âmbito da referida Decisão foi a Direcção Geral de Veterinária (DGV) com o apoio laboratorial do INRB-LNIV. O estudo foi realizado em 2008 no período compreendido entre Junho e Dezembro. Foram seleccionados 14 matadouros de aves localizados em várias regiões geográficas do País, correspondendo à amostragem de mais de 200 produtores de aves. Para a constituição da amostra, foram colhidos os cecos individuais intactos de 10 aves, seleccionadas aleatoriamente no mesmo lote para abate (aves de uma exploração individual). Os cecos intactos foram colocados em recipientes de plástico estéreis e transportados para o laboratório em condições refrigeradas (4°C). No laboratório, efectuou-se, em condições de assépsia, uma amostra composta (*pool*) a partir do conteúdo cecal de 10 cecos. As amostras cecais foram processadas num prazo não superior a 72-80 horas desde a sua colheita. No total, foram analisadas 429 amostras compostas.

O isolamento e confirmação das espécies como pertencentes ao género *Campylobacter* foram realizados por técnicos especializados do INRB-LNIV, de acordo com as indicações constantes da Decisão da Comissão 2007/516/CE e da Norma ISO10272-1:2006.

Para além dos 200 isolados atrás referidos, incluiu-se, também, neste estudo duas estirpes de referência, especificamente um isolado de fezes bovinas, *C. jejuni* subsp. *jejuni* ATCC 33560, e um isolado proveniente de fezes suínas *C. coli* CCUG 11283. Informações específicas relativas a cada isolado em estudo estão presentes na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Microrganismos utilizados no presente trabalho.

Isolado/ Estirpe	Origem	Exploração	Distrito da exploração	Data de isolamento	Tipo de produção avícola	Espécie	Referência
LNIV01	Cecos de frangos	II	Viseu	Jun-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV02	Cecos de frangos	I	Aveiro	Jun-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV03	Cecos de frangos	CXXV	Guarda	Jun-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV05	Cecos de frangos	CLXXII	Viseu	Jun-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV06	Cecos de frangos	LXXX	Aveiro	Jun-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV07	Cecos de frangos	X	Viseu	Jul-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV08	Cecos de frangos	CXVIII	Guarda	Jul-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV09	Cecos de frangos	CXLIX	Viseu	Jul-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV10	Cecos de frangos	CXXXVI	Braga	Jul-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV11	Cecos de frangos	LVIII	Guarda	Jul-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV12	Cecos de frangos	CXV	Viseu	Jul-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV14	Cecos de frangos	XXXVIII	Aveiro	Jul-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV15	Cecos de frangos	LXIX	Viseu	Jul-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV16	Cecos de frangos	XLVI	Coimbra	Jul-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV17	Cecos de frangos	XCII	Viseu	Jul-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV18	Cecos de frangos	CXXVII	Viseu	Jul-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV19	Cecos de frangos	CVII	Viseu	Jul-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV20	Cecos de frangos	I.N.D.	I.N.D.	Jul-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV22	Cecos de frangos	I.N.D.	I.N.D.	Jul-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV23	Cecos de frangos	I.N.D.	I.N.D.	Jul-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV26	Cecos de frangos	I.N.D.	I.N.D.	Jul-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV28	Cecos de frangos	I.N.D.	I.N.D.	Jul-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV29	Cecos de frangos	I.N.D.	I.N.D.	Jul-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV30	Cecos de frangos	I.N.D.	I.N.D.	Jul-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV31	Cecos de frangos	I.N.D.	I.N.D.	Ago-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV32	Cecos de frangos	I.N.D.	I.N.D.	Set-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV34	Cecos de frangos	I.N.D.	I.N.D.	Set-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV36	Cecos de frangos	I.N.D.	I.N.D.	Set-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV39	Cecos de frangos	I.N.D.	I.N.D.	Set-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV41	Cecos de frangos	I.N.D.	I.N.D.	Set-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV43	Cecos de frangos	I.N.D.	I.N.D.	Set-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV45	Cecos de frangos	I.N.D.	I.N.D.	Set-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho

Isolado/ Estirpe	Origem	Exploração	Distrito da exploração	Data de Isolamento	Tipo de produção avícola	Espécie	Referência
LNIV46	Cecos de frangos	I.N.D.	I.N.D.	N.D.	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV48	Cecos de frangos	CXL	Guarda	Set-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV50	Cecos de frangos	I.N.D.	I.N.D.	Set-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV51	Cecos de frangos	I.N.D.	I.N.D.	N.D	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV52	Cecos de frangos	I.N.D.	I.N.D.	Set-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV54	Cecos de frangos	I.N.D.	I.N.D.	Set-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV55	Cecos de frangos	I.N.D.	I.N.D.	Set-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV56	Cecos de frangos	XLVII	Viseu	Ago-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV58	Cecos de frangos	I.N.D.	I.N.D.	Set-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV59	Cecos de frangos	CIV	Viseu	Set-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV60	Cecos de frangos	IX	Viseu	Set-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV61	Cecos de frangos	LXXXII	Viseu	Set-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV63	Cecos de frangos	I.N.D.	I.N.D.	Set-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV64	Cecos de frangos	LVI	Viseu	Set-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV65	Cecos de frangos	XVII	Viseu	Set-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV66	Cecos de frangos	CLXV	Aveiro	Out-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV67	Cecos de frangos	LXXVI	Aveiro	Out-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV69	Cecos de frangos	XXIV	Aveiro	Out-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV70	Cecos de frangos	XC	Viseu	Out-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV71	Cecos de frangos	CLX	Viana do Castelo	Out-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV73	Cecos de frangos	CXX	Viseu	Out-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV74	Cecos de frangos	XX	Viana do Castelo	Out-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV76	Cecos de frangos	LX	Viseu	Out-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV78	Cecos de frangos	I.N.D.	I.N.D.	Out-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV79	Cecos de frangos	CXXXVII	Viseu	Out-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV84	Cecos de frangos	LXVIII	Viseu	Out-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV85	Cecos de frangos	III	Coimbra	Out-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV86	Cecos de frangos	LXIV	Viseu	Out-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV87	Cecos de frangos	LXXIX	Viseu	Out-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV88	Cecos de frangos	CVI	Viseu	Out-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV89	Cecos de frangos	CXXIII	Braga	Out-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV90	Cecos de frangos	LXXIV	Viseu	Out-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV92	Cecos de frangos	I.N.D.	I.N.D.	Out-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho

Isolado/ Estirpe	Origem	Exploração	Distrito da exploração	Data de Isolamento	Tipo de produção avícola	Espécie	Referência
LNIV94	Cecos de frangos	LXXXIII	Aveiro	Out-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV 95	Cecos de frangos	XLIV	Aveiro	Out-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV96	Cecos de frangos	I.N.D.	I.N.D.	Out-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV97	Cecos de frangos	CXXXII	Viseu	Out-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV98	Cecos de frangos	LXXIX	Viseu	Nov-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV100	Cecos de frangos	I.N.D.	I.N.D.	Nov-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV103	Cecos de frangos	CXL	Guarda	Nov-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV104	Cecos de frangos	CXVI	Braga	Dez-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV105	Cecos de frangos	LXXII	Leiria	Jun-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV106	Cecos de frangos	XXXIX	Leiria	Jun-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV107	Cecos de frangos	IV	Leiria	Jun-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV108	Cecos de frangos	CLIII	Setúbal	Jun-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV109	Cecos de frangos	CLVIII	Santarém	Jun-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV110	Cecos de frangos	LIV	Leiria	Jun-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV111	Cecos de frangos	CLIII	Setúbal	Jun-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV112	Cecos de frangos	XV	Évora	Jun-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV113	Cecos de frangos	XLVIII	Leiria	Jul-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV114	Cecos de frangos	Lic	Santarém	Jul-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV115	Cecos de frangos	CLIII	Setúbal	Jul-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV116	Cecos de frangos	LIV	Leiria	Jul-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV117	Cecos de frangos	XV	Évora	Jul-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV118	Cecos de frangos	XV	Évora	Jul-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV119	Cecos de frangos	I.N.D.	I.N.D.	Jul-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV120	Cecos de frangos	CXI	Santarém	Jul-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV121	Cecos de frangos	CLIII	Setúbal	Jul-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV122	Cecos de frangos	CLIII	Setúbal	Jul-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV123	Cecos de frangos	CLXXIV	Viseu	Jul-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV124	Cecos de frangos	LV	I.N.D.	Jul-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV125	Cecos de frangos	XV	Évora	Jul-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV126	Cecos de frangos	CLII	Santarém	Jul-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV127	Cecos de frangos	LIII	Santarém	Jul-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV128	Cecos de frangos	XXXVI	Castelo Branco	Jul-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV129	Cecos de frangos	CLIII	Setúbal	Jul-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho

Isolado/ Estirpe	Origem	Exploração	Distrito da exploração	Data de Isolamento	Tipo de produção avícola	Espécie	Referência
LNIV130	Cecos de frangos	XIII	Santarém	Jul-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV131	Cecos de frangos	CLIII	Setúbal	Jul-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV132	Cecos de frangos	CXIII	Santarém	Jul-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV133	Cecos de frangos	CIX	Santarém	Jul-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV134	Cecos de frangos	CLIII	Setúbal	Jul-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV135	Cecos de frangos	LXXV	Santarém	Jul-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV136	Cecos de frangos	CLV	Santarém	Jul-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV137	Cecos de frangos	CLXI	Santarém	Jul-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV138	Cecos de frangos	CLXX	Lisboa	Jul-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV139	Cecos de frangos	CXXXVIII	Lisboa	Jul-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV140	Cecos de frangos	LXX	Santarém	Jul-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV141	Cecos de frangos	XLI	Santarém	Jul-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV142	Cecos de frangos	CII	Leiria	Jul-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV143	Cecos de frangos	CXLVII	Leiria	Jul-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV144	Cecos de frangos	LII	Santarém	Jul-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV145	Cecos de frangos	CXXXVIII	Lisboa	Jul-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV146	Cecos de frangos	CLXI	Santarém	Jul-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV147	Cecos de frangos	CLIII	Setúbal	Ago-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV148	Cecos de frangos	XXII	Aveiro	Ago-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV149	Cecos de frangos	XCVII	Leiria	Set-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV150	Cecos de frangos	CLIX	Lisboa	Set-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV151	Cecos de frangos	CLIX	Lisboa	Set-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV152	Cecos de frangos	CIII	Santarém	Set-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV153	Cecos de frangos	CXLIV	Lisboa	Set-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV154	Cecos de frangos	CLIII	Setúbal	Set-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV155	Cecos de frangos	CLVII	Coimbra	Set-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV156	Cecos de frangos	CLXVI	Santarém	Set-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV157	Cecos de frangos	CLVIII	Santarém	Set-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV158	Cecos de frangos	LXXV	Santarém	Set-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV159	Cecos de frangos	XV	Évora	Set-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV160	Cecos de frangos	XI	Leiria	Set-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV161	Cecos de frangos	XCVIII	Santarém	Set-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV162	Cecos de frangos	I.N.D.	I.N.D.	I.N.D.	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho

Isolado/ Estirpe	Origem	Exploração	Distrito da exploração	Data de Isolamento	Tipo de produção avícola	Espécie	Referência
LNIV163	Cecos de frangos	LVII	Santarém	Set-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV164	Cecos de frangos	XXIII	Santarém	Set-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV165	Cecos de frangos	CLIII	Setúbal	Set-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV166	Cecos de frangos	CV	Lisboa	Out-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV167	Cecos de frangos	CLIII	Setúbal	Out-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV168	Cecos de frangos	V	Santarém	Out-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV169	Cecos de frangos	L	Leiria	Out-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV170	Cecos de frangos	XXVIII	Santarém	Out-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV171	Cecos de frangos	Llb	Santarém	Out-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV172	Cecos de frangos	CLIII	Setúbal	Out-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV173	Cecos de frangos	CLIII	Setúbal	Out-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV174	Cecos de frangos	V	Santarém	Out-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV175	Cecos de frangos	CLIII	Setúbal	Nov-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV176	Cecos de frangos	CLIII	Setúbal	Nov-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV177	Cecos de frangos	LXII	Leiria	Nov-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV178	Cecos de frangos	CLXIII	Lisboa	Nov-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV179	Cecos de frangos	XXXII	Santarém	Nov-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV180	Cecos de frangos	XLIX	Coimbra	Nov-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV181	Cecos de frangos	CLIII	Setúbal	Nov-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV182	Cecos de frangos	CLIII	Setúbal	Nov-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV183	Cecos de frangos	CXV	Viseu	Nov-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV184	Cecos de frangos	XXIX	Santarém	Nov-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV185	Cecos de frangos	CI	Lisboa	Out-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV186	Cecos de frangos	CLI	Santarém	Nov-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV187	Cecos de frangos	LXXXI	Leiria	Nov-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV188	Cecos de frangos	XXIII	Santarém	Nov-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV189	Cecos de frangos	CLXIV	Viseu	Nov-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV190	Cecos de frangos	CLIII	Setúbal	Nov-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV191	Cecos de frangos	CXXXI	Leiria	Nov-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV192	Cecos de frangos	CLIII	Setúbal	Nov-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV193	Cecos de frangos	LXVib	Santarém	Nov-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV194	Cecos de frangos	CLXIX	Viseu	Nov-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV195	Cecos de frangos	CLIII	Setúbal	Nov-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho

Isolado/ Estirpe	Origem	Exploração	Distrito da exploração	Data de Isolamento	Tipo de produção avícola	Espécie	Referência
LNIV196	Cecos de frangos	CXXXIX	Santarém	Nov-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV197	Cecos de frangos	CXLVIII	Santarém	Nov-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV198	Cecos de frangos	LIIa	Santarém	Nov-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV199	Cecos de frangos	VI	Aveiro	Nov-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV200	Cecos de frangos	CLIII	Setúbal	Nov-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV201	Cecos de frangos	CXIII	Santarém	Nov-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV202	Cecos de frangos	CL	Santarém	Nov-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV203	Cecos de frangos	XXVII	Santarém	Nov-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV204	Cecos de frangos	XXXIV	Lisboa	Nov-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV205	Cecos de frangos	CLIII	Setúbal	Nov-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV206	Cecos de frangos	LXI	Aveiro	Nov-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV207	Cecos de frangos	LXIII	Viseu	Nov-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV208	Cecos de frangos	CLIII	Setúbal	Nov-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV209	Cecos de frangos	XXXIV	Lisboa	Dez-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV210	Cecos de frangos	XLIII	Leiria	Dez-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV211	Cecos de frangos	CXXXV	Lisboa	Dez-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV212	Cecos de frangos	XXI	Santarém	Dez-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV213	Cecos de frangos	CXXIV	Santarém	Dez-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV214	Cecos de frangos	CLIII	Setúbal	Dez-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV215	Cecos de frangos	CXXVI	Santarém	Dez-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV216	Cecos de frangos	CLV	Santarém	Dez-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV217	Cecos de frangos	LXXXV	Leiria	Dez-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV218	Cecos de frangos	CLIV	Santarém	Dez-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV219	Cecos de frangos	XCVI	Santarém	Dez-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV220	Cecos de frangos	L	Leiria	Dez-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV221	Cecos de frangos	XXXV	Santarém	Dez-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV222	Cecos de frangos	CLV	Santarém	Dez-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV223	Cecos de frangos	CXXX	Viseu	Dez-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV224	Cecos de frangos	CLIV	Santarém	Dez-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV225	Cecos de frangos	CLIII	Setúbal	Dez-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV226	Cecos de frangos	CLIII	Setúbal	Dez-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV227	Cecos de frangos	XCVI	Santarém	Dez-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV228	Cecos de frangos	CLVIII	Santarém	Dez-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho

Isolado/ Estirpe	Origem	Exploração	Distrito da exploração	Data de Isolamento	Tipo de produção avícola	Espécie	Referência
LNIV229	Cecos de frangos	CLIV	Santarém	Dez-08	I.N.D.	<i>C. coli</i>	Este trabalho
LNIV230	Cecos de frangos	LXXIII	Lisboa	Dez-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
LNIV231	Cecos de frangos	CLIII	Setúbal	Dez-08	I.N.D.	<i>C. jejuni</i>	Este trabalho
ATCC33560	Fezes de bovino	-	-	-	-	<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	American Type Culture Collection (ATCC)
CCUG 11283	Fezes de suíno	-	-	-	-	<i>C. coli</i>	Colecção de Culturas da Universidade de Göteborg (CCUG)

I.N.D. – Informação Não Disponível.

## 2.2. Manutenção das Culturas

Os isolados de *C. jejuni* e *C. coli*, crescidos em placas com meio *Columbia Blood Agar Base* (Oxoid) suplementado com 5% (v/v) de sangue de carneiro, foram mantidos congelados a -80°C numa mistura de glicerol (40%v/v) contendo 6% (m/v) do meio de cultura *Tryptone Soya Broth* (Oxoid).

## 2.3. Condições de crescimento das culturas

### 2.3.1. Crescimento em meio sólido

O crescimento das culturas em meio sólido foi realizado em placas de petri com meio *Columbia Blood Agar Base* (Oxoid), suplementado com 5% (v/v) de sangue de carneiro. As placas foram incubadas em condições de microaerofília, tendo, para esse efeito, sido introduzidas em jarras de incubação (Genbox) de 2,5 L (até 12 placas de petri com 90 mm de diâmetro), 7 L (até 42 placas de petri com 90 mm de diâmetro) ou, ainda, em sacos especiais de incubação (Merck). Para gerar a atmosfera adequada (5% O<sub>2</sub>; 10% CO<sub>2</sub>), utilizaram-se sistemas geradores de gás que consistem em bolsas especiais contendo componentes que ligam quimicamente uma proporção precisamente determinada de oxigénio dentro do recipiente de incubação (jarra/saco), libertando uma quantidade definida de CO<sub>2</sub>. Nas jarras de 2,5 L, utilizou-se um gerador (GEN box, BioMérieux) e, nas jarras de 7 L, utilizaram-se 3 geradores (GEN box, BioMérieux), de acordo com as indicações do fornecedor. Para incubação em sacos, foi utilizado um mini gerador (Anaerocult C mini, Merck) humedecido com 3 mL de água destilada, conforme indicação do fornecedor, sendo o saco selado com uma pinça adequada, de modo a garantir-se que não existiriam trocas gasosas entre o interior do saco e o

exterior. As placas foram, então, incubadas a  $37\pm 1^\circ\text{C}$  ou  $41\pm 1^\circ\text{C}$ , durante 48 horas. Após o crescimento, observaram-se colônias com características morfológicas típicas [colônias acinzentadas e pequenas, 1 a 3 mm de diâmetro (Fig. 2.1)].



**Figura 2.1** - Colônias de um isolado de *Campylobacter jejuni*, crescidas em meio *Columbia Blood Agar Base*, suplementado com 5% de sangue de carneiro (v/v), após 48 h de incubação a  $41\pm 1^\circ\text{C}$ .

### 2.3.2. Preparação de pré-inóculos para o crescimento em meio líquido

Os pré-inóculos dos diferentes isolados de *C. jejuni* e *C. coli* foram preparados utilizando colônias isoladas (2 a 6 colônias, dependendo do tamanho) crescidas em meio sólido de acordo com as condições atrás referidas, sendo posteriormente transferidas, com o auxílio de uma ansa estéril, para tubos de ensaio de vidro e/ou tubos de plástico de 15 mL (Sarstedt), contendo entre 3 a 6 mL do meio de cultura testado [indicado(s) abaixo]. Os pré-inóculos foram, então, incubados a  $37\pm 1^\circ\text{C}$  ou  $41\pm 1^\circ\text{C}$ , entre 24 e 48 horas, dependendo do ensaio realizado, em condições de microaerofília. Para esse efeito, colocaram-se os tubos em sacos de incubação com geradores Anaerocult C mini (Merck).

Meios de cultura líquidos utilizados no presente trabalho:

*Mueller-Hinton Broth* – MHB (21 g/L, Becton Dickinson)

*Brucella Broth* – BB (28 g/L, Becton Dickinson)

*Trypticase Soya Broth* – TSB (30 g/L, Becton Dickinson)

*Bacto Heart Infusion Broth* – BHI (25 g/L, Becton Dickinson)

*Luria-Bertani Broth* – LB (25 g/L, Becton Dickinson)

## 2.4. Extracção e purificação do DNA total dos isolados de *C. jejuni* e *C. coli*

A extracção do DNA dos isolados foi realizada por um dos três métodos que se seguem:

- Extracção Fenol/Clorofórmio
- Extracção por fervura
- Mediante a utilização de sistemas comerciais de extracção de DNA

Inicialmente, começou por se utilizar o método de extracção Fenol/Clorofórmio descrito por Harrington *et al.* (1997), no entanto, devido ao baixo rendimento da extracção e às dificuldades sentidas aquando das reacções de polimerização em cadeia (PCR) utilizando os DNAs resultantes desta técnica de extracção (possivelmente devido à interferência de resíduos de fenol com a reacção de PCR), optou-se por testar o método de extracção por fervura e, ainda, dois sistemas comerciais de extracção de DNA. A eficácia e rendimento de extracção por recurso aos sistemas comerciais revelou-se bastante superior, comparativamente às outras duas metodologias, pelo que a grande maioria das soluções de DNA foram obtidas a partir da utilização de um desses sistemas.

### 2.4.1. Extracção Fenol/Clorofórmio

A extracção pelo método Fenol/Clorofórmio foi realizada de acordo com o protocolo da rede de laboratórios Campynet que consta do sítio <http://campynet.vetinst.dk/Fla.htm> (consultado a 8 de Outubro de 2010). Este protocolo baseia-se no método descrito por Harrington *et al.* (1997). Resumidamente, o método consiste nas seguintes etapas: lavagem das células, lise celular, remoção de proteínas, precipitação do DNA e por fim ressuspensão do mesmo.

Inicialmente, recolheram-se colónias isoladas (2 a 4 colónias, dependendo do tamanho) crescidas em meio sólido (consultar secção 2.3.1.) com o auxílio de uma ansa estéril descartável (Sarstedt) e procedeu-se à lavagem das células num microtubo contendo 1 mL de tampão SET (150 mM NaCl, 15 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl; pH 8,0). De seguida, centrifugou-se a suspensão celular, a 7000 x g (centrífuga Eppendorf 5415D) durante 5 minutos. Para lisar as células, o sedimento celular foi ressuspensado em 570 µL de tampão SET, adicionando-se 29 µL de uma solução de SDS 10% (m/v) (Sigma) e 3 µL de proteinase K (20 mg/mL) (SIGMA). A suspensão celular foi levada ao vortex (Heidolph, REAX 2000), para breve agitação, e de seguida incubada em banho-maria a 50±1°C durante 1 hora. Para a remoção de proteínas,

adicionou-se 550  $\mu\text{L}$  de uma solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico [(25:24:1) saturada com 10 mM de Tris (pH 8,0) e 1 mM de EDTA] (SIGMA), agitou-se brevemente no vortex (5 a 10 segundos), seguindo-se uma centrifugação a 12000 x g, durante 8 minutos, para separação de fases. O sobrenadante (cerca de 500  $\mu\text{L}$ ) foi transferido para um novo microtubo, ao qual se adicionou 550  $\mu\text{L}$  da solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico. A mistura resultante foi agitada antes de se proceder à sua centrifugação nas condições anteriores e o sobrenadante recuperado para novo tubo. De forma a precipitar e recolher o DNA extraído das células, adicionou-se ao sobrenadante 40  $\mu\text{L}$  de acetato de sódio (3M; pH 5,3) e 800  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto (Merck) e incubou-se durante a noite a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Foi efectuada uma centrifugação a 12000 x g durante 10 minutos, a fim de sedimentar o DNA no fundo do tubo. O sobrenadante foi removido cuidadosamente, com seringa, tendo-se procedido à lavagem do sedimento com etanol a 75% (v/v) e repetido a centrifugação nas mesmas condições. Procedeu-se a um primeiro passo de evaporação do etanol por exposição dos tubos abertos à temperatura ambiente, durante cerca de 1 hora, sendo de seguida efectuada secagem sob vácuo (DNA Speed Vac DNA110, Savant) durante 10 minutos. Após a secagem, o DNA foi ressuspensão em 50  $\mu\text{L}$  de água bidestilada MilliQ (Milli-Q plus, Millipore) autoclavada. Para remoção do RNA, adicionou-se às soluções de DNA 1  $\mu\text{L}$  de RNase (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e incubou-se a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora, seguindo-se o armazenamento a  $-20^{\circ}\text{C}$ , até posterior utilização.

A concentração do DNA foi estimada por medição da absorvância a 260 nm num espectrofotómetro (GeneQuantPro, Pharmacia), tendo em consideração que a cada unidade de absorvância correspondem 50  $\mu\text{g}$  de DNA. O grau de pureza da solução de DNA foi calculado com base na razão  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ , considerando-se com grau de pureza aceitável as soluções que apresentavam razões compreendidas entre 1,8 e 2,0.

Para verificar a integridade do DNA extraído, foi realizada electroforese (95 Volt, 60 minutos), em gel de agarose (Seakem LE Agarose Lonza) 1% (m/v), preparado a partir de tampão TBE 1x (TBE 5x: 0,89 M de Tris Base; 0,89 M de ácido bórico; 0,5 M de EDTA, pH 8.0).

#### **2.4.2. Extracção por fervura**

Dependendo do seu tamanho, 2 a 4 colónias foram recolhidas da placa de *Columbia Blood Agar Base* (consultar secção 2.3.1.) e suspensas em 100  $\mu\text{L}$  de tampão TE (10mM Tris; 1mM EDTA, pH 8,0) em microtubos estéreis. As suspensões celulares foram colocadas em banho-maria a  $95\pm 1^{\circ}\text{C}$ , durante cerca de 15 minutos. De seguida, efectuou-se uma centrifugação (Scan Speed, LaboGene) a 14000 x g, durante 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para novo tubo estéril.

A verificação da integridade do DNA extraído através desta metodologia foi efectuada como anteriormente descrito (secção 2.4.1.). As soluções de DNA foram armazenadas a -20°C até posterior utilização.

### **2.4.3. Extracção com sistema comercial**

Foram utilizados 2 sistemas comerciais de extracção de DNA – o *High Pure PCR Template Preparation* da Roche e o *Puregene core kit B* da Quiagen, seguindo as instruções dos fabricantes respectivos.

#### **2.4.3.1. Extracção de DNA por recurso ao sistema *High Pure PCR Template Preparation* da Roche**

A extracção de DNA com este sistema comercial foi efectuada de acordo com as instruções do fabricante, seguindo o protocolo de extracção de ácidos nucleicos descrito para bactérias e leveduras. Adicionou-se a um microtubo de 1,5 mL estéril, 200 µL de tampão PBS 1x (PBS 10x: 80 g/L NaCl; 2 g/L KCl; 14,4 g/L de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 2,4 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), no qual se suspenderam células recolhidas de colónias isoladas (2 a 6 colónias, dependendo do tamanho) crescidas em meio sólido (consultar secção 2.3.1.). De seguida, efectuou-se uma centrifugação (centrífuga ScanSpeed 1730R, LaboGene) da suspensão celular, a 3000 x g durante 5 minutos, tendo o sobrenadante sido descartado e o sedimento celular novamente ressuspensão em 200 µL de tampão PBS 1x. Adicionou-se 5 µL de uma solução de lisozima (10 mg/mL) (Roche) e incubou-se durante 15 minutos em banho-maria a 37±1°C. Após o período de incubação, adicionou-se 200 µL de tampão de ligação e 40 µL de proteinase K (reconstituída de acordo com as instruções do fabricante), ambos fornecidos pelo sistema comercial. A solução foi misturada, imediatamente, por recurso ao vortex e incubada durante 10 minutos, num banho-maria a 70±1°C. Após incubação, adicionou-se 100 µL de isopropanol e agitou-se novamente. Por cada reacção de extracção, inseriu-se uma coluna com filtro num tubo de recolha (existentes no sistema comercial), pipetou-se a amostra para o interior da coluna e procedeu-se a uma centrifugação (centrífuga ScanSpeed 1730R, LaboGene) de 1 minuto a 8000 x g. Após centrifugação, removeu-se a coluna do tubo de recolha, descartando-se este último com o líquido recolhido. A coluna foi então introduzida num novo tubo de recolha, adicionando-se 500 µL de tampão para remoção de inibidores ao reservatório da coluna. Centrifugou-se a 8000 x g durante 1 minuto, sendo o tubo de recolha novamente descartado. À coluna combinada com novo tubo de recolha, adicionou-se 500 µL do tampão de lavagem, procedendo-se novamente a centrifugação (centrífuga ScanSpeed 1730R, LaboGene) durante 1

minuto a 8000 x g. Desprezou-se o líquido recolhido no tubo de recolha e realizou-se uma centrifugação adicional de 30 segundos à velocidade máxima, de modo a assegurar-se a remoção de resíduos do tampão de lavagem. Para eluir o DNA, inseriu-se a coluna num microtubo estéril, adicionando-se 200 µL do tampão de eluição pré-aquecido (banho-maria a  $70\pm 1^\circ\text{C}$ ) à coluna e centrifugando-se o conjunto (coluna/tubo de recolha) durante 1 minuto a 8000 x g.

Após remoção do RNA residual nas condições anteriormente descritas (secção 2.4.1.), as soluções de DNA foram armazenadas a  $-20^\circ\text{C}$ , até posterior utilização.

#### **2.4.3.2. Extracção de DNA por recurso ao sistema *Gentra Puregene Yeast/Bact* da Quiagen**

A extracção de DNA por recurso a este sistema comercial foi efectuada de acordo com as instruções do fabricante, seguindo o protocolo descrito para a purificação de DNA a partir de uma suspensão de bactérias de Gram negativo. Recolheram-se colónias (2 a 6 colónias, dependendo do tamanho) crescidas em meio sólido (consultar secção 2.3.1.) para um microtubo estéril contendo 500 µL de tampão PBS 1x. De seguida, efectuou-se uma centrifugação (centrífuga ScanSpeed 1780R, LaboGene) a 16000 x g durante 5 segundos, para obter um sedimento celular. O sobrenadante foi removido cuidadosamente com o auxílio de uma pipeta, ressuspendendo-se as células em 500 µL da solução de lise celular fornecida pelo sistema. A suspensão celular foi incubada em banho-maria a  $80\pm 1^\circ\text{C}$  durante 5 minutos para a lise. Seguiu-se a adição de 1,5 µL da solução de RNase A (existente no sistema comercial), misturando-se por inversão cerca de 25 vezes, e incubando-se durante 60 minutos, numa estufa a  $37\pm 1^\circ\text{C}$ . Seguidamente, arrefeceu-se rapidamente a amostra em gelo durante 1 minuto. De seguida, adicionou-se 100 µL da solução de precipitação de proteínas e agitou-se, vigorosamente, no vortex durante 20 segundos. Procedeu-se a nova centrifugação (centrífuga ScanSpeed 1780R, LaboGene) durante 3 minutos, a 16000 x g, seguindo-se a remoção do sobrenadante para um novo microtubo estéril com o auxílio de uma pipeta. Adicionou-se, então, 300 µL de isopropanol, misturando-se suavemente, por inversão, cerca de 50 vezes e centrifugando-se a 16000 x g durante 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e os tubos (1 tubo por reacção de extracção) invertidos sobre papel absorvente limpo, de modo a facilitar a remoção do restante líquido. Adicionou-se, depois, a cada tubo 300 µL de etanol 70% (v/v), invertendo-se os mesmos várias vezes para lavar o DNA. Centrifugou-se novamente a 16000 x g durante 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e os tubos invertidos sobre papel absorvente limpo, durante cerca de 15 minutos para secagem. Adicionou-se 50 µL da solução de hidratação fornecida pelo sistema comercial e misturou-se no vortex durante 5 segundos a média velocidade. Esta solução foi depois incubada num banho-maria a  $65\pm 1^\circ\text{C}$  durante 1 hora

para dissolver o DNA. Por fim, por indicação do fabricante, incubou-se durante a noite a solução de DNA à temperatura ambiente com agitação suave (Heidolph, Titra Max 100).

## 2.5. Genotipagem dos isolados

Dos 353 isolados obtidos durante o estudo nacional de prevalência de *Campylobacter* spp. em cecos de frangos, seleccionaram-se aleatoriamente 200 (129 pertencentes à espécie *Campylobacter coli* e 71 pertencentes à espécie *Campylobacter jejuni*) para genotipagem.

### 2.5.1. Genotipagem dos isolados baseada na análise dos polimorfismos dos fragmentos de restrição do gene *flaA* (*flaA*-RFLP)

A genotipagem dos isolados de *C. jejuni* e *C. coli* baseada na análise dos polimorfismos dos fragmentos de restrição do gene *flaA* foi realizada de acordo com o protocolo indicado no sítio da rede Campynet (consultado a 8 de Outubro de 2010), o qual se baseia nos estudos de Nachamkin *et al.* (1993b, 1996) e que está disponível em <http://campynet.vetinst.dk/Fla.htm>. Resumidamente, o método consiste em identificar os polimorfismos do gene *flaA* através da sua amplificação por PCR e posterior restrição com uma endonuclease, seguindo-se a análise dos perfis resultantes. Para se aumentar o poder discriminatório da técnica, efectuaram-se duas análises independentes dos polimorfismos do referido gene recorrendo à sua restrição com duas endonucleases diferentes.

#### 2.5.1.1. Reacção de polimerização em cadeia para a amplificação do gene *flaA*

Foram realizadas diluições 1:10 dos *stocks* de DNA, correspondendo a uma concentração aproximada de 30 ng/μL, que foram utilizadas como DNA molde em reacções de PCR de 50 μL. Cada reacção continha 5 μL da solução de DNA; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Promega); 0,2 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP; Promega); 0,05 U/μL da enzima Taq polimerase (Promega); 1 x *Green GoTaq Flexi Buffer* (Promega); 1 μM ou 2 μM de cada um dos oligonucleótidos iniciadores, cuja sequência está publicada no estudo de Nachamkin *et al.* (1993b) (*Foward - flaA1*: 5' GGA TTT CGT ATT AAC ACA AAT GGT GC; *Reverse - flaA2*: 5' CTG TAG TAA TCT TAA AAC ATT TTG). As reacções decorreram num termociclador (MJ Mini, BioRad), usando os seguintes parâmetros: 94°C durante 1 minuto para a desnaturação inicial das cadeias de DNA molde, seguida de 35 ciclos constituídos, cada um, por um passo de desnaturação a 94°C durante 15 segundos, hibridação a 50°C durante 45 segundos, extensão a 72°C durante 1 minuto e 45 segundos. Em casos raros, foi necessário baixar a temperatura de hibridação para 45°C para se obter amplificação. Seguiu-se um passo de extensão final a 72°C

durante 5 minutos. Os produtos de PCR foram armazenados a 4°C/-20°C até posterior utilização.

### 2.5.1.2. Detecção dos produtos de amplificação do gene *flaA*

Para a detecção dos produtos de amplificação do gene *flaA* foi realizada electroforese (90 Volt, 1h30) em gel de agarose (Seakem LE Agarose, Lonza) 1,5% (m/v), preparado a partir de tampão TBE 1x, ao qual se adicionou brometo de etídio (0,3 µg/mL) para a visualização dos fragmentos num transiluminador (Bio Doc-it™ Imaging System - Cambridge, UK). De forma a confirmar a especificidade da reacção de polimerização em cadeia do gene *flaA* e a identificar-se o limite de detecção da reacção, seleccionaram-se as soluções de DNA de dois dos isolados estudados (LNIV123 e LNIV167) (Tabela 2.1) e os respectivos produtos de amplificação do gene em estudo por PCR, e prepararam-se diluições seriadas em água destilada num factor de 1:10, no caso das soluções de DNA. No caso dos produtos de amplificação do gene *flaA*, efectuaram-se diluições 1:10, 1:50 e 1:100. Seguiu-se a electroforese em gel de agarose 1,5% (m/v). Este procedimento permitiu verificar se a banda de grande intensidade que surge na posição dos 1700 pb corresponde de facto à amplificação de um único gene, neste caso o gene *flaA*. Usou-se como padrão de massas moleculares o marcador HyperLadder III (Bioline).

### 2.5.1.3. Sequenciação dos produtos de amplificação do gene *flaA*

Seleccionaram-se dois dos isolados em estudo (LNIV224 e LNIV230) para a sequenciação dos produtos de amplificação. Esta etapa foi realizada com recursos existentes na *Unidade de Ecofisiologia e Melhoramento de Plantas do Instituto Nacional de Investigação Agrária* (INRB-INIA). A reacção de sequenciação foi realizada por recurso a um sistema comercial de sequenciação da Applied Biosystems (*BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*). Esta reacção, com um volume total de 5 µL, foi preparada em tubo de 200 µL, adicionando-se 1 µL de uma solução diluída de cada oligonucleotídeo iniciador (*flaA1/flaA2*) com uma concentração de 1,6 pmol/µL, 2 µL de DNA (cerca de 100 ng) e 2 µL de solução de reacção (fornecida no kit) diluída (1 µL de solução + 0,5µL de H<sub>2</sub>O + 0,5 µL de tampão de reacção fornecido pelo kit). Foi utilizado um programa de PCR segundo o protocolo do sistema comercial, sendo a amostra desnaturada durante 2 minutos a 95°C. A electroforese capilar foi realizada num sequenciador automático da *Applied Biosystems* (modelo 3130), utilizando-se um capilar curto (36 cm) com a capacidade de leitura de até 450 pb. Para a análise do electroferograma recorreu-se ao *software* da *ABI Sequence Scanner* (v 1.0).

Recorreu-se a uma ferramenta bioinformática de alinhamento de sequências nucleotídicas (BLAST, disponível em: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), de forma a

comparar-se as sequências obtidas com sequências nucleotídicas depositadas na base de dados (*Nucleotide collection*) do NCBI.

#### **2.5.1.4. Recuperação de fragmentos de DNA de um gel de agarose**

Em alguns casos, em que se verificou, após electroforese, a presença de produtos não específicos resultantes da reacção de PCR para amplificação do gene *flaA*, teve que se proceder à recuperação da banda do gel correspondente ao gene *flaA* (fragmentos com massa molecular de, aproximadamente, 1,7 kb). Para esse fim, recorreu-se à utilização de 2 sistemas comerciais (*GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* - Amersham Biosciences; *illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit* – GE Healthcare).

Após realização da electroforese e visualização da banda de interesse no transiluminador, procedeu-se à sua remoção do gel de agarose com o auxílio de um bisturi estéril e transferiu-se para um microtubo.

##### **2.5.1.4.1. Recuperação de DNA a partir de bandas do gel por recurso ao sistema comercial *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* da Amersham Biosciences**

Quando se recorreu ao sistema comercial da Amersham Biosciences, adicionou-se ao tubo, contendo o pedaço de agarose, 300 µL de tampão de captura. Fechou-se o tubo e agitou-se vigorosamente no vortex, seguindo-se um período de incubação de cerca de 15-20 minutos em banho-maria, a 60±1°C, até a agarose se dissolver completamente. Durante esse período, colocou-se uma coluna GFX num tubo de recolha. Após a solubilização da agarose, realizou-se uma centrifugação breve (*spin*) (centrífuga Scan Speed 1730R, LaboGene), de modo a recolher a amostra no fundo do tubo. A amostra foi transferida para a coluna GFX e incubou-se à temperatura ambiente, durante 1 minuto, antes de se centrifugar à velocidade máxima, durante 30 segundos. De seguida, descartou-se o líquido do tubo de recolha e voltou-se a colocar a coluna GFX no seu interior, adicionando-se 500 µL de tampão de lavagem à coluna. Voltou a realizar-se uma centrifugação (centrífuga Scan Speed 1730R, LaboGene) à velocidade máxima, durante 30 segundos, tendo-se a seguir colocado a coluna GFX no interior de um microtubo estéril. Por fim, adicionou-se entre 30 a 50 µL de água bidestilada MilliQ (Milli-Q plus, Millipore), esterilizada em autoclave, directamente na matriz de fibra de vidro da coluna GFX, incubando-se à temperatura ambiente durante 1 minuto. Após esse período, centrifugou-se à velocidade máxima durante 1 minuto para recolher o DNA. O DNA recolhido foi armazenado a -20°C até posterior utilização.

#### **2.5.1.4.2. Recuperação de DNA a partir de bandas do gel por recurso ao sistema comercial *illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* da GE Healthcare**

De acordo com o protocolo para purificação de DNA a partir de géis de agarose preparados com TBE ou TAE, adicionou-se 500 µL do tampão de captura a cada tubo contendo o pedaço de agarose excisado do gel, misturando-se por inversão e incubando-se os tubos num banho-maria a  $60\pm 1^\circ\text{C}$ , durante 15 a 30 minutos (a cada 3 minutos os tubos foram agitados por inversão). Quando a agarose solubilizou por completo, confirmou-se que todas as soluções tinham uma cor amarela, de acordo com as indicações do fornecedor. Para cada reacção de purificação, colocou-se uma coluna GFX MicroSpin dentro de um tubo de recolha. As soluções de cor amarela foram centrifugadas brevemente (centrífuga Scan Speed 1730R, LaboGene), de modo a recolher o líquido no fundo do tubo, transferindo-se até 800 µL de cada solução para a coluna respectiva e incubando-se à temperatura ambiente durante 1 minuto. Cada conjunto coluna/tubo de recolha foi submetido a centrifugação a  $16000 \times g$  durante 30 segundos. O líquido recolhido foi descartado e a coluna colocada novamente no interior do tubo de recolha. De seguida, adicionou-se 500 µL do tampão de lavagem à coluna e realizou-se nova centrifugação a  $16000 \times g$  durante 30 segundos. Repetiu-se o passo de lavagem, descartando-se o líquido recolhido. Procedeu-se a uma centrifugação adicional de 30 segundos a  $16000 \times g$ , de modo a remover resíduos da solução de lavagem da coluna GFX. O tubo de recolha foi depois descartado e a coluna transferida para um microtubo estéril. Para eluir o DNA, adicionou-se no centro da membrana da coluna 30 a 50 µL de água estéril livre de nucleases (*Elution buffer type 6* existente no kit). Incubou-se à temperatura ambiente durante 1 minuto, procedendo-se de seguida a uma centrifugação a  $16000 \times g$  durante 1 minuto para recolher o DNA purificado. O DNA foi armazenado a  $-20^\circ\text{C}$  até ser necessário.

#### **2.5.1.5. Restrição dos produtos de amplificação do gene *flaA***

Os produtos de PCR com tamanho correspondente ao fragmento do gene *flaA* amplificado ( $\approx 1,7$  kb) (verificado em gel de agarose) foram sujeitos, separadamente, a restrição com as enzimas *Ddel* (Promega) (0,1-0,2 U/µl) e *Hinfl* (0,1 U/µl) (Promega). Cada reacção (30 µL) continha a enzima na concentração indicada, o respectivo tampão 1x fornecido pelo fabricante da enzima (*Ddel – Buffer D*, *Hinfl – Buffer B*; Promega), albumina sérica bovina-BSA (Promega) numa concentração final de 0,1 mg/mL, 5 a 10 µL do produto de PCR (consoante a sua concentração, estimada de acordo com a intensidade da banda no gel de agarose) e água bidestilada esterilizada para perfazer o volume de reacção. As reacções foram incubadas a  $37\pm 1^\circ\text{C}$  (banho-maria ou estufa), durante 3h00 ou durante a noite. Os produtos das reacções de restrição foram visualizados em géis de agarose 2% (m/v), sendo a separação

electroforética realizada entre 75 e 90 Volt durante 2 h e 30 minutos ou 3 h. Usou-se como padrão de massas moleculares os marcadores BenchTop 100 bp DNA Ladder (Promega) e 50 bp DNA Step Ladder (Promega).

#### 2.5.1.6. Análise dos perfis *flaA*-RFLP obtidos

A análise dos perfis obtidos após a restrição do gene *flaA* com uma das duas endonucleases testadas e electroforese em gel de agarose foi realizada visualmente, com o auxílio do *software* GelCompar II v 3.50 da Applied Maths (Bélgica). Todos os perfis foram normalizados de acordo com o mesmo sistema de referência (BenchTop 100 bp DNA Ladder, Promega). A comparação dos perfis obtidos com a mesma enzima de restrição deu origem a uma matriz binária do tipo 0/1, em que 0 corresponde à ausência de banda e 1 corresponde à presença de banda numa mesma posição. A partir da matriz de dados binários foi gerada uma matriz triangular de similaridades, por recurso ao coeficiente de similaridade de Dice [ $D(i_1, i_2) = 2a/(2a+b+c)$ ] muitas vezes referido como a medida de similaridade genética de Nei & Li (Kosman & Leonard, 2005). Na fórmula referida,  $i_1$  e  $i_2$  correspondem ao perfil de restrição dos isolados 1 e 2 respectivamente; (a) corresponde ao número de posições com bandas partilhadas para ambos os perfis (os “1” da matriz binária); (b) corresponde às posições em que o perfil 1 possui banda e o perfil 2 não; (c) representa a situação inversa em que o perfil 2 possui banda e o perfil 1 não possui banda. A matriz resultante deste cálculo foi utilizada para gerar os dendogramas com base no método UPGMA (*Unweighted-Pair Group Method using Arithmetic Averages*).

#### 2.5.1.7. Análise do poder discriminatório da técnica *flaA*-RFLP

O poder discriminatório da técnica foi calculado com base na fórmula proposta por Hunter (Hunter, 1990):

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s x_j(x_j - 1)$$

Nesta fórmula, correspondente ao índice de diversidade de Simpson, N corresponde ao número de estirpes testadas não relacionadas, s corresponde ao número de diferentes tipos (neste estudo, padrões de restrição) encontrados e  $x_j$  corresponde ao número de estirpes pertencentes ao padrão de restrição  $j_n$ . Um valor de  $D=1$  indica que o método de tipagem teve a capacidade de distinguir cada membro da população analisada de todos os outros membros dessa população. Um valor de  $D=0$  indica que todos os membros da população analisada pertencem ao mesmo tipo (mesmo padrão de restrição). Este parâmetro foi calculado por

recurso a uma ferramenta bioinformática que se encontra disponível no sítio [http://insilico.ehu.es/mini\\_tools/discriminatory\\_power/](http://insilico.ehu.es/mini_tools/discriminatory_power/), consultado a 18 de Junho de 2011.

## **2.5.2. Análise dos polimorfismos dos macrofragmentos de restrição separados por electroforese de campo pulsado**

Para a obtenção de uma caracterização genotípica mais discriminatória do grupo de isolados seleccionados para os ensaios de biofilmes (secção 2.6.) procedeu-se à análise dos polimorfismos dos macrofragmentos de restrição do DNA total de cada isolado separados por electroforese de campo pulsado (PFGE). Para a execução deste método, recorreu-se ao protocolo descrito pela rede de laboratórios Campynet, disponível no sítio <http://campynet.vetinst.dk/PFGE.html> e que foi consultado a 23 de Novembro de 2010. Resumidamente, este método consiste em imobilizar as células numa matriz de agarose de baixo ponto de fusão, a fim de se minimizarem as quebras mecânicas de DNA, seguindo-se a lise celular por métodos enzimáticos e químicos. Procedeu-se, então, à restrição do DNA com uma endonuclease que reconhece sequências raras e electroforese por campo pulsado (dada a elevada dimensão dos fragmentos obtidos) em agarose apropriada para o efeito.

### **2.5.2.1. Preparação do DNA total**

Inicialmente, recolheu-se 1 mL das células crescidas em meio *Mueller-Hinton Broth* - MHB (culturas crescidas *overnight*, a  $41\pm 1^\circ\text{C}$  em microaerofília), para um microtubo estéril, seguindo-se uma centrifugação (centrífuga eppendorf 5415D) a  $5000 \times g$  durante 2 minutos. Descartou-se o sobrenadante e repetiu-se o processo de modo a aumentar a quantidade de células recolhidas. Colocou-se o tubo com o sedimento celular em gelo e adicionou-se 300  $\mu\text{L}$  de tampão Pett IV (1M NaCl, 10 mM Tris, pH 8, 10 mM EDTA) acabado de retirar do frigorífico a  $4^\circ\text{C}$ . À suspensão celular, adicionou-se 700  $\mu\text{L}$  de agarose (*Certified™ Low Melt Agarose*, BioRad). Dispensou-se a mistura correspondente a cada isolado em 4 poços do molde utilizado para a preparação dos blocos de agarose (DRII Sample Mold, BioRad) e colocaram-se os moldes a  $4^\circ\text{C}$  durante cerca de 10 minutos. Os blocos de agarose foram depois colocados em tubos de Falcon de 15 mL (1 tubo por isolado) com 5 mL de solução de lise EC [1M NaCl, 100 mM EDTA, 6mM TrisHcl (autoclavar) e só depois adicionar 0,5% (m/v) Brij-58, 0,2% (m/v) desoxicolato de sódio e 0,5% (m/v) de sal sódico de N-laurilsarcosina; pH 7,6], à qual se adicionou 50  $\mu\text{L}$  de lisozima (100 mg/mL) (Roche) e 1,25  $\mu\text{L}$  de RNase (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Boehringer Mannheim). Os tubos foram incubados em banho-maria (Infors AG CH-4103 Bottmingen) a  $37\pm 1^\circ\text{C}$  com agitação (aproximadamente 60 rpm), durante a noite. No dia seguinte, fez-se a

decantação da solução de lise e pipetou-se para cada tubo 5 mL de tampão ESP (0,5 M EDTA, 1% sal sódico de N-laurilsarcosina), ao qual se adicionou 50 µL de proteinase K (100 mg/mL). Os tubos foram novamente incubados em banho-maria a  $56\pm 1^{\circ}\text{C}$  com agitação (aproximadamente 60 rpm), durante a noite. Depois de descartar-se o tampão ESP, repetiu-se a incubação nas mesmas condições com tampão ESP fresco. O tampão ESP foi novamente decantado, procedendo-se a uma série de seis lavagens dos blocos de agarose com tampão TE pH 8,0 (10mM Tris, 1mM EDTA). Os tubos foram colocados numa plataforma de balanço (Biometra WT16), no qual ficaram durante, pelo menos, 20 minutos em cada lavagem. Após as lavagens, os blocos de agarose foram colocados em 5 mL de tampão TE e armazenados a  $4^{\circ}\text{C}$  até à digestão enzimática.

#### 2.5.2.2. Restrição do DNA total

Para a digestão enzimática do DNA total dos isolados de *Campylobacter*, recorreu-se à enzima de restrição *Sma*I (Promega). Cortou-se, com o auxílio de uma lâmina, um pedaço do bloco de agarose com aproximadamente 1 milímetro, colocando-o num microtubo estéril e adicionando-se o tampão da enzima [10 µL de tampão J (Promega) + 89 µL de H<sub>2</sub>O bidestilada esterilizada + 1 µL de BSA (Promega) (10 mg/mL)]. Incubaram-se os tubos em banho-maria a  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , durante a noite. No dia seguinte, removeu-se o tampão de pré-incubação com uma pipeta e adicionou-se a solução de restrição (1 µL de *Sma*I + 10 µL de tampão J + 88 µL de H<sub>2</sub>O bidestilada esterilizada + 1 µL de BSA (10 mg/mL)). Repetiu-se o período de incubação a  $25^{\circ}\text{C}$ , durante a noite.

#### 2.5.2.3. Separação dos fragmentos de restrição por electroforese de campo pulsado

Para a separação dos fragmentos de restrição, realizou-se electroforese em campo pulsado. Prepararam-se géis 1,4% (m/v) com tampão TBE 0,5x, tendo a electroforese sido realizada numa das seguintes condições, uma vez que houve necessidade de se ajustar e otimizar as condições de corrida ao aparelho disponível (CHEF-DRII, BioRad):

- 1 - *Switch time*: 0,5 s - 40 s; Tempo de migração: 22,5 horas; Voltagem: 6 Volt/cm
- 2 - *Switch time*: 0,5 s - 30 s; Tempo de migração: 12 horas; Voltagem: 6 Volt/cm (1º bloco) /  
*Switch time*: 30 s - 40 s; Tempo de migração: 12 horas; Voltagem: 6 Volt/cm (2º bloco)
- 3 - *Switch time*: 0,5 s - 80 s; Tempo de migração: 24 horas; Voltagem: 6 V/cm

Após a corrida electroforética, os géis foram submersos num recipiente contendo TBE 0,5x e brometo de etídio (0,3 µg/mL) para permitir a visualização das bandas no transiluminador.

## 2.6. Caracterização de isolados de *C. jejuni* e *C. coli* quanto à sua capacidade de formação de biofilmes em superfícies abióticas

De forma a aferir as condições que propiciam a formação de biofilmes por isolados de campo de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* e a identificar-se isolados com capacidade acrescida/diminuída de formação de biofilmes *in vitro*, seleccionou-se um subgrupo de 9 isolados (LNIV19, LNIV52, LNIV55, LNIV63, LNIV70, LNIV76, LNIV78, LNIV104, LNIV216) de entre os isolados genotipados. Essa selecção foi efectuada tendo em consideração a espécie, os génotipos *flaA*-RFLP mais frequentes bem como o fenótipo de susceptibilidade dos isolados aos antibióticos eritromicina e ciprofloxacina, o qual se encontrava previamente caracterizado no Laboratório no âmbito de outro estudo e de acordo com a metodologia descrita pelo CLSI [*The Clinical Laboratory Standard Institute M31-A3 Vol.28 Nº8 (2008)*] (Tabela 2.2). As estirpes de referência *C. jejuni* subsp. *jejuni* ATCC 33560 e *C. coli* CCUG 11283, foram, também utilizadas neste estudo.

**Tabela 2.2** – Susceptibilidade à ciprofloxacina e eritromicina do subgrupo de isolados seleccionados para os ensaios de formação de biofilmes.

Isolado	Antibiótico	
	Ciprofloxacina	Eritromicina
LNIV19	Sensível	Sensível
LNIV52	Resistente	Resistente
LNIV55	Resistente	Resistente
LNIV63	Resistente	Resistente
LNIV70	Sensível	Sensível
LNIV76	Resistente	Resistente
LNIV78	Resistente	Sensível
LNIV104	Resistente	Sensível
LNIV216	Resistente	Resistente

### 2.6.1. Ensaios preliminares para selecção das condições que promovem o crescimento em biofilme de *C. jejuni* e *C. coli*

De modo a apurar as condições experimentais que favorecem o crescimento de biofilmes *in vitro*, os isolados seleccionados foram submetidos inicialmente a diferentes condições de crescimento. Foram analisadas as seguintes variáveis: tipo de superfície abiótica

(microplaca de poliestireno, lâmina de vidro ou lâmina de aço inoxidável), condições nutricionais, temperatura, condições atmosféricas, período de incubação, e agitação.

#### **2.6.1.1. Estudo do efeito do meio de cultura**

Para estudar o efeito dos nutrientes, variou-se a composição do meio de cultura, tendo-se testado os seguintes meios: *Trypticase Soya Broth* – TSB, *Mueller-Hinton Broth* - MHB, *Brucella Broth* - BB, *Bacto Heart Infusion Broth* – BHI e *Luria-Bertani Broth* – LB

#### **2.6.1.2. Estudo do efeito da temperatura**

Os ensaios foram realizados a uma das seguintes temperaturas: 6°C, 37°C, 42°C e à temperatura ambiente (não monitorizada).

#### **2.6.1.3. Estudo do efeito da atmosfera**

Para avaliação do efeito da atmosfera, foram testadas condições de microaerofília (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>) e aerobiose.

#### **2.6.1.4. Estudo do efeito do período de incubação**

O período de incubação teve a duração de 24 h, 62 h, 72 h, 120 h ou 135 h.

#### **2.6.1.5. Estudo do efeito da agitação**

As microplacas de poliestireno foram colocadas a incubar em estufa (Memmert BE 500 ou Memmert BE 700) sem agitação ou com agitação (velocidade de aproximadamente 40 rpm) num agitador orbital de microplacas (Insel Hamble SO3 8DH England).

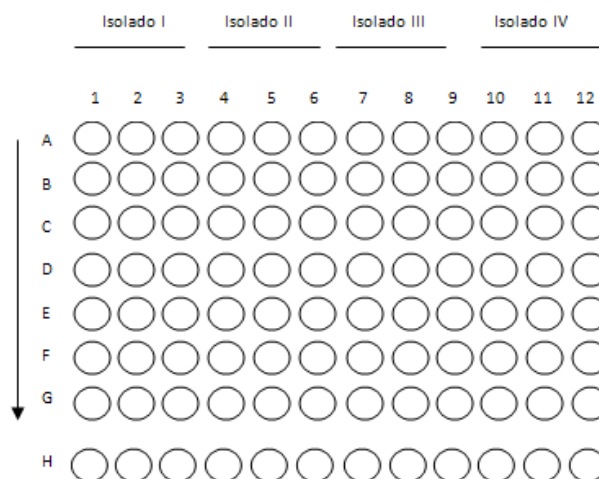
#### **2.6.1.6. Preparação dos ensaios em diferentes superfícies**

Após o crescimento dos isolados em placas com meio *Columbia Blood Agar Base* (Oxoid) suplementado com 5% de sangue de carneiro, nas condições já descritas (secção 2.3.1.), fez-se a passagem de 2 a 4 colónias (dependendo do tamanho) de cada isolado para tubos de ensaio estéreis com 5 mL do meio de cultura testado. Os tubos foram incubados entre 24 a 48 h em condições de microaerofília (GEN box, bioMérieux), a 41±1°C.

##### **2.6.1.6.1. Microplacas de poliestireno**

No caso dos ensaios em que se utilizaram microplacas de poliestireno, pipetou-se 1 mL do pré-inóculo para tubos com 5 mL do meio de cultura testado e, de seguida, fez-se a

passagem de 200  $\mu$ L da suspensão celular para os poços da microplaca (BRAND plates, BrandTech Scientific, Inc) (7 poços por meio, por isolado) usando-se como controlo negativo 200  $\mu$ L de meio fresco não inoculado (Fig. 2.2). Cada microplaca foi depois incubada, de acordo com as diferentes condições anteriormente mencionadas.



**Figura 2.2** - Diagrama esquemático representativo do procedimento de inoculação das microplacas de poliestireno nos ensaios de formação de biofilmes. Por cada placa são utilizados, no máximo, 4 isolados (I, II, III, IV) inoculados em diferentes meios de cultura (3 meios diferentes). Os inóculos são realizados no sentido da seta, sendo que para cada meio testado existe um total de 7 poços inoculados. O último poço (H) é preenchido com igual volume de meio fresco não inoculado e funciona como o controlo negativo da experiência.

#### 2.6.1.6.2. Lâminas de vidro e aço inoxidável

No que diz respeito à preparação dos ensaios em que se utilizaram lâminas de vidro e aço inoxidável, utilizaram-se tubos de Falcon com 50 mL do meio de cultura testado, cada um contendo a superfície analisada [neste caso as superfícies tinham dimensões diferentes; lâminas de vidro (7,5 cm x 2,5 cm; VWR, ECN 631-1550) e lâminas de aço inoxidável (4,5 cm x 2,5 cm)]. Pipetou-se, a partir do pré-inóculo um volume determinado de modo que a suspensão celular final ficasse diluída com um factor de 200.

A preparação das lâminas de vidro e de aço inoxidável foi efectuada de acordo com o que já havia sido descrito por Gunther & Chen (2009): numa primeira etapa, as lâminas de vidro foram limpas com um spray desinfectante (Oxivir Spray, Johnson Diversey) e lavadas com água destilada, antes de serem lavadas por imersão em acetona (Merck). Após este processo, as lâminas foram deixadas a secar expostas ao ar e foram depois enroladas em papel de alumínio para serem esterilizadas por autoclave (120°C, 15 minutos). As lâminas de aço

inoxidável foram cortadas a partir de folhas de aço inoxidável AISI 304 ou 316, tendo a sua lavagem e esterilização sido efectuadas da mesma forma realizada para as lâminas de vidro.

Para a reutilização das superfícies em ensaios subsequentes, lavaram-se as lâminas de vidro e de aço inoxidável por submersão em lixívia pura, durante cerca de 40 minutos, tendo, de seguida, sido passadas para um recipiente com lixívia 7% (v/v), onde foram deixadas *overnight*. De seguida, efectuou-se o processo de lavagem e esterilização como descrito acima. Os tubos foram depois incubados, de acordo as diferentes condições anteriormente mencionadas.

A morfologia dos isolados formadores de biofilme foi observada directamente por recurso a um microscópio óptico (Olympus BX 40) nas ampliações de 40x e 100x.

### **2.6.1.7. Quantificação dos biofilmes formados**

#### **2.6.1.7.1. Quantificação dos biofilmes formados em microplaca de poliestireno**

Após o período de incubação, procedeu-se à remoção do meio de cultura e das células que não aderiram à superfície dos poços com uma pipeta multicanal. De seguida, procedeu-se à lavagem cuidadosa dos poços da microplaca com água destilada (2 a 3 vezes por pipetagem), e colocou-se a microplaca na estufa a 42°C, durante cerca de 15 minutos, antes de se proceder à coloração dos biofilmes. A coloração dos biofilmes (células aderentes) foi efectuada com uma solução de violeta de cristal 1% [1 g Violeta de Cristal (Merck) + 80 mL de H<sub>2</sub>O bidestilada + 20 mL de etanol absoluto (Merck)], pipetando-se 200 µL dessa solução para cada poço e deixando actuar durante cerca de 15 minutos. Após a coloração, efectuaram-se 3 lavagens dos poços com água destilada. A solubilização do corante associado às células aderentes foi feita por adição de 200 µL de etanol absoluto. O biofilme disperso foi então quantificado por medição da absorvância a 570 nm num leitor de microplacas (DYNEX Technologies – MRXII).

A extensão do biofilme formado foi determinada através da aplicação da seguinte fórmula:

$$A_{570(x)} = A_{570(xi)} - A_{570(x0)}$$

Em que a absorvância num determinado poço da microplaca ( $A_{570(x)}$ ) corresponde à absorvância a 570 nm da solução resultante da solubilização do violeta de cristal associado a células formadoras de biofilme ( $A_{570(xi)}$ ), subtraindo-se a absorvância a 570 nm resultante da solubilização do violeta de cristal associado à parede do poço controlo (meio de cultura não inoculado) ( $A_{570(x0)}$ ).

Tratando-se de uma abordagem inicial para selecção de condições experimentais os resultados apresentados resultam da média  $\pm$  erro padrão de valores obtidos numa

experiência independente. No caso das microplacas até 7 valores resultantes das leituras efectuadas nos 7 poços inoculados por isolado.

#### **2.6.1.7.2. Quantificação dos biofilmes formados em lâminas de vidro e aço inoxidável**

Após o período de incubação, o meio de cultura foi descartado e as lâminas de vidro/aço inoxidável foram observadas a olho nú para verificar a existência de biofilme macroscopicamente visível. As superfícies foram colocadas dentro de placas de petri de vidro, que depois foram introduzidas numa estufa a  $80\pm 1^\circ\text{C}$  durante 30 minutos, para fixar o biofilme. Depois de retiradas da estufa, as superfícies foram submersas em 15 mL de uma solução de violeta de cristal 1% (v/v) durante, pelo menos, 5 minutos. Após esta etapa, procedeu-se à lavagem das superfícies com água destilada. O violeta de cristal que ficou retido no biofilme foi solubilizado com 15 mL de etanol absoluto durante, pelo menos, 15 minutos. Pipetaram-se 2 mL da solução para 3 cuvetes descartáveis e efectuaram-se as leituras de absorvância a 595 nm num espectrofotómetro (GeneQuantPro, Pharmacia).

A extensão do biofilme formado foi determinada de acordo com a seguinte fórmula:

$$A_{595(x)} = A_{595(x1)} - A_{595(x0)}$$

Em que a absorvância efectiva da solução resultante da solubilização do biofilme formado ( $A_{595(x)}$ ) corresponde à absorvância a 595 nm dessa solução ( $A_{595(x1)}$ ), subtraindo-se a absorvância a 595 nm resultante da solubilização do violeta de cristal associado à superfície (vidro ou aço inoxidável) colocada no tubo controlo (meio de de cultura não inoculado) ( $A_{595(x0)}$ ).

Tal como anteriormente referido, por tratar-se de uma abordagem inicial para selecção de condições experimentais os resultados apresentados relativos às leituras de absorvância a 595 nm correspondem à média  $\pm$  erro padrão de valores obtidos apenas numa experiência independente, realizada em duplicado.

#### **2.6.2. Caracterização das curvas de crescimento e determinação da taxa específica máxima de crescimento**

Após a triagem inicial de várias condições experimentais foram seleccionados para estudos posteriores os isolados que revelaram ter maior capacidade de formação de biofilme. De modo a permitir uma melhor caracterização e comparação da sua capacidade de formação de biofilmes, esses isolados foram caracterizados no que diz respeito ao crescimento em descontínuo (*batch*) tendo-se realizado a mesma caracterização para as estirpes de referência.

Para o efeito, foram descongelados e crescidos em meio sólido, sendo de seguida preparados os pré-inóculos em meio líquido. Esta etapa de crescimento das culturas foi realizada de acordo com a metodologia anteriormente descrita (consultar secção 2.3.). Depois, procedeu-se à medição em espectrofotómetro (Evolution 300 UV-Vis, Thermo Scientific) da densidade óptica a 600 nm ( $A_{600nm}$ ) das culturas assim crescidas, tendo-se, para esse efeito utilizado 1 mL de cada pré-inóculo. Os inóculos foram preparados em frascos de cultura celular (25 cm<sup>3</sup> Nunclon *filter caps flasks*; Nunc) com 15 mL de meio *Mueller-Hinton Broth* - MHB. Para a preparação do inóculo, efectuou-se o cálculo do volume de pré-inóculo necessário para se obter uma  $A_{600nm}$  inicial de cerca de 0,01. Esse volume foi retirado para microtubos estéreis de 1,5-2,0 mL, tendo-se de seguida realizado uma centrifugação (centrífuga ScanSpeed 1730R, LaboGene) a 14000 x g, durante 5 minutos, de modo a depositar as células no fundo do tudo. De seguida, descartou-se o sobrenadante e resuspendeu-se o sedimento celular em 1 mL de meio de cultura fresco, transferindo-se para o frasco de cultura celular. Todas as manipulações envolvendo a transferência das culturas celulares foram efectuadas em condições de assépsia, numa câmara de fluxo laminar (Steril – CTH, Angelantoni Industrie).

O acompanhamento do crescimento dos isolados em meio líquido foi efectuado através de leituras periódicas da  $A_{600nm}$  até ao final do período de incubação (leituras efectuadas em T=5,0; 8,0; 19,0; 21,5; 24,0; 28,5; 42,0; 49,0 e 72,0 horas).

No caso de incubação em microaerofília, os geradores foram sempre substituídos de cada vez que se abriu a jarra de incubação para efectuar as medidas da absorvância.

Os resultados apresentados das leituras de  $A_{600nm}$  correspondem à média  $\pm$  erro padrão de duas experiências independentes.

As curvas de crescimento assim obtidas foram utilizadas no cálculo da taxa específica máxima de crescimento [ $\mu_c(h^{-1})$ ], efectuando-se a análise de regressão linear à zona linear da representação semi-logarítmica da  $A_{600nm}$  em função do tempo, com base na equação:

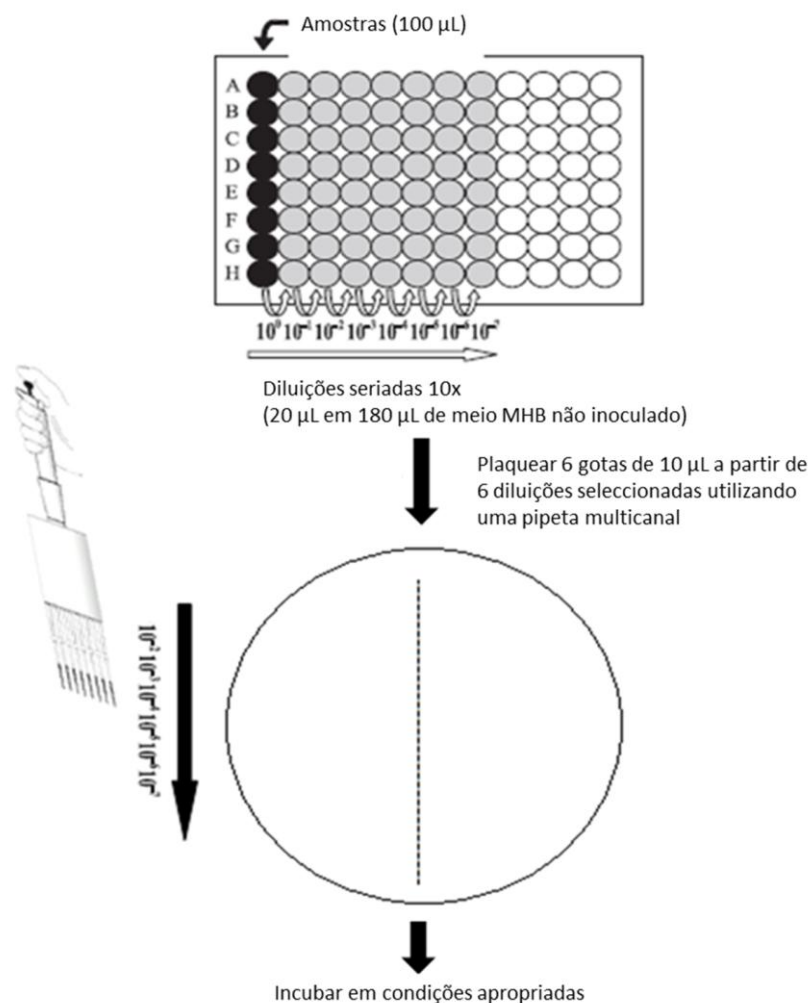
$$\ln DO_t = \ln DO_0 + \mu_c \cdot t$$

em que  $DO_t$  e  $DO_0$  correspondem à densidade óptica da suspensão celular, medida a 600 nm, no tempo t(h) e no início da fase exponencial do crescimento.

### 2.6.3. Determinação do número de Unidades Formadoras de Colónias (UFCs)

Durante a caracterização das curvas de crescimento dos isolados em estudo, procedeu-se simultaneamente à determinação do número de unidades formadoras de colónias, UFCs, às 24h e 49h do crescimento em meio líquido. Esta determinação foi efectuada

com base na metodologia “6x6 drop” descrita por Chen *et al.* (2003). Na figura 2.3 pode observar-se um diagrama esquemático do procedimento efectuado.



**Figura 2.3** - Representação esquemática da metodologia “6x6 drop” seguida no presente trabalho para a determinação de UFCs. Adaptado de Chen *et al.*, 2003.

Brevemente, pipetou-se 100 µL da cultura para o poço inicial de cada linha de uma microplaca de 96 poços (BRAND plates, BrandTech Scientific, Inc), sendo de seguida realizadas diluições seriadas 1:10 utilizando uma pipeta multicanal, através da transferência de 20 µL da coluna *i* para 180 µL de meio *Mueller-Hinton Broth*- MHB na coluna *i+1*, misturando 10 vezes e repetindo o processo. Foram realizados dois ensaios independentes. De seguida, 6 replicados de 10 µL de cada uma das 6 diluições seleccionadas, foram plaqueados em meio *Mueller Hinton agar* [*Mueller-Hinton Broth* 21 g/L (Becton Dickinson) + 17 g/L de agar (Bacto TM Agar, Becton Dickinson)], utilizando a pipeta multicanal. As placas foram deixadas a secar à temperatura ambiente e depois levadas para a estufa a 37±1°C, onde ficaram em condições de microaerofilia (Geradores GEN box, bioMérieux) durante 48 h.

Às 24 h de crescimento, foram utilizadas para plaqueamento as diluições  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  e  $10^{-7}$ , enquanto que às 49 h se seleccionaram para plaqueamento as diluições  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ .

Após o período de incubação, colónias com 0,5-1 mm de diâmetro foram enumeradas. Os resultados apresentados relativos à enumeração das colónias correspondem à média  $\pm$  erro padrão de dois ensaios independentes, considerando que, em cada ensaio, as diluições e respectivo plaqueamento foram realizados em triplicado e que foram calculadas as médias da enumeração para o conjunto de diluições repetidas.

#### **2.6.4. Ensaios de formação de biofilmes**

Pretendeu-se com este estudo identificar as condições nas quais a produção de biofilmes por isolados de campo de *C. jejuni* e *C. coli* é máxima, tentando-se ainda mimetizar algumas das condições ambientais presentes durante a cadeia de processamento alimentar. Para além das estirpes de referência, foram incluídos nestes ensaios os isolados LNIV19, LNIV52, LNIV63, LNIV76 e LNIV104, que inicialmente demonstraram ter capacidade de formação de biofilme sob diferentes condições experimentais.

##### **2.6.4.1. Crescimento dos isolados em biofilme utilizando, para o efeito, microplacas de poliestireno**

Após o crescimento dos isolados em placas com meio *Columbia Blood Agar Base* (Oxoid) suplementado com 5% de sangue de carneiro, nas condições já descritas (secção 2.3.1.), fez-se a passagem de 2 a 4 colónias (dependendo do tamanho) de cada isolado para tubos de ensaio estéreis com 5 mL do meio testado. Os tubos foram incubados entre 24 a 48 h em condições de microaerofília (GEN box, bioMérieux), a  $41\pm 1^\circ\text{C}$ . Pipetou-se um volume determinado do pré-inóculo de modo a obter em cada poço da microplaca [7 poços por meio, por isolado (Fig. 2.2 secção 2.6.1.6.1.)] (BRAND plates, BrandTech Scientific, Inc) um volume final de 200  $\mu\text{L}$  de suspensão celular com uma  $A_{600\text{nm}}$  inicial de pelo menos 0,01. Usou-se como controlo negativo 200  $\mu\text{L}$  de meio fresco não inoculado (Fig. 2.2 secção 2.6.1.6.1.). A microplaca foi depois incubada nas várias condições testadas, de acordo com o que abaixo se descreve.

Meio de Cultura: MHB

Temperatura:  $6^\circ\text{C}$ ,  $12^\circ\text{C}$  e  $37^\circ\text{C}$

Atmosfera: microaerofília ou aerobiose

Período de incubação: 72 h

A quantificação do biofilme formado foi efectuada de acordo com o procedimento anteriormente descrito (secção 2.6.1.7.1.).

Os resultados apresentados das leituras de absorvância a 570 nm, resultam da média  $\pm$  erro padrão de duas experiências independentes.

#### **2.6.4.2. Crescimento dos isolados em biofilme utilizando, para o efeito, lâminas de vidro ou de aço inoxidável**

Utilizaram-se tubos de Falcon (Sarstedt), contendo 15 mL do meio de cultura MHB, nos quais se introduziu um pedaço de uma das superfícies [aço inoxidável AISI 316 ou vidro com dimensões idênticas (7,5 cm x 2,5 cm)] preparadas de acordo com o procedimento anteriormente descrito (secção 2.6.1.6.2.). Cada tubo foi inoculado com uma suspensão celular (pré-inóculo) do respectivo isolado de modo a obter-se uma  $A_{600nm}$  inicial de pelo menos 0,01. Os tubos foram, então incubados de acordo com as condições abaixo descritas.

Meio de Cultura: MHB

Temperatura: 12°C e 37°C

Atmosfera: microaerofília ou aerobiose

Período de incubação: 72 h nos ensaios realizados a 37°C e 212 h nos ensaios a 12°C

A quantificação do biofilme formado foi efectuada de acordo com o procedimento anteriormente descrito (secção 2.6.1.7.2.), tendo-se procedido à seguinte alteração, após solubilização do biofilme em 15 mL de etanol absoluto (com recurso a um processo de raspagem para solubilização completa, no caso dos biofilmes mais firmemente associados à superfície) procedeu-se à leitura da absorvância a 570 nm (Evolution 300 UV-Vis, Thermo Scientific) utilizando-se para esse efeito 1 mL da solução resultante da solubilização do biofilme. Os resultados apresentados das leituras de absorvância a 570 nm, resultam da média  $\pm$  erro padrão de duas experiências independentes.

#### **2.6.5. Ensaios de mobilidade: *Swimming* e *Swarming***

Os ensaios de mobilidade foram efectuados em meio *Mueller-Hinton Broth* - MHB contendo uma percentagem adequada de agar consoante o tipo de mobilidade em estudo, a qual é bastante inferior à normalmente utilizada em meios de cultura sólidos, pelo que são designados de *soft agar*.

Inocularam-se placas de *Swim agar* [MHB suplementado com agar 0,3% (m/v) (Difco Agar Noble, Becton Dickinson)] ou de *Swarm agar* [MHB suplementado com agar 0,4% (m/v)

(Difco Agar Noble, Becton Dickinson)] com colónias isoladas crescidas em meio sólido (consultar secção 2.3.1.) usando um palito estéril. As placas foram incubadas a  $37\pm 1^\circ\text{C}$ , durante 72 h em condições de microaerofilia (5%  $\text{O}_2$ , 10%  $\text{CO}_2$ ) ou aerobiose. A migração das células é indicada pela existência de uma zona circular túrbida em torno do ponto de inoculação. Os diâmetros dos halos de migração foram medidos às 48 h e 72 h, tendo-se substituído os geradores de microaerofília aquando da medição às 48 h. Os resultados apresentados dos diâmetros dos halos de migração são a média  $\pm$  erro padrão de duas experiências independentes.

#### 2.6.6. Determinação da hidrofobicidade da superfície celular

A hidrofobicidade da superfície celular foi determinada usando o teste designado por MATH (*Microbial Adhesion to Hydrocarbon*) (Rosenberg *et al.*, 1980), no qual se estima a percentagem de células microbianas que aderem a um hidrocarboneto apolar, o hexadecano.

Recolheram-se células de culturas crescidas em meio *Mueller-Hinton Broth* - MHB, em condições de microaerofília (5%  $\text{O}_2$ , 10%  $\text{CO}_2$ ), a  $37\pm 1^\circ\text{C}$  durante 72 h (aquando do término do ensaios das curvas de crescimento) e lavou-se duas vezes com tampão PBS 1x concentrado, realizando-se, de cada uma das vezes, centrifugação (centrífuga ScanSpeed 1730R, LaboGene) durante 5 minutos a  $14000 \times g$ . Após a lavagem das células, preparou-se uma suspensão celular com  $A_{600\text{nm}} \approx 0,5$  em tampão PBS 1x. Em microtubos estéreis, misturou-se 1,5 mL da suspensão celular com 500  $\mu\text{L}$  de hexadecano e vortexou-se durante 20 segundos, passando-se de seguida para cuvetes descartáveis (Sarstedt) de 2 mL e deixando-se repousar durante 30 minutos para equilíbrio de fases. Por fim, mediu-se a perda de absorvância da fase aquosa ( $A_{600\text{nm}}$ ) relativamente à absorvância inicial ( $A_{600\text{nm}}$  inicial). A percentagem de células aderentes ao hexadecano foi estimada usando a equação que se segue:

$$\text{Hidrofobicidade (\%)} = [(A_{600\text{nm}} \text{ inicial} - A_{600\text{nm}}) / A_{600\text{nm}} \text{ inicial}] \times 100$$

Os resultados apresentados são a média  $\pm$  erro padrão de duas experiências independentes.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Caracterização genotípica de isolados de *C. jejuni* e *C. coli* obtidos a partir de cecos de frangos provenientes de várias regiões de Portugal Continental

##### 3.1.1. Âmbito do estudo realizado

Em Portugal, são ainda escassos os dados existentes sobre a incidência de bactérias do género *Campylobacter*, quer em alimentos quer em infecções humanas. Os estudos existentes sugerem elevadas taxas de incidência em produtos alimentares de origem avícola (Mena *et al.*, 2008; EFSA, 2010a, 2010b), a emergência de várias estirpes de origem animal e humana resistentes a diferentes agentes antimicrobianos (Cabrita *et al.*, 1992b; Mena *et al.*, 2008; Vicente *et al.*, 2008) e a presença, no genoma, de factores de virulência essenciais para o potencial patogénico das estirpes (Fernandes *et al.*, 2010).

Apesar dos dados existentes indicarem a necessidade de vigilância das infecções humanas causadas por *Campylobacter*, a campilobacteriose não integra o grupo de Doenças de Declaração Obrigatória em Portugal (Anónimo, 2007), não existindo, até ao presente momento, um sistema activo de vigilância epidemiológica que permita fornecer dados sobre a incidência da doença na população. Em 2009, Portugal e a Grécia foram os únicos países da UE que não reportaram casos de campilobacteriose em humanos (EFSA, 2011).

Em 2008, foi realizado um estudo de prevalência de *Campylobacter* spp. em bandos e carcaças de frangos, no âmbito da Decisão da Comissão 2007/516/CE, pela Direcção Geral de Veterinária e com o apoio do Laboratório Nacional de Referência, INRB-LNIV. O estudo mostrou que bandos e carcaças de frangos com origem em várias regiões de Portugal Continental apresentavam níveis de colonização/contaminação muito elevados, tendo-se verificado que 82,0% das amostras cecais e 70,2% das carcaças analisadas estavam contaminadas por *Campylobacter*, com predominância da espécie *C. coli* (61,6%) nas amostras cecais e da espécie *C. jejuni* (67,2%) nas amostras de carcaças (EFSA, 2010a, 2010b).

No presente trabalho, é descrita a caracterização molecular de um subgrupo de isolados de *Campylobacter* obtidos em Portugal no âmbito do estudo supracitado. Desde 2008, tem sido realizada, no INRB-LNIV, a conservação sistemática de todos os isolados classificados a nível fenotípico e molecular como *Campylobacter*, tal como sugerido na Decisão da Comissão 2007/516/CE, e com o objectivo de estes virem a ser caracterizados no futuro. Dos 353 isolados de *Campylobacter* obtidos do conteúdo cecal de frangos durante o estudo de prevalência de 2008, seleccionaram-se aleatoriamente 200 isolados para análise molecular no âmbito desta dissertação.

### 3.1.2. Caracterização da subpopulação de isolados de *C. jejuni* e *C. coli* examinados

Dos 200 isolados estudados, 71 pertencem à espécie *C. jejuni* e 129 à espécie *C. coli*, de acordo com a classificação baseada em testes bioquímicos e moleculares, realizada por técnicos especializados do INRB-LNIV aquando do estudo de prevalência. Essa classificação ao nível da espécie baseou-se na norma ISO10272-1:2006 e na análise dos genes 23S rDNA *hipO* (hipuricase), *glyA* (serina hidroximetiltransferase) e *sapB2*, de acordo com a metodologia proposta por Wang *et al.* (2002). A origem dos cecos de frangos dos quais se obtiveram os isolados caracterizados neste trabalho é muito diversa, correspondendo a 119 explorações (30 isolados com origem desconhecida) (Tabela 3.1) distribuídas geograficamente por 12 distritos de Portugal Continental (Fig. 3.1). Desconhece-se, no presente, o regime de produção das várias explorações (produção intensiva ou extensiva) bem como o respectivo tamanho dos bandos.

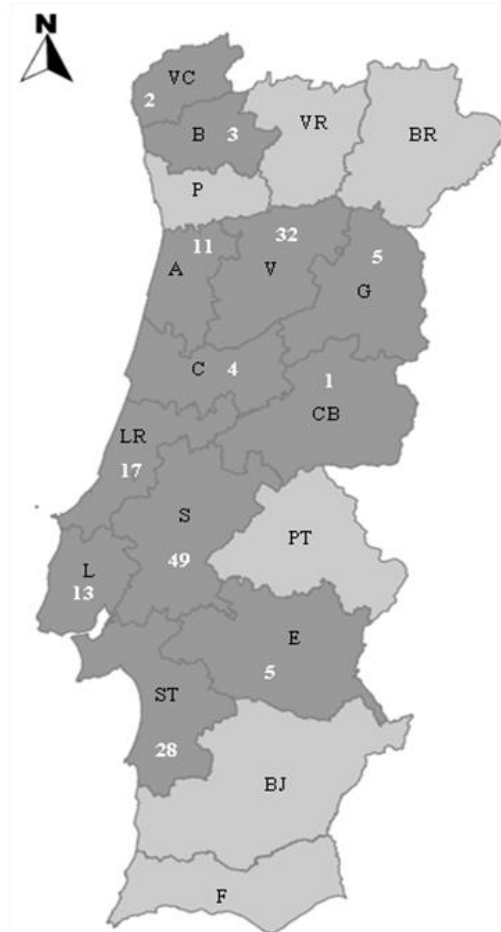
**Tabela 3.1** - Identificação das explorações/isolados por distrito. Número de explorações analisadas, número de isolados por cada exploração e número total de isolados por distrito.

Distrito	Número de explorações analisadas	Identificação das explorações (número de isolados*)	Número de isolados
Aveiro	11	I, VI, XXII, XXIV, XXXVIII, XLIV, LXI, LXXX, LXXVI, LXXXIII, CLXV	11
Braga	3	CXVI, CXXIII, CXXXVI	3
Castelo Branco	1	XXXVI	1
Coimbra	4	III, XLVI, XLIX, CLVII	4
Évora	1	XV	5
Guarda	4	LVIII, CXL, CXVIII, CXXV IV, XI, XXXIX, XLIII, XLVIII, L (2), LIV (2), LXII, LXXII, LXXXI, LXXXV, XCVII, CII, CXXXI, CXLVII	5
Leiria	15	XXXIV (2), LXXIII, CI, CV, CXXXV, CXXXVIII (2), CXLIV, CLIX (2), CLXIII, CLXX V (2), XIII, XXI, XXIII (2), XXVII, XXVIII, XXIX, XXXII, XXXV, XLI, LIIa (2), LIIb, LIc, LIII, LVII, LXVIb, LXX, LXXV (2), XCVI (2), XCVIII, CIII, CIX, CXI, CXIII (2), CXXIV, CXXVI, CXXXIX, CXLVIII, CL, CLI, CLII, CLIV (3), CLV (3), CLVIII (3), CLXI (2), CLXVI	17
Lisboa	10	XXXIV (2), LXXIII, CI, CV, CXXXV, CXXXVIII (2), CXLIV, CLIX (2), CLXIII, CLXX V (2), XIII, XXI, XXIII (2), XXVII, XXVIII, XXIX, XXXII, XXXV, XLI, LIIa (2), LIIb, LIc, LIII, LVII, LXVIb, LXX, LXXV (2), XCVI (2), XCVIII, CIII, CIX, CXI, CXIII (2), CXXIV, CXXVI, CXXXIX, CXLVIII, CL, CLI, CLII, CLIV (3), CLV (3), CLVIII (3), CLXI (2), CLXVI	13
Santarém	36	XXXIV (2), LXXIII, CI, CV, CXXXV, CXXXVIII (2), CXLIV, CLIX (2), CLXIII, CLXX V (2), XIII, XXI, XXIII (2), XXVII, XXVIII, XXIX, XXXII, XXXV, XLI, LIIa (2), LIIb, LIc, LIII, LVII, LXVIb, LXX, LXXV (2), XCVI (2), XCVIII, CIII, CIX, CXI, CXIII (2), CXXIV, CXXVI, CXXXIX, CXLVIII, CL, CLI, CLII, CLIV (3), CLV (3), CLVIII (3), CLXI (2), CLXVI	49

Distrito	Número de explorações analisadas	Identificação das explorações (número de isolados*)	Número de isolados
Setúbal	1	CLIII (28)	28
Viana do Castelo	2	XX, CLX	2
Viseu	30	II, IX, X, XVII, XLVII, LVI, LX, LXIII, LXIV, LXVIII, LXIX, LXXIV, LXXIX (2), LXXXII, XC, XCII, CIV, CVI, CVII, CXV (2), CXX, CXXVII, CXXX, CXXXII, CXXXVII, CXLIX, CLXIV, CLXIX, CLXXII, CLXXIV	32
I.N.D.	I.N.D.	I.N.D.	30

\*Apenas são assinaladas as explorações com mais do que um isolado.

I.N.D. – Informação não disponível.



**Figura 3.1** – Distribuição geográfica dos 200 isolados de *C. jejuni* e *C. coli* seleccionados para tipagem molecular. Para 30 dos isolados em estudo não foi possível obter informação sobre o distrito da exploração de origem. Imagem construída a partir da Carta Administrativa Oficial de Portugal (CAOP 2010, disponível em <http://www.igeo.pt/>). A cinzento-escuro estão marcados

os distritos de origem dos isolados utilizados para o estudo de genotipagem, os restantes estão assinalados a cinzento-claro. Os números apresentados (a branco) representam a quantidade de isolados utilizados por distrito. Legenda: VC – Viana do Castelo; B – Braga; VR – Vila Real; BR – Bragança; P – Porto; V – Viseu; A – Aveiro; G – Guarda; C – Coimbra; CB – Castelo Branco; LR – Leiria; S – Santarém; L – Lisboa; E – Évora; ST – Setúbal; BJ – Beja; F – Faro.

### **3.1.3. Genotipagem baseada na análise dos polimorfismos dos fragmentos de restrição do gene *flaA* (*flaA*-RFLP)**

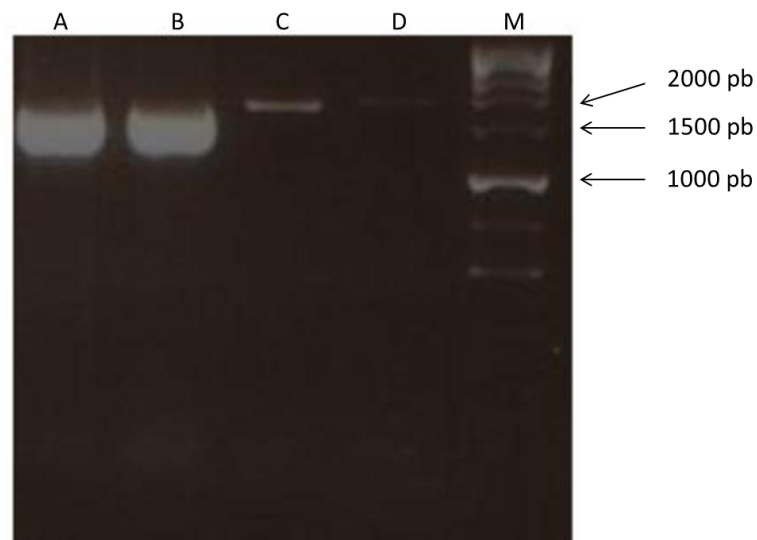
A caracterização molecular dos isolados de *Campylobacter* obtidos de cecos de frangos efectuada neste trabalho baseou-se na análise comparativa dos polimorfismos dos fragmentos de restrição do gene *flaA* dos diferentes isolados (*flaA*-RFLP). Têm sido vários os procedimentos desenvolvidos para a tipagem de *Campylobacter* spp. com base na amplificação e restrição do gene *flaA*. Esses procedimentos apresentam diferenças consideráveis relativamente à forma de preparação do DNA, ao conjunto de oligonucleótidos iniciadores utilizado e às temperaturas de hibridação e enzimas de restrição usadas (revisto por Wassenaar & Newell, 2000). No que diz respeito à escolha das enzimas de restrição, têm sido várias as enzimas utilizadas individualmente ou de forma combinada, nomeadamente, *AluI*, *DdeI*, *Hinfi*, *EcoRI* e *PstI* (Ertas *et al.*, 2004). No presente trabalho, optou-se por seguir o procedimento proposto pela rede Campynet (<http://campynet.vetinst.dk/Fla.htm>) criada na UE em 1998, com o intuito de padronizar os métodos de subtipagem de *C. coli* e *C. jejuni*. Por sua vez, este procedimento baseia-se na metodologia descrita por Nachamkin e colaboradores (Nachamkin *et al.*, 1993b, 1996), a qual é considerada uma técnica rápida e discriminatória.

#### **3.1.3.1. Amplificação do gene *flaA***

Em *Campylobacter* spp., o locus genético da flagelina formado pelos genes *flaA* e *flaB* organizados em tandem possui regiões variáveis e regiões altamente conservadas, pelo que está documentado que a análise dos polimorfismos dos fragmentos de restrição destes genes amplificados pela reacção em cadeia da polimerase (PCR) permite uma diferenciação satisfatória dos isolados, com utilidade em estudos epidemiológicos. (Wassenaar & Newell, 2000; Jagannathan & Penn, 2005).

No presente trabalho, procedeu-se à amplificação do gene *flaA* dos isolados de campo de *C. jejuni* e *C. coli* em estudo com vista à análise sistemática dos seus genótipos. Assim, por recurso à técnica de PCR e usando a combinação de sequências iniciadoras indicadas no capítulo *Material e Métodos*, procedeu-se à tentativa de amplificação de uma região de DNA

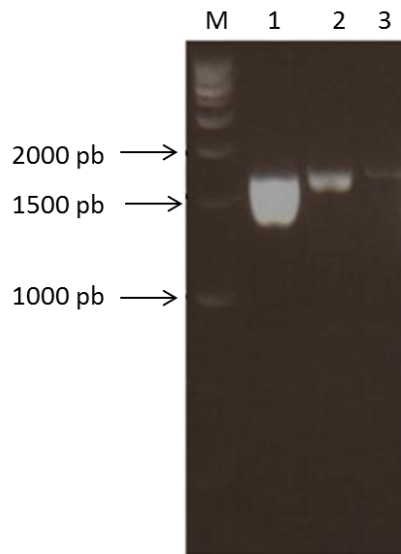
codificante específica para bactérias do género *Campylobacter*, esperando obter-se um fragmento amplificado característico de, aproximadamente, 1,7 kb. As reacções de polimerização em cadeia efectuadas sobre o DNA cromossómico de 200 isolados originaram amplificados em 179 dos 200 (90%) isolados testados. No caso dos isolados LNIV01, LNIV02, LNIV06, LNIV08, LNIV10, LNIV14, LNIV16, LNIV17, LNIV60, LNIV64, LNIV84, LNIV85, LNIV86, LNIV87, LNIV88, LNIV89, LNIV90, LNIV95, LNIV97, LNIV98, LNIV103, verificou-se a ausência de qualquer fragmento de amplificação. Nos restantes isolados, obtiveram-se, na maioria dos casos, amplificados únicos com uma dimensão inequívoca. Noutros casos, a elevada intensidade da banda visualizada em gel de agarose não permitiu confirmar com segurança que se tratava de um fragmento único específico, apesar da sua massa molecular ser de, aproximadamente, 1,7 kb (Fig. 3.2).



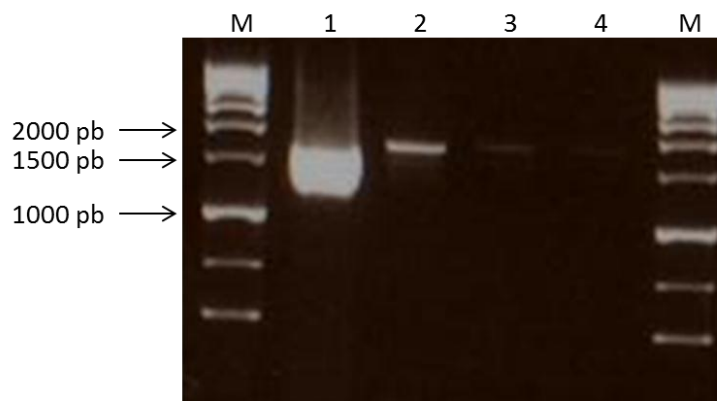
**Figura 3.2** – Produto de amplificação do gene *flaA* por PCR, após separação electroforética em gel de agarose 1,5% (m/v). Legenda: A – LNIV46; B – LNIV48; C – LNIV50; D – LNIV59; M - marcador de massa molecular (HyperLadder III, Bioline).

De modo a esclarecer se o fragmento obtido era específico e não o resultado da acumulação de vários produtos de amplificações inespecíficas com massas moleculares semelhantes, seleccionaram-se alguns dos isolados em que se verificou esta situação e procedeu-se à diluição seriada do DNA molde para repetição das reacções de PCR. Efectuou-se, paralelamente, a diluição seriada dos produtos de PCR de elevada intensidade obtidos para verificar se o fragmento correspondia a uma elevada concentração dos produtos resultantes da amplificação do gene *flaA*. Estas abordagens permitiram confirmar que o fragmento de elevada intensidade obtido se devia, de facto, a uma elevada concentração do DNA molde

usado e ao elevado rendimento da reacção de PCR com a acumulação exponencial de um fragmento de 1,7 kb, tal como se exemplifica nas figuras 3.3 e 3.4.



**Figura 3.3** – Amplificação de uma região com, aproximadamente, 1,7 kb, correspondente ao gene *flaA*, utilizando diferentes diluições de um *stock* de DNA do isolado LNIV167. Legenda: (M) Marcador de massas moleculares (HyperLadder III, Bioline), (1) sem diluição, (2) diluição 1:10000, (3) diluição 1:50000.



**Figura 3.4** – Exemplo de separação electroforética em gel de agarose de diluições seriadas do produto de amplificação por PCR do gene *flaA* para o isolado LNIV167. Legenda: (M) Marcador de massas moleculares (HyperLadder III, Bioline), (1) - sem diluição, (2) diluição 1:10, (3) diluição 1:50, (4) diluição 1:100.

### 3.1.3.2. Sequenciação dos produtos de amplificação do gene *flaA*

Para se confirmar que o fragmento de 1,7 kb amplificado utilizando oligonucleótidos específicos na reacção em cadeia da polimerase correspondia ao gene *flaA*, seleccionaram-se dois dos isolados em estudo (LNIV230 – *C. jejuni* e LNIV224 – *C. coli*) para a sequenciação dos respectivos produtos de amplificação. Utilizaram-se os oligonucleótidos iniciadores *flaA1* e

*flaA2* (cuja sequência se encontra disponível no capítulo *Material e Métodos*) na reacção de sequenciação das cadeias directa e complementar, respectivamente, de ambos os fragmentos. A análise dos electroferogramas obtidos por sequenciação dos dois produtos de amplificação segundo o método Sanger foi efectuada por recurso ao *software Sequence Scanner* (v 1.0) da Applied Biosystems (ABI), estando as sequências resultantes apresentadas na Tabela 3.2. De seguida, recorreu-se à ferramenta bioinformática BLAST (*nucleotide BLAST - megablast*) para o alinhamento das sequências nucleotídicas obtidas com sequências nucleotídicas existentes na base de dados de nucleótidos (*nucleotide collection nr/nt*) do NCBI. Verificou-se que as sequências do gene *flaA* dos isolados LNIV224 e LNIV230 obtidas por sequenciação, apresentam um elevado nível de similaridade (83-100%), quer com sequências do gene *flaA* (maioritariamente), quer com sequências do gene *flaB* pertencentes às espécies *C. jejuni* e *C. coli* (Fig. 3.5).

```

1   AGTTTAGATGCTTCTTTAAGCAGACTTAGTTCAGGTCTTAGAATTAACCTCCGCAGCAGAT   60
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
151 AGTTTGGATGCTTCTTTAAGCAGACTTAGTTCAGGTCTTAGAATCAACTCCGCAGCAGAT   210
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
61  GATGCTTCAGGGATGGCTATAGC-A-GATTCTTTGCGTTCACAAAGC-AGCTACTTTAGGT   117
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
211 GATGCTTCAGGGATGGCGAT--CAAGGATAGTTTAAAGATCTCAAGCTA-ATACTTTAGGT   267
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
118 CAAGCTATAAAC-AATGGTAACGATGCTATAGGTATCTTACAAACTGCTGATAAGGCTAT   176
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
268 CAAGCTAT-ATCTAATGGTAACGATGCTTTAGGTATTTTACAAACTGCTGATAAGGCTAT   326
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
177 GGATGAGCAACTTAAAAATCTTAGATACAATCAAAACTAAGGCAACTCAAGCGGCTCAAGA   236
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
327 GGATGAGCAACTTAAAAATCTTAGATACAATCAAAACTAAGGCAACTCAAGCGGCTCAAGA   386
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
237 TGGACAAAGTTTAAAAACAAGAACCATGCTTCAAGCAGATATCAACCGTTTAAATGGAGGA   296
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
387 TGGACAAAGTTTAAAAACAAGAACCATGCTTCAAGCAGATATCAACCGTTTAAATGGAGGA   446
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
297 ACTTGACAATATCGCAAATACTACTTTCATTTAACGGTAAGCAACTTTTAAAGTGGAAATTT   356
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
447 ACTTGACAATATCGCAAATACTACTTTCATTTAACGGTAAGCAACTTTTAAAGTGGAAATTT   506
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
357 TATCAATCAAGAATTTCAAATCGGTGCTAGTTCAAATCAAAGTGTAAAAGCAAGTATAGG   416
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
507 TATCAATCAAGAATTTCAAATCGGTGCGAGTTCAAATCAAAGTGTAAAAGCAAGTATAGG   566
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
417 AGCAACCCAGTCTTCTAAGATAGGTTTAACTCGTTTTGAAACAGGATCAAGGATTTTCAGT   476
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
567 AGCAACCCAGTCTTCTAAGATAGGTTTAACTCGTTTTGAAACAGGATCAAGGATTTTCAGT   626
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
477 TGGTGGTGAAGTGCAATTTACCCTTAAAAACTACAACGGTATAGATGATTTTAAATTC   536
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
627 TGGTGGTGAAGTGCAATTTACCCTTAAAAATTACAATGGTATAGATGATTTTAAATTC   686
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
537 AAAAGTAGTTATTTCAACCTCAGTTGGAACAGGACTTGGAGCTTTAGC   584
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
687 AAAAGTTGTGATTTCAACTTCAGTTGGAACAGGACTTGGAGCTTTAGC   734

```

**Figura 3.5** - Exemplo do alinhamento de uma das sequências nucleotídicas obtidas a partir do gene *flaA* do isolado LNIV224 (amplificação a partir do oligonucleotídeo iniciador *flaA1* (*foward*)) com uma das sequências nucleotídicas existente na base de dados de nucleótidos (*nucleotide collection nr/nt*) do NCBI. A sequência representada na parte superior do alinhamento corresponde à sequência obtida, por sequenciação, para o isolado LNIV224, enquanto que a sequência na parte inferior do alinhamento corresponde a uma parte da sequência nucleotídica comum aos genes *flaA* e *flaB* da estirpe *C. jejuni* ATCC 43431. O alinhamento representado está associado a um grau de similaridade de 97%.

**Tabela 3.2** - Sequências nucleotídicas obtidas por sequenciação do produto de amplificação de uma região de DNA codificante, presumivelmente, do gene *flaA* referente aos isolados LNIV224 e LNIV230.

Sequências nucleotídicas	
<p>AGTTTAGATGCTTCTTTAAGCAGACTTAGTTCAGGCTTAGAATTAAGTCCGCAGCAGAT                      GATGCTTCAGGGATGGCTATAGCAGATTCTTTGCGTTCACAAGCAGCTACTTTAGGTCAA                      GCTATAAACAATGGTAACGATGCTATAGGTATCTTACAACTGCTGATAAGGCTATGGAT                      GAGCAACTTAAAACTTAGATAACAATCAAACTAAGGCAACTCAAGCGGCTCAAGATGG                      ACAAAGTTTAAAAACAAGAACCATGCTTCAAGCAGATATCAACCGTTTAAATGGAGGAAC                      TTGACAATATCGCAAATACTACTTCATTTAACGGTAAGCAACTTTAAGTGGAAATTTAT                      CAATCAAGAATTTCAAATCGGTGCTAGTTCAAATCAACTGTAAAAGCAAGTATAGGAG                      CAACCCAGTCTTCTAAGATAGGTTAACTCGTTTTGAAACAGGATCAAGGATTTCAAGTTG                      GTGGTGAAGTGAATTTACCTTAAAACTACAACGGTATAGATGATTTTAAATCCAAA                      AAGTAGTTATTTCAACCTCAGTTGGAACAGGACTTGGAGCTTAGCAGAAGA</p>	<p>Isolado: <b>LNIV224</b></p> <p>Número de nucleótidos: <b>590</b></p> <p>Oligonucleótido Iniciador: <b><i>flaA1</i> (forward)</b></p>
<p>CGCAGGATGTTATATTTAGAAAATTTGCACTTTCAGCTGCAAAGTCTACATCTTATGGT                      TGATTGAGTCTTTAACGTTTACTTGAGTAACAGTAATGTTGTTTATAGTCACTTGAAGT                      TGATTTGACCCGAACCAATGTCTGCTCTGATTTGATCAAGATTTGTTGTGGCTGTTTCAG                      CTATATCCATCACC GCCATAGCACCTTAAAGTGTAGTAACACCTGCGGTTTCATCTTTAC                      ACCAAGAGTATTTCTGCTGAAGTTTTCATGGTTGCAAACCTGAGAAAGTCCGCTTTGACT                      AGAAAAACCTGAGCCTGCAGATACATTATACACATTAGAAAGAGAAGATGCGGTTGACA                      TAGCTACTACATTTGCAAACCCGTAGAATATTCTTTACCGCTGCCTATAGAATAACCCGA                      ACCTGAAGAAAATCCACTTCTGCACTACTCATATAACCAGAAATAGAAGAATAACCTCC                      TAAAATATTTCTTTATTTGCGGAATTAAGCCCATAGCATCAGCTACATTTGCATCGATT                      TGCCCTTAGATTCTCTTAAAGAAACGGAAGCTTGAGAAAATC</p>	<p>Isolado: <b>LNIV224</b></p> <p>Número de nucleótidos: <b>588</b></p> <p>Oligonucleótido Iniciador: <b><i>flaA2</i> (reverse)</b></p>
<p>GTTTAGATGCTTCTTTAAGCAGACTTAGTTCAGGCTTAGAATCAACTCCGCAGCAGATG                      ATGCTTCAGGGATGGCGATAGCAGACAGTTTAAAGATCTCAAGCTAATACTTTAGGTCAA                      GCTATATCTAATGGTAACGATGCTTTAGGTATCTTACAACTGCTGATAAGGCTATGGAT                      GAGCAACTTAAAACTTAGATACTATTAATACTAAGGCAACTCAAGCGGCTCAAGATGG                      ACAAAGTTTAAAAACAAGAACCATGCTTCAAGCAGATATCAACCGTTTAAATGGAAGAAC                      TTGACAATATCGCAAATACTACTTCATTTAACGGTAAGCA</p>	<p>Isolado: <b>LNIV230</b></p> <p>Número de nucleótidos: <b>337</b></p> <p>Oligonucleótido Iniciador: <b><i>flaA1</i> (forward)</b></p>
<p>TAGATATTTGCTTTAGAGTAGTTTGCCTCTCGGCTGCAAAGTCTACATCACGGATTTGT                      GACTCAGCTGCTTTAACGTTTACTTGAGTAACGGTAATGTTGTTTATAGTTGATGTAACCT                      GATTTTGCCTGAACCAATGTCAGCTCTGATTTGATCAAGATTTGTTATAGCTGTGTCAGC                      TATGTCCATCACTGCCATAGCACCC</p>	<p>Isolado: <b>LNIV230</b></p> <p>Número de nucleótidos: <b>207</b></p> <p>Oligonucleótido Iniciador: <b><i>flaA2</i> (reverse)</b></p>

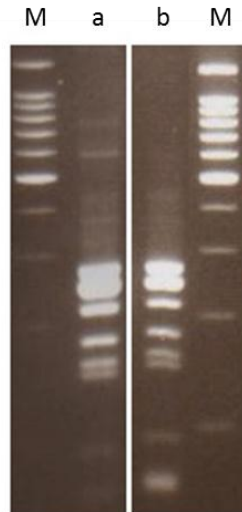
O resultado da comparação das sequências nucleotídicas obtidas com as sequências depositadas na base de dados pública apenas permite confirmar tratarem-se de regiões codificantes para os genes *flA* e *flB*, não permitindo a diferenciação clara entre os dois genes. Considerando que as sequências nucleotídicas dos genes *flaA* e *flaB* nas espécies *C. jejuni* e *C. coli* apresentam um elevado nível de similaridade (cerca de 95%) (Meinersmann & Hiett, 2000), este resultado estará essencialmente relacionado com o facto de não ter sido possível obter a sequência nucleotídica completa dos fragmentos amplificados. De facto, através da análise dos electroferogramas correspondentes, as maiores sequências obtidas possuem apenas 590 e 588 nucleótidos seguidos, sem interrupções, tendo estas sido obtidas a partir da sequenciação do produto de amplificação do gene *flaA* gerado pelo isolado LNIV224. Este resultado limita uma análise mais aprofundada das sequências, tendo em consideração o tamanho total do gene (1,7 kb), no entanto considerou-se que os fragmentos amplificados correspondiam à região de interesse, tendo-se prosseguido os estudos.

### **3.1.3.3. Interpretação dos polimorfismos dos fragmentos de restrição do gene *flaA* gerados pelas endonucleases *HinfI* e *DdeI***

Tendo em consideração que a amplificação do gene *flaA* não foi possível para os 200 isolados em estudo, apenas se prosseguiu a genotipagem dos 179 isolados pela metodologia *flaA*-RFLP para os quais se obteve um amplificado específico. Para o efeito, procedeu-se à restrição, de forma independente, do fragmento amplificado correspondente ao gene *flaA* com as endonucleases *DdeI* e *HinfI*, cujas sequências de corte estão, presumivelmente, presentes em várias regiões do gene em análise. Os padrões de restrição característicos do gene *flaA* gerados pela acção de cada uma das endonucleases foram denominados de perfis *flaA*-RFLP, sendo-lhes atribuída uma designação alfanumérica.

Em alguns dos perfis obtidos verificou-se, independentemente da enzima utilizada, o aparecimento de bandas muito ténues num plano secundário do gel de agarose. Esta situação, também reportada noutro estudo de tipagem baseado no mesmo método (Owen *et al.*, 1994), ocorreu, essencialmente, quando se excedeu o período de incubação das reacções de restrição, possivelmente devido a digestões parciais e à perda da fidelidade da actividade da enzima (*star activity*), com o aumento da clivagem em sítios não específicos, tendo-se conseguido melhores resultados com períodos de incubação menos extensos (3 h). Assumiu-se, deste modo, que as bandas secundárias (ténues) observadas resultavam do prolongamento do período de incubação das reacções de restrição (Fig. 3.6), tendo os perfis sido definidos com base nas bandas de maior intensidade (primeiro plano) e em função do tamanho do gene em questão.

Por outro lado, em alguns perfis de restrição, as bandas de baixa massa molecular apresentaram menor intensidade do que as bandas de maior massa molecular, o que se deve a menor intercalação de moléculas de brometo de etídio no DNA, resultando, conseqüentemente, numa menor emissão de luz quando expostos à radiação UV. A presença destas bandas foi na grande maioria das vezes reprodutível, tendo sido consideradas como parte integrante do perfil, uma vez que a sua inclusão no somatório das massas moleculares dos fragmentos gerados completava a dimensão esperada para o gene *flaA*.



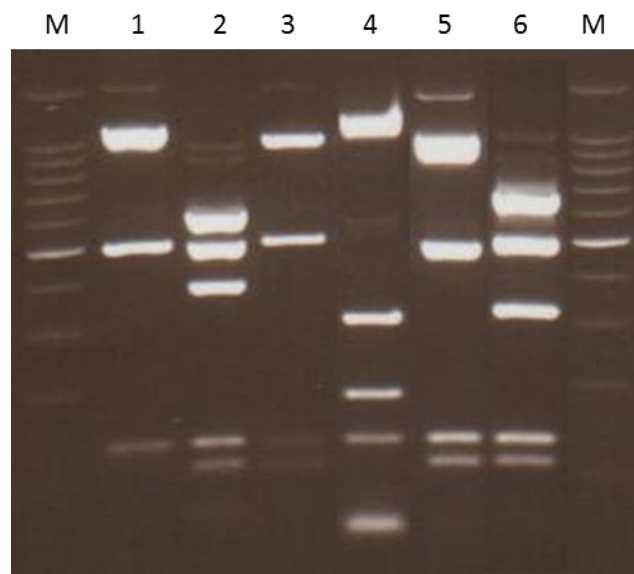
**Figura 3.6** - Perfil de restrição do gene *flaA* do isolado LNIV124 resultante da utilização da enzima *DdeI*, após electroforese em gel de agarose 2% (m/v), obtido com diferentes períodos de incubação. (a) Perfil obtido de uma reacção de restrição incubada a 37°C durante a noite; (b) Perfil *flaA*-RFLP 1 obtido de uma reacção de restrição incubada a 37°C durante 3 h; (M) Marcador de massas moleculares BenchTop 100 bp DNA Ladder.

Para a grande maioria dos perfis *flaA*-RFLP obtidos, o somatório das massas moleculares dos fragmentos de restrição obtidos foi de, aproximadamente, 1700 pb. No entanto, verificaram-se algumas excepções. Nos casos em que o somatório excedeu este valor, tal deveu-se possivelmente: (i) à restrição incompleta do fragmento correspondente ao gene *flaA*, (ii) à possibilidade de amplificação simultânea do gene *flaB* que se distingue do gene *flaA* em apenas 5-8% dos nucleótidos (Guerry *et al.*, 1990; Harrington *et al.*, 1997). Numa análise comparativa das sequências dos dois genes encontraram-se 2 regiões variáveis, uma maior compreendida entre os 700 e 1450 nucleótidos e uma mais pequena compreendida entre os 450 a 600 nucleótidos (Meinersmann & Hiatt, 2000). Se as sequências onde hibridam os oligonucleótidos iniciadores se mantiverem conservadas em ambos os genes, existe a possibilidade de dupla amplificação. O aparecimento de bandas mais fracas, presumivelmente

resultantes da amplificação do gene *flaB*, já foi relatado (Owen *et al.*, 1994). No entanto, também já foi verificado que a variação entre os genes *flaA* e *flaB* ocorre essencialmente nas regiões conservadas do gene, tanto em isolados de *C. jejuni* como em isolados de *C. coli* (Harrington *et al.*, 1997). No caso de amplificação de ambos os genes, seria de esperar um somatório dos fragmentos de restrição de cerca de 3400 pares de bases (1700 + 1700), no entanto essa situação nunca foi verificada no presente trabalho. Nos casos em que o somatório não atingiu o tamanho esperado, tal poderá resultar (i) da existência de fragmentos de baixa massa molecular que, por terem grande mobilidade electroforética, já não estariam presentes no gel de agarose quando da sua visualização; (ii) da obtenção de fragmentos com massas moleculares muito semelhantes que, em termos visuais, sejam considerados como uma única banda no gel de agarose.

#### 3.1.3.4. Diversidade e frequência dos perfis de restrição do gene *flaA*

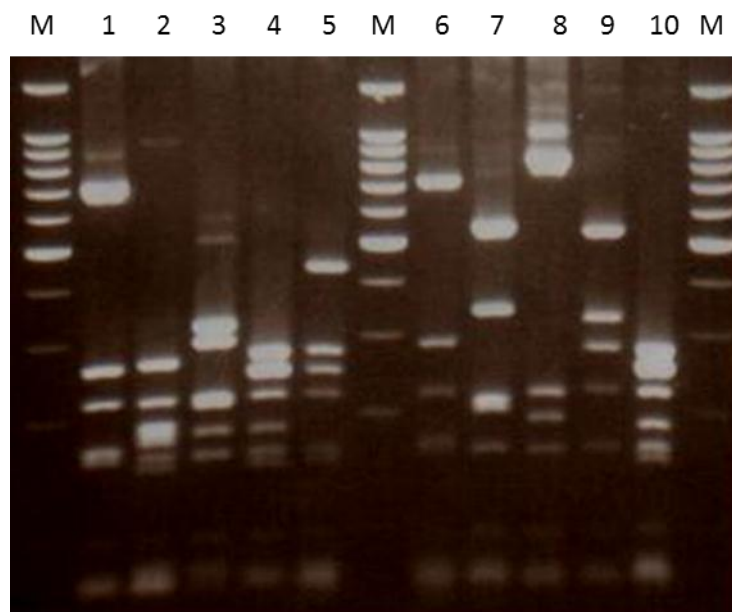
A restrição do gene *flaA* efectuada com a enzima *HinfI* originou 12 perfis de restrição (Fig 3.7), incluindo o perfil único gerado por uma das estirpes de referência, representados esquematicamente na figura 3.9 (secção 3.1.3.5) que exibem entre três e oito fragmentos de restrição. Para todos os perfis *flaA*-RFLP obtidos com a enzima *HinfI*, o somatório das massas moleculares dos fragmentos de restrição gerados rondou 1700 pb, com a excepção do perfil L, correspondente ao perfil gerado unicamente pelo isolado LNIV15, para o qual o somatório foi de 2300 pb, possivelmente resultante de digestão incompleta do gene.



**Figura 3.7** - Representação de alguns dos perfis *flaA*-RFLP (*lanes* 1 a 6) gerados através da restrição enzimática com a enzima *HinfI*, após electroforese em gel de agarose 2% (m/v). M: BenchTop 100 bp DNA Ladder.

O perfil mais frequente, designado de F, também gerado por uma das estirpes de referência, apresenta 56,4% de frequência relativa, seguido do perfil D, com uma frequência relativa de 20,1%, e do perfil G (14,5%). Para os restantes perfis, observou-se uma frequência bastante inferior (Tabela 3.3). De todos os perfis de restrição identificados, quatro são únicos (E, H, I, L), estando todos associados a isolados da espécie *C. coli*. Também os perfis B e J, mais frequentes, estão associados, exclusivamente, à espécie *C. coli*. Em contraste, o perfil C, foi gerado apenas por isolados da espécie *C. jejuni*. Verificou-se ainda, que quatro perfis são partilhados por ambas as espécies (G, F, D, A), incluindo os três perfis mais frequentes.

Em contraste, a análise dos polimorfismos de restrição do gene *flaA* dos mesmos 179 isolados utilizando a endonuclease *DdeI* originou 50 perfis de restrição (Fig 3.8), incluindo os dois perfis únicos gerados pelas duas estirpes de referência, e que se encontram esquematicamente representados na figura 3.10 (secção 3.1.3.5). Os perfis obtidos com esta enzima apresentaram maior complexidade, variando o número de fragmentos de restrição entre quatro e dez. Para a grande maioria dos perfis *flaA*-RFLP obtidos com a endonuclease *DdeI*, o somatório das massas moleculares dos fragmentos de restrição obtidos foi de, aproximadamente, 1700 pb, no entanto, verificaram-se algumas excepções, nomeadamente para os perfis 30, 35, 38, 42 e 43. O mesmo se verificou no perfil de restrição da estirpe de referência ATCC 33560. De notar que os perfis para os quais esta situação se verificou são perfis únicos, com a excepção do perfil 35 gerado por apenas dois dos isolados (LNIV140 e LNIV141).



**Figura 3.8** - Representação de alguns dos perfis *flaA*-RFLP (*lanes* 1 a 10) gerados através da restrição enzimática com a enzima *DdeI*, após electroforese em gel de agarose 2% (m/v). M: BenchTop 100 bp DNA Ladder.

O perfil *flaA*-RFLP *DdeI* mais comum, designado de perfil 1, apresenta uma frequência relativa de 26,8%, seguido do perfil 6 com uma incidência de 13,4% e, dos perfis 9 e 10, ambos gerados por 7,8% dos isolados. Os restantes perfis obtidos foram menos comuns, tendo-se registado ainda 29 perfis únicos, cada um com 0,6% de frequência relativa (Tabela 3.4). Destes, 55% foram associados a isolados da espécie *C. jejuni* e 48% associados a isolados da espécie *C. coli*. Do total de perfis identificados, 21 foram associados só a isolados de *C. jejuni* e 16 só a isolados de *C. coli*, 11 foram partilhados por ambas as espécies. Os dois perfis restantes pertencem às estirpes de referência incluídas no estudo.

**Tabela 3.3** - Identificação dos perfis *flaA*-RFLP obtidos com a enzima *Hinfl*. Na tabela é apresentada a frequência relativa de cada perfil no total da área amostrada, bem como a frequência relativa da espécie (*C. coli* ou *C. jejuni*) com o mesmo perfil. Para cada espécie são ainda indicadas as explorações e distritos de proveniência dos isolados.

Perfil <i>flaA</i> - RFLP <i>Hinfl</i>	Número de isolados (%)	Número de isolados <i>C. jejuni</i> (%)	Origem		Número de isolados <i>C. coli</i> (%)	Origem	
			Exploração	Distrito		Exploração	Distrito
A	4 (2,2)	1 (0,6)	LXXXV	Leiria	3 (1,7)	XCVII Desconhecidas: 2	Leiria
B	4 (2,2)	0	-	-	4 (2,2)	XX, CXX Desconhecidas: 2	Viseu, Viana do Castelo
C	2 (1,1)	2 (1,1)	XXXIX Desconhecidas: 1	Leiria	0	-	-
D	36 (20,1)	9 (5,0)	CLXV, CXXXVIII, XXI, LXX, CLIII Desconhecidas: 3	Aveiro, Lisboa, Santarém, Setúbal	27 (15,1)	XXIV, CXVI, XI, CII, CXXXV, CXI, CXXIV, CXXVI, CLIV, CIX, LXXV, CLXI, CLXVI, XXXII, CLI, CLIV, CLV, XXIX, XCVI, XLI, LXVIIb, CLXXII, CIV, CXV, CLXIX Desconhecidas: 1	Aveiro, Braga, Leiria, Lisboa, Santarém, Viseu
E	1 (0,6)	0	-	-	1(0,6)	XXXIV	Lisboa
F	101 (56,4)	34 (19,0)	LXXXIII, XV, LXXII, CXXXI, XXXIV, CLIX, LXXIII, XIII, LIII, CXIII, CLIII, CLX, CLXIV Desconhecidas: 6	Aveiro, Évora, Leiria, Lisboa, Santarém, Setúbal, Viana do Castelo, Viseu	67 (37,4)	CLVIII, CXLVIII, CL, CXIII, LIa, LIB, XXXV, XXVI, CXXXIX, CLIII, CLVII, XLIX, LV, CXLIX, CVII, LX, CXXXVII, CLXXIV, XLVII, X, CXV, CXXVII, LXXXII, LXIII, XCVI	Santarém, Setúbal, Castelo Branco, Coimbra, Viseu, Desconhecido: 1

Perfil <i>flaA</i> - RFLP <i>HinfI</i>	Número de isolados (%)	Número de isolados <i>C. jejuni</i> (%)	Origem		Número de isolados <i>C. coli</i> (%)	Origem	
			Exploração	Distrito		Exploração	Distrito
G	26 (14,5)	21 (11,7)	LXI, XV, LVIII, LXII, CLXIII, XXVII, LIc, CLV, CLIII , CXXX , XC, Desconhecidas: 1	Aveiro, Évora, Guarda, Leiria, Lisboa, Santarém, Setúbal, Viseu	5 (2,8)	XCVI, LIV, CLII, CLXI, XCVIII Desconhecidas: 1	Santarém, Leiria
H	1 (0,6)	0	-	-	1 (0,6)	CLIV	Santarém
I	1 (0,6)	0	-	-	1(0,6)	XVII	Viseu
J	2 (1,1)	0	-	-	2 (1,1)	L, CLIX	Leiria, Lisboa
L	1 (0,6)	0	-	-	1 (0,6)	LXIX	Viseu

\*A estirpe de referência ATCC 33560 possui o perfil F, enquanto que a estirpe CCUG 11283 demonstrou um perfil *flaA* – RFLP *HinfI* diferente dos identificados para os isolados em análise.

**Tabela 3.4** - Identificação dos perfis *flaA*-RFLP obtidos com a enzima *Ddel*. Na tabela é apresentada a frequência relativa de cada perfil no total da área amostrada, bem como a frequência relativa da espécie (*C. coli* ou *C. jejuni*) com o mesmo perfil. Para cada espécie são ainda indicadas as explorações e distritos de proveniência dos isolados.

Perfil <i>flaA</i> - RFLP <i>Ddel</i> *	Número de isolados (%)	Número de isolados <i>C. jejuni</i> (%)	Origem		Número de isolados <i>C.</i> <i>coli</i> (%)	Origem	
			Exploração	Distrito		Exploração	Distrito
1	48 (26,8)	5 (2,8)	CXXX, XXI, CLIII, XIII	Viseu, Santarém, Setúbal	43 (24,0)	CLVIII, CLIV, CXXVI, CXXIV, XXIII, LXXXI, CI, V, L, LVII, CLVII, CXLIV, CLIII, CXXXVIII, CXLVII, CLV, CLII, LV, CXI, CXXXVII, XX, LXXVI, CVII, CXLIX, CXXV, XXVIII, CIII, CLXX, LX, CXX Desconhecidas:6	Santarém, Leiria, Lisboa, Coimbra, Setúbal, Viseu, Viana do Castelo, Aveiro, Guarda
2	4 (2,2)	4 (2,2)	LXXXV, XV, CLX Desconhecidas: 1	Leiria, Évora, Viana do Castelo	0	-	-
3	1 (0,6)	1 (0,6)	LXXII	Leiria	0	-	-
4	1 (0,6)	0	-	-	1 (0,6)	Desconhecida	-
5	1 (0,6)	0	-	-	1 (0,6)	Desconhecida	-
6	24 (13,4)	6 (3,4)	XXXIV, XXVII, CLIII Desconhecidas: 2	Santarém, Setúbal, Lisboa	18 (10,1)	CLIV, XXXIV, CL, VI, CXLVIII, CLI, CXV, XXXII, XI, LXXV, CLXVI, CLXI, LXXV, CIX, CLXXII, CIV, XXIV Desconhecidas: 1	Santarém, Lisboa, Aveiro, Viseu, Leiria,
7	7 (3,9)	0	-	-	7 (3,9)	CLXIX, XLIX, XV, LIV, XLVII Desconhecidas: 1	Viseu, Coimbra, Évora, Leiria,

Perfil <i>flaA</i> - RFLP <i>Ddel</i> *	Número de isolados (%)	Número de isolados <i>C. jejuni</i> (%)	Origem		Número de isolados <i>C.</i> <i>coli</i> (%)	Origem	
			Exploração	Distrito		Exploração	Distrito
8	1 (0,6)	1 (0,6)	CLIII	Setúbal	0	-	-
9	14 (7,8)	11 (6,1)	CLIII, LIII Desconhecidas: 1	Setúbal, Santarém	3 (1,7)	CLV, CXIII Desconhecidas: 1	Santarém
10	14 (7,8)	3 (1,7)	CLIII Desconhecidas: 1	Setúbal	11(6,1)	CLIII, LIIa, LIb, CV, XXXVI, CXL, CXXVII, CXV, X Desconhecidas: 2	Setúbal, Santarém, Lisboa, Castelo Branco, Guarda, Viseu
11	1 (0,6)	0	-	-	1 (0,6)	XVII	Viseu
12	1 (0,6)	1 (0,6)	Desconhecida	Desconhecido	0	-	-
13	9 (5,0)	5 (2,8)	CLV, CLIII, LIc, LVIII	Santarém, Setúbal, Guarda	4 (2,2)	XXXV, CXXXV, LIIa, CXVI	Santarém, Lisboa, Braga
14	4 (2,2)	4 (2,2)	CLIII, XV	Setúbal, Évora	0	-	-
15	1 (0,6)	0	-	-	1 (0,6)	Desconhecida	-
16	2 (1,1)	1 (0,6)	CLXV	Aveiro	1 (0,6)	XXIX	Santarém
17	2 (1,1)	1 (0,6)	Desconhecida	Desconhecida	1 (0,6)	XXII	Aveiro
18	1 (0,6)	1 (0,6)	LXI	Aveiro	0	-	-
19	1 (0,6)	0	-	-	1 (0,6)	LXXXII	Viseu

Perfil <i>flaA</i> - RFLP <i>Ddel</i> *	Número de isolados (%)	Número de isolados <i>C. jejuni</i> (%)	Origem		Número de isolados <i>C.</i> <i>coli</i> (%)	Origem	
			Exploração	Distrito		Exploração	Distrito
20	3 (1,7)	1 (0,6)	XC	Viseu	2 (1,1)	XCVIII, CLXI	Santarém
21	5 (2,8)	1 (0,6)	CXIII	Santarém	4 (2,2)	XCVII, LIV Desconhecidas: 2	Leiria
22	1 (0,6)	1 (0,6)	LXXXIII	Aveiro	0	-	-
23	1 (0,6)	1 (0,6)	Desconhecida	-	0	-	-
24	2 (1,1)	2 (1,1)	XXXIX Desconhecidas: 1	Leiria	0	-	-
25	2 (1,1)	0	-	-	2 (1,1)	XLIII, LXIX	Leiria, Viseu
26	1 (0,6)	0	-	-	1 (0,6)	CLIX	Lisboa
27	1 (0,6)	1 (0,6)	CLIX	Lisboa	0	-	-
28	1 (0,6)	1 (0,6)	Desconhecida	Desconhecido	0	-	-
29	1 (0,6)	0	-	-	1 (0,6)	XCVI	Santarém
30	1 (0,6)	1 (0,6)	CLIII	Setúbal	0	-	-
31	2 (1,1)	2 (1,1)	CLXIII, LXII	Leiria, Lisboa	0	-	-
32	1 (0,6)	1 (0,6)	CLXIV	Viseu	0	-	-
33	1 (0,6)	0	-	-	1 (0,6)	CII	Leiria
34	1 (0,6)	1 (0,6)	Desconhecida	Desconhecido	0	-	-
35	2 (1,1)	1 (0,6)	LXX	Santarém	1 (0,6)	XLI	Santarém
36	1 (0,6)	0	-	-	1 (0,6)	LXIII	Viseu
37	1 (0,6)	0	-	-	1 (0,6)	CLIV	Santarém
38	1 (0,6)	0	-	-	1 (0,6)	XCVI	Santarém
39	1 (0,6)	1 (0,6)	CLIII	Setúbal	0	-	-
40	1 (0,6)	0	-	-	1 (0,6)	IV	Leiria
41	1 (0,6)	0	-	-	1 (0,6)	L	Leiria
42	1 (0,6)	1 (0,6)	CLIII	Setúbal	0	-	-
43	1 (0,6)	1 (0,6)	CXXXI	Leiria	0	-	-
44	1 (0,6)	1 (0,6)	CXXXVIII	Lisboa	0	-	-

Perfil <i>flaA</i> - RFLP <i>Ddel</i> *	Número de isolados (%)	Número de isolados <i>C. jejuni</i> (%)	Origem		Número de isolados <i>C.</i> <i>coli</i> (%)	Origem	
			Exploração	Distrito		Exploração	Distrito
45	2 (1,1)	2 (1,1)	CLIII, LXXIII	Setúbal, Lisboa	0	-	-
46	2 (1,1)	2 (1,1)	CLIII Desconhecidas: 1	Setúbal	0	-	-
47	2 (1,1)	1 (0,6)	XV	Évora	1 (0,6)	LXVIb	Santarém
48	1 (0,6)	0	-	-	1 (0,6)	CXXXIX	Santarém

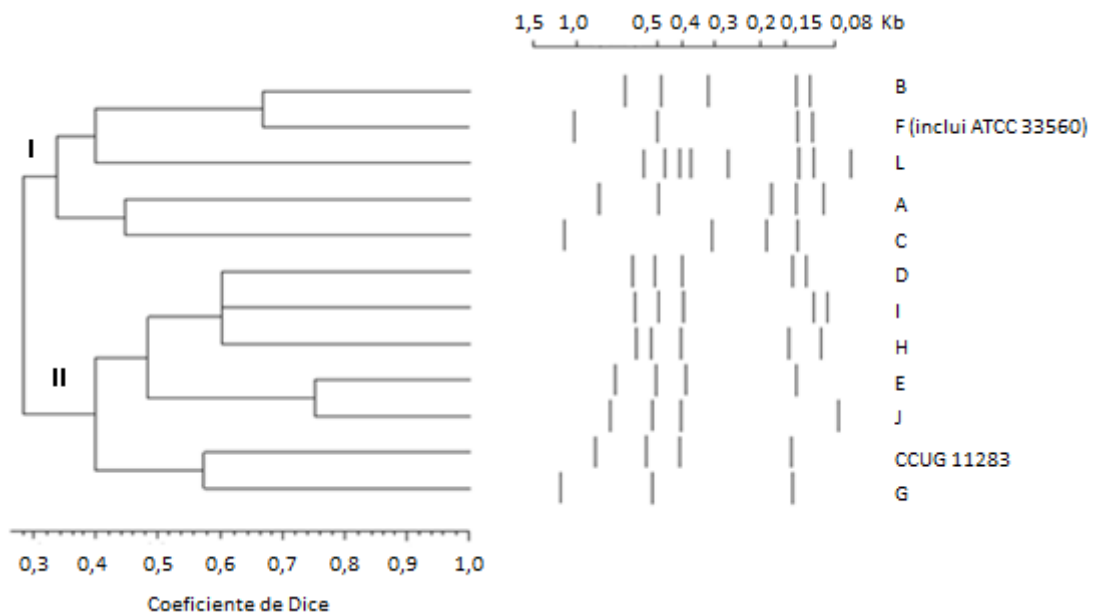
\*Os dois perfis adicionais são representados pelas estirpes de referência.

Apesar da análise dos perfis gerados pela enzima *Ddel* ser substancialmente mais complexa, por comparação à análise dos perfis gerados pela enzima *Hinfl*, devido ao maior número de fragmentos de restrição gerados, a utilização daquela enzima aumentou consideravelmente o poder discriminatório da técnica. De facto, com a utilização independente das duas enzimas, verificou-se, no caso da enzima *Ddel*, que a técnica apresenta um poder discriminatório de  $D=0,8947$  (índice de diversidade de Simpson) e que, com a utilização da enzima *Hinfl*, esse valor baixa para  $D=0,6222$ ; ou seja, ao utilizarmos este sistema de tipagem, a probabilidade média deste sistema atribuir um perfil diferente a duas estirpes não relacionadas, amostradas ao acaso na população microbiana considerada, é de 89,47%, se utilizarmos a enzima *Ddel*, e 62,22%, se utilizarmos a enzima *Hinfl*. Se considerarmos separadamente os isolados de cada espécie (*C. coli* e *C. jejuni*), o poder discriminatório da técnica é, em ambas as abordagens, superior para a espécie *C. jejuni* (94,92% com a enzima *Ddel*; 63,87% com a enzima *Hinfl*). Este resultado sugere que, apesar de se ter analisado neste trabalho um maior número de isolados da espécie *C. coli*, os isolados pertencentes à espécie *C. jejuni* apresentam, de modo geral, maior variabilidade no gene *flaA*.

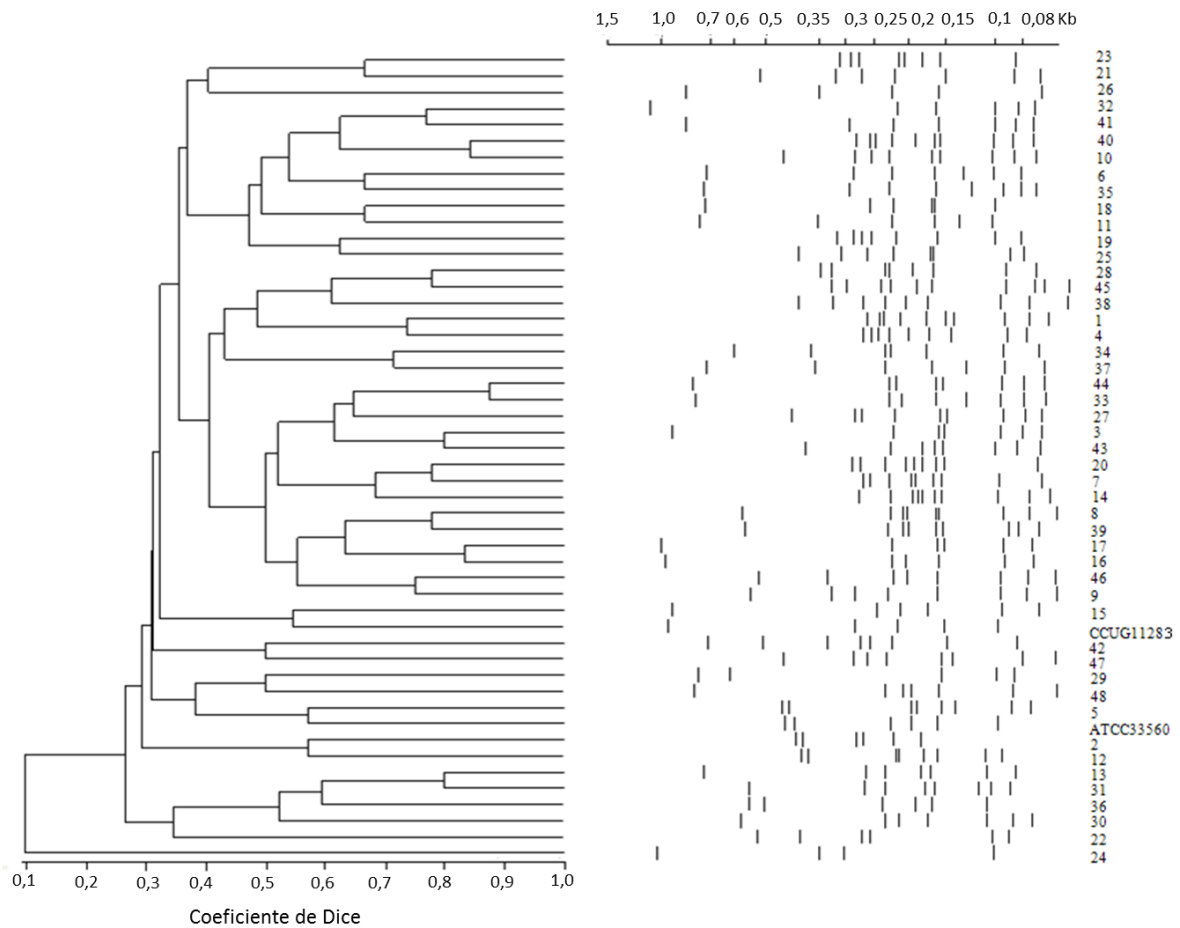
Considerando que, para ser possível uma interpretação epidemiológica dos resultados de tipagem, se deve obter um índice de diversidade de, pelo menos, 0,90 (Hunter & Gaston, 1988), o método de tipagem *flaA*-RFLP utilizando a enzima *Ddel* é mais indicado para a diferenciação da subpopulação de isolados de *Campylobacter* caracterizada, possibilitando um maior poder de discriminação dos isolados. Estes dados, que demonstram a elevada capacidade de discriminação resultante da utilização da enzima *Ddel*, estão de acordo com a maioria dos estudos referidos na literatura. Num estudo em que se utilizou a enzima *Ddel* e as enzimas *EcoRI* e *PstI* (abordagem combinada), verificou-se que a utilização individual da enzima *Ddel* conseguiu identificar 35 perfis de restrição num grupo de 315 isolados de *C. jejuni* e *C. coli*, enquanto que a utilização combinada das enzimas *EcoRI* e *PstI* apenas originou 26 perfis de restrição para o mesmo grupo de isolados (Fitzgerald *et al.*, 2001). Apesar de tudo, se considerarmos os grupos de isolados agrupados de acordo com os perfis mais frequentes obtidos com a utilização da enzima *Ddel* (p.e. perfis 1 e 6), verificamos que é possível discriminá-los ainda mais mediante a utilização da enzima *Hinfl*: essencialmente os perfis F, D e G (Fig. 3.11 secção 3.1.3.6) que já foram descritos como os mais prevalentes entre o grupo de perfis *flaA*-RFLP *Hinfl*. Por isso, no seu conjunto, os resultados obtidos sugerem que o nível de discriminação dos isolados pertencentes às espécies *C. jejuni* e *C. coli* por recurso à análise dos polimorfismos dos fragmentos de restrição do gene *flaA* pode ser melhorado, complementando a análise dos perfis *flaA*-RFLP *Ddel* com os perfis *flaA*-RFLP *Hinfl*, tal como havia sido sugerido anteriormente (Wassenaar & Newell, 2000).

**3.1.3.5. Análise fenética dos isolados em estudo com base nos polimorfismos identificados no gene *flaA***

De forma a aferir sobre a relação genética dos isolados com base nos polimorfismos identificados no gene *flaA*, recorreu-se ao *software* GelCompar II (Applied Maths). Com este programa, compararam-se os perfis de restrição obtidos para cada enzima, e, usando o índice de similaridade de Dice, obtiveram-se as respectivas matrizes de similaridade, a partir das quais se construíram os dendogramas (por recurso ao método UPGMA), exibidos nas figuras 3.9 e 3.10.



**Figura 3.9** - Dendograma obtido a partir da comparação dos diferentes perfis *flaA*-RFLP resultantes da utilização da enzima *HinfI*. O dendograma foi obtido com recurso ao método UPGMA, sendo apresentado o grau de similaridade na escala inferior. O grau de similaridade entre os diferentes perfis foi determinado pelo coeficiente de Dice. Cada letra na zona direita da imagem está associada ao respectivo perfil de restrição.



**Figura 3.10** - Dendograma obtido a partir da comparação dos diferentes perfis *flaA*-RFLP resultantes da utilização da enzima de restrição *DdeI*. O dendograma foi obtido com recurso ao método UPGMA, sendo apresentado o grau de similaridade na escala inferior. O grau de similaridade entre os diferentes perfis foi determinado pelo coeficiente de Dice. Cada número na zona direita da imagem está associado ao respectivo perfil de restrição.

Como se pode verificar na figura 3.9, a similaridade entre os perfis *flaA*-RFLP gerados pela enzima *HinfI* é relativamente reduzida, verificando-se, através desta análise, que para uma similaridade de cerca de 30% se distinguem dois grandes grupos de perfis (assinalados na figura como I e II). O grupo II, contém maioritariamente perfis originados exclusivamente por isolados da espécie *C. coli* (perfis E, H, I, J), enquanto que o grupo I é constituído por perfis originados por isolados de ambas as espécies. Apenas dois perfis (E e J) agrupam com similaridade superior a 70%.

A análise fenética dos perfis *flaA*-RFLP com a enzima *DdeI* (Figura 3.10) salienta a existência de vários grupos de perfis que partilham uma similaridade superior a 70%, existindo inclusive cinco grupos com similaridade superior a 80%. Apesar disso, de modo geral, a inclusão de perfis adicionais na comparação tende a gerar níveis de similaridade

significativamente mais baixos, o que traduz a elevada diversidade genotípica (baseada nos polimorfismos de gene *flaA*) dos isolados em estudo.

A análise da similaridade dos diferentes perfis *flaA*-RFLP gerados com as enzimas *Ddel* e *Hinfl* não revelou nenhum grupo bem definido relativamente às duas espécies em análise (*C. coli* e *C. jejuni*). Se considerarmos o perfil G associado maioritariamente à espécie *C. jejuni* verificamos que este agrupa com o perfil *flaA*-RFLP *Hinfl* gerado para a estirpe de referência *C. coli* CCUG 11283 com um grau de similaridade superior a 50%. Por outro lado, se considerarmos o perfil *flaA*-RFLP obtido com a enzima *Hinfl* para a estirpe de referência *C. jejuni* subsp. *jejuni* ATCC 33560 verificamos que este é coincidente com o perfil F associado, neste trabalho, exclusivamente à espécie *C. coli*.

No que diz respeito aos perfis gerados com a enzima *Ddel*, ambas as estirpes de referência demonstraram ter perfis únicos diferentes dos 48 identificados para o grupo de isolados analisados. O perfil da estirpe ATCC 33560 agrupou com o perfil 5 (*C. coli*) com um nível de similaridade superior a 50%, o mesmo nível de similaridade foi verificado para a estirpe CCUG 11283 que agrupou com o perfil 15 (*C. coli*).

Para a maioria dos grupos de perfis com níveis de similaridade superiores a 80% [perfis (40,10); (44, 33); (17, 16); (13, 31)] verifica-se a inclusão de isolados de ambas as espécies. No seu conjunto, estes resultados sugerem que apesar do gene *flaA* ser adequado para diferenciar intra-especificamente os isolados, tendo utilidade em estudos epidemiológicos, não permite a diferenciação a nível da espécie (variação inter específica) nem traduz a filogenia dos isolados.

### 3.1.3.6. Distribuição geográfica dos perfis *flaA*-RFLP

A análise da origem geográfica dos isolados em relação ao perfil *flaA*-RFLP gerado encontra-se representada na figura 3.11. No que diz respeito aos perfis *flaA*-RFLP obtidos com a enzima *Hinfl*, verifica-se uma distribuição ampla do perfil prevalente designado de F, tendo a ocorrência deste sido registada em todos os distritos amostrados, com a exceção de Braga. O segundo perfil mais prevalente (perfil D) foi registado nos distritos de Braga, Viseu, Aveiro, Leiria, Setúbal, Lisboa e Santarém, tendo ocorrido com maior frequência neste último distrito (53%). O perfil G (terceiro em prevalência) foi, por sua vez, registado com maior frequência em Setúbal (39%).

No que diz respeito aos perfis *flaA*-RFLP *Ddel* mais frequentes, os perfis 1 e 6 são os que se encontram mais amplamente distribuídos. O perfil 1 surge na grande maioria dos distritos amostrados, com exceção dos distritos de Évora, Braga e Castelo Branco (onde o número de isolados genotipados com origem nestes distritos também foi reduzido), enquanto que o perfil 6 foi obtido de isolados provenientes dos distritos de Setúbal, Lisboa, Santarém,

Leiria, Aveiro e Viseu, apresentando maior prevalência em Santarém (frequência relativa de 46%). O perfil 10 foi obtido a partir de isolados dos distritos de Santarém, Setúbal, Lisboa, Viseu e Castelo Branco, enquanto que a ocorrência do perfil 9 foi apenas registada nos distritos de Santarém e Setúbal.

A maioria dos isolados cujos perfis *flaA*-RFLP só ocorreram uma vez, estão associados a explorações individuais, isto é, cada perfil único associado a uma exploração diferente. As exceções correspondem à exploração CLIII, pertencente ao distrito de Setúbal, na qual se verificou a ocorrência de 4 isolados com quatro perfis *flaA*-RFLP *Ddel* distintos, os quais ocorreram unicamente nesta exploração e deram origem a perfis únicos (39, 30, 8 e 42) e à exploração CLIX, pertencente ao distrito de Lisboa, na qual se verificou a ocorrência dos perfis 26 e 27. Verificou-se ainda que os perfis únicos (identificados nas tabelas 3.3 e 3.4) foram encontrados essencialmente nos distritos com maior número de isolados analisados (Lisboa, Santarém, Leiria, Viseu, Setúbal).

De modo geral, tanto os isolados pertencentes à espécie *C. coli*, como os isolados da espécie *C. jejuni* estavam presentes na grande maioria dos distritos amostrados. No entanto, e apesar de se encontrarem em inferioridade numérica neste estudo, os isolados pertencentes à espécie *C. jejuni* foram, maioritariamente, oriundos do distrito de Setúbal (n=26), estando todos eles associados à exploração CLIII.

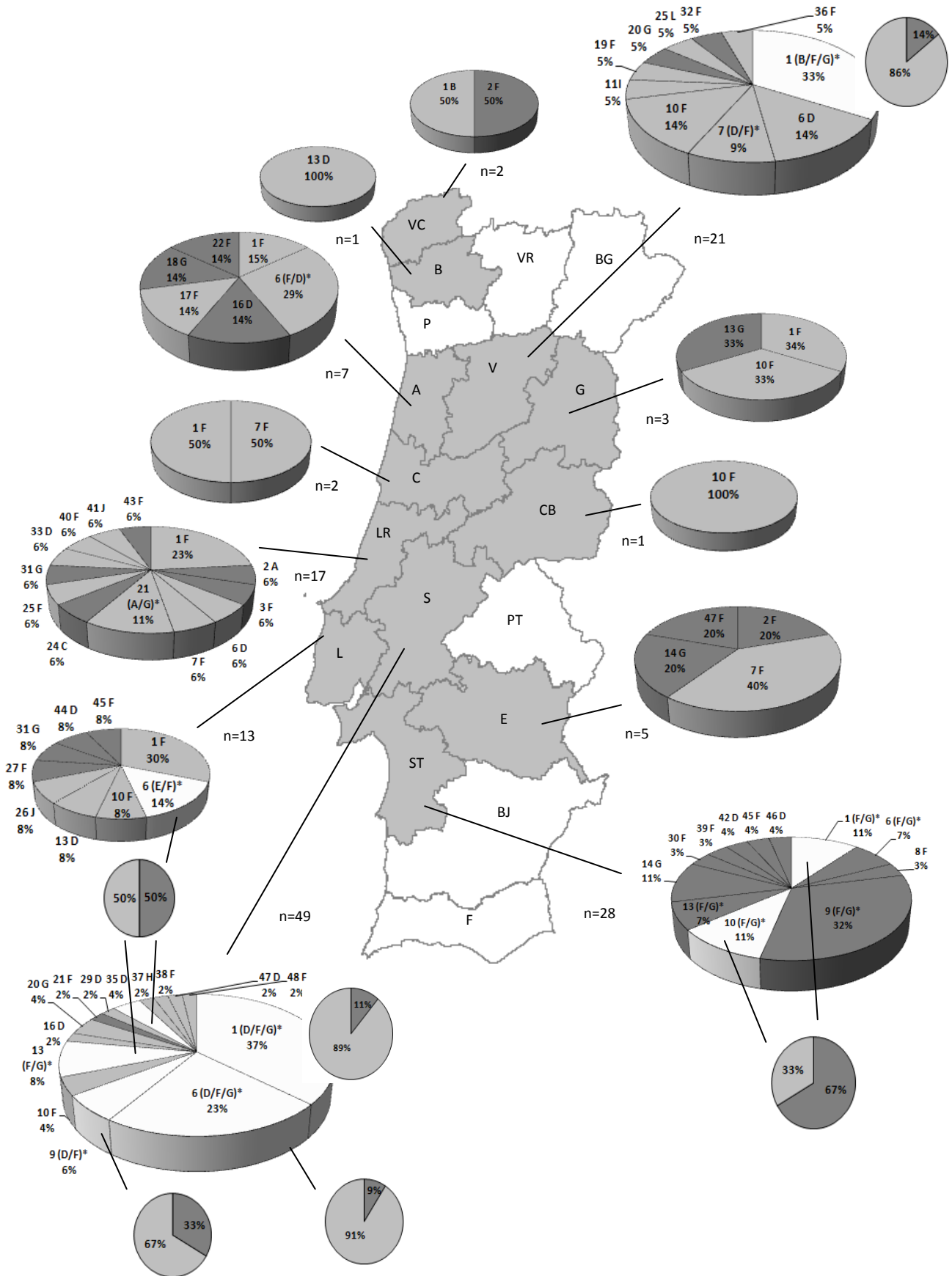


Figura 3.11 – A legenda encontra-se na página 96.

**Figura 3.11** – Representação gráfica indicando a distribuição geográfica e a frequência dos perfis *flaA*-RFLP obtidos dos isolados, para os quais se conhece o distrito da exploração de origem. Em cada gráfico os diferentes perfis *flaA*-RFLP obtidos com a enzima *DdeI* estão representados por numeração árabe enquanto que as letras representam o perfil *flaA*-RFLP obtido com a enzima *HinI*. Nos casos em que os isolados apresentam o mesmo perfil *flaA*-RFLP com a enzima *DdeI*, mas apresentam diferentes perfis *flaA*-RFLP com a enzima *HinI*, os diferentes perfis *flaA* - RFLP *HinI* são apresentados entre parêntesis (consultar Tabela 3.3 para mais informações sobre a frequência relativa dos perfis *flaA* - RFLP *HinI*). A frequência relativa de cada perfil no distrito considerado é apresentada em percentagem. Para a representação da espécie *C. jejuni* é utilizado um tom cinza-escuro, enquanto que para a representação da espécie *C. coli* é utilizado um tom cinza claro. Nas situações em que se obteve o mesmo perfil *flaA*-RFLP com a enzima *DdeI* para isolados das duas espécies, representou-se a branco a porção do gráfico correspondente a esse perfil comum, indicando-se não só a frequência relativa do perfil no distrito, mas também, num segundo gráfico, a frequência relativa correspondente a cada espécie (*C. jejuni* e *C. coli*) para esse mesmo perfil. As iniciais no mapa representam os diferentes distritos: VC – Viana do Castelo; B – Braga; VR – Vila Real; BR – Bragança; P – Porto; V – Viseu; A – Aveiro; G – Guarda; C – Coimbra; CB – Castelo Branco; LR – Leiria; S – Santarém; L – Lisboa; E – Évora; ST – Setúbal; BJ – Beja; F – Faro. O número de isolados genotipados por distrito é indicado pela letra n. Nota: dos 179 isolados caracterizados pela metodologia *flaA*-RFLP, 30 têm origem desconhecida.

### 3.1.3.7. Distribuição temporal dos perfis *flaA*-RFLP considerando isolados provenientes da mesma exploração

Como se pode verificar pela análise da Tabela 3.5, a grande maioria dos isolados provenientes da mesma exploração (análise efectuada para 68 isolados) mas obtidos em diferentes meses do ano durante o qual foi efectuada a amostragem das explorações, originaram perfis *flaA*-RFLP diferentes. Esta situação verificou-se, quer nos perfis originados pela utilização da enzima *DdeI*, quer pela enzima *HinI*. Só em algumas explorações do distrito de Santarém (CLVIII, LXXV, XXIII) se verificou a obtenção de isolados que, ao longo do tempo, originaram consistentemente o mesmo perfil de restrição do gene *flaA* com ambas as enzimas. O perfil 1F foi consistentemente obtido das explorações CLVIII e XXIII e o perfil 6D na exploração LXXV. Apesar disso, em outras situações em que se encontrou o mesmo perfil em diferentes períodos de amostragem, também se verificou a ocorrência simultânea de isolados com perfis diferentes, como é o caso da exploração XV.

**Tabela 3.5** – Distribuição dos perfis *flaA*-RFLP de isolados provenientes da mesma exploração pelos diferentes meses do ano em que foi realizado o estudo de prevalência (2008). A numeração árabe representa o perfil *flaA*-RFLP obtido com a enzima *DdeI* enquanto que as letras representam o perfil obtido com a enzima *HinfI*. Cada conjunto número/letra representa um isolado particular. A distinção entre isolados das duas espécies em estudo é efectuada mediante a utilização do símbolo (•) para isolados pertencentes à espécie *C. coli*. Entre parêntesis é indicado o número de isolados com o mesmo perfil de restrição associado.

Exploração (Distrito)	Meses						
	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro
CLIII (Setúbal)	42D 9F	1G, 10G 14G (3) 46D	1F •	9F (2)	9F (3)	8F, 30F, 9F (2) 13G, 13F, 6G, 6F, 1G, 9G	10G 10F • 45F, 39F
CLIV (Santarém)							1D • 37M • 6D •
CLIX (Lisboa)				27F, 26J •			
CLV (Santarém)		1F •					9D •, 13G
CLVIII (Santarém)	1F •			1F •			1F •
CLXI (Santarém)		6D • 20G •					
CXIII (Santarém)		9F •				21F	
CXV (Viseu)		10F •				6D •	
CXXXVIII (Lisboa)		44D 1F •					
L (Leiria)					1F •		41J •
LIIa (Santarém)		10F •				13F •	
LIV (Leiria)	7F •	21G •					
LXXV (Santarém)		6D •		6D •			
V (Santarém)					1F (2) •		
XCVI (Santarém)							29D • 38F •
XV (Évora)	2F	7F • 47F, 14G		7F •			
XXIII (Santarém)				1F •		1F •	
XXXIV (Lisboa)						6E •	6F

### 3.1.4. Genotipagem dos isolados baseada na análise dos polimorfismos dos macrofragmentos de restrição separados por electroforese de campo pulsado

A técnica de RFLP-PFGE tem sido considerada a metodologia de referência na genotipagem de *Campylobacter* spp., à semelhança do que se verifica para outros microrganismos, uma vez que, em contraste com a técnica de *flaA*-RFLP, se baseia na análise do genoma total (Klena & Konkel, 2005), sendo por isso mais discriminatória. As enzimas de restrição usadas neste tipo de abordagem para digerir o DNA cromossomal de bactérias do género *Campylobacter* variam em diferentes estudos, tendo sido utilizadas com resultados satisfatórios as seguintes: *SmaI*, *SalI*, *KpnI*, *ApaI* e *BssHII* (Wassenaar & Newell, 2000). As condições utilizadas na electroforese também variam de estudo para estudo, sendo que essas alterações podem, nalgumas situações, conduzir a aparentes diferenças nos perfis obtidos a partir da mesma preparação de DNA (Wassenaar & Newell, 2000).

Como se referiu anteriormente, para se obter uma caracterização genotípica mais discriminatória do grupo de isolados seleccionados para os estudos de formação de biofilmes (LNIV19, LNIV52, LNIV55, LNIV63, LNIV70, LNIV76, LNIV78, LNIV104 e LNIV216) procedeu-se à análise dos macrofragmentos de restrição do DNA genómico de cada isolado, separados por electroforese de campo pulsado [*Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE)]. Recorreu-se, para isso, à utilização da enzima *SmaI* de acordo com o protocolo descrito pela rede Campynet. São várias as variáveis que afectam a resolução global e a separação das moléculas de DNA, incluindo o tempo de corrida, a força iónica do tampão, o ângulo de reorientação, a concentração de agarose, a voltagem e o intervalo entre a alternância periódica dos campos eléctricos (*switch time*) (Herschleb *et al.*, 2007). No presente trabalho, foram testadas algumas condições para otimizar a separação dos macrofragmentos de restrição aquando da corrida electroforética, no entanto, devido a algumas limitações de ordem técnica (avaria irreversível do aparelho) não foi possível concluir o processo de optimização (Figuras 3.12 e 3.13).

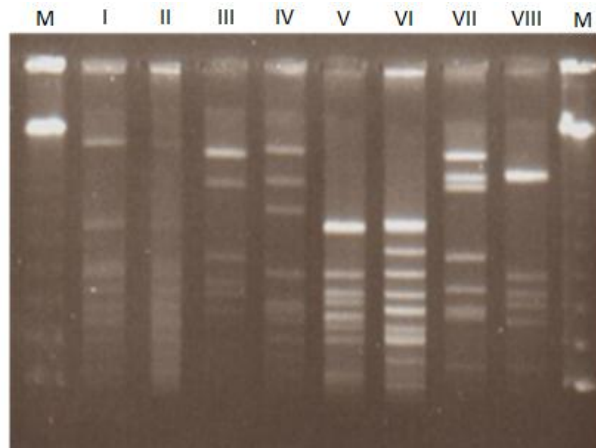
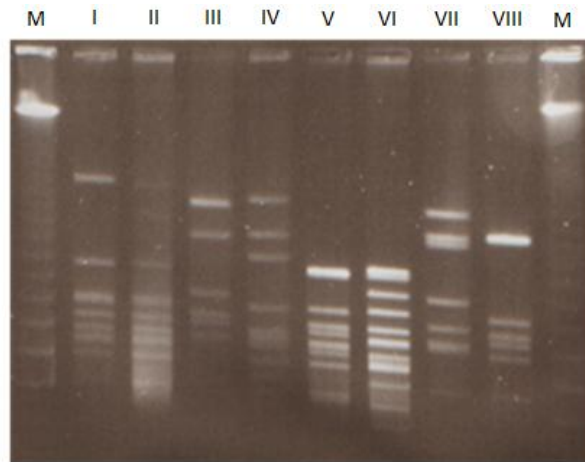


Figura 3.12 – Legenda na página 99.

**Figura 3.12** – Separação electroforética dos macrofragmentos de restrição de alguns dos isolados de *C. jejuni* e *C. coli* em estudo (I – LNIV76, II – LNIV19, III – LNIV52, IV – CCUG 11283, V – LNIV55, VI – LNIV104, VII – LNIV78, VIII – LNIV63). A primeira e última *lane* correspondem ao marcador molecular M (Lambda Ladder, BioRad). A electroforese decorreu num período total de 24 horas repartido por dois períodos de pulso (blocos) de 12 horas cada. No primeiro bloco utilizou-se um *switch time* de 0,5 s – 30 s e no segundo bloco alterou-se o *switch time* para 30 s – 40 s. A voltagem manteve-se constante ao longo da corrida (6 volt/cm).



**Figura 3.13** – Separação electroforética dos macrofragmentos de restrição de alguns dos isolados de *C. jejuni* e *C. coli* em estudo (I – LNIV76, II – LNIV19, III – LNIV52, IV – CCUG 11283, V – LNIV55, VI – LNIV104, VII – LNIV78, VIII – LNIV63). A primeira e última *lane* correspondem ao marcador molecular M (Lambda Ladder, BioRad). A electroforese decorreu num período total de 24 horas num único bloco em que se utilizou um *switch time* de 30 s – 40 s. A voltagem manteve-se constante ao longo da corrida (6 volt/cm).

Assim, seria desejável ter conseguido uma melhor separação das bandas correspondentes aos diferentes macrofragmentos de restrição, gerados pela enzima *Sma*I. Outro factor que teria de ser optimizado em experiências futuras, seria a concentração da suspensão celular utilizada inicialmente na preparação dos blocos de agarose, de modo a facilitar a análise dos fragmentos obtidos. Para além da estirpe de referência *C. jejuni* subsp. *jejuni* ATCC 33560, dois dos isolados caracterizados quanto à sua capacidade de formação de biofilme (LNIV70, LNIV216) não chegaram a ser caracterizados através desta metodologia.

A genotipagem de 9 isolados com os perfis *flaA*-RFLP [1F (2 isolados), 13D, 20G, 28F, 34D, 6G, 10F e 9D] originou 7 perfis RFLP-PFGE (perfil não determinado para os isolados LNIV70 e LNIV216, pelos motivos anteriormente mencionados) (Tabela 3.6). Apesar de aos isolados LNIV19 e LNIV76 corresponder o mesmo genótipo *flaA*-RFLP com as enzimas *Hinf*I e

*DdeI* (1F), após caracterização genotípica dos mesmos isolados pela técnica RFLP-PFGE, verificou-se que estes possuem genótipos diferentes, o que traduz a elevada capacidade discriminatória da técnica PFGE, comparativamente com a técnica *flaA*-RFLP.

De modo geral, os dados resultantes do estudo de genotipagem efectuada no presente trabalho apontam para uma elevada diversidade genética dos isolados de *Campylobacter* analisados, verificada através da metodologia *flaA*-RFLP e confirmada pela aplicação da metodologia PFGE em alguns dos isolados.

### **3.2. Estudo da formação de biofilme como possível mecanismo de persistência de *Campylobacter* na cadeia de processamento alimentar**

#### **3.2.1. Âmbito do estudo realizado**

Embora a carne de aves seja considerada um dos principais veículos de transmissão de espécies de *Campylobacter* patogénicas para o Homem, existem alguns estudos filogenómicos que, sendo controversos, têm evidenciado uma maior proximidade genética entre isolados clínicos e os de origem ambiental do que entre isolados clínicos e os obtidos de animais de produção (Champion *et al.*, 2005). Em alguns estudos tem-se verificado que os genótipos dos isolados que colonizam os frangos na exploração são diferentes dos isolados presentes nas respectivas carcaças em matadouro, evidenciando que a colonização das carcaças possa ter origem no ambiente do matadouro e sugerindo que algumas estirpes estejam melhor adaptadas para sobreviver às condições adversas presentes nos matadouros (Fitzgerald *et al.*, 2005). Apesar dos esforços para se reduzir o número de casos de campilobacteriose, os níveis de incidência mantêm-se elevados e as medidas higiénicas que levaram à redução dos níveis de prevalência de *Salmonella enterica* em frangos mantêm-se pouco eficazes no controlo de *Campylobacter*, o que se deve certamente a diferenças marcadas entre a biologia deste microrganismo e a de outros patogénicos entéricos (Ingmer, 2010). É, portanto, necessário esclarecer a fisiologia e os mecanismos de sobrevivência de *Campylobacter* em animais e durante o processamento e armazenamento de produtos cárneos. Uma melhor compreensão dos mecanismos de sobrevivência em ambientes fabris agressivos, onde se processam animais de produção que dão origem a produtos alimentares, e em que o microrganismo é exposto a temperaturas extremas, a concentrações tóxicas de oxigénio, a condições de stresse hiposmótico, à ausência de nutrientes e desidratação (Park, 2005; Jackson *et al.*, 2009), permitirá limitar a cadeia de transmissão. Existem evidências preliminares de que a capacidade de formação de biofilmes, variável em função das condições nutricionais e ambientais (Reeser

*et al.*, 2007), poderá contribuir para a sobrevivência destas bactérias em ambientes externos ao hospedeiro (Murphy *et al.*, 2006), nomeadamente na presença de oxigénio (Joshua *et al.*, 2006). Nesse contexto, efectuou-se, no presente trabalho, uma caracterização de um grupo seleccionado de isolados de *C. jejuni* e *C. coli* quanto à sua capacidade de formação de biofilmes em superfícies e condições ambientais típicas do processamento fabril de produtos de origem animal.

### 3.2.2. Selecção dos isolados e condições experimentais utilizadas para avaliação da capacidade de formação de biofilmes

De forma a aferir as condições que propiciam a formação de biofilmes por isolados de campo de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* em diferentes superfícies abióticas, seleccionou-se, de entre o conjunto de isolados em estudo na presente dissertação, um subgrupo de nove isolados (LNIV19, LNIV52, LNIV55, LNIV63, LNIV70, LNIV76, LNIV78, LNIV104, LNIV216, listados na Tabela 2.1). Essa selecção foi efectuada tendo em consideração, não só os genótipos *flaA*-RFLP mais frequentes determinados neste trabalho, bem como o fenótipo de resistência/susceptibilidade aos antibióticos eritromicina e ciprofloxacina, determinado fora do âmbito deste trabalho (Tabela 3.6).

**Tabela 3.6** – Genótipos dos isolados seleccionados para os ensaios de formação de biofilmes por recurso às diferentes metodologias utilizadas no presente trabalho (*flaA*-RFLP e RFLP-PFGE) e perfil de susceptibilidade à eritromicina (E) e ciprofloxacina (C), determinado de acordo com a metodologia proposta pelo CLSI [*The Clinical Laboratory Standard Institute* M31-A3 Vol.28 Nº8 (2008)]. Foram determinadas as CMI's e para atribuição da designação resistente (R) ou sensível (S) foram tidos em consideração os valores de referência epidemiológicos (*The epidemiological cut-off value* – ECOFF) estabelecidos pelo EUCAST ([http://www.srga.org/eucastwt/WT\\_EUCAST.htm](http://www.srga.org/eucastwt/WT_EUCAST.htm)) – eritromicina: > 16 µg/mL (*C. coli*), > 4 µg/mL (*C. jejuni*); ciprofloxacina: > 1 µg/mL (ambas as espécies).

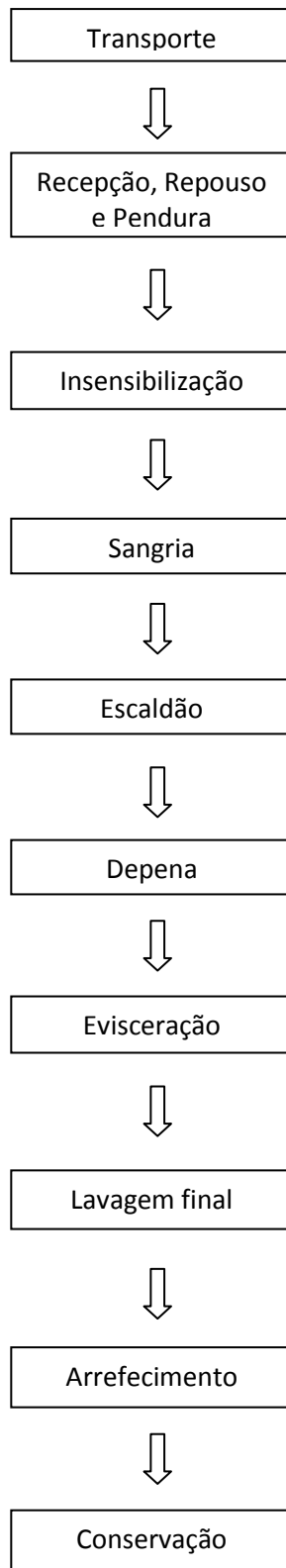
Isolado	Espécie	Resistência		Perfil <i>flaA</i> -RFLP	Perfil <i>flaA</i> -RFLP	Perfil RFLP-
		C	E	<i>DdeI</i>	<i>HinfI</i>	PFGE
LNIV104	<i>C. coli</i>	R	S	13	D	VI
LNIV19	<i>C. coli</i>	S	S	1	F	II
LNIV70	<i>C. jejuni</i>	S	S	20	G	N.D.

Isolado	Espécie	Resistência		Perfil <i>flaA</i> -RFLP	Perfil <i>flaA</i> - RFLP	Perfil RFLP-
		C	E	<i>DdeI</i>	<i>HinfI</i>	PFGE
LNIV63	<i>C. jejuni</i>	R	R	28	F	VIII
LNIV76	<i>C. coli</i>	R	R	1	F	I
LNIV52	<i>C. jejuni</i>	R	R	34	D	III
LNIV78	<i>C. jejuni</i>	R	S	6	G	VII
LNIV55	<i>C. coli</i>	R	R	10	F	V
LNIV216	<i>C. coli</i>	R	R	9	D	N.D.

N.D. – Não determinado.

Na indústria alimentar, podem encontrar-se biofilmes nas mais diversas superfícies, desde plástico, vidro, metal, madeira, até aos próprios produtos alimentares (Chmielewski & Frank, 2003). Sendo um dos objectivos da presente dissertação avaliar a capacidade de formação de biofilmes como possível mecanismo de persistência de *Campylobacter* na cadeia alimentar, e considerando a origem dos isolados estudados (cecos de frangos), achou-se pertinente a visita a uma unidade de processamento de frangos de corte de modo a acompanhar o processo (Fig. 3.14) e apurar condições de temperatura e superfícies que tipicamente entram em contacto com as carcaças. Na visita efectuada, verificou-se que o a grande maioria do material/equipamento existente ao longo da linha de processamento é constituído por aço inoxidável (Fig. 3.17), podendo também encontrar-se material plástico (p.e. polietileno, polipropileno, PVC) em superfícies de corte (Fig. 3.16) e em caixas de armazenamento do produto final (Fig. 3.18), e borracha, nos dedos mecânicos da depenadora (Fig. 3.15).

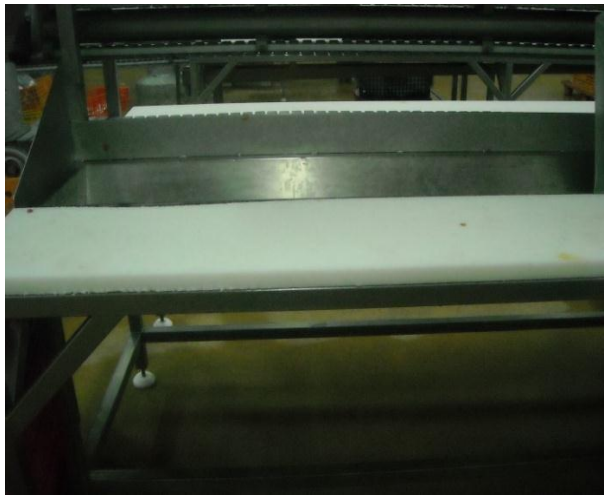
O processamento das carcaças em matadouro é realizado em ambiente controlado. Após o processo de evisceração, as carcaças devem ser mantidas a uma temperatura não superior a 4°C. Nos processos de desmancha, acondicionamento e embalagem, a temperatura da carne deve ser mantida refrigerada mediante uma temperatura ambiente de 12°C ou um sistema alternativo de efeito equivalente (Regulamento (CE) nº853/2004). A temperatura mais elevada a que podem ser sujeitas as carcaças ao longo do processamento, corresponde a 55°C durante o escaldão (Canôa, 2008). No final do processo, as carcaças são armazenadas em câmaras frigoríficas a uma temperatura próxima dos 0°C, garantindo-se que esta não ultrapassa os 4°C (Canôa, 2008).



**Figura 3.14** – Fluxograma das principais operações de processamento de carne de frango, em matadouro.



**Figura 3.15** – Máquina depenadora com dedos de borracha.



**Figura 3.16** – Mesa de corte.



**Figura 3.17** – Cubas em Aço inoxidável.



**Figura 3.18** – Caixas de PVC para transporte e armazenamento.

Assim, tendo em conta os materiais identificados durante a referida visita, foram seleccionados três tipos de superfícies abióticas para os ensaios realizados no presente trabalho: o aço inoxidável (superfície hidrofílica), o vidro (superfície hidrofílica), e o poliestireno (superfície hidrofóbica). Embora não se tenha identificado o poliestireno como uma das superfícies mais características destes processos, as microplacas que são utilizadas em laboratório para ensaios de formação de biofilmes em larga escala, permitindo o rastreio de uma grande quantidade de isolados/condições em simultâneo, são vulgarmente constituídas por este material. Além disso, as cuvetes utilizadas na embalagem do produto final contêm poliestireno. O vidro, embora também pouco comum nesta fase da produção, está presente nas superfícies da venda a retalho. Para além das superfícies mencionadas, consideraram-se várias variáveis que poderão exercer um papel fundamental na transição do crescimento do estado isolado para o crescimento na forma de biofilme, nomeadamente temperatura, tempo de incubação, condições atmosféricas (microaerofília versus aerobiose) e condições nutricionais, aferidas no presente trabalho pela utilização de diferentes meios de cultura. Estas condições foram testadas para a totalidade do painel de nove isolados seleccionados tendo-se, no entanto, efectuado uma triagem preliminar de várias condições experimentais, visando a escolha, para posteriores ensaios, dos isolados que exibiam maiores diferenças na capacidade de formação de biofilmes.

### 3.2.2.1. Ensaios preliminares para selecção das condições que promovem o crescimento em biofilme de *C. jejuni* e *C. coli*

As condições experimentais usadas nos ensaios de formação de biofilme *in vitro* foram previamente apuradas, testando-se a capacidade de formação de biofilmes dos isolados em microplacas de poliestireno, lâminas de vidro e lâminas de aço inoxidável.

Tal como anteriormente referido no capítulo *Material e Métodos*, os resultados referentes ao escrutínio de várias condições experimentais para a realização dos ensaios de biofilmes foram obtidos para cada conjunto de condições testadas a partir de uma experiência independente, calculando-se a média  $\pm$  erro padrão. No caso dos ensaios realizados em microplaca de poliestireno, foram utilizados, por meio de cultura e por isolado estudado, os valores de absorvância correspondentes a sete poços inoculados. No caso dos ensaios realizados com as lâminas de vidro ou aço inoxidável, os ensaios foram realizados em duplicado numa mesma ocasião, correspondendo à obtenção de dois valores para uma única experiência completamente independente. Assim, antes de se iniciar a descrição e análise de resultados referentes à abordagem experimental inicial, interessa mencionar os seguintes aspectos:

- (1) A quantificação do biofilme formado foi realizada através da leitura da absorvância a 570 nm (nos ensaios realizados em microplacas de poliestireno) ou 595 nm (nos ensaios em que se utilizaram as lâminas de vidro e aço inoxidável) de uma solução resultante da dissolução em etanol absoluto do violeta de cristal aderente às células agrupadas em biofilme;
- (2) Foram calculadas as médias dos valores de absorvância resultantes da aplicação da seguinte fórmula:

$$A = A_x - A_{x0}$$

Em que a absorvância efectiva (A) em cada poço da microplaca/tubo de Falcon contendo a superfície de vidro/aço corresponde à absorvância medida a 570 nm/595 nm ( $A_x$ ), subtraindo-se a absorvância medida no mesmo comprimento de onda no poço/tubo controlo da mesma microplaca/tubo contendo meio não inoculado ( $x_0$ ).

- (3) Nos ensaios em que se utilizaram microplacas de poliestireno, verificou-se, em algumas situações, que a formação de biofilme era negligenciável ou nula. Nesses casos, a subtracção do valor de absorvância registada no poço controlo aos valores de absorvância registados em cada poço inoculado, deu origem a valores próximos

de zero; deste modo, os valores de absorvância apresentados nos gráficos podem corresponder:

- À média de até sete valores de absorvância;
- A apenas um valor de absorvância (assinalado com \* nos gráficos);  
ou
- Nos casos em que a subtração foi zero, utilizou-se a abreviatura NQ de não quantificável.

(4) É de salientar que, apesar de, em alguns casos, se ter verificado a formação de um biofilme considerável em microplacas de poliestireno, também se verificou nalgumas situações alguma discrepância entre a observação visual do biofilme e a quantificação do mesmo através da leitura de absorvância a 570 nm da solução de etanol-violeta de cristal. Esta situação deveu-se à dificuldade de se efectuar a completa solubilização do violeta de cristal aderido às células agrupadas em biofilme, sem aplicação de força mecânica, presumivelmente devido ao facto do biofilme ser constituído por agregados celulares estáveis, firmemente associados à superfície. Esta dificuldade experimental levou a que, em alguns casos, se subestimasse a quantidade de biofilme formado.

Nas Tabelas 3.7 e 3.8 são apresentadas as condições testadas para cada um dos isolados seleccionados, mencionando-se o conjunto de condições específicas nas quais se conseguiu detectar biofilme por parte de alguns dos isolados seleccionados.

**Tabela 3.7** – Resumo das condições experimentais testadas (meio de cultura, temperatura, período de incubação, arejamento, atmosfera) para apuramento preliminar das variáveis que favorecem a formação de biofilme em microplacas de poliestireno.

Isolado (espécie)	Meios de cultura					Temperatura (°C)				Período de incubação (horas)					Agitação		Aerobiose	Microaerofília	Observação
	TSB	MHB	BB	LB	BHI	6	T. a.	37	42	24	62	72	120	135	Sim	Não			
LNIV19 ( <i>C. coli</i> )	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X (40 rpm)	X	X	X	2
LNIV52 ( <i>C. jejuni</i> )	X	X	X	X				X	X	X	X	X		X	X (40 rpm)	X	X	X	2
LNIV55 ( <i>C. coli</i> )		X	X	X				X	X		X			X		X	X	X	2
LNIV63 ( <i>C. jejuni</i> )	X	X	X		X	X	X	X	X		X	X	X	X	X (40 rpm)	X	X	X	1
LNIV70 ( <i>C. jejuni</i> )		X	X		X			X	X		X			X		X	X	X	2
LNIV76 ( <i>C. coli</i> )	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X (40 rpm)	X	X	X	1, 2
LNIV78 ( <i>C. jejuni</i> )		X	X	X				X	X		X			X		X	X	X	-
LNIV104 ( <i>C. coli</i> )	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X (40 rpm)	X	X	X	1, 2
LNIV216 ( <i>C. coli</i> )		X	X					X			X					X	X	X	-

Legenda: T.a. – Temperatura ambiente (não controlada ou monitorizada); rpm – rotações por minuto

1 – Biofilme formado na interface líquido-ar à temperatura ambiente (não monitorizada), em aerobiose, durante 72 h; 2 – Biofilme formado na interface líquido-ar a 37°C, em aerobiose, durante 135 h.

**Tabela 3.8** – Resumo das condições experimentais testadas (meio de cultura, temperatura, período de incubação, arejamento, atmosfera) para apuramento preliminar das variáveis que favorecem a formação de biofilme em lâminas de vidro e aço inoxidável.

Isolado (espécie)	Meios de cultura					Temperatura (°C)				Período de incubação (horas)					Agitação		A	M	V	AI	Observação
	TSB	MHB	BB	LB	BHI	6	T. a.	37	42	24	62	72	120	135	Sim	Não					
LNIV19 ( <i>C. coli</i> )		X	X						X			X				X		X	X	X	1
LNIV63 ( <i>C. jejuni</i> )		X	X				X		X			X				X	X	X	X	X	
LNIV70 ( <i>C. jejuni</i> )		X	X						X			X				X		X	X	X	
LNIV76 ( <i>C. coli</i> )		X	X				X					X				X	X		X		
LNIV104 ( <i>C. coli</i> )		X	X						X			X				X		X	X	X	1

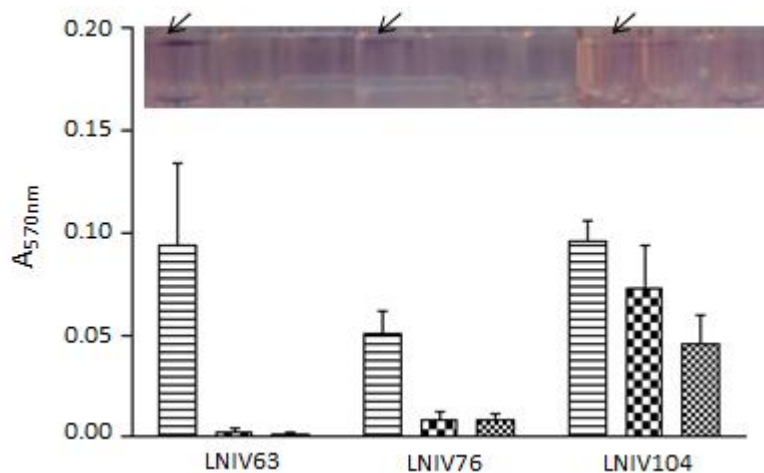
Legenda: T.a. – Temperatura ambiente (não monitorizada); A - Aerobiose; M – Microaerofília; V – Vidro; AI – Aço Inoxidável

1 – Formação de biofilme na interface líquido-ar, em lâmina de vidro, após período de incubação de 72 h, em microaerofília, a 42°C.

### 3.2.2.1.1. Avaliação da capacidade de formação de biofilmes em poliestireno e aerobiose

Após diluição das culturas de células, recolhidas na fase exponencial do crescimento, inocularam-se microplacas de poliestireno de 96 poços contendo meio TSB, BB, MHB, BHI ou LB, tendo-se procedido à sua incubação a 6°C, temperatura ambiente, 37°C, ou 42°C, com ou sem agitação, durante períodos variáveis.

A formação de biofilme pelos isolados LNIV63, LNIV76 e LNIV104 à temperatura ambiente (que não foi monitorizada ao longo do período de incubação) e em aerobiose, mostrou-se claramente dependente do meio de cultura, tendo-se verificado a formação de biofilme na interface líquido-ar que, apesar de ser visualmente pouco exuberante, foi, para os três isolados, mais abundante em meio de cultura BB. No caso do isolado LNIV104, verificou-se que o meio MHB também promoveu a formação de biofilme (Fig. 3.19). Apesar de o biofilme formado pelo isolado LNIV63 ser visualmente maior que o biofilme formado pelo isolado LNIV104, os valores de absorvância a 570 nm obtidos são muito semelhantes, devido à dificuldade em solubilizar o biofilme (Fig. 3.19).

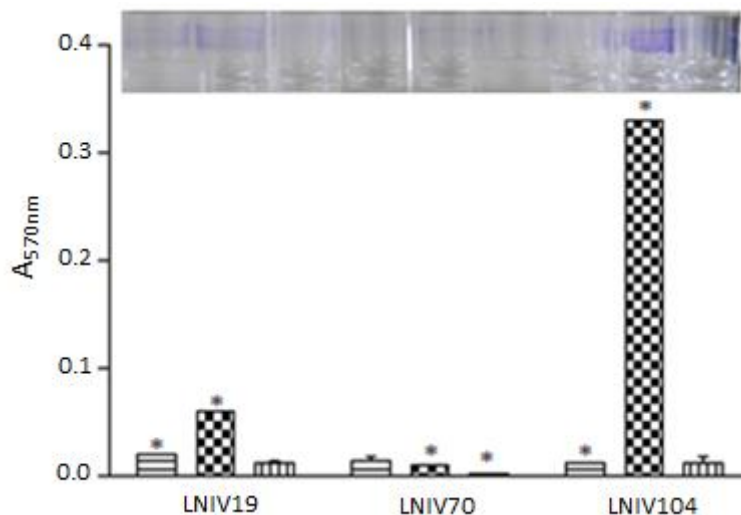


**Figura 3.19** – Quantificação do biofilme formado pelos isolados LNIV63, LNIV76 e LNIV104, após um período de incubação de 72 h, em aerobiose, à temperatura ambiente (não monitorizada), sem agitação. A absorvância a 570 nm ( $A_{570nm}$ ) indica a quantidade de violeta de cristal, após solubilização do biofilme em etanol absoluto. O biofilme visível formou-se na interface líquido-ar tal como assinalado pelas setas na fotografia em cima. Legenda: BB (≡); MHB (▣); TSB (⊞).

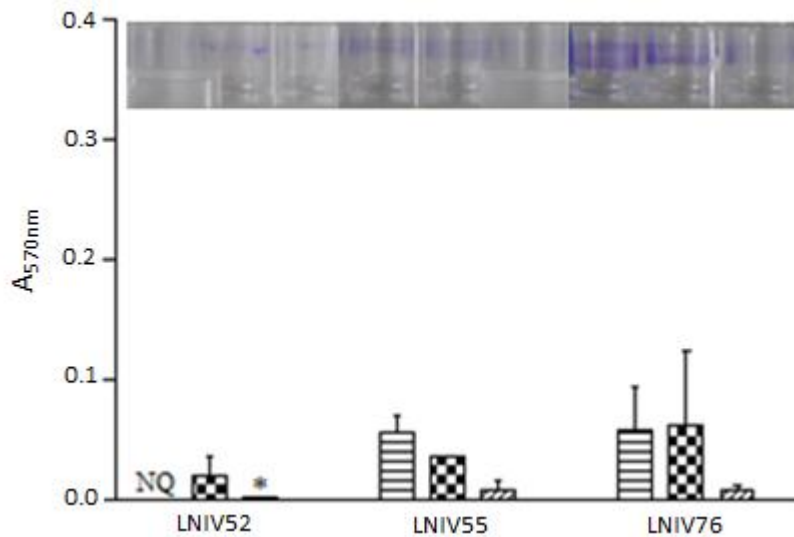
Neste ensaio, a microplaca de poliestireno foi colocada na bancada de laboratório, sem controlo ou monitorização da temperatura da sala. Apesar de difícil de reproduzir resultados nestas condições, nesta experiência investigou-se se a temperatura ambiente não controlada, com a ocorrência de amplitudes térmicas que também se verificam no

processamento e venda a retalho dos alimentos, poderia propiciar formação de biofilme, tendo-se observado, pela primeira vez, a formação de biofilme pelo isolado LNIV104, em meio de cultura BB e MHB (Fig. 3.19). Os ensaios seguintes realizaram-se sempre a temperaturas controladas.

A 37°C (temperatura controlada termostaticamente), em condições de aerobiose, verificou-se, após 135 h, a formação de biofilme visível para os isolados LNIV19, LNIV52, LNIV55, LNIV70, LNIV76 e LNIV104 (Figuras 3.20 e 3.21). Apesar do meio BB também favorecer a formação de biofilme para os isolados LNIV19, LNIV55 e LNIV76 nestas condições, verificou-se que o crescimento em meio MHB promove a formação de biofilme para todos os isolados testados e propicia a formação de biofilmes de maior dimensão, sendo mais evidente para os isolados LNIV19, LNIV104 e LNIV76 (Fig. 3.20 e 3.21). A quantidade dos biofilmes formados pelo isolado LNIV104 foi mais exuberante no ensaio a 37°C, por comparação com o ensaio realizado à temperatura ambiente, no entanto o período de incubação a 37°C foi superior.

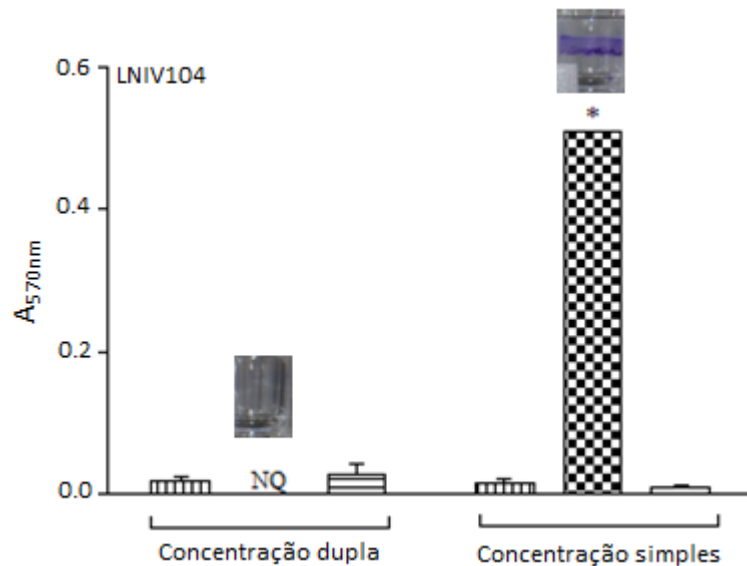


**Figura 3.20** – Quantificação do biofilme formado pelos isolados LNIV19, LNIV70 e LNIV104, após um período de incubação de 135 h, em aerobiose, a 37°C, sem agitação. A absorvância a 570 nm ( $A_{570nm}$ ) indica a quantidade de violeta de cristal, após solubilização do biofilme em etanol absoluto. Legenda: BB (▨); MHB (▩); BHI (▧). As barras assinaladas com (\*) correspondem a valores de absorvância únicos.



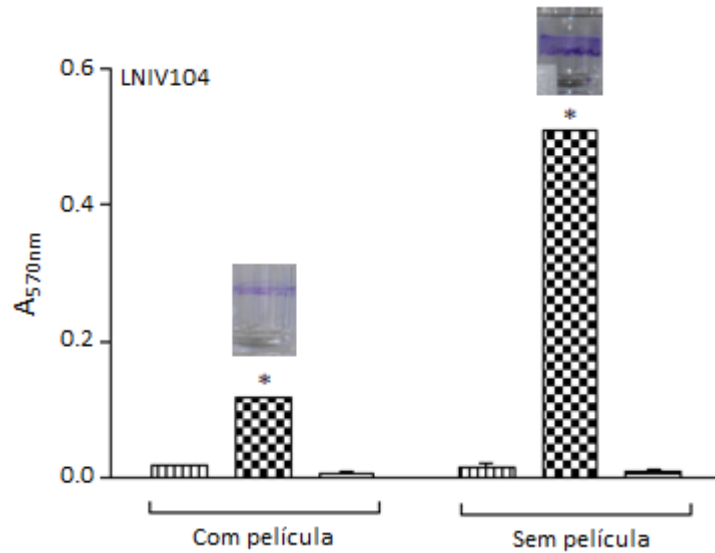
**Figura 3.21** – Quantificação do biofilme formado pelos isolados LNIV52, LNIV55 e LNIV76, após um período de incubação de 135 h, em aerobiose, a 37°C, sem agitação. A absorvância a 570 nm ( $A_{570nm}$ ) indica a quantidade de violeta de cristal, após solubilização do biofilme em etanol absoluto. Legenda: BB (▨); MHB (▩); LB (▧). A barra assinalada com (\*) corresponde a um valor de absorvância único e a abreviatura NQ assinala que o biofilme negligenciável formado pelo isolado LNIV52 no ensaio realizado em meio BB foi classificado como não quantificável.

Para todos os isolados nos quais se observou capacidade de formação de biofilme em microplacas de poliestireno, verificou-se que o biofilme formado ocorre preferencialmente na interface líquido-ar. Surpreendentemente, em todas as situações em que se verificou a formação de biofilme, esta observou-se com maior expressão nos poços da periferia da microplaca (frentes visualizadas nas Figs. 3.19, 3.20 e 3.21), o que explica, nesses casos, a apresentação de barras de erro maiores associadas à média amostral. Nestes poços existe, inevitavelmente, uma maior evaporação do meio de cultura e da suspensão celular, havendo, conseqüentemente, um efeito de concentração dos nutrientes presentes. Assim, de forma a se avaliar se a disponibilidade de nutrientes estaria envolvida na formação do biofilme, testaram-se três meios de cultura em concentração simples e em concentração dupla, respectivamente. Como se pode observar da figura 3.22, a variação da concentração do meio MHB interferiu com a capacidade de formação de biofilme do isolado LNIV104, verificando-se formação de biofilme apenas no ensaio em que o isolado foi crescido em meio simples (concentração simples), indicando que o aumento de biofilme na periferia da placa, provavelmente, não se deve a um aumento da concentração de nutrientes resultante da evaporação.



**Figura 3.22** – Avaliação do efeito da variação da concentração do meio (concentração simples ou concentração dupla). Ensaio realizado em microplacas de poliestireno, em aerobiose, a 37°C, num período de incubação de 120 h. Todos os ensaios representados são referentes a apenas um dos isolados seleccionados (LNIV104). O ensaio realizado em meio MHB em concentração dupla está assinalado na figura com a abreviatura NQ (Não quantificável). A barra assinalada com (\*) corresponde a apenas um valor de absorvância. Legenda: BB (▨); MHB (▩); BHI (▧).

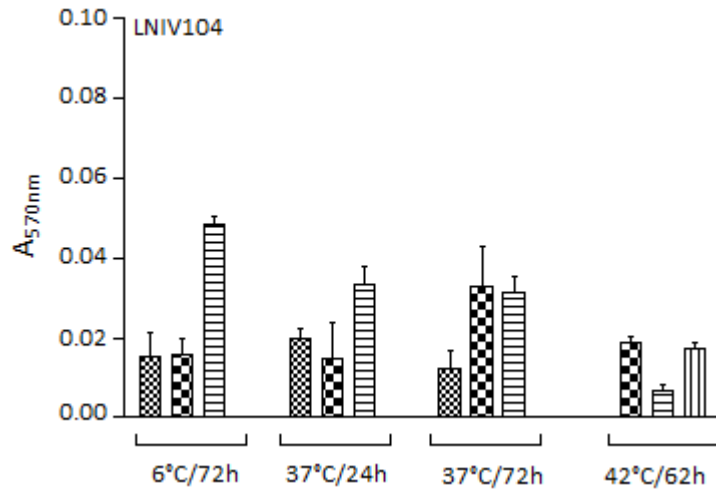
Assim, rejeitada a anterior hipótese, ponderou-se a possibilidade de o aumento da formação de biofilme verificado na periferia da microplaca de poliestireno se dever a uma resposta das células ao efeito da desidratação resultante da maior evaporação do meio de cultura. Para testar esta hipótese, realizaram-se dois ensaios exactamente nas mesmas condições com a diferença de que, num deles, a microplaca possuía uma película aderente a tapar a abertura dos poços de modo a limitar a evaporação do meio (Fig. 3.23). Apenas se registaram diferenças na quantidade de biofilme formado para o meio MHB, uma vez que, a minimização das perdas por evaporação através da colocação da película, levou à formação de um biofilme claramente menos extenso do que o que foi formado na microplaca sem película aderente à superfície (Fig. 3.23). Para o crescimento nos restantes meios, não se verificaram diferenças, uma vez que a quantidade de biofilme formado foi reduzida, quer na presença da película quer na sua ausência.



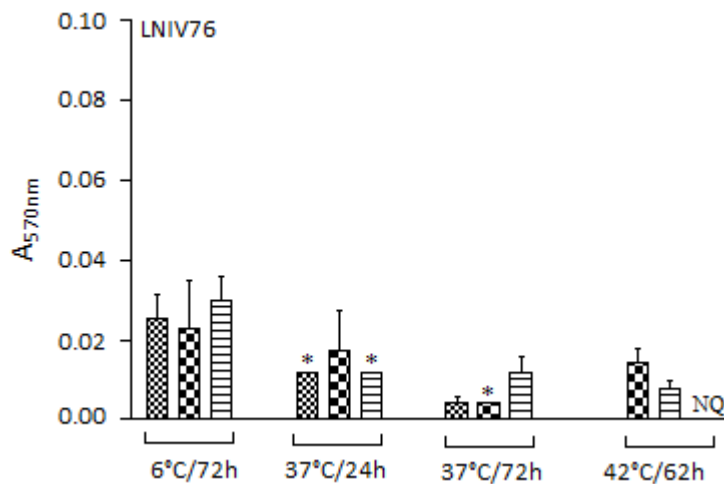
**Figura 3.23** – Avaliação do efeito da desidratação. Foram utilizadas duas microplacas, uma sem película e outra com película aderente à superfície para limitar os efeitos da evaporação do meio. Os ensaios foram realizados em aerobiose, a 37°C, durante um período de incubação de 120 h. Todos os ensaios representados são referentes a apenas um dos isolados seleccionados (LNIV104). As barras assinaladas com (\*) correspondem a apenas um valor de absorvância. Legenda: BB (▨); MHB (▩); BHI (▧).

#### 3.2.2.1.2. Avaliação da capacidade de formação de biofilmes em poliestireno e microaerofília

No que diz respeito ao estudo do efeito da microaerofília na quantidade dos biofilmes formados, para os isolados LNIV104 e LNIV76 verificou-se que, independentemente das diferentes variáveis consideradas (meio de cultura, tempo de incubação, temperatura), a quantidade de biofilme formado (Figs. 3.24 e 3.25) era claramente inferior à quantidade do biofilme formado em aerobiose, registada sobretudo a 37°C (Figs. 3.20 e 3.21). Dada a natureza microaerofílica de bactérias do género *Campylobacter*, estes resultados sugerem que a formação de biofilmes em condições de aerobiose possa ser uma resposta ao stresse oxidativo gerado pela presença de oxigénio. Em microaerofília, também se registou um ligeiro aumento da quantidade de biofilmes a 6°C para ambos os isolados, por comparação com as restantes temperaturas testadas, ainda que, no seu conjunto, os valores da absorvância a 570 nm obtidos fossem baixos (Figs. 3.24 e 3.25).



**Figura 3.24** - Formação de biofilme em microplacas de poliestireno, em microaerofília, pelo isolado LNIV104. Os ensaios a 6°C e 42°C, foram realizados sem agitação, enquanto que os ensaios a 37°C foram realizados com agitação ( $\approx$  40 rpm). Legenda: TSB (▨); MHB (▩); BB (▧); BHI (▦).



**Figura 3.25** - Formação de biofilme em microplacas de poliestireno, em microaerofília, pelo isolado LNIV76. Os ensaios a 6°C e 42°C foram realizados sem agitação, enquanto que o ensaio a 37°C foi realizado com agitação ( $\approx$  40 rpm). O ensaio realizado a 42°C durante 62 h em meio de cultura LB originou um biofilme negligenciável pelo que está assinalado na figura com a abreviatura NQ (Não quantificável). As barras assinaladas com (\*) correspondem a um valor de absorvância único. Legenda: TSB (▨); MHB (▩); BB (▧); LB (▦).

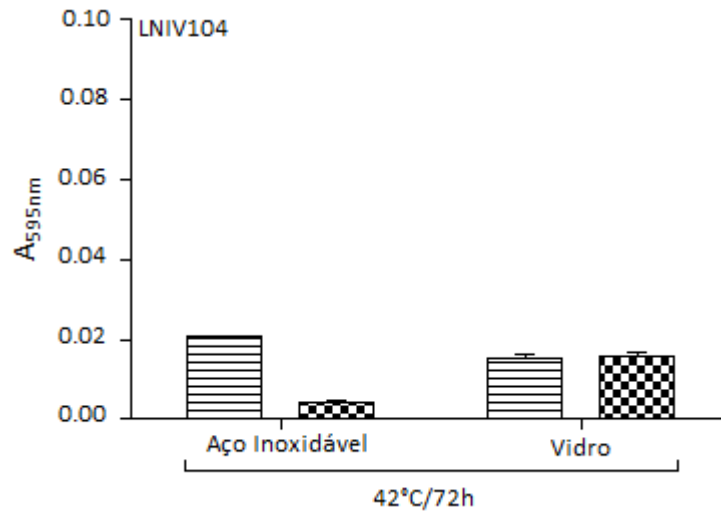
Resumindo, os dados obtidos dos ensaios realizados para aferir as condições que promovem o crescimento de *C. jejuni* e *C. coli* em biofilme em microplacas de poliestireno,

ainda que preliminares, sugerem que a capacidade de formação de biofilme na superfície considerada poderá variar de acordo com:

- **Disponibilidade de nutrientes:** dos meios de cultura testados, os meios MHB e BB aparentam promover a formação de biofilme em maior quantidade para alguns dos isolados seleccionados.
- **Constituição da atmosfera:** só se verificou a formação de biofilme visível na interface líquido-ar em condições de aerobiose.
- **Temperatura:** a formação de biofilme depende da temperatura de incubação, estando, aparentemente, favorecida a 37°C e à temperatura ambiente (ainda que esta não tenha sido monitorizada).
- **Humidade:** sob condições de desidratação, a formação de biofilme foi favorecida.
- **Período de incubação:** apesar de não ser possível, em todos os casos apresentados, a comparação directa dos valores da quantidade de biofilme formado nas diferentes condições, os resultados reunidos apontam para uma dependência do tempo de incubação, registando-se um aumento com o aumento do período de incubação, em condições de aerobiose.
- **Agitação:** Apenas nos ensaios realizados sem a introdução da variável “arejamento (agitação)” se verificou a formação de biofilme.

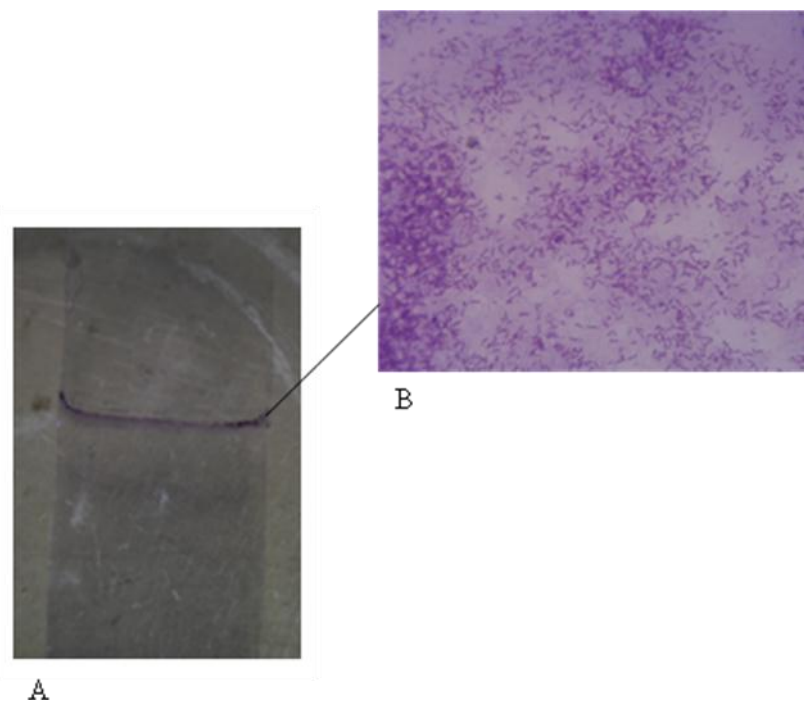
#### **3.2.2.1.3. Avaliação da capacidade de formação de biofilmes em vidro e aço, em microaerofília**

Em relação ao apuramento das condições que favorecem o crescimento dos isolados em biofilme em lâminas de vidro e aço inoxidável, foram também realizados alguns ensaios preliminares, efectuados apenas em condições de microaerofília. Optou-se por testar dois meios de cultura, nomeadamente o meio BB e o meio MHB, seleccionados com base nos resultados obtidos durante os ensaios realizados em microplacas de poliestireno. Nestas condições, verificou-se, para o isolado LNIV104, que a quantidade de biofilme formado foi, com base na leitura de absorvância a 595 nm da solução etanol-violeta de cristal, muito reduzida independentemente do meio de cultura e das superfícies utilizadas (Fig. 3.26).



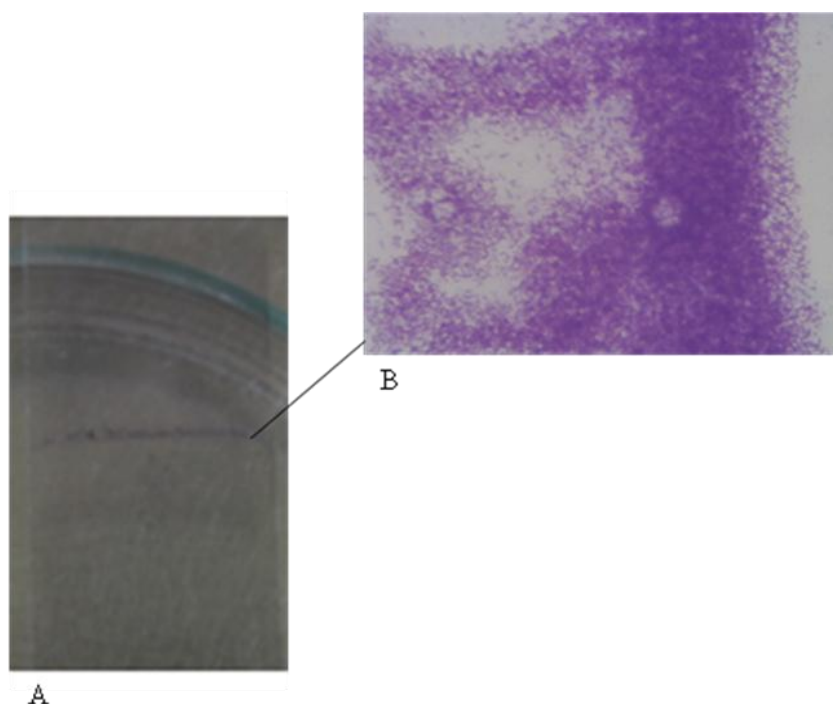
**Figura 3.26** – Avaliação do tipo de superfície como suporte ao crescimento em biofilme. Ensaio realizado em tubos de Falcon, com lâminas de vidro e aço inoxidável, em microaerofilia (42°C, 72 h). O ensaio representado é referente a apenas um dos isolados seleccionados (LNIV104). Legenda: MHB (▣); BB (▨).

No entanto, num dos ensaios preliminares realizados em lâminas de vidro, observou-se macroscopicamente a formação de biofilme considerável em dois dos isolados examinados (LNIV19 e LNIV104). A observação microscópica dos biofilmes encontra-se representada nas Figuras 3.27 e 3.28, estando, no entanto, impossibilitada a sua quantificação devido à preparação microscópica realizada para visualização com maior detalhe.



**Figura 3.27** – Legenda na página 118.

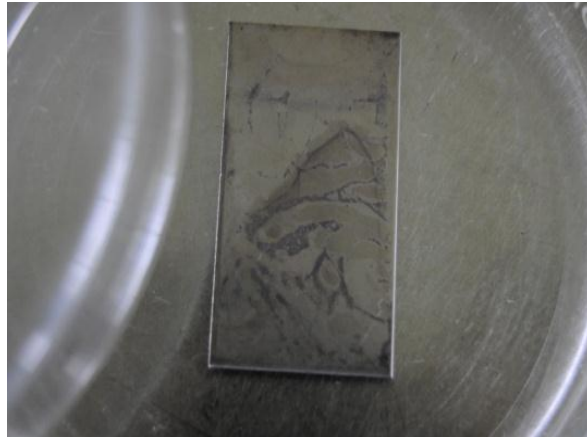
**Figura 3.27** – (A) Biofilme formado na interface líquido - ar pelo isolado LNIV104, em condições de microaerofília, a 42°C, durante 72 h, em meio MHB (lâmina de vidro). (B) Observação microscópica (100x) do biofilme formado demonstrando o agrupamento expressivo de bastonetes.



**Figura 3.28** – (A) Biofilme formado na interface líquido - ar pelo isolado LNIV19, em condições de microaerofília, a 42°C, durante 72 h, em meio MHB (lâmina de vidro). (B) Observação microscópica (100x) do biofilme formado.

Tal como evidenciado nas Figuras 3.27 e 3.28 verificou-se, no caso das lâminas de vidro, que a formação de biofilme é favorecida na interface líquido-ar, observando-se por microscopia uma zona mais densa de bastonetes junto à interface líquido-ar. À medida que o campo de visualização se afastou da zona da interface com o líquido, observavam-se aglomerados muito menos densos de bactérias. Nas lâminas de aço inoxidável, no caso do isolado LNIV104 (Fig. 3.29), observou-se a ocorrência de biofilme na superfície submersa em meio de cultura. Há que considerar, no entanto, que as lâminas de vidro (7,5 cm x 2,5 cm) e as lâminas de aço inoxidável (4,5 cm x 2,5 cm) utilizadas nestes ensaios possuíam dimensões diferentes e que o volume de meio de cultura utilizado foi igual para ambas as situações (50 mL); deste modo, a coluna de ar à qual foi exposta a lâmina de aço inoxidável é bastante inferior comparativamente com a lâmina de vidro. Em ensaios posteriores, otimizou-se a situação, colocando-se ambas as superfícies em condições equivalentes, utilizando-se para o

efeito, lâminas com as mesmas dimensões e, ainda, reduzindo o volume de meio de cultura que passou para 15 mL.



**Figura 3.29** - Biofilme formado pelo isolado LNIV104, em condições de microaerofília, a 42°C, durante 72 h, em meio MHB (lâmina de aço inoxidável).

Verificou-se, ainda, para alguns dos isolados estudados que, apesar da formação de biofilme ser observável em lâminas de aço inoxidável (Fig. 3.29), quando se efectuou a quantificação do mesmo, esta não se reflectiu num valor de absorvância a 595 nm elevado ( $A_{595nm} = 0,003$ ). Esta discrepância deveu-se, tal como referido em anteriores casos, à dificuldade em causar a disrupção do biofilme sem agressão mecânica e, conseqüentemente, solubilizá-lo. Em ensaios posteriores, para a solubilização completa dos biofilmes formados em lâminas de vidro e aço inoxidável, foi necessário recorrer a um processo de raspagem dos mesmos, de forma a conseguir quebrar a forte ligação estabelecida com a superfície.

### 3.2.3. Avaliação do crescimento em biofilme como resposta ao stresse ambiental

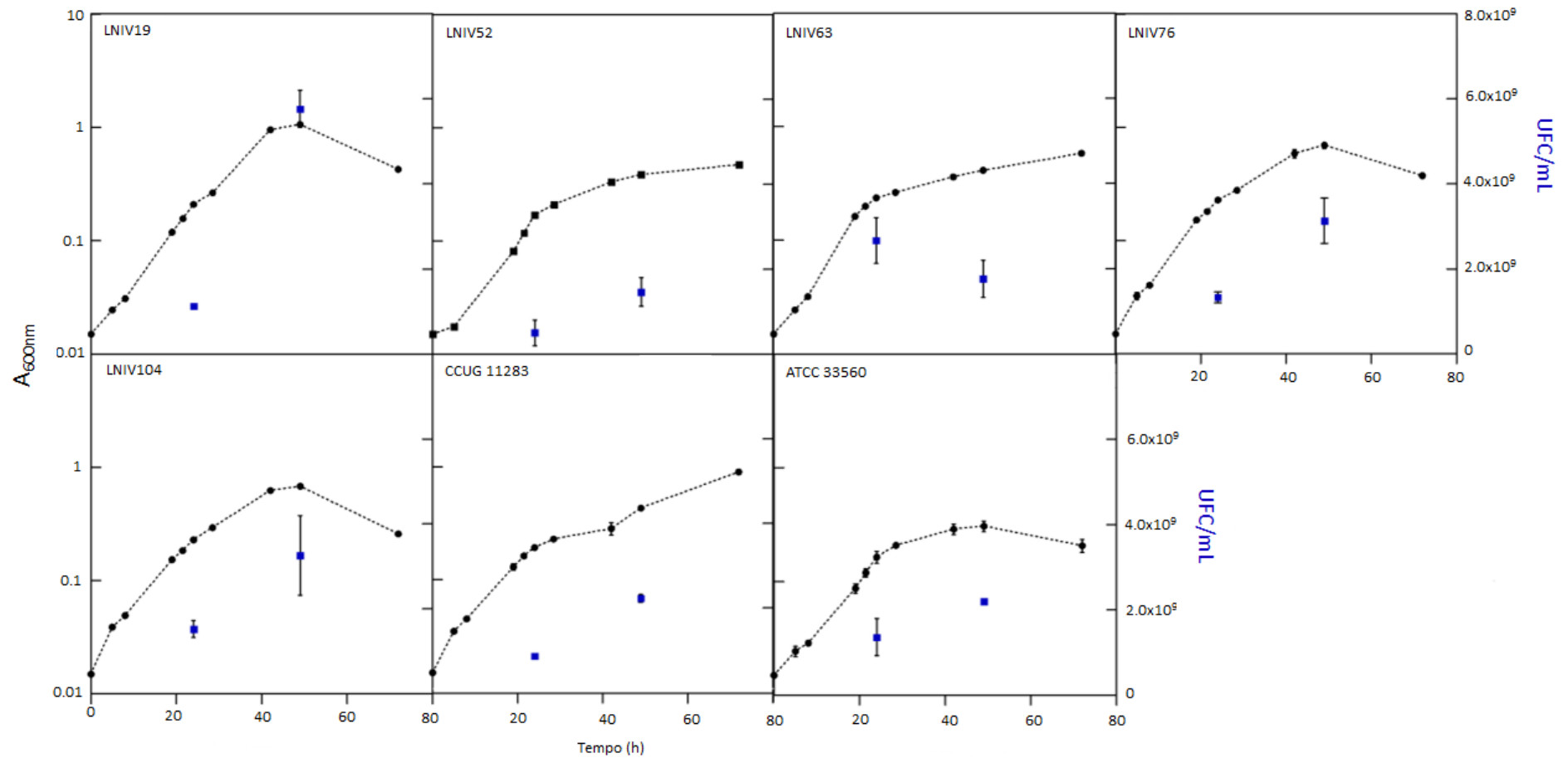
Após a identificação de condições experimentais que favorecem a formação de biofilme, nomeadamente o crescimento em meio MHB, deu-se continuidade ao estudo da caracterização do crescimento dos isolados em biofilme em diferentes superfícies apenas com o grupo de isolados que demonstrou formação de biofilme nas condições preliminares testadas, excluindo-se os isolados LNIV55, LNIV70, LNIV78 e LNIV216. Apesar de o isolado LNIV55 ter apresentado maior capacidade de formação de biofilme do que o isolado LNIV52 (em condições de aerobiose, 135 h, 37°C), optou-se por manter o isolado LNIV52 na caracterização mais aprofundada por pertencer à espécie *C. jejuni*, que, do ponto de vista epidemiológico, é mais relevante. Sendo assim, mantiveram-se os isolados LNIV104, LNIV19 e LNIV76, da espécie *C. coli*, que representam dois dos genótipos *flaA*-RFLP mais prevalentes [1F

(n=2) e 13D]; e os isolados LNIV52 e LNIV63, da espécie *C. jejuni*, que representam dois genótipos *flaA*-RFLP *Ddel* únicos (perfis 28 e 34).

### 3.2.3.1. Determinação das taxas específicas de crescimento dos isolados em estudo

Para averiguar se as diferenças observadas entre os isolados na capacidade de formação de biofilmes não se deviam a divergências nas taxas de crescimento em cultura descontínua, caracterizou-se o crescimento de cada isolado em condições padrão, isto é, em microaerofília, a 37°C, durante 72 h, utilizando-se, para o efeito, o meio de cultura MHB (que foi o meio seleccionado para o prosseguimento do estudo) (Fig. 3.30), tendo-se determinado as taxas específicas de crescimento (Fig. 3.31).

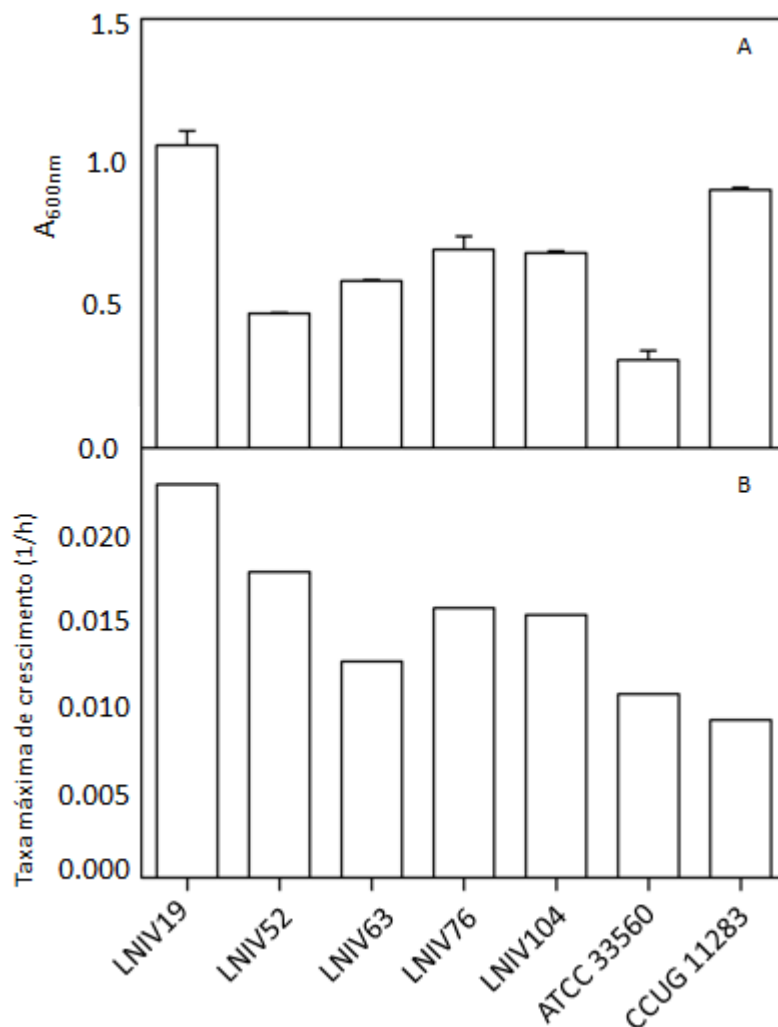
Como se pode verificar na figura 3.30, os isolados LNIV19, LNIV76 e LNIV104 cresceram exponencialmente até às 42h. Às 49h, a  $A_{600nm}$  era ligeiramente superior e, às 72h, as culturas celulares já se encontravam em fase de declínio (morte celular). Por sua vez, os isolados LNIV52 e LNIV63, cresceram exponencialmente até às 24h, verificando-se após esse período um aumento ligeiro da  $A_{600nm}$  que se manteve até às 72h. O crescimento exponencial das culturas das estirpes de referência deu-se até às 24h, mas enquanto que, às 72h, a cultura da estirpe ATCC 33560 se encontrava em fase de declínio, a cultura da estirpe CCUG 11283 ainda se mantinha a crescer (Fig. 3.30).



**Figura 3.30** – Curvas de crescimento dos isolados seleccionados para a realização dos ensaios de biofilmes em condições padronizadas. Os isolados foram crescidos em MHB, a 37°C, em condições de microaerofília, durante 72 h. Foram efectuadas leituras da densidade óptica das culturas a 600 nm ( $A_{600nm}$ ) às 5,0; 8,0; 19,0; 21,5; 24,0; 28,5; 42,0; 49,0 e 72,0 h do crescimento. Às 24h e 49 h foram efectuadas contagens de UFCs, representadas na figura por pontos azuis. Os resultados apresentados correspondem às médias  $\pm$  erro padrão de duas experiências independentes.

O isolado LNIV19 foi o que apresentou maior número de células viáveis às 49 h, tendo-se também registado que a densidade óptica máxima da cultura deste isolado atingiu valores superiores aos dos restantes isolados caracterizados.

Verificou-se que, para o conjunto de isolados seleccionados, os valores das taxas máximas de crescimento são reduzidos (Fig. 3.31). O isolado LNIV19 foi o que apresentou maior taxa específica de crescimento (0,0229), seguindo-se, por ordem decrescente, os isolados LNIV52 (0,0178), LNIV76 (0,0157), LNIV104 (0,0153), LNIV63 (0,0126), sem grandes diferenças entre si, e as estirpes de referência ATCC 33560 (0,0107) e CCUG 11283 (0,0092), nas quais se registaram taxas específicas mais baixas. Assim, nestas condições, o isolado LNIV19 aparenta estar melhor adaptado ao crescimento em descontínuo.



**Figura 3.31** – (A) Comparação das densidades ópticas máximas medidas a 600 nm ( $A_{600nm}$ ) durante o acompanhamento do crescimento em descontínuo, em condições padrão (microaerofília, 37°C), dos isolados seleccionados. (B) Comparação das taxas específicas de

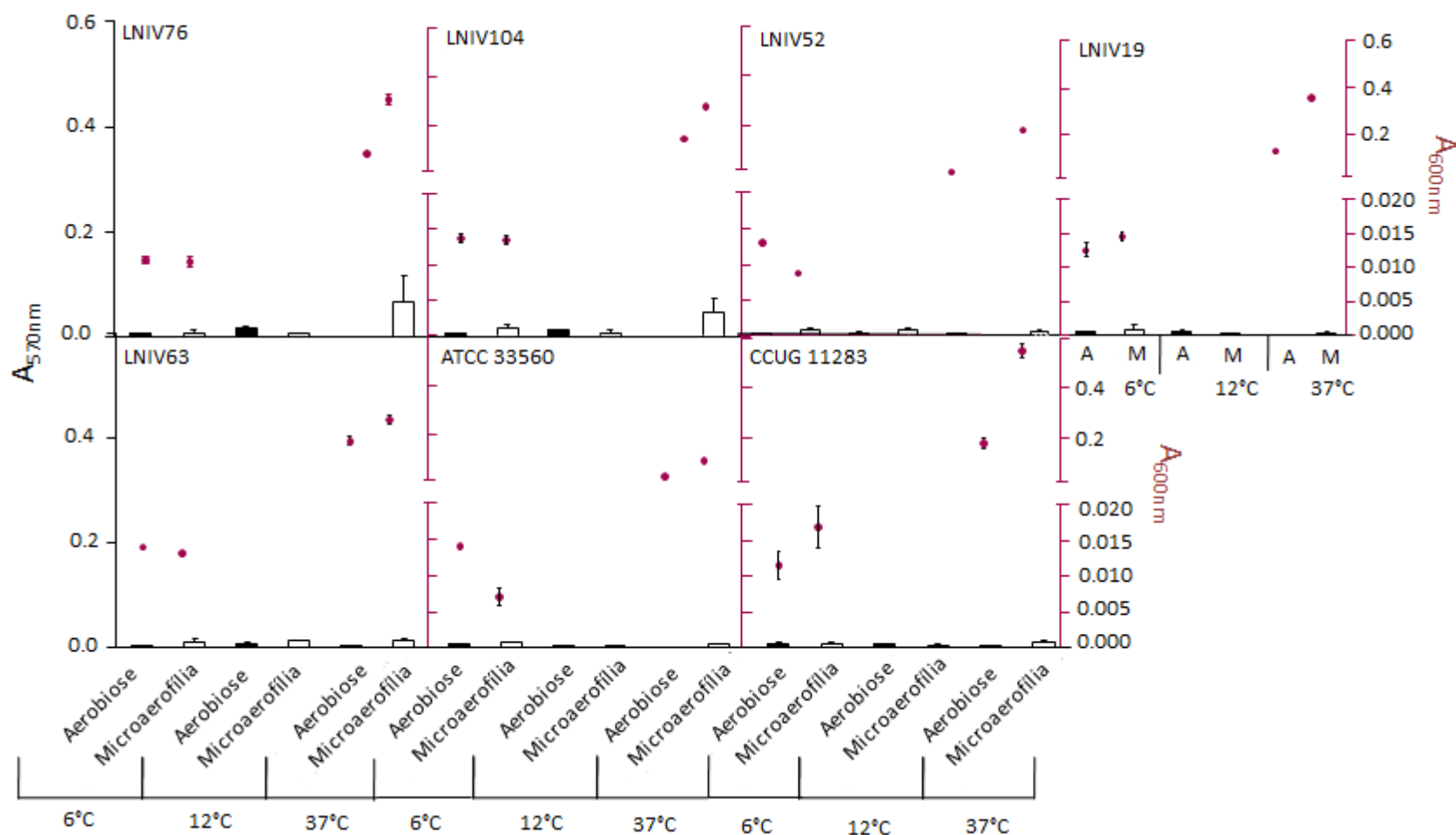
crescimento entre os diferentes isolados, determinadas por análise de regressão linear aplicada à zona linear da representação semi-logarítmica da  $A_{600nm}$  em função do tempo.

### 3.2.3.2. Dimensão dos biofilmes formados em microplacas de poliestireno

No que diz respeito aos ensaios realizados em microplacas de poliestireno para caracterização do grupo mais restrito de isolados, foi utilizada, para cada ensaio, uma microplaca para os 5 isolados e as 2 estirpes de referência em estudo. A microplaca foi dividida por filas de 8 poços e atribuiu-se uma fila para o crescimento de cada isolado (o último poço de cada fila incluiu apenas meio MHB não inoculado como controlo negativo da experiência, tal como referido no capítulo *Material e Métodos*). Cada poço contendo meio MHB foi inoculado com um volume determinado do pré-inóculo de modo a obter-se uma suspensão celular de 200  $\mu$ L com uma DO inicial que variou entre 0,01 (no caso dos ensaios a 12°C) e 0,025 (no caso dos ensaios a 6°C e 37°C). Cada placa foi incubada a 6°C, 12°C e 37°C, em aerobiose e microaerofília durante um período de 72 h.

Nos ensaios realizados a 6°C, não se verificou a formação de biofilme por qualquer dos isolados testados, quer em microaerofília quer em aerobiose, tal como já se tinha registado em ensaios preliminares (Fig. 3.32). No entanto, verificou-se que, após as 72 h de incubação, a absorvância da suspensão celular medida a 600 nm se mantinha muito baixa (Fig. 3.32), indicando um crescimento muito reduzido nestas condições.

Testou-se ainda o crescimento em microplacas incubadas a 12°C, temperatura que não havia sido testada nos ensaios preliminares, mas que está presente em algumas etapas do processamento de alimentos. Nos ensaios realizados sob o efeito desta temperatura, não se observou macroscopicamente o crescimento da cultura e, conseqüentemente, a formação de biofilme.



**Figura 3.32** – Ensaios de biofilmes realizados em microplacas de poliestireno. Os isolados foram crescidos em meio MHB, em condição de microerofilia ou aerobiose, às temperaturas de 6°, 12° e 37°C. Na figura são apresentados os valores da densidade da cultura celular ( $A_{600nm}$ ) após o fim do ensaio, bem como os valores de absorvância a 570 nm da solução de etanol resultante da solubilização do violeta de cristal aderente a células formadoras de biofilme.

Apesar de ser ter verificado o crescimento das culturas de todos os isolados a 37°C (Fig. 3.32), a capacidade de formação de biofilme variou consoante as condições experimentais. Para os ensaios realizados em aerobiose, verificou-se a formação de um biofilme, ainda que pouco extenso, apenas pelos isolados LNIV104 e LNIV19, tendo a formação de biofilme ocorrido na interface líquido-ar apenas no poço localizado na zona periférica da microplaca (Fig. 3.33).



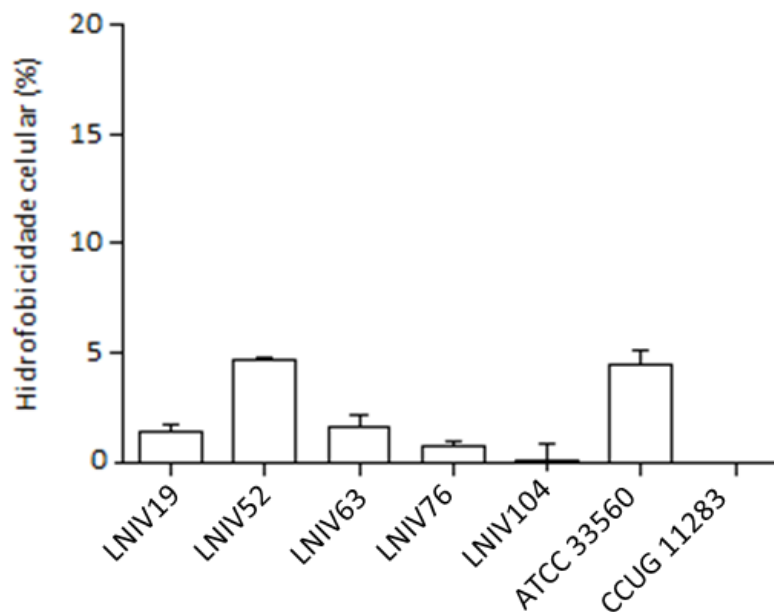
**Figura 3.33** – Biofilme formado na interface líquido-ar (assinalado pelas setas). Os isolados foram crescidos em meio MHB, em aerobiose, durante 72 h.

Estes resultados não são absolutamente coincidentes com os resultados obtidos nos ensaios preliminares, na medida em que os isolados LNIV19, LNIV52, LNIV76, LNIV104 haviam demonstrado capacidade de formação de biofilme, em meio MHB, a 37°C, em aerobiose. No entanto, o período de incubação tinha sido mais extenso (135 h) do que o período de incubação usado nos ensaios aqui considerados (72 h). O tempo de incubação parece ser, nestes ensaios, determinante para a transição do crescimento das células do estado planctónico para o crescimento em biofilme, o que se pode dever ao facto de, com o aumento do período de incubação, interferirem outros factores que limitam a capacidade de crescimento óptimo da cultura *in vitro*, nomeadamente o decréscimo da disponibilidade de nutrientes no meio de cultura. Adicionalmente, em aerobiose, a exposição prolongada ao oxigénio leva à produção de espécies reactivas de oxigénio (reactive oxygen species - ROS), que se não forem neutralizadas podem causar dano letal a nível dos ácidos nucleicos, de proteínas e da membrana celular (Park, 2005). *Campylobacter* spp. possui mecanismos celulares de defesa contra as ROS (Park, 2005), existindo evidências providenciadas por alguns estudos recentes de que células formadoras de biofilme possuem uma expressão aumentada de proteínas envolvidas no stresse oxidativo (Tpx, Ahp) por comparação com células planctónicas (Kalmokoff *et al.*, 2006). Apesar da incubação a 37°C corresponder a uma temperatura compreendida na gama óptima de crescimento de *Campylobacter* spp., nos ensaios realizados em microplacas, um período de incubação mais prolongado contribui

inevitavelmente para a evaporação do meio de cultura [volume reduzido (200  $\mu\text{L}$ )], essencialmente nos poços da zona periférica da microplaca, e como se pôde verificar nos ensaios preliminares, a desidratação surge como um possível factor desencadeante da formação de biofilme.

Por outro lado, a capacidade de adesão a uma superfície está dependente não só das condições ambientais externas, como das propriedades físico-químicas das células e do próprio substrato. A adesão máxima das células bacterianas depende da energia livre da superfície ou da sua afinidade para a água, sendo que superfícies com maior energia livre ou maior afinidade para a água (hidrofílicas) favorecem a adesão bacteriana (Chmielewski & Frank, 2003). O poliestireno, contrariamente ao vidro e ao aço inoxidável, é uma superfície hidrofóbica, pelo que, naturalmente, terá tendência a repulsar a adesão bacteriana. Apesar disso, sabe-se que as propriedades aderentes de uma célula são moduladas por alterações químicas que ocorrem na membrana celular, em resposta a estímulos ambientais e fenómenos de comunicação inter celular – *quorum-sensing* (Chmielewski & Frank, 2003).

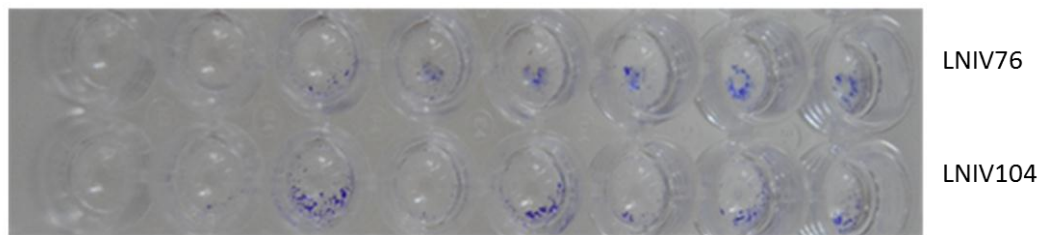
De forma a avaliar se a natureza hidrofóbica/hidrofílica da superfície celular poderia estar relacionada com a baixa capacidade de adesão celular ao poliestireno, procedeu-se à comparação da hidrofobicidade de células dos diferentes isolados, medindo-se a afinidade das células para o hexadecano (solvente polar). Foram preparadas suspensões celulares dos diferentes isolados, crescidos em meio MHB, em microaerofília, durante 72 h e adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  de hexadecano, conforme descrito na secção *Material e Métodos*. A percentagem de células aderentes à fase orgânica foi estimada espectrofotometricamente (Fig. 3.34).



**Figura 3.34** – Legenda na página 127.

**Figura 3.34** – Hidrofobicidade dos diferentes isolados examinados nos ensaios de formação de biofilmes, estimada por adição de 500  $\mu$ L de hexadecano a suspensões celulares lavadas com tampão PBS 1x. A hidrofobicidade foi estimada por quantificação da percentagem de células aderentes ao hexadecano, a qual foi determinada por medição da perda de absorvância a 600 nm da fase aquosa em relação à densidade óptica da suspensão celular inicial (antes da adição do hexadecano).

Verificou-se que os isolados e estirpes de referência em estudo apresentam afinidade muito baixa para o hexadecano, sugerindo que a sua superfície celular seja hidrofílica. Esta característica poderá explicar o facto de os isolados LNIV104 e LNIV76 terem aderido ao fundo dos poços da microplaca de poliestireno, e não nas paredes e na interface líquido-ar, quando as microplacas foram incubadas em microaerofília, a 37°C, durante 72 h. Sob as condições referidas, verificou-se a formação de biofilme não só nos poços da periferia, como também na grande maioria dos restantes poços inoculados (Fig. 3.35).



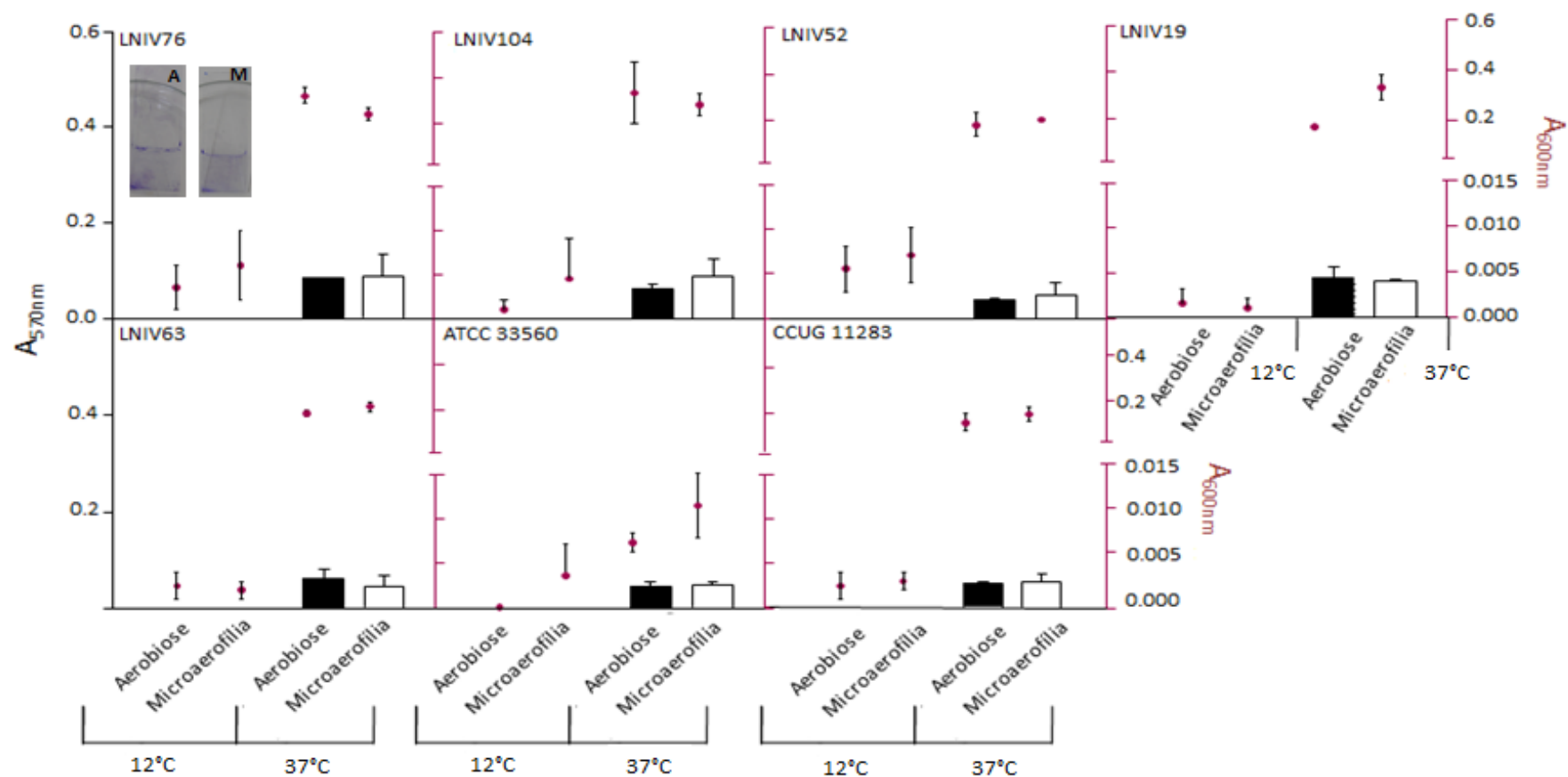
**Figura 3.35** – Biofilmes formados pelos isolados LNIV76 e LNIV104 no fundo dos poços da microplaca de poliestireno. Os isolados foram incubados em microaerofília, a 37°C, durante 72 h.

O facto de, nos ensaios preliminares realizados em condições de microaerofília, a 37°C, durante 72 h, não se ter registado por parte de nenhum dos isolados a capacidade de formação de biofilme, poderá estar relacionado com a interferência do processo de lavagem/secagem precedente à etapa de coloração, na estabilidade do biofilme formado. O processo de lavagem acaba por inevitavelmente remover parte das células formadoras de biofilme, pelo que se torna essencial uma correcta secagem dos poços da microplaca antes da coloração, para a fixação das células remanescentes no biofilme, processo que se optimizou à medida que se desenrolaram as experiências. Nestes ensaios verificou-se, tal como se registou anteriormente, uma discrepância entre a identificação visual de biofilmes formados e a sua quantificação (Fig. 3.32). No caso dos biofilmes formados em microaerofília, tal deveu-se à incompleta solubilização do biofilme formado no fundo dos poços das microplacas; no caso dos biofilmes formados em aerobiose, para além da fraca solubilização do biofilme formado na

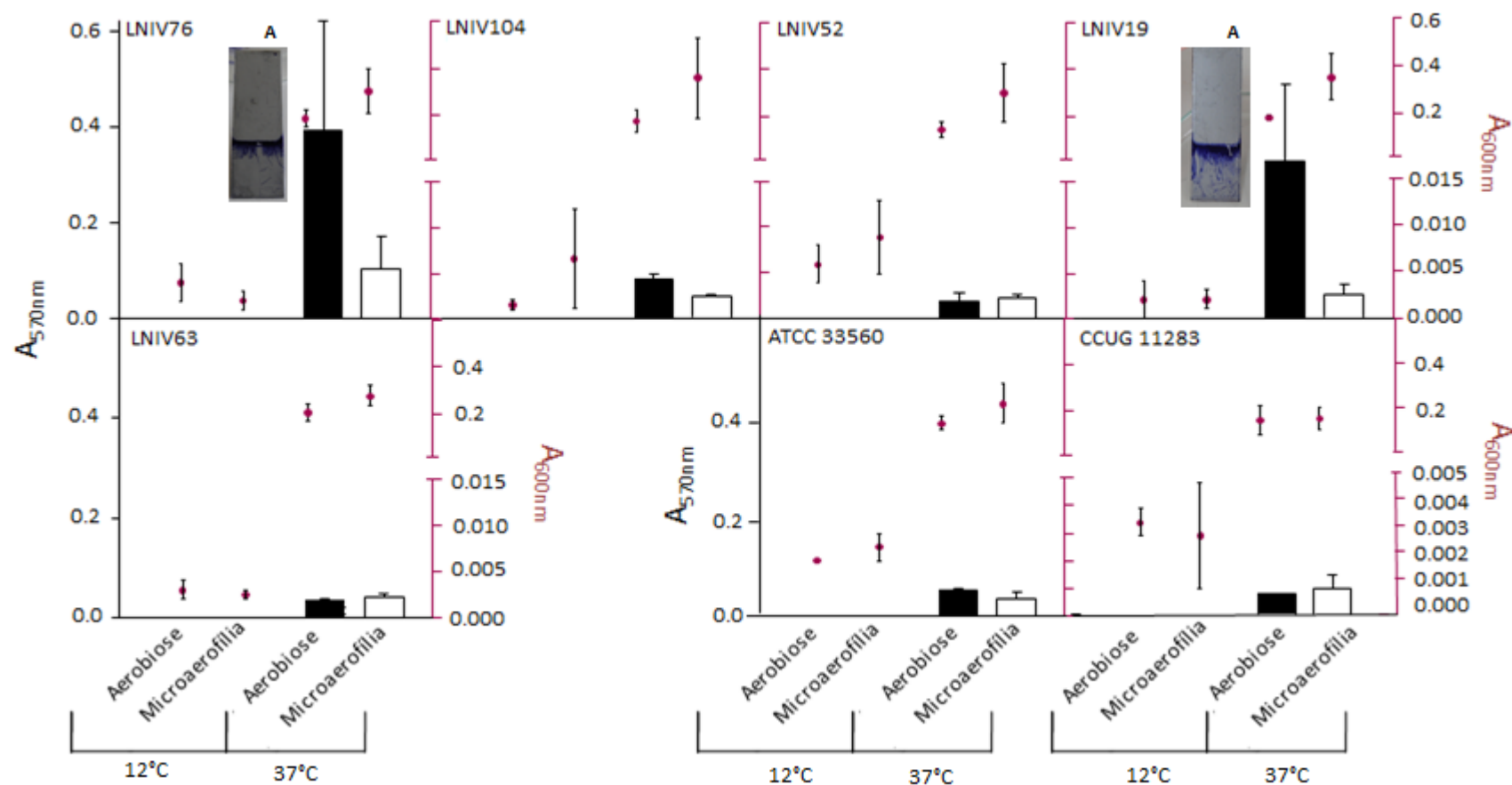
interface líquido-ar nos poços da periferia, acresce a interferência das leituras de absorvância registadas nos restantes poços (nos quais não se verificou visualmente formação de biofilme) e que, após subtração dos valores de absorvância obtidos para o controlo não inoculado, contribuiu para reduzir os valores estimados.

### **3.2.3.3. Dimensão dos biofilmes formados em lâminas de vidro e aço inoxidável**

Após a avaliação da capacidade de formação de biofilme dos isolados seleccionados em microplacas de poliestireno, realizaram-se novos ensaios variando a superfície abiótica testada. Os isolados foram inoculados em tubos de Falcon contendo 15 mL de meio MHB e uma das superfícies em análise (lâmina de vidro ou aço inoxidável AISI 316). Os tubos foram depois incubados em microaerofília e aerobiose, a 12°C e 37°C. Nos ensaios realizados a 37°C com as lâminas de vidro, os isolados formaram biofilmes na zona da interface líquido-ar mas de dimensão reduzida e sem grandes diferenças entre si, tanto em microaerofília como em aerobiose (Fig. 3.36). Em contraste, nos ensaios realizados com as lâminas de aço, não se verificou a formação de biofilme pelo isolado LNIV19 em microaerofília, apesar de o mesmo isolado, em aerobiose, ter formado biofilmes muito expressivos (Fig. 3.37). Por sua vez, o isolado LNIV76 formou biofilmes em aço, em microaerofília e aerobiose, apesar do biofilme formado em aerobiose ser muito mais extenso (Fig 3.37).



**Figura 3.36** – Ensaio de biofilmes realizados em lâminas de vidro. Os isolados foram crescidos em meio MHB, em condição de microaerofilia ou aerobiose, às temperaturas de 12 e 37°C. Na figura são apresentados os valores da densidade da cultura celular ( $A_{600nm}$ ) após o término do ensaio, bem como os valores de absorvância a 570 nm da solução de etanol resultante da solubilização do violeta de cristal aderente a células formadoras de biofilme (apenas para os ensaios realizados a 37°C). São apresentadas, como exemplo, as fotografias do biofilme formado pelo isolado LNIV76, em aerobiose (A) e microaerofilia (M).



**Figura 3.37** – Ensaio de biofilmes realizados em lâminas de aço. Os isolados foram crescidos em meio MHB, em condição de microaerofília ou aerobiose, às temperaturas de 12 e 37°C. Na figura são apresentados os valores da densidade da cultura celular ( $A_{600nm}$ ) após o término do ensaio, bem como os valores de absorvância a 570 nm da solução de etanol resultante da solubilização do violeta de cristal aderente a células formadoras de biofilme (apenas para os ensaios realizados a 37°C). São apresentadas as fotografias dos biofilmes mais exuberantes, formados em condição de aerobiose (A).

Uma vez mais, nos casos em que se verificou a formação de biofilme, a quantificação do mesmo nem sempre correspondeu a valores de absorvância a 570 nm diferentes dos valores obtidos em situações em que não se observou macroscopicamente biofilme. Estes casos aconteceram essencialmente para biofilmes pouco extensos formados na interface líquido-ar, sendo necessário considerar o elevado volume de etanol (15 mL) utilizado para a solubilização do violeta de cristal aderente a células formadoras de biofilme e também a dificuldade de solubilização do biofilme formado, sem aplicação de tensão de corte. Esta dificuldade de solubilização dos biofilmes formados também se reflectiu, no caso de biofilmes mais extensos que aderiram fortemente à superfície, num erro padrão expressivo relativamente ao valor médio obtido para as experiências independentes realizadas (indicado pelas barras de erro) (Fig. 3.37).

A maior adesão das células a superfícies hidrofílicas, como é o caso do vidro e do aço inoxidável, parece também resultar da fraca hidrofobicidade celular registada para os isolados em estudo, nestas condições (Fig. 3.34).

A incubação a temperaturas manifestamente abaixo da temperatura óptima afectaram fortemente o crescimento da cultura celular, tendo este sido negligenciável a 12°C nos tubos contendo as lâminas, tal como se tinha registado anteriormente em microplacas de poliestireno, quer a 12° quer a 6°C. Isto reflectiu-se, obviamente, na ausência de biofilme. Assim, nestes ensaios, apresentam-se apenas as leituras da densidade óptica das culturas celulares ( $A_{600nm}$ ) após o final do período de incubação, não se tendo procedido à coloração das lâminas com violeta de cristal (Fig. 3.36 e 3.37). Refira-se, ainda que a quantidade de células usada para inocular o tubo de Falcon onde se deu o ensaio ( $A_{600nm}$  da suspensão celular inicial de aproximadamente 0,01) foi reduzida e que a existência de biomassa insuficiente para a organização das células em biofilme poderá ter interferido com a capacidade de as células se organizarem em biofilmes, sobretudo se fenómenos de *quorum-sensing* estiverem envolvidos neste tipo de processos. Para testar esta hipótese, seria interessante repetir os mesmos ensaios, usando como inóculo uma concentração celular superior.

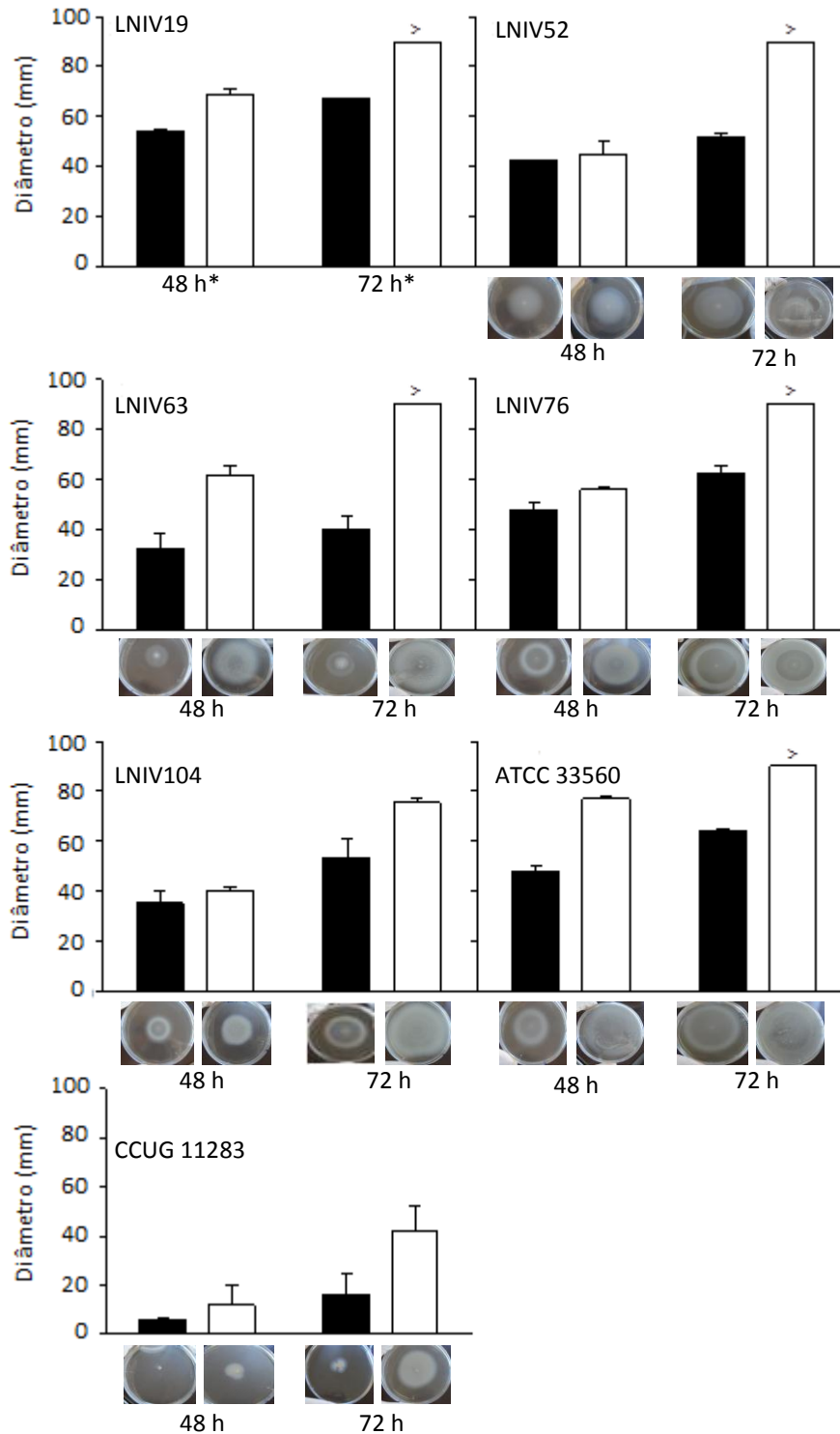
Como se descreveu anteriormente, os isolados utilizados no estudo de formação de biofilme apresentam taxas específicas de crescimento baixas, quando crescidos em meio MHB, em condições padrão (microaerofília, 37°C), tendo-se registado  $A_{600nm}$  máximas, essencialmente, entre as 42 h e 49 h de crescimento (Fig. 3.31). O facto de se terem utilizado suspensões celulares iniciais pouco concentradas prendeu-se também com a obtenção de pré-inóculos com  $A_{600nm}$  baixas (períodos de incubação entre 24 h e 48 h). No caso dos ensaios realizados com as lâminas de vidro e aço inoxidável, como o volume de meio de cultura era substancialmente superior ao volume de meio de cultura utilizado nas microplacas e se

pretendia o lançamento das culturas com  $A_{600nm}$  iniciais semelhantes, as  $A_{600nm}$  das suspensões celulares iniciais foram mais reduzidas (aproximadamente 0,01).

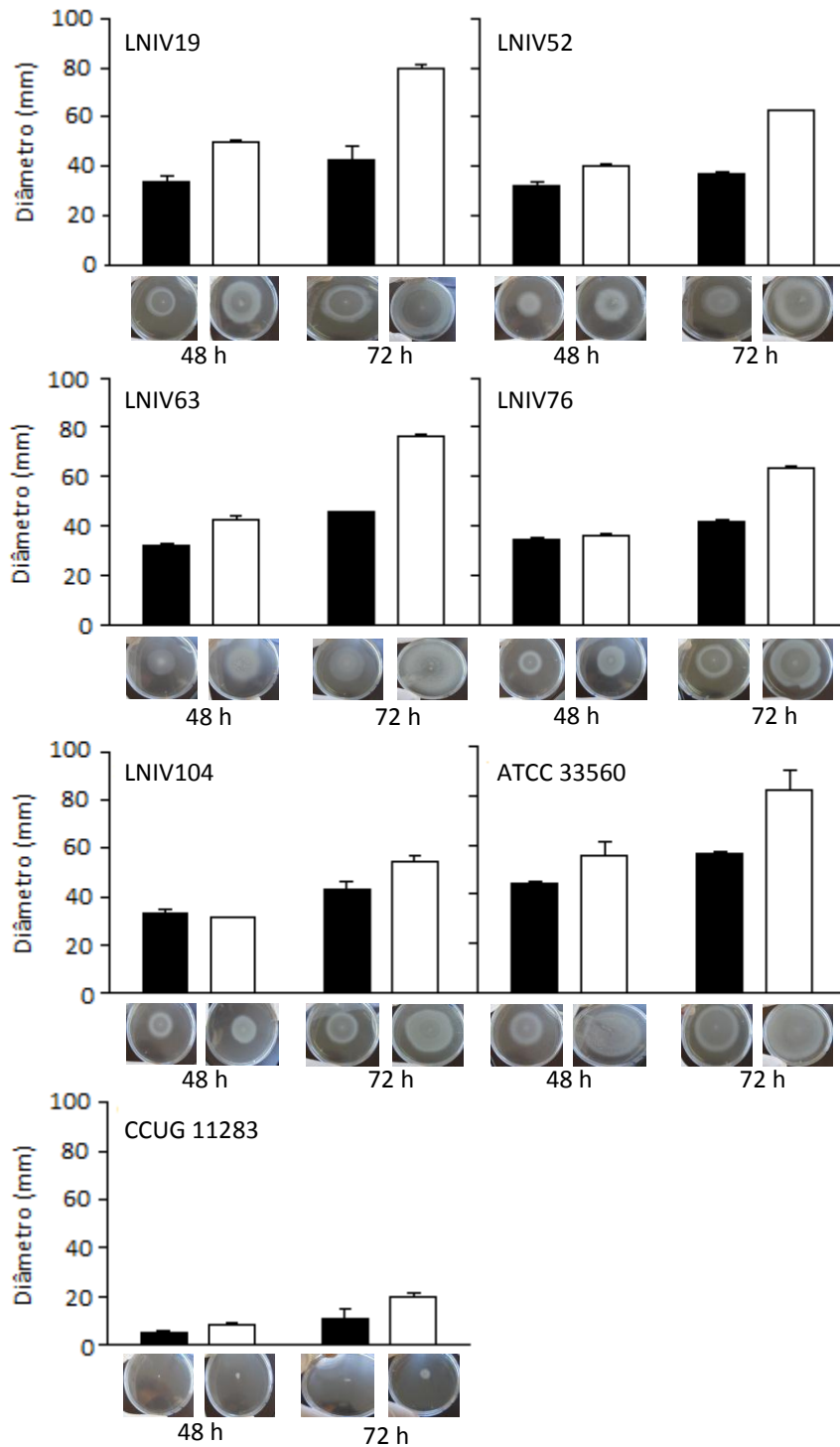
#### **3.2.3.4. Comparação da mobilidade dos isolados como determinante na formação de biofilme**

Existe ainda a evidência de que, a baixas temperaturas, *Campylobacter* permanece com a mobilidade flagelar intacta, o que possibilita o deslocamento para ambientes favoráveis (Hazeleger *et al.*, 1998). Deste modo, e porque se sabe que noutras espécies os mecanismos de mobilidade são essenciais nos primeiros estadios de formação de biofilmes, procedeu-se neste trabalho à realização de estudos comparativos da mobilidade celular para os diferentes isolados em análise, usando meios adequados para cada tipo de mobilidade específica, nomeadamente em meios sólidos com baixa percentagem de agar (*Swim agar* e *Swarm agar*). Foram preparadas placas com meio MHB ao qual se adicionou uma percentagem reduzida de agar, inoculando-se as placas com um palito. A mobilidade dos isolados em condições de microaerofília e aerobiose foi avaliada pela existência de uma zona circular túrbida (halo) em torno do ponto de inoculação, indicando a capacidade de migração das células, medindo-se os halos de migração às 48 h e 72 h (Fig. 3.38 e 3.39).

A comparação das mobilidades dos diferentes isolados permitiu verificar que todos apresentaram capacidade de se movimentar através da superfície utilizando os dois tipos de mobilidade, sob as diferentes condições testadas (microaerofília e aerobiose). Verificou-se de modo geral, para ambos os tipos de mobilidade, que a capacidade de movimentação por parte dos isolados foi superior em condições de microaerofília, no entanto, a mobilidade celular em aerobiose foi considerável para a maioria dos isolados. Esta característica poderá propiciar o estabelecimento de biofilmes e constituir um mecanismo de defesa contra o stresse ambiental.



**Figura 3.38** – Ensaio de mobilidade (*Swimming*) realizados para os diferentes isolados caracterizados quanto à capacidade de formação de biofilme. Os isolados foram inoculados no centro de placas com meio MHB contendo 0,3% de *soft agar*. Foram efectuadas as medidas dos halos de migração celular às 48 h e 72 h, em microaerofília (barras brancas) e aerobiose (barras pretas). O sinal (>) indica que os halos de migração se estenderam pela totalidade da placa (90 mm de diâmetro). \* Fotografias não disponíveis.



**Figura 3.39** - Ensaio de mobilidade (*Swarming*) realizados para os diferentes isolados caracterizados quanto à capacidade de formação de biofilme. Os isolados foram inoculados no centro de placas com meio MHB contendo 0,4% de *soft agar*. Foram efectuadas as medidas dos halos de migração celular às 48 h e 72 h, em microaerofília (barras brancas) e aerobiose (barras pretas).

#### 4. Discussão Final e Perspectivas Futuras

Nos últimos anos, tem-se verificado um aumento significativo do número de casos de infecção humana por bactérias do género *Campylobacter*. Apesar dos esforços de vários países para a implementação de sistemas de vigilância, são ainda muitos os casos que ficam por notificar (FAO/WHO, 2009). As taxas de incidência reportadas a nível mundial estão compreendidas entre 5-20%, mas os dados existentes sugerem que a real taxa de infecção possa ser 8 a 100 vezes superior ao número de casos reportados (FAO/WHO, 2009). Apesar de a doença estar, normalmente, associada a casos de infecção esporádicos, têm-se registado ao longo dos anos diversos surtos envolvendo grupos de vários indivíduos que, provavelmente, também são subnotificados (Miller & Mandrell, 2005; EFSA, 2011).

São vários os possíveis veículos e vias de transmissão de *Campylobacter* spp. ao Homem, visto tratar-se de um microrganismo ubíquo na Natureza. Apesar disso, nem todas as espécies apresentam o mesmo impacto no que diz respeito ao potencial patogénico, quando em contacto com o organismo humano. A infecção humana por *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* pode levar ao desenvolvimento de várias manifestações clínicas. Normalmente, a infecção é autolimitada mas, nalguns casos pós-infecção, podem surgir graves complicações de que é exemplo a síndrome de Guillain-Barré (SGB). A SGB é considerada a causa mais frequente de paralisia flácida aguda no mundo, desde a quase eliminação da poliomielite. Por ano, estima-se que ocorram 1-2 casos por cada 100.000 indivíduos, em diversas regiões do globo (Young & Mansfield 2005; Zhong & Ca, 2007). A utilização indiscriminada de antibióticos na produção animal e no tratamento de infecções humanas tem contribuído para o crescente número de estirpes de *C. jejuni* e *C. coli* resistentes, o que tem sido associado a manifestações mais severas da doença (Helms *et al.*, 2005 citado por Humphrey *et al.*, 2007). Acresce ainda o aumento do número de novas espécies descritas, cujo potencial patogénico para o Homem é ainda desconhecido.

Tendo em consideração todos os aspectos referidos, torna-se essencial uma melhor compreensão da epidemiologia da campilobacteriose, sendo o isolamento e caracterização do agente patogénico fundamental para esse efeito. A caracterização fenotípica e genotípica dos isolados de *Campylobacter* associados a infecções humanas, visando a sua diferenciação inter- e intra-espécie, têm sido determinantes na identificação das fontes de contaminação e vias de transmissão, permitindo implementar estratégias de prevenção e melhorar o controlo de surtos. Actualmente, recorre-se maioritariamente a técnicas moleculares devido à sua elevada rapidez, reprodutibilidade e maior poder de discriminação.

#### **4.1. Importância, para Portugal, do estudo de genotipagem de isolados de *C. jejuni* e *C. coli* com origem em cecos de frangos**

Em 2009, Portugal, a par da Grécia, foram os únicos Países da União Europeia que não reportaram casos de campilobacteriose em humanos (EFSA, 2011). Contrariamente a outras doenças de origem alimentar, de que são exemplo a salmonelose, sigelose, cólera e botulismo, a campilobacteriose não integra o grupo de Doenças de Declaração Obrigatória em Portugal (Anónimo, 2007), não existindo até ao momento um sistema de vigilância que permita fornecer dados sobre a incidência da doença na população. Nos últimos anos, tem-se verificado em Portugal o interesse crescente pela investigação em *Campylobacter*, reflectido no aumento progressivo do número de publicações. Em Fevereiro de 2008, uma pesquisa na PubMed (NCBI) com as palavras “*Campylobacter*” e “Portugal” resultou em apenas 7 publicações (Vicente *et al.*, 2008); a mesma pesquisa realizada em Dezembro de 2011 no âmbito do presente trabalho já resultou em 23 publicações. Dessas publicações, nem todas derivaram de estudos efectuados no País. De facto, alguns dos dados existentes sobre infecções por *Campylobacter* contraídas em Portugal são originários de estudos realizados noutros países, que têm avaliado o risco de se contrair a infecção por este agente através de viagens a países terceiros (*Campylobacter Sentinel Surveillance Scheme Collaborators*, 2002; Ekdahl & Giesecke, 2004).

No presente trabalho, a caracterização molecular de isolados de *C. jejuni* e *C. coli* obtidos em Portugal à escala nacional apresenta elevada importância, uma vez que a informação mais abrangente obtida e publicada a este nível no País data de 1992, no âmbito dos estudos realizados por Cabrita e colaboradores, nos quais isolados de *Campylobacter* com origem em infecções humanas foram caracterizados por biotipagem (Cabrita *et al.*, 1992a). Entre 1984 e 1989, foram examinadas amostras fecais referentes a 2811 casos de gastroenterite em Portugal, tendo sido realizada nessas amostras a pesquisa de *C. jejuni* e *C. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Yersinia* spp. As espécies de *Campylobacter* foram identificadas em 5,3 % das amostras e nesse estudo os isolados não apresentavam resistência à eritromicina (Cabrita *et al.*, 1992a).

Num outro estudo nacional, com o objectivo de se identificar potenciais reservatórios das espécies *C. jejuni* e *C. coli*, foram avaliadas as incidências de ambas as espécies em diferentes animais (selvagens e destinados à produção de alimentos) oriundos do Nordeste de Portugal. Dos animais em estudo verificou-se uma maior taxa de incidência em frangos (60,2%) e suínos (57,4%). Os testes de susceptibilidade antimicrobiana referentes à totalidade dos isolados revelaram que 5,5% das estirpes eram resistentes à ampicilina; 5,5% à tetraciclina;

12,6% à eritromicina e 23,5% à estreptomicina. As resistências à eritromicina e estreptomicina revelaram-se particularmente superiores em isolados com origem suína (Cabrita *et al.*, 1992b).

De Maio de 2005 a Outubro de 2006, 164 amostras de aves de produção obtidas em diferentes explorações e estabelecimentos de retalho no Norte de Portugal foram analisadas para a presença de *Campylobacter* spp. Foram isoladas no total 99 estirpes de *Campylobacter*, das quais 44 (68% *C. jejuni* e 32% *C. coli*) foram caracterizadas quanto à sua capacidade de resistência a diferentes antimicrobianos. Para 90% dos isolados foi verificada resistência à tetraciclina, ácido nalidíxico, rifampicina, eritromicina, vancomicina e penicilina. A sensibilidade à gentamicina e ao cloranfenicol foram demonstrados neste estudo. De acordo com o fenótipo de resistências aos antimicrobianos, os isolados demonstraram ser diferentes, incluindo os que foram obtidos da mesma amostra e no mesmo período de tempo (Mena *et al.*, 2008).

Um grupo de 123 isolados de *Campylobacter* spp. (89% *C. jejuni* e 11% *C. coli*) obtidos entre 2003 e 2007 a partir de amostras fecais de cidadãos portugueses [grande maioria com idade inferior a 14 anos (69,1%)], provenientes de cinco laboratórios hospitalares, foi caracterizado fenotipicamente quanto à sua capacidade de resistência a três agentes antimicrobianos. A grande maioria dos isolados demonstrou resistência à ciprofloxacina (80,5%), moxifloxacina (51,2%) e à gatifloxacina (47,2%). Os resultados desse estudo sugerem, por comparação com dados de outros países europeus, que Portugal é um dos países onde se registam taxas mais elevadas de resistência às quinolonas (Vicente *et al.*, 2008).

Apesar do impacto que a campilobacteriose apresenta para a Saúde Pública a nível mundial, são ainda pouco conhecidos os mecanismos utilizados pelo microrganismo para causar doença. Como foi referido na revisão da literatura que se fez anteriormente neste trabalho, os presumíveis factores de virulência identificados englobam a mobilidade flagelar, a adesão à camada mucosa intestinal/invasão e a capacidade de produção de toxinas. A toxina CDT é a melhor caracterizada entre o grupo de toxinas produzidas por *Campylobacter* spp. tendo sido descrita como um importante factor de virulência para o agente patogénico (Zhongming *et al.*, 2008). Em Portugal, um conjunto de 190 isolados de *C. coli* (20 originários de casos clínicos e 170 originários de produtos alimentares com origem avícola) foram examinados para a presença da toxina CDT através da pesquisa por PCR multiplex dos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*. Verificou-se que os genes anteriormente referidos estavam presentes em 100% dos isolados de origem clínica e que, nos isolados de origem alimentar, os genes *cdtA* e *cdtC* estavam presentes em 99,4% e o gene *cdtB* em 98,8% das estirpes analisadas. Neste estudo foi destacada a importância da compreensão das diferenças entre isolados de origem alimentar e clínica, no que diz respeito à presença dos genes *cdt*, bem como da determinação

da prevalência dos mesmos genes em isolados de *C. jejuni* e *C. coli*, de forma a contribuir para a definição dos seus padrões de virulência (Fernandes *et al.*, 2010).

Em 2008, bandos e carcaças de frangos com origem em várias regiões de Portugal Continental demonstraram níveis de colonização/contaminação muito elevados. Verificou-se que 82,0% das amostras cecais e 70,2% das carcaças analisadas estavam contaminadas por *Campylobacter*, com predominância da espécie *C. coli* (61,6%) nas amostras cecais e da espécie *C. jejuni* (67,2%) nas amostras de carcaças (EFSA, 2010a; EFSA, 2010b). Nesse estudo, realizado no âmbito da Decisão da Comissão 2007/516/CE, foi possível avaliar o nível real de infecção, uma vez que foram amostrados os cecos das aves. O presente trabalho consistiu na caracterização genotípica de um conjunto de isolados obtidos dessas amostras cecais, contribuindo para uma melhor compreensão da epidemiologia da campilobacteriose em Portugal. Cento e setenta e nove isolados de *C. coli* (n = 112) e *C. jejuni* (n = 67) foram caracterizados a nível molecular pela análise de polimorfismos dos fragmentos de restrição do gene *flaA* (*flaA*-RFLP). A análise molecular dos isolados com a enzima *Hinfi* gerou 11 perfis, dos quais quatro são únicos, revelando uma capacidade moderada de discriminação. O perfil mais frequente, designado de F, foi comum a 56% dos isolados. A restrição do gene *flaA* dos mesmos isolados com *Ddel* aumentou substancialmente o poder discriminatório (D = 0,89), gerando 48 perfis. Neste caso, o perfil 1 foi identificado como o mais prevalente (27%) no grupo de isolados estudados, tendo-se registado 29 perfis únicos. A caracterização da estirpe de referência ATCC 33560 pela mesma metodologia gerou, no caso da utilização da enzima *Hinfi*, um perfil idêntico ao dos isolados de campo (perfil F), enquanto que, utilizando a enzima *Ddel*, foram originados dois perfis originais para as duas estirpes de referência incluídas, para além dos 48 identificados para os isolados de campo. Verificou-se que vários perfis são comuns a isolados das espécies *C. coli* e *C. jejuni*. Assim, apesar da técnica *flaA*-RFLP se ter revelado útil na discriminação dos isolados, a avaliação da relação genética tendo por base o gene *flaA* não permite agrupar os isolados ao nível da espécie.

Registou-se uma ampla distribuição geográfica dos perfis mais frequentes nas regiões amostradas (12 distritos), sendo que os perfis menos frequentes apresentam uma distribuição localizada. Apesar de, ao nível da colonização cecal, se terem registado genótipos *flaA*-RFLP predominantes (perfis 1 e F), a sua capacidade de persistência ao longo de ciclos produtivos sucessivos, na mesma exploração, nem sempre foi confirmada. Na maioria dos casos analisados, verificou-se a emergência de novos genótipos em meses de amostragem diferentes, o que pode reflectir a introdução de novas estirpes nos bandos por contaminação horizontal ou também a hipótese de transmissão vertical de novas estirpes a partir de diferentes linhagens parentais.

Os dados resultantes da aplicação da metodologia de genotipagem *flaA*-RFLP a todos os isolados, e complementada pela aplicação da metodologia RFLP-PFGE em alguns dos isolados, apontam para uma elevada diversidade genética dos isolados em estudo. Apesar do número de isolados caracterizados por ambas as técnicas ter sido significativamente diferente, verificou-se que a metodologia RFLP-PFGE possui um maior poder de discriminação do que a metodologia *flaA*-RFLP. A variabilidade genotípica de isolados *Campylobacter* com origem avícola verificada neste estudo por aplicação das duas metodologias, também tem, de acordo com a literatura, sido registada noutros países (Fitzgerald *et al.*, 2005). Mas, enquanto que, em alguns estudos, se confirma o maior poder discriminatório da técnica RFLP-PFGE (Behringer *et al.*, 2010), noutros a metodologia *flaA*-RFLP apresenta um poder discriminatório equivalente (Nebola & Steinhäuserová, 2006). A técnica de RFLP-PFGE é considerada a referência na tipagem de *Campylobacter* spp., uma vez que se baseia na análise do genoma completo, no entanto, o tempo necessário para executá-la de forma adequada é elevado (5 dias) e mais exigente do ponto de vista técnico, existindo também a desvantagem de alterações no genoma (mutações) poderem interferir com o resultado, tornando a análise subjectiva. Considerando estas limitações bem como as associadas à técnica de *flaA*-RFLP, resultante da possibilidade de recombinação de material genético no *locus* da flagelina (Harrington *et al.*, 1997), seria portanto adequado complementar este tipo de abordagem com a utilização de outro tipo de metodologia (p.e. MLST), com resultados mais passíveis de comparação interlaboratorial.

Apesar de não ser adequada para estudos epidemiológicos globais, numa abordagem metodológica única, a metodologia *flaA*-RFLP não deixa de ser adequada para estudos epidemiológicos limitados no espaço e no tempo, como é o caso do presente estudo, salientando-se, ainda, que da sua utilização retiramos a vantagem do baixo custo associado e rapidez na execução do procedimento experimental.

Apesar de se terem vindo a desenvolver várias metodologias para a tipagem de isolados de *Campylobacter*, não se tem verificado um aproveitamento adequado das vantagens conferidas pelas mesmas, devido à falta de padronização das metodologias aplicadas nos vários laboratórios a nível nacional e internacional, a qual é essencial para a comparação/troca de dados que permita rastrear a distribuição e prevalência de diferentes estirpes/linhagens a nível local, nacional e global (Fitzgerald *et al.*, 2005). Têm sido efectuados esforços nesse sentido, nomeadamente nos Estados Unidos, através da rede PulseNet (1996), responsável pela padronização da metodologia aplicada à subtipagem de agentes patogénicos transmitidos através de alimentos; também na União Europeia, através da criação da rede Campynet, estabelecida em 1998 com o intuito de padronizar os métodos de subtipagem de C.

*coli* e *C. jejuni*. Enquanto que na rede PulseNet (<http://www.cdc.gov/pulsenet/>) se tem aplicado a técnica RFLP-PFGE para esse fim, na rede Campynet (<http://campynet.vetinst.dk/CONTENTS.HTM>) são sugeridas as técnicas *flaA*-RFLP, RFLP-PFGE e AFLP. Apesar dos esforços, os progressos obtidos na padronização da metodologia de subtipagem de *Campylobacter* spp. têm ocorrido lentamente (Fitzgerald *et al.*, 2005). As técnicas mencionadas têm permitido investigar a diversidade de estirpes existentes, mas com o surgimento de novas técnicas que permitem investigar a instabilidade genética ao nível do nucleótido (p.e. MLST; DNA microarrays) as expectativas aumentam, ambicionando-se a possibilidade de que, no futuro, se consiga aplicar na rotina uma análise comparativa dos genomas de estirpes individuais (Fitzgerald *et al.*, 2005).

Em suma, a construção do plano de caracterização deverá, ser realizada de acordo com a finalidade do estudo epidemiológico em questão, considerando-se a realização de estudos de curta duração num espaço geográfico restrito (p.e. na avaliação de um surto particular) *versus* a utilização de outras metodologias para a realização de estudos globais de longa duração.

De modo geral, os dados existentes disponíveis sobre *Campylobacter* em Portugal, no momento de publicação deste trabalho, apontam para elevadas taxas de incidência de *Campylobacter* em frangos de abate e produtos alimentares de origem avícola, para a elevada diversidade genética dos isolados de frangos de abate, para a emergência de várias estirpes resistentes a agentes antimicrobianos que são utilizados no tratamento da campilobacteriose e para a presença, no genoma, de factores de virulência essenciais para a manifestação do potencial patogénico das estirpes. Assim, torna-se fundamental a implementação, no País, de um sistema de vigilância para as infecções provocadas por *Campylobacter*. Esse sistema permitirá a obtenção de dados sobre a real incidência da campilobacteriose na população portuguesa, essenciais para o desenvolvimento de novos estudos relativos à epidemiologia da doença e que conduzirão, certamente, a uma melhor prevenção e controlo. Os génotipos dos isolados identificados no presente trabalho poderão, no futuro, ser comparados com génotipos obtidos de isolados clínicos, o que permitirá aferir sobre a importância do frango e produtos alimentares derivados como veículo de transmissão de *Campylobacter* no seio da população portuguesa. Em trabalhos futuros, a complementação da caracterização molecular efectuada no âmbito desta dissertação com outras metodologias moleculares (p.e MLST) será também importante para verificar a presença de eventuais complexos clonais entre os isolados nacionais. Acresce que, para além da diversidade genética dos isolados de *Campylobacter* com origem aviária, também se tem verificado que alguns clones de *C. jejuni* possuem a capacidade de persistência ao longo de vários ciclos de produção (Fitzgerald *et al.*, 2005), com a existência

de diferentes genótipos em bandos de frangos e no produto final, o que sugere que alguns genótipos poderão possuir melhor capacidade adaptativa às condições de stresse (Fitzgerald *et al.*, 2005). Assim, no futuro, seria também interessante caracterizar isolados de *Campylobacter* em diferentes pontos da cadeia alimentar, de modo a possibilitar a comparação de genótipos e a aferir sobre a existência de genótipos associados a maior persistência na cadeia alimentar, no contexto da realidade nacional.

#### **4.2. Importância do crescimento em biofilme como possível mecanismo de persistência de isolados de *C. jejuni* e *C. coli* na cadeia de processamento alimentar**

Para além da caracterização genotípica dos isolados, também se avaliou, para um subgrupo de estirpes, seleccionado com base na espécie, genótipo *flaA*-RFLP e fenótipo de resistência à ciprofloxacina e eritromicina, o potencial de formação de biofilmes *in vitro* em diferentes superfícies abióticas presentes ao longo da cadeia de processamento alimentar, como possível mecanismo de persistência do microrganismo. Sabe-se, noutras espécies, que, nos biofilmes, os microrganismos ficam protegidos do stresse ambiental, da radiação UV, da predação por protozoários (Matz *et al.*, 2005) e da desidratação (Hanning & Slavik, 2009; Moe *et al.*, 2010; Reuter *et al.*, 2010). Acresce que, ao adoptarem este modo de vida, a generalidade dos microrganismos fica cerca de 1000 vezes mais resistente a agentes desinfectantes e antimicrobianos, do que os seus homólogos em estado planctónico (Reuter *et al.*, 2010). De facto, um estudo recente demonstrou um aumento de duas vezes no tempo de sobrevivência de estirpes de *C. jejuni* crescidas em biofilmes em condições atmosféricas normais, por comparação com estirpes homólogas crescidas no estado planctónico (isolado) (Joshua *et al.*, 2006). Existem, ainda, alguns estudos que demonstram que espécies pertencentes ao género *Campylobacter* podem apresentar diferentes capacidades de formação de biofilmes (Gunther & Chen, 2009) que variam, também, em função das condições nutricionais e ambientais (Reeser *et al.*, 2007). As condições favoráveis de crescimento em meio líquido utilizadas em estudos *in vitro* são, frequentemente, usadas como referência para avaliação do comportamento bacteriano, no entanto, estas condições nem sempre reflectem a real situação em que as bactérias se encontram no seu ambiente natural. Num estudo recente, Sampathkumar e colaboradores (2006) compararam, mediante o recurso a genómica funcional e proteómica, os padrões de expressão proteica de *C. jejuni* durante o seu crescimento em estilo planctónico (crescimento em meio líquido) e imobilizado (crescimento em meio sólido), tendo verificado que, durante o crescimento em meio sólido, são induzidos, entre outros,

sistemas moleculares relacionados com a aquisição do ferro pelas células, resposta ao stresse oxidativo, transdução de sinal e modificação do conteúdo membranar. Por outro lado, esses autores verificaram uma repressão dos sistemas envolvidos na produção de energia, na mobilidade e síntese proteica de proteínas não essenciais, em condições de limitação de ferro. De acordo com este estudo, é sugerido que, aquando do crescimento em associação com uma superfície, *C. jejuni* manifesta um fenótipo que facilita a adaptação aos ambientes dentro e fora do hospedeiro, através da promoção do funcionamento de sistemas que permitam ultrapassar desafios como limitação de ferro e stresse oxidativo (Sampathkumar *et al.*, 2006).

Apesar de, no presente trabalho, se analisar o potencial de formação de biofilme apenas para um pequeno grupo de isolados, verificou-se que os isolados manifestaram diferentes capacidades de formação de biofilme, independente dos genótipos *flaA*-RFLP e RFLP-PFGE, mas dependendo das condições ambientais testadas. Para todos os ensaios realizados a temperaturas baixas (6°C, 12°C), o crescimento das culturas celulares foi negligenciável e não se observou a formação de biofilme em qualquer das superfícies testadas. Os microrganismos pertencentes ao género *Campylobacter* possuem uma gama estreita de temperatura de crescimento que varia entre um mínimo de 30°C e um máximo de 46°C. Considerando este requisito, seria de esperar que *Campylobacter* spp. não se conseguisse multiplicar a temperaturas fora da gama indicada. Sabe-se que o processo de congelação dos alimentos contribui para a redução significativa de bactérias sobreviventes (Humphrey & Cruickshank, 1985; citado por Park, 2002), embora também seja reconhecida a capacidade destes microrganismos resistirem a baixas temperaturas (Park, 2002). Existem estudos que evidenciaram que *C. jejuni* consegue permanecer metabolicamente activo a temperaturas muito inferiores à temperatura mínima de crescimento, realizando respiração e produzindo ATP a 4°C (Hazeleger *et al.*, 1998). No entanto, no presente trabalho, o crescimento dos isolados a baixas temperaturas foi sempre muito reduzido para os tempos de incubação estudados. Contrariamente a outros microrganismos que demonstram uma diminuição gradual da taxa de crescimento perto da temperatura mínima de crescimento, na mesma situação, *Campylobacter jejuni* apresenta uma diminuição repentina dessa taxa (Hazeleger *et al.*, 1998). Aliás, numa análise ao genoma de *C. jejuni*, verifica-se que este microrganismo não possui a informação genética responsável pela síntese de proteínas de choque térmico (*cold shock proteins*) que noutros microrganismos permitem a multiplicação sob o efeito de temperaturas inferiores à temperatura óptima de crescimento (Parkhill *et al.*, 2000; Park, 2002), o que poderá explicar em parte a sua incapacidade de multiplicação a temperaturas baixas, normalmente associadas ao armazenamento de alimentos. Apesar disso, existe ainda a evidência de que a baixas temperaturas *Campylobacter* permanece com a mobilidade flagelar

intacta, o que possibilita o deslocamento para ambientes favoráveis (Hazeleger *et al.*, 1998). Como verificado nos ensaios de mobilidade realizados neste trabalho, todos os isolados estudados apresentam capacidade de movimentação em condições de crescimento padrão (microaerofília, a 37°C) e em aerobiose, não se tendo, no entanto, avaliado a mobilidade desses mesmos isolados a baixas temperaturas.

Reunindo-se os dados emergentes dos ensaios preliminares para selecção de condições ambientais com a caracterização mais aprofundada que se fez posteriormente, verificou-se que, apesar da natureza hidrofílica da superfície celular dos isolados analisados, ainda assim alguns deles conseguem aderir ao poliestireno (superfície hidrofóbica). Os biofilmes formaram-se, preferencialmente, na interface líquido-ar, em aerobiose, à temperatura ambiente e a 37°C, durante 72 h de incubação (biofilme pouco extenso) e durante 135 h (biofilme mais extenso). Também se identificou a formação de biofilmes no fundo dos poços da microplaca em microaerofília, a 37°C, durante 72 h de incubação (registada apenas para os isolados LNIV76 e LNIV104). A capacidade de formação de biofilme por isolados de *C. jejuni* e *C. coli* em poliestireno, para além de, aparentemente, não depender do genótipo, parece, nas condições testadas, ser favorecida por temperaturas mais altas, na presença de oxigénio e por períodos prolongados. O tempo de incubação foi, aliás, considerado crucial para a adaptação das bactérias às condições ambientais, bem como a desidratação que também foi identificada como um determinante na promoção do crescimento em biofilme.

Interessa aqui mencionar que, apesar da metodologia utilizada para a quantificação dos biofilmes formados em microplacas se tenha baseado em procedimentos há muito estabelecidos para outras espécies, sobretudo na avaliação das primeiras etapas do desenvolvimento do biofilme, a comparação quantitativa (leitura de absorvância) e qualitativa (observação visual) evidenciou algumas discrepâncias. Biofilmes facilmente visíveis nem sempre se correlacionaram com valores de absorvância significativamente diferentes dos valores obtidos nos controlos negativos das experiências ou de valores obtidos em ensaios em que a formação de biofilme não foi tão evidente macroscopicamente. Estes dados sugerem, tal como já foi constatado noutros estudos (Gunther & Chen, 2009), alguns problemas com a abordagem de quantificação através da dissolução do violeta de cristal aderente às células formadoras de biofilmes, manifestando claramente a necessidade de optimização e de metodologias alternativas.

Relativamente aos ensaios em lâminas de vidro e aço inoxidável (superfícies hidrofílicas), verificou-se que, independentemente do carácter hidrofílico da superfície celular registada para os isolados em estudo, o qual se presumiu que favoreceria a adesão das

bactérias ao tipo de superfícies em questão, nem todos os isolados demonstraram capacidade de formar biofilme, nas condições testadas. Em lâmina de vidro, a formação de biofilme foi registada ao fim de 72h na interface líquido-ar em (a) condições de microaerofília e 42°C (para os isolados LNIV19 e LNIV104); (b) em aerobiose ou microaerofília, a 37°C, apesar do biofilme ser pouco extenso. Em lâmina de aço inoxidável, o crescimento em biofilme foi registado ao fim de 72h na interface líquido-ar, sendo muito exuberantes os biofilmes formados em aerobiose para os isolados LNIV19 e LNIV76.

No seu conjunto, os dados obtidos neste trabalho indicam que a formação de biofilmes, quer em lâminas de vidro, quer em aço inoxidável ou em poliestireno é favorecida a temperaturas mais elevadas e, sobretudo, em condições de aerobiose. Assim, neste trabalho foi possível identificar um conjunto de isolados que, nas diferentes superfícies testadas e sob as condições referidas, formam biofilmes de elevada dimensão, o que sugere que este mecanismo possa ser uma resposta adaptativa a várias condições de stresse ambiental, contribuindo para persistência e propagação destes microrganismos ao longo da cadeia alimentar. Além disso, identificaram-se dois isolados (LNIV19 e LNIV104) que formam biofilmes muito expressivos em comparação com os restantes, os quais serão úteis para, no futuro, se estudarem os determinantes moleculares envolvidos nesse processo. Seria, ainda, interessante, em abordagens futuras, analisar o envolvimento de fenómenos de sinalização célula a célula (*quorum-sensing*) no processo de adaptação às condições limitantes do crescimento, geradas por baixas temperaturas e presença de oxigénio, e ainda na formação de biofilmes, quer de culturas puras quer de culturas mistas. Finalmente, estão identificados vários tipos de lipooligossacáridos (LOS) constituintes da membrana celular de *Campylobacter spp.* que podem actuar como factores de adesão, contribuir para a estabilidade da membrana externa e proteger as células do stress ambiental, influenciando também a quantidade de biofilme formado (Naito *et al.*, 2010). Assim, seria interessante, no futuro, caracterizar-se o tipo de LOS produzido por cada isolado genotipado no presente trabalho, através da pesquisa de genes que se presumem codificar para diferentes classes de LOS (designadas de A a H), de modo a verificar-se a existência de uma relação entre a classe de lipooligossacárido produzida e a quantidade de biofilme formada. Acresce, ainda, que esta caracterização também permitirá aferir sobre o potencial patogénico dos isolados nacionais, na medida em que se sabe que três classes de LOS (A,B e C) de *Campylobacter jejuni* são predominantes nas estirpes que têm sido associadas ao desenvolvimento das Síndromes Guillain-Barré (SGB) e Miller Fisher (SMF). Esta informação permitirá estimar o risco de exposição da população portuguesa ao desenvolvimento deste tipo de neuropatias.

## 5. Referências Bibliográficas

- Altekruse** S.F., Stern N.J., Fields P.I., Swerdlow D.L. 1999. *Campylobacter jejuni* - An Emerging Foodborne Pathogen. *Emerging Infectious Diseases*. **28**: 28 - 35.
- Anónimo**. 2007. Doenças de Declaração Obrigatória 2002-2006. Regiões e Sub-Regiões de Saúde no Continente e Regiões Autónomas. Disponível em: <http://www.dgs.pt/upload/membro.id/ficheiros/i008987.pdf>. Consultado a 5 de Dezembro de 2011.
- Anónimo**. 2005. Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food: Second Report on *Campylobacter*. Food Standards Agency. Disponível em: <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/acmsfcampylobacter.pdf>. Consultado a: 10 de Novembro de 2011
- AVEC** [Association of Poultry Processors and Poultry Trade in the EU Countries]. 2011. Annual Report. Disponível em: <http://www.avec-poultry.eu/>. Consultado a: 10 de Novembro de 2011
- Barrios** P.R., Reiersen J., Lowman R., Bisailon J.R., Michel P., Fridriksdottir V., Gunnarsson E., Stern N., Berke O., McEwen S., Martin W. 2006. Risk factors for *Campylobacter* spp. colonization in broiler flocks in Iceland. *Preventive Veterinary Medicine*. **74**: 264–278.
- Baylis** C.L., MacPhee S., Martin K.W., Humphrey T.J., Betts R.P. 2000. Comparison of three enrichment media for the isolation of *Campylobacter* spp. from foods. *Journal of Applied Microbiology*. **89**: 884–891.
- Behringer** M., Miller W.G., Oyarzabal O.A. 2011. Typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from live broilers and retail broiler meat by flaA-RFLP, MLST, PFGE and REP-PCR. *Journal of Microbiological Methods*. **84**: 194-201.
- Biswas** D., Itoh K., Sasakawa C. 2003. Role of microfilaments and microtubules in the invasion of INT-407 cells by *Campylobacter jejuni*. *Microbiology and Immunology*. **47**: 469–473.
- Bolton** F.J., Wareing D.R., Sails A.D. 1997. Comparison of a novel microaerobic system with three other gas-generating systems for the recovery of *Campylobacter* species from human faecal samples. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. **16**: 839–842.
- Butzler** J. 2004. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. *Clinical Microbiology and Infection*. **10**: 868–876.
- Butzler** J.P., Dekeyser P., Detrain M., Dehaen F. 1973. Related vibrios in stools. *The Journal of Pediatrics*. **82**: 493-495.

- Cabrita J.**, Pires I., Vlaes L., Coignau H., Levy J., Goossens H., Gonçalves A.P., de Mol P., Butzler J.P. 1992a. *Campylobacter* enteritis in Portugal: epidemiological features and biological markers. *European Journal of Epidemiology*. **8**: 22-26.
- Cabrita J.**, Rodrigues J., Bragança F., Morgado C., Pires I., Gonçalves A.P. 1992b. Prevalence, biotypes, plasmid profile and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolated from wild and domestic animals from northeast Portugal. *Journal of Applied Bacteriology*. **73**: 279-285.
- Campylobacter Sentinel Surveillance Scheme Collaborators.** 2002. Ciprofloxacin resistance in *Campylobacter jejuni*: case-case analysis as a tool for elucidating risks at home and abroad. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. **50**: 561-568.
- Canôa J.M.** 2008. *Requisitos para a implementação do HACCP em matadouros de aves*. Trabalho de Fim de Curso com vista à obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária. Lisboa, 85 pp.
- Champion O.L.**, Gaunt M.W., Gundogdu O., Elmi A., Witney A.A., Hinds J., Dorrell N., Wren B.W. 2005. Comparative phylogenomics of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals genetic markers predictive of infection source. *PNAS*. **44**: 16043–16048
- Chen C.-Y.**, Nace G.W., Irwin P.L. 2003. A 6x6 drop plate method for simultaneous colony counting and MPN enumeration of *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*. *Journal of Microbiological Methods*. **55**: 475– 479.
- Chmielewski R.A.N.**, Frank J.F. 2003. Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **2**: 22-32.
- Coker A.O.**, Isokpehi R.D., Thomas B.N., Amisu K.O., Obi C.L. 2002. Human *Campylobacteriosis* in Developing Countries. *Emerging Infectious Diseases*. **8**: 237-243.
- Dasti J.I.**, Tareen A.M., Raimond L., Zautner A.E., Groß U. 2010. *Campylobacter jejuni*: A brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. *International Journal of Medical Microbiology*. **300**: 205–211.
- Davey M.E.**, O`Toole G.A. 2000. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **64**: 847–867.
- de Boer P.**, Wagenaar J.A., Achterberg R.P., van Putten J.P., Schouls L.M., Duim B. 2002. Generation of *Campylobacter jejuni* genetic diversity *in vivo*. *Molecular Microbiology*. **44**: 351-359.
- Debruyne L.**, Grevers D., Vandamme P. 2008. Taxonomy of the *Campylobacteraceae*. In I. Nachamkin, C. Szymanski, M. Blaser (ed.), *Campylobacter* (Third Edition), ASM Press. 3-27.

- Decisão da Comissão 2007/516/EC** - No Jornal Oficial da União Europeia [notificada com o número C (2007), 3440]. Jornal Oficial nº L190 de 21/07/2007 p. 25-37.
- Dekeyser P.**, Gossuin-Detrain M., Butzler J.P., Sternon J. 1972. Acute enteritis due to a related vibrio: first positive stool cultures. *Journal of Infectious Diseases*. **125**: 390–392.
- Deviner R.** 2003. La consommation des produits carnés. *INRA Productions Animales*. **16**: 325-327.
- Dingle K.E.**, Colles F.M., Wareing D.R., Ure R., Fox A.J., Bolton F.E., Bootsma H.J., Willems R.J., Urwin R., Maiden M.C. 2001. Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology*. **39**: 14–23.
- Doig P.**, Yao R., Burr D.H., Guerry P., Trust T.J. 1996. An environmentally regulated pilus-like appendage involved in *Campylobacter* pathogenesis. *Molecular Microbiology*. **20**: 885-894.
- Dorrell N.**, Mangan J.A., Laing K.G., Hinds J., Linton D., Al-Ghusein H., Barrell B.G., Parkhill J., Stoker N.G., Karlyshev A.V., Butcher P.D., Wren B.W. 2001. Whole genome comparison of *Campylobacter jejuni* human isolates using a low-cost microarray reveals extensive genetic diversity. *Genome Research*. **11**: 1706–1715.
- EFSA** [European Food Safety Authority]. 2010a. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses in the EU, 2008, Part A: *Campylobacter* and *Salmonella* prevalence estimates. *EFSA Journal* 2010; 8(03):1503). doi:10.2903/j.efsa.2010.1503. Available online: [www.efsa.europa.eu](http://www.efsa.europa.eu). 100 pp.
- EFSA** [European Food Safety Authority]. 2010b. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses, in the EU, 2008; Part B: Analysis of factors associated with *Campylobacter* colonisation of broiler batches and with *Campylobacter* contamination of broiler carcasses; and investigation of the culture method diagnostic characteristics used to analyse broiler carcass samples. *EFSA Journal* 2010; 8(8):1522. doi:10.2903/j.efsa.2010.1522. Available online: [www.efsa.europa.eu/efsajournal.htm](http://www.efsa.europa.eu/efsajournal.htm). 132 pp.
- EFSA** [European Food Safety Authority]. 2011. European Centre for Disease Prevention and Control; The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009; *EFSA Journal* 2011; 9(3):2090. doi:10.2903/j.efsa.2011.2090. Available online: [www.efsa.europa.eu/efsajournal](http://www.efsa.europa.eu/efsajournal) 378pp.

- Ekdahl** K., Giesecke J. 2004. Travellers returning to Sweden as sentinels for comparative disease incidence in other European countries, campylobacter and giardia infection as examples. *Euro Surveillance*. **9**: 6-9.
- Ertas** H.B., Çetinkaya B.C., Muz A., Öngör H. 2004. Genotyping of broiler-originated *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates using *fla* typing and random amplified polymorphic DNA methods. *International Journal of Food Microbiology*. **94**: 203– 209.
- FAO/WHO** [Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization]. 2009. Risk assessment of *Campylobacter* spp. in broiler chickens: Interpretative Summary. Microbiological Risk Assessment Series No 11. Geneva. 35pp.
- Fernandes** M., Mena C., Silva J., Teixeira P. 2010. Study of cytolethal distending toxin (cdt) in *Campylobacter coli* using a multiplex polymerase chain reaction assay and its distribution among clinical and food strains. *Foodborne Pathogens and disease*. **7**: 103-106.
- Fitzgerald** C., Stanley K., Andrew S., Jones K. 2001. Use of pulsed-field gel electrophoresis and flagellin gene typing in identifying clonal groups of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in farm and clinical environments. *Applied and Environmental Microbiology*. **67**: 1429-1436.
- Fitzgerald** C., Sails A.D., Fields P.I. 2005. *Campylobacter jejuni* strain variation. In J.M. Ketley & M. Konkel (Eds), *Campylobacter: Molecular and Cellular Biology*. Norfolk: Horizon Bioscience. 59-72.
- Gaynor** E.C., Cawthraw S., Manning G., MacKichan J.K., Falkow S., Newell D.G. 2004. The Genome-Sequenced Variant of *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 and the Original Clonal Clinical Isolate Differ Markedly in Colonization, Gene Expression, and Virulence-Associated Phenotypes. *Journal of Bacteriology*. **186**: 503–517.
- Ghigo** J. M. 2003. Are there biofilm-specific physiological pathways beyond a reasonable doubt?. *Research in Microbiology*. **154**: 1–8.
- Guerry** P., Logan S.M., Thornton S., Trust T.J. 1990. Genomic Organization and Expression of *Campylobacter* Flagellin Genes. *Journal of Bacteriology*. **172**: 1853-1860.
- Gunther** N., Chen C. 2009. The biofilm forming potential of bacterial species in the genus *Campylobacter*. *Food Microbiology*. **26**: 44–51.
- Hanning** I., Slavik M. 2009. *Campylobacter jejuni* as a Primary Colonizing Biofilm Former. *International Journal of Poultry Science*. **8**: 1-6.

- Harrington** C.S., Thomson-Carter F.M., Carter P.E. 1997. Evidence for recombination in the flagellin locus of *Campylobacter jejuni*; implications for the flagellin gene typing scheme. *Journal of Clinical Microbiology*. **35**: 2836-2892.
- Hazeleger** W.C., Wouters J.A., Rombouts F.M., Abee T. 1998. Physiological activity of *Campylobacter jejuni* far below the minimal growth temperature. *Applied and Environmental Microbiology*. **164**: 3917–3922.
- Hendrixson** D.R., DiRita V.J. 2004. Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in commensal colonization of the chick gastrointestinal tract. *Molecular Microbiology*. **52**: 471–484.
- Herman** L., Heyndrickx M., Grijspeerdt K., Vandekerchove D., Rollier I., De Zutter L. 2003. Routes for *Campylobacter* contamination of poultry meat: epidemiological study from hatchery to slaughterhouse. *Epidemiology and Infection*. **131**: 1169-1180.
- Herschleb** J., Ananiev G., Schwartz D.C. 2007. Pulsed-field gel electrophoresis. *Nature Protocols* **2**: 677-684.
- Heuvelink** A.E., van Heerwaarden C., Zwartkruis-Nahuis A., Tilburg J.J., Bos M.H., Heilmann F.G., Hofhuis A., Hoekstra T., de Boer E. 2009. Two outbreaks of campylobacteriosis associated with the consumption of raw cows' milk. *International Journal of Food Microbiology*. **134**: 70-74.
- Hofreuter** D., Novik V., Galán J.E. 2008. Metabolic Diversity in *Campylobacter jejuni* Enhances Specific Tissue Colonization. *Cell Host & Microbe*. **4**: 425–433.
- Hu** L., Kopecko D.J. 1999. *Campylobacter jejuni* 81-176 Associates with Microtubules and Dynein during Invasion of Human Intestinal Cells. *Infection and Immunity*. **67**: 4171–4182.
- Hue** O., Le Bouquin S., Laisney M.J., Allain V., Lalande F., Petetin I., Rouxel S., Quesne S., Gloaguen P.Y., Picherot M., Santolini J., Salvat G., Bougeard S., Chemaly M. 2010. Prevalence of and risk factors for *Campylobacter* spp. contamination of broiler chicken carcasses at the slaughterhouse. *Food Microbiology*. **27**: 992-999.
- Humphrey** T., O'Brien S.J., Madsen M. 2007. Campylobacters as zoonotic pathogens: a food production perspective. *International Journal of Food Microbiology*. **117**: 237–257.
- Hunter** P.R., Gaston M.A. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology*. **26**: 2465-2466.
- Hunter** P.R. 1990. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. *Journal of Clinical Microbiology*. **28**: 1903-1905.

- Hussain I.**, Mahmood M.S., Akhtar M., Khan A. 2007. Prevalence of *Campylobacter* species in meat, milk and other food commodities in Pakistan. *Food Microbiology*. **24**: 219-222.
- Ingmer H.** 2010. Challenges of *Campylobacter jejuni* in poultry production. *International Journal of Food Microbiology*. **145**: S110.
- ISO10272-1:2006.** Microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal methods for detection and enumeration of *Campylobacter*, Part 1, Detection method.
- Jackson D.N.**, Davis B., Tirado S.M., Duggal M., van Frankenhuyzen J. K., Deaville D., Wijesinghe M.A.K., Tessaro M., Trevors J.T. 2009. Survival mechanisms and culturability of *Campylobacter jejuni* under stress conditions. *Antonie van Leeuwenhoek*. **96**: 377–394.
- Jagannathan A.**, Penn C. 2005. Motility. In J.M. Ketley & M. Konkel (Eds), *Campylobacter: Molecular and Cellular Biology*. Norfolk: Horizon Bioscience. 331-344.
- Janssen R.**, Krogfelt K.A., Cawthraw S.A., van Pelt W., Wagenaar J.A., Owen R.J. 2008. Host-Pathogen Interactions in *Campylobacter* Infections: the Host Perspective *Clinical Microbiology Reviews*. **21**: 505–518.
- Jørgensen F.**, Bailey R., Williams S., Henderson P., Wareing D.R., Bolton F.J., Frost J.A., Ward L., Humphrey T.J. 2002. Prevalence and numbers of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. on raw, whole chickens in relation to sampling methods. *International Journal of Food Microbiology*. **76**: 151–164.
- Joshua G.**, Guthrie-Irons C., Karlyshev A., Wren B. 2006. Biofilm formation in *Campylobacter jejuni*. *Microbiology*. **152**: 387–396.
- Kalmokoff M.**, Lanthier P., Tremblay T.L., Foss M., Lau P.C., Sanders G., Austin J., Kelly J., Szymanski C.M. 2006. Proteomic Analysis of *Campylobacter jejuni* 11168 Biofilms Reveals a Role for the Motility Complex in Biofilm Formation *Journal of Bacteriology*. **188**: 4312–4320.
- Karatan E.**, Watnick P. 2009. Signals, Regulatory Networks, and Materials That Build and Break Bacterial Biofilms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **73**: 310–347.
- Kelly D.J.** 2005. Metabolism, electron transport and bioenergetics of *Campylobacter jejuni*: implications for understanding life in the gut and survival in the environment. In J.M. Ketley & M.E. Konkel (Eds). *Campylobacter: Molecular and Cellular Biology*. Norfolk: Horizon Bioscience. 275–292.
- Kist M.** 1986. Who discovered *Campylobacter jejuni/coli*? A review of hitherto disregarded literature. *Zentralbl Bakteriologie Mikrobiologie Hygiene*. **261**: 177-186.
- Klausen M.**, Heydorn A., Ragas P., Lambertsen L., Aaes-Jørgensen A., Molin S., Tolker-Nielsen T. 2003. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* Wild type, flagella and type IV pili mutants *Molecular Microbiology*. **48**: 1511–1524.

- Klena** J.D., Konkel, M.E. 2005. Methods for epidemiological Analysis of *Campylobacter jejuni*. In J.M. Ketley & M. Konkel (Eds), *Campylobacter: Molecular and Cellular Biology*. Norfolk: Horizon Bioscience. 166-175.
- Konkel** M.E., Monteville M.R., Rivera-Amill V., Joens L.A. 2001. The pathogenesis of *Campylobacter jejuni*-mediated enteritis. *Current Issues in Intestinal Microbiology*. **2**: 55–71.
- Kopecko** D.J., Hu L. Zaal J.M. 2001. *Campylobacter jejuni* – microtubule dependent invasion. *Trends in Microbiology*. **9**: 389–396.
- Kosman** E., Leonard K.J. 2005. Similarity coefficients for molecular markers in studies of genetic relationships between individuals for haploid, diploid, and polyploid species. *Molecular Ecology*. **14**: 415–424.
- Levin** R. 2007. *Campylobacter jejuni*: A review of its characteristics, pathogenicity, ecology, distribution, subspecies characterization and molecular methods of detection. *Food Biotechnology*. **21**: 271-347.
- Lin** J. 2009. Novel Approaches for *Campylobacter* Control in Poultry. *Foodborne Pathogens and Disease*. **6**: 755-762.
- Matz** C., McDougald D., Moreno A., Yung P., Yildiz F., Kjelleberg S. 2005. Biofilm formation and phenotypic variation enhance predation-driven persistence of *Vibrio cholera*. *PNAS*. **46**: 16819–16824.
- Meinersmann** R.J., Hiatt K.L. 2000. Concerted evolution of duplicate *fla* genes in *Campylobacter*. *Microbiology*. **146**: 2283–2290.
- Mena** C., Rodrigues D., Silva J., Gibbs P., Teixeira P. 2008. Occurrence, identification, and characterization of *Campylobacter* species isolated from portuguese poultry samples collected from retail establishments. *Poultry Science*. **87**: 187-190.
- Miller** M.B., Bassler B.L. 2001. Quorum Sensing in Bacteria. *Annual Review of Microbiology*. **55**: 165–199.
- Miller** W.G., Mandrell R.E. 2005. Prevalence of *Campylobacter* in the Food and Water Supply: Incidence, Outbreaks, Isolation and Detection. In J.M. Ketley & M. Konkel (Eds), *Campylobacter: Molecular and Cellular Biology*. Norfolk: Horizon Bioscience. 101-108.
- Moe** K., Mimura J., Ohnishi T., Wake T., Yamazaki W., Nakai M., Misawa N. 2010. The Mode of Biofilm Formation on Smooth Surfaces by *Campylobacter jejuni*. *Journal of Veterinary Medical Science*. **72**: 411–416.
- Monteville** M.R., Konkel M.E. 2002. Fibronectin-Facilitated Invasion of T84 Eukaryotic Cells by *Campylobacter jejuni* Occurs Preferentially at the Basolateral Cell Surface. *Infection and Immunity*. **70**: 6665–6671.

- Murphy**, C., Carroll, C., Jordan, K.N. 2006. Environmental survival mechanisms of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. *Journal of Applied Microbiology*. **100**: 623–632.
- Nachamkin** I., Yang X., Stern N. 1993a. Role of *Campylobacter jejuni* flagella as colonization factors for three-day-old chicks: analysis with flagellar mutants. *Applied and Environmental Microbiology*. **59**: 1269–1273.
- Nachamkin** I., Bohachick K., Patton C.M. 1993b. Flagellin gene typing of *Campylobacter jejuni* by restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. **31**: 1531-1536.
- Nachamkin** I., Ung H., Patton C.M. 1996. Analysis of HL and O serotypes of *Campylobacter* strains by the flagellin gene typing system. *Journal of Clinical Microbiology*. **34**: 277-281.
- Naito** M., Frirdich E., Fields J., Pryjma M., Li J., Cameron A., Gilbert M., Thompson S., Gaynor E. 2010. Effects of Sequential *Campylobacter jejuni* 81-176 Lipooligosaccharide Core Truncations on Biofilm Formation, Stress Survival, and Pathogenesis. *Journal of Bacteriology*. **192**: 2182–2192
- Nather** G., Alter T., Martin A., Ellerbroek L. 2009. Analysis of risk factors for *Campylobacter* species infection in broiler flocks. *Poultry Science*. **88**: 1299–1305.
- Nebola** M., Steinhäuserová I. 2006. PFGE and PCR/RFLP typing of *Campylobacter jejuni* strains from poultry. *British Poultry Science*. **47**: 456-61.
- NG Lai-King**, Sherburne R., Taylor D., Stiles M. 1985. Morphological Forms and Viability of *Campylobacter* Species Studied by Electron Microscopy. *Journal of Bacteriology*. **164**: 338-343.
- On** S.L.W. (1996) - Identification methods for *Campylobacters*, *Helicobacters*, and related organisms. *Clinical Microbiology Reviews*. **9**: 405-422.
- On** S. 2005. Taxonomy, Phylogeny, and Methods for the Identification of *Campylobacter* Species. In J.M. Ketley & M. Konkel (Eds), *Campylobacter: Molecular and Cellular Biology*. Norfolk: Horizon Bioscience. 13-34.
- Owen** R.J., Fitzgerald C., Sutherland K., Borman P. 1994. Flagellin gene polymorphism analysis of *Campylobacter jejuni* infecting man and other hosts and comparison with biotyping and somatic antigen serotyping. *Epidemiology and Infection*. **113**: 221-234.
- Park** S.F. 2002. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*. **74**: 177-188.
- Park** S.F. 2005. *Campylobacter jejuni* Stress Responses During Survival in the Food Chain and Colonization. In J.M. Ketley & M. Konkel (Eds), *Campylobacter: Molecular and Cellular Biology*. Norfolk: Horizon Bioscience. 311-324.

- Parkhill J.**, Wren B.W., Mungall K., Ketley J.M., Churcher C., Basham D., Chillingworth T., Davies R.M., Feltwell T., Holroyd S., Jagels K., Karlyshev A.V., Moule S., Pallen M. J., Pennk C.W., Quail M.A., Rajandream M-A., Rutherford K.M., van Vliet H.M., Whitehead S., Barrell B. G. 2000. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature*. **403**: 665-668.
- Pepe T.**, De Dominicis R., Esposito G., Ventrone I., Fratamico P.M., Cortesi M.L. 2009. Detection of *Campylobacter* from poultry carcass skin samples at slaughter in Southern Italy. *Journal of Food Protection*. **72**: 1718-1721.
- Percival S.L.**, Chalmers R.M., Embrey M., Hunter P.R., Sellwood J., Wyn-Jones P. 2004. *Microbiology of Waterborne Diseases – Part 2 Bacteriology, 5 Campylobacter*, Elsevier Academic Press. 50 pp.
- Pratt L.A.**, Kolter R. 1999. Genetic analyses of bacterial biofilm formation. *Current Opinion in Microbiology*. **2**: 598–603.
- Reeser R.**, Medler R., Billington S., Jost B., Joens L. 2007. Characterization of *Campylobacter jejuni* Biofilms under Defined Growth Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. **73**: 1908–1913.
- Regulamento (CE) nº853/2004** de 29 de Abril de 2004. No Jornal Oficial da União Europeia. Journal Oficial nº L139 de 30/4/2004.
- Reuter M.**, Mallett A., Pearson B., Vliet A. 2010. Biofilm Formation by *Campylobacter jejuni* is Increased under Aerobic Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. **76**: 2122–2128.
- Ridley A.**, Morris V., Gittins J., Cawthraw S., Harris J., Edge S., Allen V. 2011. Potential sources of *Campylobacter* infection on chicken farms: contamination and control of broiler-harvesting equipment, vehicles and personnel. *Journal of Applied Microbiology*. **111**: 233-244.
- Rosenberg M.**, Gutnick D., Rosenberg E. 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters*. **9**: 29-33.
- Rosenquist H.**, Nielsen N.L., Sommer H.M., Norrung B., Christensen B.B. 2003. Quantitative risk assessment of human campylobacteriosis associated with thermophilic *Campylobacter* species in chickens. *International Journal of Food Microbiology*. **83**: 87-103.
- Rosenquist H.**, Sommer H.M., Nielsen N.L., Christensen B.B. 2006. The effect of slaughter operations on the contamination of chicken carcasses with thermotolerant *Campylobacter*. *International Journal of Food Microbiology*. **108**: 226-232.

- Sampathkumar** B., Napper S., Carrillo C.D., Willson P., Taboada E., Nash J.H.E., Potter A.A., Babiuk L.A., Allan B.J. 2006. Transcriptional and translational expression patterns associated with immobilized growth of *Campylobacter jejuni*. *Microbiology*. **152**: 567–577.
- Shreeve** J.E., Toszeghy M., Pattison M., Newell D.G. 2000. Sequential Spread of *Campylobacter* infection in a multipen broiler house. *Avian diseases*. **44**: 983-988.
- Silva** J., Leite D., Fernandes M., Mena, C., Gibbs, P., Teixeira P. 2011. *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: a review. *Frontiers in Microbiology*. **2**: 1-12.
- Skirrow** M.B. 1977. *Campylobacter* enteritis: a “new” disease. *British Medical Journal* **2**: 9-11.
- Snelling** W.J., Matsuda M., Moore J.E., Dooley J.S.G. 2005. UNDER THE MICROSCOPE - *Campylobacter jejuni*. *Letters in Applied Microbiology*. **41**: 297-302.
- Totten** P.A., Patton C.M., Tenover F.C., Barrett T.J., Stamm W.E., Steigerwalt A.G., Lin J.Y., Holmes K.K., Brenner D.J. 1987. Prevalence and characterization of hippurate-negative *Campylobacter jejuni* in King County, Washington. *Journal of Clinical Microbiology*. **25**: 1747–1752.
- Turkington** C., Ashby B.L. 2007. *The Encyclopedia of Infectious Diseases (Third Edition)*, Facts on File, Inc., New York. 41-43.
- Vandamme** P., Van Doorn L.J., Al Rashid S.T., Quint W.G.V., Van Der Plas J., Chan V.L., On S.L.W. 1997. *Campylobacter hyoilei* Alderton *et al.* 1995 and *Campylobacter coli* Véron and Chatelain 1973 are subjective synonyms. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **47**: 1055-1060.
- Vandamme** P., On S.L.W. 2001. Recommendations of the Subcommittee on the taxonomy of *Campylobacter* and related bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **51**: 719-721.
- Vandamme** P., Debruyne L., De Brandt E., Falsen E. 2010. Reclassification of *Bacteroides ureolyticus* as *Campylobacter ureolyticus* comb. nov., and emended description of the genus *Campylobacter*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **60**: 2016-2022.
- Verhoeff-Bakkenes** L., Jansen H.A.P.M., in 't Veld P.H., Beumer R.R., Zwietering M.H., van Leusden F.M. 2011. Consumption of raw vegetables and fruits: A risk factor for *Campylobacter* infections. *International Journal of Food Microbiology*. **144**: 406-412.
- Véron** M., Chatelain R. 1973. Taxonomic Study of the Genus *Campylobacter* Sebald and Véron and Designation of the Neotype Strain for the Type Species, *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and Véron. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **23**: 22-134.

- Vicente** A., Barros R., Florinda A., Silva A., Hanscheid T. 2008. High rates of fluoroquinolone, resistant *Campylobacter* in Portugal, Need for Surveillance. EuroSurveill.2008;13(6):pii=8031.Availableonline:http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=8031
- Wang** G., Clark C., Taylor T., Pucknell C., Barton C., Price L., Woodward D., Rodgers, F. 2002. Colony Multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp *fetus*. Journal of Clinical Microbiology. **40**: 4744-4747.
- Wassenaar** T.M. 1997. Toxin Production by *Campylobacter* spp. Clinical Microbiology Reviews. **10**: 466–476.
- Wassenaar** T.M., Blaser M.J. 1999. Pathophysiology of *Campylobacter jejuni* infections of humans. Microbes and Infection. **1**: 1023–1033.
- Wassenaar** T., Newell D. 2000. Genotyping of *Campylobacter* spp. Applied and Environmental Microbiology. **66**: 1–9.
- Wassenaar** T., Newell D. 2006. The Genus *Campylobacter*. In: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, Karl-Heinz Schleifer and E. Stackebrandt (ed.), The Prokaryotes, Vol. 7: Proteobacteria: Delta, Epsilon Subclass, Springer. 119 pp.
- Wilson** D.J., Gabriel E., Leatherbarrow A.J.H., Cheesbrough J., Gee S., Bolton E., Fox A., Fearnhead P., Hart C.A., Diggle P.J. 2008. Tracing the Source of *Campylobacteriosis*. PLoS Genet 4(9): e1000203. doi:10.1371/journal.pgen.1000203
- Wingstrand** A., Neimann J., Engberg J., Nielsen E.M., Gerner-Smidt P., Wegener H.C., Molbak K. 2006. Fresh chicken as main risk factor for *campylobacteriosis*, Denmark. Emerging Infectious Diseases. **12**: 280-285.
- Young** V.B., Mansfield L.S. 2005. *Campylobacter* Infection – Clinical Context. In J.M. Ketley & M. Konkel (Eds), *Campylobacter: Molecular and Cellular Biology*. Norfolk: Horizon Bioscience. 1-8.
- Yuki** N. 1999. Pathogenesis of Guillain-Barré and Miller Fisher syndromes subsequent to *Campylobacter jejuni* enteritis. Japanese Journal of Infectious Diseases. **52**: 99-105.
- Zhao** C., Ge B., De Villena J., Sudler R., Yeh E., Zhao S., White D.G., Wagner D., Meng J. 2001. Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, and *Salmonella* Serovars in Retail Chicken, Turkey, Pork, and Beef from the Greater Washington, D.C., Area. Applied and Environmental Microbiology. **67**: 5431–5436.
- Zhong** M., Ca F.C. 2007. Current perspectives on Guillain-Barré syndrome. World Journal of Pediatrics. **3**: 187-194.

**Zhongming** G., Schauer D.B., Fox J.G. 2008. *In vivo* virulence properties of bacterial cytolethal-distending toxin. *Cellular Microbiology*. **10**: 1599-1607.