

Universidade Federal de Minas Gerais
Escola de Veterinária
Colegiado dos Cursos de Pós-Graduação

Paula Alexandra da Graça Morais Rios

**Aderência e invasibilidade em células HeLa de amostras de
Campylobacter spp. isoladas de animais.**

Dissertação apresentada ao curso de
Mestrado em Medicina Veterinária, área de
concentração de Medicina Veterinária
Preventiva, da Escola de Veterinária da
UFMG.

Orientador: Andrey Pereira Lage

Belo Horizonte
2005

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| RESUMO | 4 |
| 1- INTRODUÇÃO | 6 |
| 2- LITERATURA CONSULTADA | 7 |
| 3- OBJETIVOS | 10 |
| 4- MATERIAL E MÉTODOS | 11 |
| 4.1- AMOSTRAS BACTERIANAS..... | 11 |
| 4.2- CULTIVO DAS AMOSTRAS..... | 11 |
| 4.3- CÉLULAS HeLa..... | 13 |
| 4.4- ENSAIO DE ADERÊNCIA E INVASÃO..... | 13 |
| 4.5- DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERIANA..... | 13 |
| 4.6- CÁLCULO DA CAPACIDADE DE ADERÊNCIA E INVASÃO..... | 14 |
| 4.7- ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 14 |
| 5- RESULTADOS | 15 |
| 6- DISCUSSÃO | 20 |
| 7- CONCLUSÕES | 23 |
| 8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 24 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1- Amostras de <i>Campylobacter</i> sp. isoladas de animais, utilizadas neste estudo..... | 12 |
| Tabela 2- Aderência e invasão de amostras de <i>Campylobacter</i> sp. isoladas de animais em células HeLa. | 16 |
| Tabela 3 - Aderência e invasão em células HeLa por amostras de <i>Campylobacter</i> sp. isoladas de primatas não-humanos..... | 18 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Média dos percentuais de aderência e invasão em células HeLa das amostras de <i>Campylobacter</i> sp. isoladas de animais..... | 15 |
| Figura 2 - Capacidade de aderência e invasão em células HeLa por amostras de <i>Campylobacter</i> sp. isoladas de animais..... | 17 |
| Figura 3 – Percentual de amostras de <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> aderentes e invasivas em células HeLa segundo a origem da amostra..... | 18 |
| Figura 4 – Percentagem de amostras de <i>C. fetus</i> isoladas de fezes e aparelho genital de bovinos capazes de aderir e invadir as células Hela..... | 19 |

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a capacidade de aderência e invasão de amostras de *Campylobacter* sp. isoladas de bezerros, suínos, frangos, cães e primatas não humanos utilizando ensaio com gentamicina. Sessenta e três amostras foram testadas quanto à sua capacidade de aderência e invasão, pelo ensaio com gentamicina, em células HeLa. Sessenta e três amostras foram testadas quanto à sua capacidade de aderência e invasão, pelo ensaio com gentamicina, em células HeLa. Os resultados demonstraram que amostras de *C. jejuni*, *C. coli* e *C. fetus* subsp. *fetus*, isoladas de fezes de animais são capazes de aderir e invadir as células HeLa, porém nenhuma amostra de *C. fetus* subsp. *fetus* isolada de trato genital bovino foi capaz de invadir as células HeLa

Palavras-Chave: *Campylobacter*, aderência, invasão.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the adhesiveness and invasiveness of *Campylobacter* sp. isolated from calves, swine, broilers, dogs and non-human primates by the gentamicin assay. Sixty-three *Campylobacter* sp. strains were tested for “in vitro” adherence and invasiveness in HeLa cells. Our results demonstrate that *C. jejuni*, *C. coli* e *C. fetus* subsp. *fetus* isolated from animals has were able to adhere to and to invade HeLa cells.

Keywords: *Campylobacter*, adhesiveness, invasiveness

INTRODUÇÃO

Animais domésticos e selvagens podem ser considerados importantes reservatórios de *Campylobacter* spp. e possíveis fontes de infecção para o homem.

Vários estudos “in vitro” para a determinação da capacidade de aderência e invasão de *Campylobacter* sp., principalmente *C. jejuni* e *C. coli*, em culturas de células têm sido realizados. Esses estudos são importantes, pois a aderência e a colonização dos tecidos animais são passos fundamentais para o estabelecimento de uma infecção.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a capacidade de aderência e invasão de amostras de *Campylobacter* sp. isoladas de bezerros, suínos, frangos, cães e primatas não humanos utilizando ensaio com gentamicina.

MATERIAIS E MÉTODOS

Sessenta e três amostras foram testadas quanto à sua capacidade de aderência e invasão, pelo ensaio com gentamicina, em células HeLa. Dentre as 63 amostras testadas, 4 foram isoladas de frangos (3 *C. jejuni* e 1 *C. coli*), 4 de cães (todas *C. jejuni*), 16 de primatas não-humanos (7 *C. jejuni* e 9 *C. coli*), 9 de suínos (4 *C. jejuni* e 5 *C. coli*), 18 de fezes de bezerros e 12 de trato genital bovino (todas *C. fetus* subsp. *fetus*).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Trinta e duas amostras testadas (51%) aderiram e dentre essas, treze invadiram as células HeLa. Uma entre quatro (25%) amostras isoladas de cães foram invasivas em células HeLa, assim como 4 (25%) isoladas de primatas não-humanos (2 *C. jejuni* e 2 *C. coli*), 1 *C. coli* (11%) isolada de suíno e 7 (39%) de fezes de bezerro (todas *C. fetus* subsp. *fetus*). Apenas 25% das amostras isoladas de frangos e cães e 23% das amostras isoladas de suínos foram capazes de aderir às células, enquanto 65% das amostras isoladas de fezes de bezerros e 83% das amostras isoladas do trato genital bovino apresentam essa capacidade. Cinco entre 19 amostras (26%) de *C. jejuni* foram capazes de aderir e 3 (16%) de invadir as células HeLa. Entre as amostras de *C. coli*, 6 (40%) foram aderentes e 3 (20%) invasivas enquanto entre as 29 amostras de *C. fetus* subsp. *fetus*, 21 (76%) foram capazes de aderir e 7 (24%) de invadir. Entre todas as amostras de *Campylobacter* sp. testadas, 51% foram capazes de aderir e 21% aderiram e invadiram as células HeLa. Os resultados obtidos nesse estudo diferem dos resultados obtidos por outros pesquisadores. Existem poucos estudos de aderência e invasão em células epiteliais utilizando amostras de *Campylobacter* sp. isoladas de animais e poucas amostras são analisadas. Pode ser que haja

diferença no uso de células de origem humana quando se avalia a capacidade de aderência e invasão de amostras de *Campylobacter* isoladas de animais. Outro motivo provável que justifique o baixo número de amostras de *Campylobacter* sp. aderentes e invasivas pode estar relacionado com a quantidade de vezes que as amostras testadas foram repicadas em laboratório.

CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que amostras de *C. jejuni*, *C. coli* e *C. fetus* subsp. *fetus*, isoladas de fezes de animais são capazes de aderir e invadir as células HeLa, porém nenhuma amostra de *C. fetus* subsp. *fetus* isolada de trato genital bovino foi capaz de invadir as células HeLa

1) INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Campylobacter* têm recebido a atenção dos pesquisadores nas últimas três décadas, pois é cada vez mais freqüente o isolamento dessas espécies no homem, em animais e alimentos. *Campylobacter* sp. são considerados parte da microbiota intestinal indígena da maioria dos animais domésticos e selvagens e podem ser transmitidas ao homem pela contaminação fecal de alimentos e da água. A infecção com amostras de *C. jejuni* também está relacionada com o desenvolvimento da síndrome de Guillain-Barré. As espécies *C. jejuni* e *C. coli* são agentes causadores de enterocolites no homem e *C. fetus* pode causar bacteremia em indivíduos imunodeficientes e aborto e infertilidade nos animais.

Muitos patógenos entéricos, inclusive *Campylobacter* sp., tentam evadir-se do sistema de defesa do organismo hospedeiro e penetram em células epiteliais, causando doenças. A penetração na mucosa intestinal causa inflamação e bacteremia, sugerindo então que a invasão celular é um importante mecanismo de virulência para *Campylobacter* sp. A aderência em células epiteliais é um pré-requisito para invasão e esse processo de invasão inclui a entrada da bactéria no interior da célula, multiplicação intracelular e muitas vezes, morte celular. A capacidade de aderência e invasão de amostras de *Campylobacter* sp. isoladas de homens e animais tem sido testada " in vitro " em diversas linhagem celulares. Essa interação da *Campylobacter* sp. com as células epiteliais ainda não é totalmente entendida.

Apesar da importância como patógeno humano e veterinário, muito pouco é conhecido sobre os fatores de virulência de microrganismos do gênero *Campylobacter*, principalmente de amostras isoladas de animais, pois a maioria dos estudos são realizados com amostras isoladas de seres humanos.

2) LITERATURA CONSULTADA

Os microrganismos do gênero *Campylobacter* são bastonetes Gram-negativo, espiralados, em forma de vírgula, “S” ou “asa de gaivota”. São microaerófilos, necessitando de uma atmosfera rica em CO₂ (10%) e reduzida concentração de O₂ (5%) para seu crescimento. Possuem um ou dois flagelos polares e giram em torno do próprio eixo. Sua motilidade característica é melhor observada em microscopia de contraste de fase ou de campo escuro. Este gênero bacteriano não fermenta nem oxida nenhum tipo de carboidrato. Algumas espécies são termofílicas, crescendo a uma temperatura de incubação de 37°C a 42°C (Smibert, 1978).

Campylobacter sp. tem sido reconhecido como um importante patógeno no homem e em animais e pode ser transmitido ao homem por animais infectados, constituindo agente de importante zoonose. Aves domésticas e selvagens, suínos, bovinos, cães e gatos, podem ser considerados importantes reservatórios de *Campylobacter* sp. e possíveis fontes de infecções para o homem. A transmissão para o homem ocorre pela ingestão de alimentos e água contaminados, incluindo leite não pasteurizado e carne de aves mal cozidas, ou por contato direto com material fecal contaminado de animais ou pessoas (Tauxe, 1997).

As infecções causadas por *Campylobacter* sp. no homem podem ser classificadas em dois tipos: infecção intestinal e infecção extra-intestinal (Blaser, 1990). Dentre as espécies causadoras de infecções intestinais foram classificadas: *C. jejuni* subsp. *jejuni*, *C. jejuni* subsp. *doylei*, *C. coli*, *C. upsaliensis*, *C. lari*, *C. fetus* subsp. *fetus* e *C. hyointestinalis*. As infecções extra-intestinais seriam causadas por: *C. jejuni* subsp. *jejuni*, *C. upsaliensis*, *C. lari*, *C. fetus* subsp. *fetus*, *C. fetus* subsp. *venerealis*, *C. sputorum*, *C. curvus* e *C. retus*.

Mais recentemente, os interesses científicos aumentaram em relação às infecções por *Campylobacter* sp., pois passaram a ser vistos como um amplo problema de saúde pública. Algumas espécies do gênero *Campylobacter* são agentes causadores de enterocolites no homem em muitos países industrializados e em desenvolvimento. Infecções entéricas por *C. jejuni* e *C. coli* estão entre os principais problemas de saúde pública nos países industrializados (Tauxe, 1992; ACMSF, 1993). Nestes países, o número de casos de infecção intestinal por essas duas espécies de *Campylobacter* é significativamente maior que outros patógenos entéricos, incluindo *Salmonella* sp. (ACMSF, 1993). Nos países em desenvolvimento, a infecção é frequentemente relatada em crianças e, muitas vezes, é assintomática, sendo reflexo da aquisição de imunidade pela frequente exposição à *Campylobacter* sp. (Ketley, 1997).

As subespécies de *Campylobacter fetus*, *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* e *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, são responsáveis por diferentes doenças em hospedeiros mamíferos (Thompson e Blaser, 2000). *C. fetus* subsp. *fetus* tem sido estabelecido como importante patógeno veterinário, causando aborto em ovinos e bovinos, e como patógeno entérico no homem, causando bacteremia e outras infecções sistêmicas, especialmente em pacientes imunossuprimidos (Dekeyser, 1984; Ohya *et al.*, 1993). *C. fetus* subsp. *venerealis* coloniza o trato reprodutivo de bovinos e causa altas taxas de repetição de cio, a intervalos aumentados e irregulares, podendo ainda levar a aborto e esterilidade (Dekeyser, 1984; Thompson e Blaser, 2000).

Estudos microbiológicos realizados no estado de Minas Gerais - Brasil, que isolaram *Campylobacter* sp. de frangos, bezerras, sagüis e crianças com menos de 5 anos, com e sem

diarréia, demonstraram a alta frequência de infecção por bactérias do gênero *Campylobacter* em nosso meio (Mendes et al., 1985; Carvalho, 1992; Lage et al., 1992).

Muito pouco é conhecido sobre a relação parasito-hospedeiro e os fatores de virulência de microrganismos do gênero *Campylobacter*, principalmente de amostras isoladas de animais domésticos (Ketley, 1997). Os estudos de patogenicidade de amostras de *Campylobacter* sp. demonstram diversos fatores associados à patogenicidade destas bactérias: capacidade de invadir células epiteliais (Fauchère et al., 1986), produção de enterotoxina (Ruiz-Palácios et al., 1983) e de citotoxina (Wassenaar, 1997). Dentre estes fatores, a capacidade de adesão e invasão em células epiteliais é considerado o mais importante mecanismo patogênico da diarréia por *Campylobacter* sp. (Ketley, 1997).

Vários estudos “in vitro” para a determinação da capacidade de aderência e invasão de *Campylobacter* sp., principalmente *C. jejuni* e *C. coli*, em culturas de células têm sido realizados. Esses estudos são importantes, pois a aderência e a colonização dos tecidos animais são passos fundamentais para o estabelecimento de uma infecção. A adesão de microrganismos na superfície mucosa é o passo principal na patogenia de muitas infecções intestinais e um pré-requisito para a invasão celular. Em grande parte das vezes, a invasão celular consiste na entrada da bactéria no interior da célula epitelial, multiplicação intracelular e destruição da célula (Tay et al., 1996).

A habilidade da *C. jejuni* de se ligar a linhagens de células epiteliais “in vitro” é significativamente afetada pelo estágio de crescimento e temperatura de crescimento da bactéria, mas não pela composição do meio de crescimento. Para determinar a influência do tempo de crescimento de *C. jejuni* e a habilidade de aderir em células INT 407, Konkel et al. (1992) cultivaram esses organismos em ágar de infusão de cérebro -coração (Brain Heart Infusion – BHI) acrescido de sangue por vários períodos. O máximo de aderência foi observado em culturas de 24 horas. Entretanto, houve apenas uma pequena redução de aderência em bactérias cultivadas por 48 horas. O máximo de aderência também foi observado em bactérias cultivadas a 37°C. As bactérias crescidas a 42°C tiveram uma diminuição de 66% e as bactérias crescidas a 30°C uma diminuição de 91% na capacidade de adesão em relação às bactérias cultivadas a 37°C. Uma diminuição no número de bactérias internalizadas também ocorre quando o ensaio de aderência é realizado a 4°C, quando comparado ao ensaio realizado à 37°C. Nenhuma diferença significativa foi observada entre bactérias crescidas em meio líquido BHI e ágar sangue Mueller-Hinton (MH) (Konkel et al., 1992).

Em monocamadas de células INT 407, não há diferença significativa no número de bactérias aderidas durante as 3 primeiras horas de infecção. O aumento na multiplicidade da infecção aumenta o número de células atacadas. Isso só não acontece, quando a multiplicidade da infecção é menor que 1000 bactérias/célula (Konkel et al., 1992).

C. jejuni isolado de pacientes com febre e diarréia é capaz de invadir mais efetivamente células de linhagem epitelial de origem humana como células INT 407, Hep-2 e HeLa. As células de linhagem epitelial de origem não-humana, Vero, MDBK e CHO-K1, são menos efetivas para a realização do teste de invasão (Konkel et al., 1992).

Muitas técnicas foram desenvolvidas para diferenciar a capacidade de bactérias enteropatogênicas de aderir e invadir células epiteliais. Fauchère et al. (1986) utilizaram um teste “in vitro” para avaliar a associação em células HeLa de *C. jejuni* e *C. coli* isolados de

pacientes. Após a infecção as células foram coradas com Giemsa para quantificar o número de bactérias associadas. Menos da metade das amostras de *C. jejuni* e *C. coli* isoladas de fezes humanas podem se associar com células eucarióticas “in vitro”. Fernandez e Trabulsi (1995) também utilizaram essa técnica para observar a capacidade de invasão em células HeLa de amostras de *C. jejuni* e *C. coli*. Todas as amostras isoladas de animais foram capazes de invadir as células HeLa. Outros pesquisadores têm utilizado testes similares para avaliar a capacidade associativa e invasiva de amostras de *Campylobacter* sp. Manninen et al. (1982), em Toronto, Canadá, testaram amostras de *C. jejuni* isoladas de fezes de animais e de crianças, em células HeLa. Todas as amostras foram capazes de aderir e invadir as células HeLa. Entretanto, Manninen et al. (1982) descreveram que a técnica de coloração por Giemsa dificulta a quantificação de bactérias intracelulares por elas serem muito pequenas e corarem muito pouco, podendo ser confundidas com o citoplasma celular.

A coloração pela prata também é descrita por alguns autores para observação da capacidade de adesão em células epiteliais por bactérias enteroinvasivas. Lindblom et al. (1990) utilizaram a coloração pela prata e o ensaio com gentamicina para observar a capacidade de aderência e invasão em células HEP-2 de 200 amostras de *C. jejuni* e *C. coli* isoladas de pacientes suecos com enterocolites aguda. Todas as amostras foram capazes de aderir às células Hep-2 e 39% das amostras foram consideradas invasivas.

Fernandez et al. (1997) utilizaram a técnica de coloração pelo laranja de acridina em solução de Gey e cristal violeta e, por microscopia de fluorescência, puderam observar *C. jejuni* verde fluorescente no interior de células Hep-2. Essa técnica é muito utilizada para a determinação de bactérias internalizadas e não permite a observação das bactérias associadas (Miliotis, 1991).

Graham (2002) investigou a capacidade de aderência e invasão de amostras de *C. fetus* em células INT 407, por imunofluorescência e ensaio com gentamicina. Todas as amostras foram detectadas intracelularmente usando ambas as técnicas. Entretanto, Manninen et al. (1982) descreveram que o processo de coloração por imunofluorescência requer um grande número de lavagens resultando na diminuição de bactérias na superfície celular. Konkel e Joens (1989) também condenam o método, por se gastar muito tempo contando as bactérias intracelulares, e classificam o ensaio com gentamicina como sendo mais fácil e de grande acurácia.

O ensaio utilizando gentamicina é realizado por muitos pesquisadores para quantificar o número de bactérias associadas e intracelulares (Melo et al., 1989; Konkel et al., 1992; Russel e Blake, 1994; Wooldridge et al., 1996). A concentração de 250µg/ml de gentamicina em meio essencial mínimo (MEM) mata todas as bactérias extracelulares após 3 horas de exposição. Paralelamente, a mesma amostra deve ser testada utilizando MEM sem gentamicina, permitindo assim o cálculo de amostras aderidas. Após lise celular e contagem de unidades formadoras de colônia (UFC), o número de bactérias intracelulares e associadas pode ser calculado por diferença (Biswas et al., 2003).

A maior parte dos estudos sobre os fatores associados à patogenicidade de *Campylobacter* sp. são de amostras isoladas de pacientes humanos. Muito pouco é conhecido sobre a capacidade de aderência e invasão de amostras isoladas de animais domésticos.

3) OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- Avaliar a capacidade de aderência e invasão de amostras de *Campylobacter* sp. isoladas de fezes de animais;
- Comparar a capacidade de aderência e invasão entre as espécies de *Campylobacter* isoladas de fezes de diferentes animais;
- Comparar a capacidade de aderência e invasão entre as amostras de *C. fetus* subsp. *fetus* isoladas de fezes e do trato genital de bovinos.

4) MATERIAL E MÉTODOS

4.1) Amostras bacterianas

Foram testadas 63 amostras de *Campylobacter* sp. (Tabela 1) isoladas de fezes de bezerros com e sem diarreia, de “swab” retal de frangos e de suínos, de fezes de cães e de primatas das coleções do Laboratório de Bacteriologia Aplicada, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária e do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ) e do Animal Disease Research Institute, Canadá. Como controle positivo foi utilizada a amostra de *C. jejuni* 84sp (invasiva) e como controle negativo a amostra de *C. coli*, não invasiva, 49sp (Carvalho et al., 2001). As amostras isoladas já haviam sido identificadas por técnicas de rotina (Vandamme e Goossens, 1992; Hum et al., 1997).

4.2) Cultivo das amostras

As amostras bacterianas foram cultivadas em ágar BHI (Difco - USA) acrescido de 10% de sangue equino, a 37^o C em microaerofilia (5% O₂, 5% H₂, 10% CO₂ e 80% N₂) por 48 horas. A pureza das amostras foi comprovada pela coloração por fucsina e análise em microscopia óptica.

Para manutenção, as amostras foram conservadas a -70^o C em caldo tioglicolato (Merck - Alemanha) com 20% de glicerol (Mills e Gherna, 1988).

Tabela 1- Amostras de *Campylobacter* sp. isoladas de animais, utilizadas neste estudo.

| Amostras | Espécie | Origem | Referência |
|-----------|-------------------------------------|------------------------|-------------------------|
| LBA 85 | <i>C. coli</i> | Frango | LBA, 1990 |
| LBA 152 | <i>C. coli</i> | Suíno | LBA, 1990 |
| LBA 166 | <i>C. coli</i> | Suíno | LBA, 1990 |
| LBA 168 | <i>C. coli</i> | Suíno | LBA, 1990 |
| LBA 183 | <i>C. coli</i> | Suíno | LBA, 1990 |
| LBA 195 | <i>C. coli</i> | Suíno | LBA, 1990 |
| Q 247 | <i>C. coli</i> | primatas não-humanos | Lauria-Filgueiras, 2000 |
| R107 | <i>C. coli</i> | primatas não-humanos | Lauria-Filgueiras, 2000 |
| R192 | <i>C. coli</i> | primatas não-humanos | Lauria-Filgueiras, 2000 |
| R226 | <i>C. coli</i> | primatas não-humanos | Lauria-Filgueiras, 2000 |
| R268 | <i>C. coli</i> | primatas não-humanos | Lauria-Filgueiras, 2000 |
| R27 | <i>C. coli</i> | primatas não-humanos | Lauria-Filgueiras, 2000 |
| R37 | <i>C. coli</i> | primatas não-humanos | Lauria-Filgueiras, 2000 |
| R46 | <i>C. coli</i> | primatas não-humanos | Lauria-Filgueiras, 2000 |
| T44 | <i>C. coli</i> | primatas não-humanos | Lauria-Filgueiras, 2000 |
| LBA 206 | <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> | Bezerro | Lage, 1992 |
| LBA 207 | <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> | Bezerro | Lage, 1992 |
| LBA 301 | <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> | Bezerro | Lage, 1992 |
| LBA 319 | <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> | Bezerro | Lage, 1992 |
| LBA 322 | <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> | Bezerro | Lage, 1992 |
| LBA 334 | <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> | Bezerro | Lage, 1992 |
| LBA 339 | <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> | Bezerro | Lage, 1992 |
| LBA 354 | <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> | Bezerro | Lage, 1992 |
| LBA 356 | <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> | Bezerro | Lage, 1992 |
| LBA 363 | <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> | Bezerro | Lage, 1992 |
| LBA 367 | <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> | Bezerro | Lage, 1992 |
| LBA 368 | <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> | Bezerro | Lage, 1992 |
| LBA 383 | <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> | Bezerro | Lage, 1992 |
| LBA 392 | <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> | Bezerro | Lage, 1992 |
| LBA 393 | <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> | Bezerro | Lage, 1992 |
| LBA 401 | <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> | Bezerro | Lage, 1992 |
| LBA 389 | <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> | Bezerro | Lage, 1992 |
| EV5 | <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> | feto bovino | Leite, 1977 |
| T5738 | <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> | lavado prepucial | LBA, 1990 |
| Curvelo | <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> | lavado prepucial | LBA, 1990 |
| Fundação | <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> | mucosa cérvico vaginal | LBA, 1990 |
| Gáúcho | <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> | lavado prepucial | LBA, 1990 |
| Grécia | <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> | mucosa cérvico vaginal | LBA, 1990 |
| Magneto | <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> | lavado prepucial | LBA, 1990 |
| Olinda | <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> | mucosa cérvico vaginal | LBA, 1990 |
| ADRI 1810 | <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> | trato genital | ADRI |
| ADRI 1811 | <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> | trato genital | ADRI |
| ADRI 1812 | <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> | trato genital | ADRI |
| ADRI 1813 | <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> | trato genital | ADRI |
| LBA 84 | <i>C. jejuni</i> | Frango | LBA, 1990 |
| LBA 86 | <i>C. jejuni</i> | Frango | LBA, 1990 |
| LBA 88 | <i>C. jejuni</i> | Frango | LBA, 1990 |
| LBA 112 | <i>C. jejuni</i> | Cão | LBA, 1990 |
| LBA 113 | <i>C. jejuni</i> | Cão | LBA, 1990 |
| LBA 116 | <i>C. jejuni</i> | Cão | LBA, 1990 |
| LBA 119 | <i>C. jejuni</i> | Cão | LBA, 1990 |
| LBA 151 | <i>C. jejuni</i> | Suíno | LBA, 1990 |
| LBA 154 | <i>C. jejuni</i> | Suíno | LBA, 1990 |
| LBA 156 | <i>C. jejuni</i> | Suíno | LBA, 1990 |
| LBA 199 | <i>C. jejuni</i> | Suíno | LBA, 1990 |
| LPB 4810 | <i>C. jejuni</i> | primatas não-humanos | Carvalho, 1992 |
| LPB 4815 | <i>C. jejuni</i> | primatas não-humanos | Carvalho, 1992 |
| R270 | <i>C. jejuni</i> | primatas não-humanos | Lauria-Filgueiras, 2000 |
| R31 | <i>C. jejuni</i> | primatas não-humanos | Lauria-Filgueiras, 2000 |
| SQ308 | <i>C. jejuni</i> | primatas não-humanos | Lauria-Filgueiras, 2000 |
| LBA 208 | <i>C. jejuni</i> | Bezerro | Lage, 1992 |
| LPB 4792 | <i>C. jejuni</i> | primatas não-humanos | Carvalho, 1992 |
| LPB 4820 | <i>C. jejuni</i> | primatas não-humanos | Carvalho, 1992 |

ADRI – Animal Disease Research Institute, Canadá.

LBA – Laboratório de Bacteriologia Aplicada, EV / UFMG

LPB- Laboratório de Pesquisa em Bacteriologia, FM / UFMG

4.3) Células HeLa

Foram empregadas células HeLa (CCL2 - ATCC - USA), mantidas em meio mínimo essencial (MEM - Sigma - USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB – Gibco - USA), 200 UI/mL de penicilina G (Sigma - USA) e 50 µg/mL de estreptomicina (Sigma - USA). As células foram cultivadas em garrafas plásticas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C por 24 a 48 horas. Após a obtenção de uma monocamada confluyente na superfície da garrafa, as células eram tripsinizadas, diluídas 1:3 em MEM com 5% de SFB e antibióticos e incubadas novamente nas mesmas condições.

4.4) Ensaio de Aderência e Invasibilidade

Dezoito horas antes do início do experimento era preparada uma suspensão de células HeLa em MEM, suplementado com 5% de SFB, sem antibiótico, na concentração de 4×10^5 células/mL. Em cada poço da placa de 48 poços (Corning Incorporation - USA) foram adicionados 550µL da suspensão celular e a placa foi incubada a 37°C, em atmosfera úmida com 5% CO₂.

Após a incubação das células HeLa, o meio foi descartado e cada poço foi lavado 10 vezes com 500µL de PBS pH 7,2.

As amostras bacterianas foram suspensas em PBS após o crescimento em agar BHI e a concentração foi ajustada para 10^8 UFC/mL, equivalente ao tubo 3 da Escala de MacFarland. Essa suspensão foi centrifugada (14000 X g por 10 min) e o sedimento ressuspenso em um mesmo volume de MEM com 5% de SFB e sem antibióticos. Foram então inoculados 140µL da suspensão bacteriana, em quadruplicata, na placa de 48 poços. A multiplicidade de infecção empregada foi de 1000 bactérias/célula.

As placas com as células e as suspensões bacterianas foram incubadas a 37°C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂, por três horas, para permitir a adesão bacteriana nas células.

Após a incubação, o meio foi descartado e os poços foram lavados 10 vezes com 500µL de PBS pH 7,2. Em dois poços foram adicionados 140µL de MEM com 5% SFB + 250µg/ml de gentamicina e nos outros dois poços foi colocado 140µl de MEM com 5% SFB e sem antibiótico. As placas foram incubadas novamente a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ por mais três horas. O meio foi descartado e os poços lavados 10 vezes com 500µL de PBS pH 7,2. As células foram lisadas pela adição de 200µL de Triton X100 (LKB Bromma - Suécia) na concentração de 0,1% por poço, por 10 min.

Foram realizados dois testes por amostra e todos os testes foram realizados em duplicata.

4.5) Determinação da concentração bacteriana.

A determinação da concentração das suspensões bacterianas foi realizada em placa de agar BHI com 5% de sangue de cavalo, em duplicata, pelo “drop count method” (Miles e Misra, 1938).

4.6) Cálculo da capacidade de aderência e invasão

Uma amostra foi considerada como não aderente e não invasiva (Ad^- / Inv^-) quando não houve crescimento bacteriano nas contagens bacterianas realizadas a partir dos poços sem e com gentamicina.

Uma amostra foi considerada como aderente e não invasiva (Ad^+ / Inv^-) quando houve crescimento bacteriano na contagem bacteriana realizada a partir dos poços sem gentamicina, mas não houve crescimento bacteriano ou o número de bactérias foi igual ou inferior ao do controle negativo (49 sp) nos poços com gentamicina.

Uma amostra foi considerada como invasiva (Ad^+ / Inv^+) quando houve crescimento na contagem bacteriana realizada a partir dos poços sem gentamicina e quando o número de bactérias na contagem dos poços com gentamicina foi maior que o controle negativo (49 sp).

As percentagens de aderência e invasão foram calculadas segundo Tay et al. (1996). A percentagem de aderência de cada amostra foi calculada utilizando as contagens bacterianas do inóculo e dos poços sem gentamicina:

$$\% \text{ de aderência} = \frac{\text{número de bactérias intracelulares} + \text{bactérias aderentes} / \text{mL}}{\text{número de bactérias do inóculo} / \text{mL}} \times 100$$

A percentagem de invasão de cada amostra foi calculada utilizando a contagem bacteriana do inóculo e dos poços com gentamicina:

$$\% \text{ de invasão} = \frac{\text{número de bactérias intracelulares} / \text{mL}}{\text{número de bactérias do inóculo} / \text{mL}} \times 100$$

4.7) Análise estatística

A associação entre a capacidade de aderência e invasão em células HeLa por amostras isoladas de animais foi analisada pelo teste do χ^2 ou pelo teste de Fisher, quando adequado.

5) RESULTADOS

Os resultados de aderência e invasão em células HeLa por amostras de *Campylobacter* sp. isoladas de animais estão demonstrados na Tabela 2. A amostra de *C. jejuni*, 84sp, foi utilizada como controle positivo, sendo seu percentual médio de internalização de 0,005%. O controle negativo utilizado no ensaio foi a amostra *C. coli* 49sp, que demonstrou percentual médio de internalização (0,000051%). Todas as amostras que apresentaram percentual de invasão maior que o índice determinado pelo controle negativo foram consideradas invasivas. A habilidade de aderir e invadir células HeLa variou muito entre as amostras estudadas. A percentagem de internalização variou entre 0,000128% e 0,55814% e a percentagem de aderência variou entre 0,0000053% e 2,09302%.

As amostras de *C. fetus* subsp. *fetus* isoladas de fezes tiveram a maior média tanto no percentual de aderência quanto no percentual de invasão. Ao contrário, as amostras da mesma espécie, porém isoladas do trato genital de bovinos apresentaram uma média as menores médias de aderência e invasão celular comparadas com as outras amostras testadas (Fig. 1).

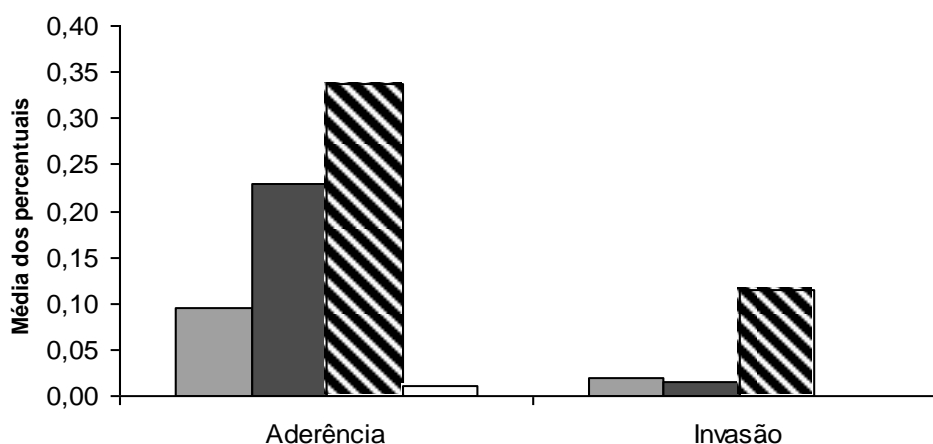


Figura 1 – Média dos percentuais de aderência e invasão em células HeLa das amostras de *C. jejuni* □, *C. coli* ■, *C. fetus* subsp. *fetus* (fezes) ▨ e *C. fetus* subsp. *fetus* (trato genital) □ isoladas de animais.

Entre as 63 amostras isoladas, 32 amostras (51%) foram capazes de aderir ou invadir as células HeLa. Destas, 19 amostras (59%) aderiram e não invadiram (Ad^+ / Inv^-) e 13 amostras (41%) aderiram e invadiram (Ad^+ / Inv^+) as células HeLa. Quase a metade das amostras testadas (49%) não foi capaz nem de aderir, nem de invadir as células HeLa (Tab. 2).

Tabela 2- Aderência e invasão de amostras de *Campylobacter* sp. isoladas de animais em células HeLa.

| ESPÉCIE | ORIGEM | Ad ⁻ /Inv ⁻ 1 | Ad ⁺ /Inv ⁻ 2 | Ad ⁺ /Inv ⁺ 3 | Total |
|-------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------|
| <i>C. jejuni</i> | frango | 2 | 1 | 0 | 3 |
| | cão | 3 | 0 | 1 | 4 |
| | suíno | 4 | 0 | 0 | 4 |
| | bezerro | 0 | 1 | 0 | 1 |
| | primatas não-humanos | 5 | 0 | 2 | 7 |
| Sub-total | | 14 | 2 | 3 | 19 |
| <i>C. coli</i> | frango | 1 | 0 | 0 | 1 |
| | suíno | 3 | 1 | 1 | 5 |
| | primatas não-humanos | 5 | 2 | 2 | 9 |
| Sub-total | | 9 | 3 | 3 | 15 |
| <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> | bezerro (fezes) | 6 | 4 | 7 | 17 |
| | bovinos (trato genital) | 2 | 10 | 0 | 12 |
| Sub-total | | 8 | 14 | 7 | 29 |
| Total | | 31 | 19 | 13 | 63 |

- 1- Amostras não aderentes e não invasivas
- 2- Amostras aderentes e não invasivas
- 3- Amostras aderentes e invasivas.

Nenhuma das amostras de *Campylobacter* sp. isoladas de fezes de frangos foi capaz de invadir (Ad⁺ / Inv⁺) as células HeLa. Dentre as quatro amostras de *Campylobacter* sp. isoladas de cães apenas uma (*C. jejuni*) foi considerada invasiva (Ad⁺ / Inv⁺), assim como apenas uma amostra (*C. coli*) isolada de suíno (Tab. 2 e Fig.2).

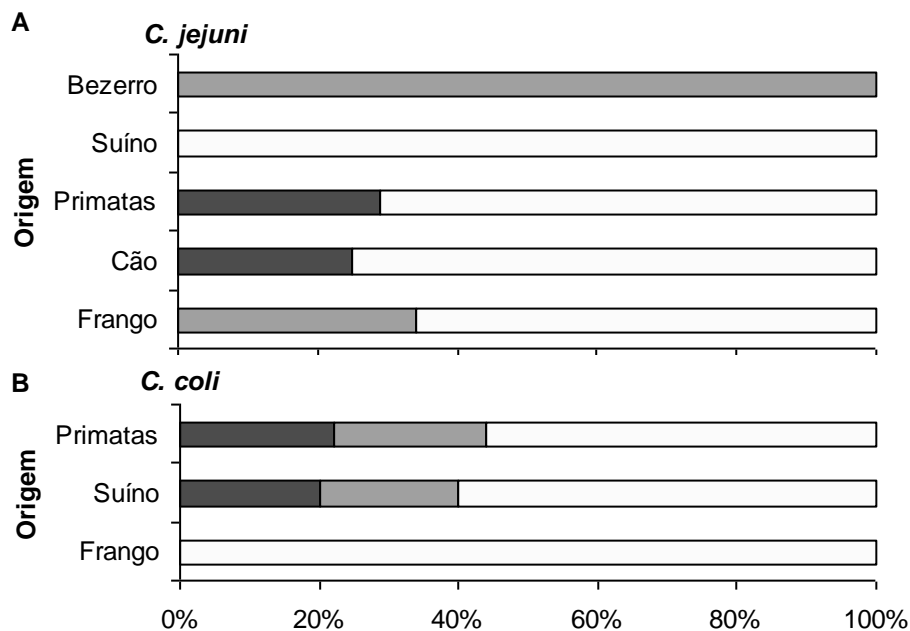


Figura 2 – Percentual de amostras de *C. jejuni* e *C. coli*, não aderentes (Ad⁻/Inv⁻) □, aderentes (Ad⁺/Inv⁻) ◻ e invasivas (Ad⁺/Inv⁺) ■ em células HeLa segundo a origem da amostra.

Dentre as 19 amostras de *C. jejuni* testadas, duas (10,5%) foram capazes de aderir (Ad⁺/Inv⁻) e três (15,7%) invadiram (Ad⁺/Inv⁺) as células HeLa. Dentre as 15 amostras de *C. coli*, três aderiram (Ad⁺/Inv⁻) e outras três (20,0%) invadiram (Ad⁺/Inv⁺) as células HeLa. Das 29 amostras de *C. fetus* testadas, 14 foram capazes apenas de aderir (Ad⁺/Inv⁻) e 7 foram capazes de invadir (Ad⁺/Inv⁺) células HeLa (Tab.2 e Fig.3).

Mais da metade das amostras de *C. jejuni* e *C. coli*, 73% e 60% respectivamente, não aderiram, nem invadiram (Ad⁻/Inv⁻) as células HeLa. Porém, apenas 28% das amostras de *C. fetus* subsp. *fetus* não tiveram esse potencial. Entre as amostras de *C. fetus* subsp. *fetus* de origem intestinal, 35% não aderiram, nem invadiram (Ad⁻/Inv⁻) as células HeLa assim como 17% das amostras isoladas do trato genital.

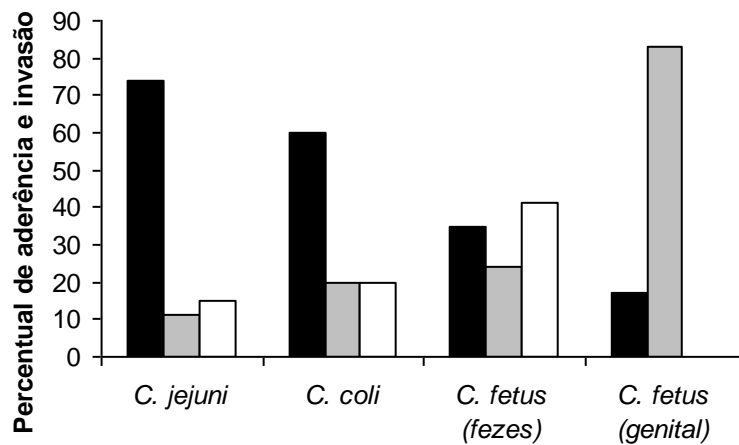


Figura 3
 Percentagem de amostras de *Campylobacter* sp. aderentes e invasivas (Ad⁺ / Inv⁺) □ , aderentes e não invasivas (Ad⁺/ Inv⁻)■ e amostras não aderentes e não invasivas (Ad⁻/ Inv⁻ ■ , em células HeLa, isoladas de animais.

Tabela 3 - Aderência e invasão em células HeLa por amostras de *Campylobacter* sp. isoladas de primatas não-humanos.

| Espécie | Origem | Ad ⁻ /Inv ⁻ ¹ | Ad ⁺ /Inv ⁻ ² | Ad ⁺ /Inv ⁺ ³ | Total |
|------------------|-------------------------------|--|--|--|-----------|
| <i>C. jejuni</i> | <i>Macaca mulatta</i> | 1 | 0 | 0 | 1 |
| | <i>Macaca fascicularis</i> | 2 | 0 | 0 | 2 |
| | <i>Callithrix penicillata</i> | 0 | 2 | 2 | 4 |
| Sub-total | | 3 | 2 | 2 | 7 |
| <i>C. coli</i> | <i>Macaca mulatta</i> | 2 | 2 | 1 | 5 |
| | <i>Macaca fascicularis</i> | 3 | 0 | 1 | 4 |
| Sub-total | | 5 | 2 | 2 | 9 |
| Total | | 8 | 4 | 4 | 16 |

1- Amostras não aderentes e não invasivas

2- Amostras aderentes e não invasivas

3- Amostras aderentes e invasivas

Podemos observar na tabela 3 que dentre as 16 amostras isoladas de fezes de primatas não-humanos, duas das sete amostras de *C. jejuni* e duas das nove amostras de *C. coli* foram invasivas (Ad⁺ / Inv⁺). Dentre as sete amostras de *C. jejuni* testadas, quatro foram isoladas de *Callithrix penicillata* em um surto de diarreia, no Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências

Biológicas da UFMG e três foram isoladas de *Macaca mulatta* e *Macaca fascicularis*, no Centro de Criação de Animais de Laboratório (Cecal) da FIOCRUZ-RJ durante o manejo, assim como todas as 9 amostras de *C. coli*.

Metade amostras de *C. jejuni* isoladas de *Callithrix penicillata* aderiram e invadiram as células HeLa. As amostras de *C. jejuni* isoladas de primatas não-humanos no Cecal (FIOCRUZ-RJ), sendo duas isoladas de *Macaca mulatta* e uma isolada de *Macaca fascicularis*, não foram capazes de aderir nem invadir as células HeLa (Ad^- / Inv^-).

Duas das nove amostras de *C. coli* isoladas de primatas não-humanos do Cecal (FIOCRUZ-RJ) aderiram e invadiram (Ad^+ / Inv^+) células HeLa, sendo que uma foi isolada de *Macaca mulatta* e a outra foi isolada de *Macaca fascicularis*. Duas amostras, isoladas de *Macaca mulatta*, apenas aderiram (Ad^+ / Inv^-) enquanto 5 amostras, sendo 3 isoladas de *Macaca fascicularis* e 2 isoladas de *Macaca mulatta*, não aderiram nem invadiram (Ad^- / Inv^-) as células HeLa.

A figura 4 apresenta os resultados da capacidade de aderência e invasão de amostras de *C. fetus* isoladas de fezes e trato genital de bovinos.

Entre as amostras de *C. fetus* subsp. *fetus* isoladas de fezes de bezerros, 24% aderiram (Ad^+ / Inv^-), 41% foram capazes de invadir (Ad^+ / Inv^+) e 35% não aderiram e nem invadiram (Ad^- / Inv^-) as células HeLa. Porém, 83% das amostras de *C. fetus* subsp. *fetus* isoladas do trato genital de bovinos aderiram (Ad^+ / Inv^-) mas nenhuma das amostras testadas foi capaz de invadir as células HeLa (fig.4).

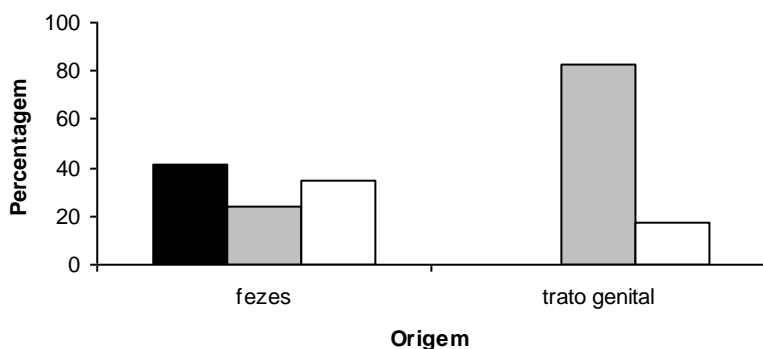


Figura 4 – Percentagem de amostras de *C. fetus* subsp. *fetus* isolados de fezes e aparelho genital de bovinos capazes de aderir (Ad^+ / Inv^-) e invadir (Ad^+ / Inv^+) e não aderir nem invadir (Ad^- / Inv^-) as células HeLa.

Não houve diferença significativa entre a capacidade de aderência e invasão entre amostras de *C. jejuni* e *C. coli* isoladas de animais. Apenas houve diferença significativa quanto à frequência de amostras de *C. fetus* subsp. *fetus* isoladas de trato genital de bovinos e amostras de *C. fetus* subsp. *fetus* isoladas de fezes de bezerros (Teste Exato de Fisher, $P = 0,0039$) que apresentaram capacidade de aderência e invasão.

6) DISCUSSÃO

O ensaio de aderência e invasão utilizado no presente estudo é geralmente aceito como um modelo “in vitro” para determinar a capacidade de aderência e invasão “in vivo” de vários patógenos entéricos. Este ensaio é capaz de diferenciar as amostras que invadem as células epiteliais, pois as bactérias que estão aderidas, e não invadem, são mortas pela gentamicina, que não penetra na célula epitelial (Konkel e Joens, 1989).

A invasão de células eucarióticas é um passo crítico na patogênese de muitas infecções bacterianas. Wooldridge e Ketley (1997) descreveram que no gênero *Campylobacter*, *C. jejuni* e *C. coli* demonstravam capacidade de invadir células epiteliais tanto “in vivo” quanto “in vitro”. Em 2002, Graham demonstrou, utilizando o ensaio com gentamicina e técnica de imunofluorescência, que além de *C. jejuni* e *C. coli*, *C. fetus* também era capaz de aderir e invadir células epiteliais.

Outros autores testaram a capacidade de aderência e invasão de amostras de *Campylobacter* sp. isoladas do homem em células de origem intestinal humana INT 407 e Caco-2 (Russel e Blake Jr, 1994; Harvey et al., 1999; Graham, 2002; Nadeau et al., 2003). No presente estudo, foram utilizadas células HeLa, originárias do trato genital humano, e as amostras de *C. jejuni*, *C. coli* e *C. fetus* subsp. *fetus* testadas foram isoladas de animais, o que pode ter ocasionado algumas das diferenças encontradas no presente estudo.

O percentual de invasão do controle negativo (0,000051%) utilizado no presente estudo para determinar a capacidade de invasão foi maior que o índice utilizado por Tay et al. (1996), que em seu estudo empregaram células Hep-2 e a amostra de *E. coli* K12, como controle negativo, e consideraram como invasivas as amostras que apresentassem um percentual de invasão superior a 0,0000039%.

A habilidade de aderir e invadir células HeLa variou muito entre as amostras estudadas. Tay et al. (1996) realizaram estudo similar, testando isolados clínicos e isolados de aves domésticas da Malásia, em células HEP-2. Eles encontraram índices de internalização, de amostras isoladas de aves domésticas, variando de 0,00078% a 0,0091%, e índices de aderência variando de 0,000006% e 0,045%. Todas as seis amostras isoladas de aves domésticas, testadas por eles, aderiram e quatro (67%) invadiram as células Hep-2. As amostras isoladas de animais, testadas em nosso estudo, com índices mais baixos, tanto de aderência como de invasão, apresentaram percentagens muito próximas às encontradas por Tay et al. (1996), porém algumas amostras apresentaram percentual de aderência e invasão superiores. Nadeau *et al.* (2003) testaram a capacidade de aderência e invasão em células INT-407 de 173 amostras de *C. jejuni* e *C. coli* isoladas de aves domésticas do Canadá. Utilizando o ensaio com gentamicina, eles concluíram que 19% das amostras eram invasivas. Em nosso estudo, uma de quatro (25%) amostras isoladas de frango foi capaz de aderir e nenhuma foi capaz de invadir células HeLa. A diferença encontrada entre os resultados pode estar relacionada com o número reduzido de amostras testadas, com os diferentes tipos de células utilizadas nos testes e ainda com diferenças geográficas dos animais dos quais as amostras de *Campylobacter* sp. foram isoladas.

Os resultados deste trabalho demonstram que menos da metade das amostras de *C. jejuni* e *C. coli* isoladas de animais foram capazes de aderir (Ad⁺/Inv⁻) às células HeLa, em concordância com o estudo de amostras *C. jejuni* e *C. coli* isoladas do homem realizado em células HeLa por Fauchère et al. (1986). Entretanto, outros pesquisadores têm concluído que todas as amostras de

C. jejuni e *C. coli* isoladas de animais foram capazes de aderir e invadir células HeLa (Fernandez e Trabulsi, 1995; Manninen *et al.*, 1982). A utilização de técnicas diferentes, como coloração com Giemsa e técnicas de imunofluorescência, respectivamente, além do pequeno número de amostras testadas nesses estudos, pode ter ocasionado as diferenças encontradas.

Konkel e Joens (1989) e Fernandez e Trabulsi (1995) testaram a capacidade de aderência e invasão em células Hep-2 e HeLa, respectivamente, de amostras de *C. jejuni* e *C. coli* isoladas de suínos e consideraram todas as amostras invasivas, apesar dos baixos índices de invasão. Apenas 20% das amostras de *C. coli* isoladas de suínos testadas em nosso estudo, foi capazes de invadir (Ad⁺/Inv⁺) células HeLa. Entretanto nenhuma amostra de *C. jejuni* isolada de suínos foi capaz de aderir, nem invadir as células HeLa.

Muito pouco se conhece sobre a patogenicidade das amostras de *Campylobacter* sp. isoladas de primatas. Carvalho (1992) testou a capacidade de aderência e invasão em células Hep-2 de amostras de *C. jejuni* isoladas de primatas não-humanos (*Callithrix penicillata*) em um surto de diarreia, no biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, e descreveu que 80% das amostras testadas foram capazes de associar e invadir monocamadas de células Hep-2. Em nosso estudo foram incluídas 4 amostras de *C. jejuni* isoladas de *Callithrix penicillata* por Carvalho (1992) e 50% dessas amostras aderiram e invadiram as células HeLa. A diferença dos resultados encontrados pode estar relacionada com número de amostras utilizadas nesse estudo ou ainda pela perda de virulência dessas amostras na manutenção e repique no laboratório.

Nenhuma das amostras de *C. jejuni* isoladas de primatas não humanos durante o manejo zootécnico no Centro de Criação de animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ) foi capaz de aderir e invadir as células HeLa. Entre as amostras de *C. coli*, isolados desses primatas, 22% foram capazes de aderir e invadir (Ad⁺/Inv⁺) e mais da metade das amostras (55%) não foi capaz nem de aderir e nem invadir (Ad⁻/Inv⁻) as células HeLa.

A diferença dos resultados encontrados entre as amostras de *C. jejuni* isoladas de primatas não-humanos em nosso estudo pode estar relacionada com diferença geográfica dos animais. Outra hipótese para a diferença dos resultados obtidos é a presença de um surto de diarreia quando as amostras de *C. jejuni* isoladas *Callithrix penicillata* por Carvalho (1992) enquanto as amostras de *C. jejuni* e *C. coli* isoladas de *Macaca mulatta* e *Macaca fascicularis* foram obtidas durante o manejo, onde não foram identificados casos de diarreia.

Entre os poucos trabalhos que testaram a capacidade de aderência e invasibilidade em células HeLa de amostras de *Campylobacter* sp, alguns autores descrevem sobre a capacidade de aderência e invasão de amostras isoladas de cães (Manninen *et al.*, 1982; Fernandez e Trabulsi, 1995). Fernandez e Trabulsi (1995) testaram a capacidade invasiva em células HeLa de uma amostra de *C. jejuni* e uma amostra de *C. coli* isoladas de cães e ambas foram consideradas invasivas. Manninen *et al.* (1982) também testou apenas uma amostra de *C. jejuni* isolada de cão e essa amostra invadiu as células HeLa. Em nosso estudo foram testadas 4 amostras de *C. jejuni* isoladas de cães e apenas 25% foram capazes de aderir e invadir (Ad⁺/Inv⁺) as células HeLa.

Tanto *C. fetus* subsp. *fetus* quanto *C. fetus* subsp. *venerealis* podem causar doenças nos bovinos, entretanto os nichos são diferentes. *C. fetus* subsp. *venerealis* habita o trato genital e causa problemas, como repetição de cio, aborto ou sub-fertilidade. *C. fetus* subsp. *fetus* coloniza o trato intestinal e pode atingir a placenta causando abortos esporádicos (Thompson e Blaser, 2000). A capacidade de aderência e invasibilidade das amostras de *C. fetus* subsp. *fetus* isoladas

de fezes de animais estudadas no presente trabalho não correspondem aos achados de Graham (2002). O autor testou amostras de *C. fetus* subsp. *fetus* de referência e isolados clínicos de pacientes humanos e considerou todas as amostras positivas para aderência e invasão em diferentes tempos de incubação. A diferença no percentual de aderência e invasão das amostras de *C. fetus* subsp. *fetus* isoladas de fezes e de trato genital de bovinos ($P = 0,0039$) pode estar relacionada com diferenças de patogenicidade entre as duas sub-espécies de *C. fetus*.

Provavelmente, as amostras de *C. fetus* subsp. *fetus* isoladas de trato intestinal tem capacidade de invadir células epiteliais devido à necessidade de colonizar o intestino dos animais e evadir-se dos movimentos peristálticos intestinais. Para que haja a translocação pela barreira mucosa intestinal, é necessária interação com as células epiteliais (Graham, 2002). Entretanto, quando as amostras de *C. fetus* subsp. *fetus* estão colonizando o trato genital, estão em um ambiente onde não há necessidade de invasão, apenas a aderência às células epiteliais permite a colonização.

Os resultados obtidos nesse estudo diferem dos resultados obtidos por outros pesquisadores. Primeiramente, existem poucos estudos de aderência e invasão em células epiteliais utilizando amostras de *Campylobacter* sp. isoladas de animais e ainda assim são utilizadas poucas amostras. A maior parte autores que pesquisaram a capacidade de aderência e invasão em células epiteliais de origem humana, como a célula HeLa, testaram amostras de *Campylobacter* isoladas do homem. Konkel *et al.* (1992) descreveram que não há diferença significativa na capacidade de invasão por amostras de *Campylobacter* em células de origem humanas (INT 407, Hep-2 e HeLa), porém eles testaram somente amostras isoladas do homem. Pode ser que haja diferença no uso de células de origem humana quando se avalia a capacidade de aderência e invasão de amostras de *Campylobacter* isoladas de animais. Possivelmente células de linhagem não humana possam expressar diferentes tipos ou quantidades de proteínas de superfície. Seriam necessários estudos que utilizem células de origem animal (Vero, MDBK e CHO-K1) e humana (INT 407, Hep-2 e HeLa) e amostras isoladas de animais para se verificar a real diferença na capacidade de aderência e invasão dessas amostras. Outro motivo provável que justifique o baixo número de amostras de *Campylobacter* sp. aderentes e invasivas pode estar relacionado com a quantidade de vezes que as amostras testadas foram repicadas em laboratório. Konkel e Joens (1989) descreveram que isolados clínicos recentes de *Campylobacter* sp. têm maior capacidade de invasão em células epiteliais e que passagem “in vitro” reduz essa capacidade nas amostras.

7) CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que:

- Amostras de *C. jejuni*, *C. coli* e *C. fetus* subsp. *fetus* isoladas de fezes de animais tem capacidade de aderir e invadir células HeLa;
- Apenas amostras de *C. jejuni* isoladas de primatas e cães, amostras de *C. coli* isoladas de primatas não-humanos e suínos e amostras de *C. fetus* subsp. *fetus* isoladas de fezes de bezerro foram capazes de invadir as células HeLa;
- Nenhuma amostra de *C. fetus* subsp. *fetus* isolada de trato genital bovino foi capaz de invadir as células HeLa;
- Houve diferença significativa entre a capacidade de aderência e invasão das amostras de *C. fetus* subsp. *fetus* isoladas de trato genital e amostras isoladas de fezes de bovinos ($P = 0,0039$).

8) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACMSF; Advisory Committee on the Microbiological Safety of food (1993). Interim Report on Campylobacter. London, HMSO.

BISWAS, D.; ITOH, K.; SASAKAWA, C. Role of microfilaments and microtubules in the invasion of INT-407 cells by *Campylobacter jejuni*. *Microbiol. Immunol.*, v.47, n 6, p. 469-473, 2003.

BLASER, M. J. Campylobacter species. In Principles and practice of infectious diseases. 3rd. ed. Mandell, G.L., Douglas, R.G., Bennett, J.E. (eds.). New York: Churchill Livingstone, 1990.

CARVALHO, A.C.T. et al. Molecular characterization of invasive and non-invasive *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates. *J. Clin. Microbiol.*, v. 39, n. 4, p. 1353-1359, 2001.

CARVALHO, A.C.T. Fatores de virulência de amostras de *Campylobacter jejuni* isoladas de *Callithrix penicillata* com diarreia. 1992. 81f. Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

DEKEYSER, J. Bovine genital Campylobacteriose. In: BUTZLER, J.P. *Campylobacter infection in man and animal*. Boca Raton: CRC Press, 1984. p.181-191.

FAUCHERE, J. L. et al. Association with Hela cells of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from human feces. *Infect. Immun.*, v. 54, p. 283-297, 1986.

FERNANDEZ, H. et al. Detection of *Campylobacter jejuni* invasion of Hep-2 cells by acridine orange - cristal violet staining. *Mem Inst. Oswaldo Cruz*, v. 92, n 4, p. 509-511, 1997

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

GARVIS, S.G.; PUZON, J. G.; KONKEL, M. E. Molecular characterization of a *Campylobacter jejuni* 29-kilodalton periplasmic binding protein. *Infect. Immun.* v.64, p. 3537-3543, 1996.

GRAHAM, L. L. *Campylobacter fetus* adheres to and enters INT 407 cells. *Can. J. Microbiol.* v. 48, n 11, p. 995-1007, 2002.

HARVEY, P.; BATTLE, T.; LEACH, S. Different invasion phenotypes of *Campylobacter* isolates in Caco-2 cells monolayers. *J. Med. Microbiol.* v. 48, p. 461-469, 1999.

HUM, S., QUINN, K., BRUNNER, J. & ON, S. L. W. Evaluation of a PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. *Aust. Vet. J.* v. 75, p. 827-831, 1997.

- KETLEY, J.M. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. *Microbiology*, v.147, p. 5-21, 1997.
- KONKEL, M. E. et al. Factors that influence the interaction of *Campylobacter jejuni* with cultured mammalian cells. *J. Med. Microbiol.* v. 37, p. 30-37, 1992.
- KONKEL, M. E.; JOENS, L. A. Adhesion to and invasion of Hep-2 cells by *Campylobacter* spp. *Infect. Immun.* v. 57, n. 10, p. 2984-2990, 1989.
- LAGE, A. P.; CARVALHO, A. C. T.; LEITE, R. C. Comparison of procedures for isolating *Campylobacter* sp from diarrheic and normal calves. *Vet. Microbiol.* v. 23, p. 151-154, 1992.
- LAGE, A. P. Estudo das espécies termotolerantes de *Campylobacter* isoladas de bezerros com e sem diarreia. 1992. 48f. Dissertação de Mestrado. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- LAURIA-FILGUEIRAS, A. L. Circulação de espécies termofílicas de *Campylobacter* em primatas não-humanos mantidos em cativeiro. 2000. 2v. 82f. Tese de Doutorado. Departamento de Biologia Parasitária, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- LINDBLOM. G.B, et al. Adherence, enterotoxigenicity, invasiveness and serogroups in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains from adult humans with acute enterocolitis. *AMPIIS.* v. 98, p. 179-184, 1990.
- MANNINEN, K. I.; PRESCOTT, J. F.; DOHOO, I. R. Pathogenicity of *Campylobacter jejuni* isolates from animals and humans. *Infect. Immun.*, v. 8, n. 1, p. 46-52, 1982.
- MELO, M. A.; GABBIANI. G.; PECHÈRE, J.C. Cellular events and intracellular survival of *Campylobacter jejuni* during infection of Hep-2 cells. *Infect. Immun.* v. 57, p. 2214-2222, 1989.
- MENDES, E. N. Frequência de *Campylobacter jejuni* em crianças com e sem diarreia em Belo Horizonte. 1985. 109f. Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MILES, A. A.; MISRA, S.S. The estimation of the bactericidal power of the blood. *J. Hyg.* v. 38, p. 732-742, 1938.
- MILIOTIS, M.D. Acridine Orange stain for determining intracellular enteropathogens in HeLa cells. *J. Clin. Microbiol.* v. 29, n.4, p. 830-831, 1991.
- MILLS, C. K.; GHERNA, R. L. Cryopreservation studies of *Campylobacter* cryobiology, v. 25, p. 148-152, 1988.
- NADEAU, E.; MESSIER, S.; QUESSY, S. Comparison of *Campylobacter* isolates from poultry and humans: association between In Vitro virulence properties, biotypes, and pulsed-field gel electrophoresis clusters. *Appl. Env. Microb.* v. 69, n.10, p. 6316 - 6320, 2003.

- OHYA, T.; TOMINAGA, K.; NAKAZAKA, M. Production of cytolethal distending toxin (CLDT) by *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* isolated from calves. *J. Vet. Med. Sci.*, v.55, n. 3, p. 507-509, 1993.
- PICHER, D. G.; SAUNDERS, N. A.; OWEN, R. J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidinium thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.* v.8, p.151-156, 1989.
- RUIZ- PALACIOS, G. M. et al. Cholera-like enterotoxin produced by *Campylobacter jejuni*. *Lancet*. P.250-253, 1983.
- RUSSEL, R. G.; BLAKE JR, D. C.; Cell association and invasion of Caco-2 cells by *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun*, v. 62, n. 9, p. 3773-3779, 1994.
- SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária, 1998. 221p.
- SMIBERT, R. M. The genus *Campylobacter*. *Ann. Ver. Microbiol.* v. 32, p. 673-709, 1978.
- TAUXE, R. V. Emerging Food borne Diseases: An evolving public health challenge. *Emerging Infectious Disease*. v.3, n.4, p. 425-434, 1997.
- TAUXE, R. V. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infection in the United States and others industrialized nations. In: I. Nachamkin, M. J. Blaser & L. S. Tompkins, editors. *Campylobacter jejuni: Currents Status and Future Trends*. Washington: DC: American Society for Microbiology. 1992. p. 9-19.
- TAY, S. T. et al. In vitro demonstration of the invasive ability of *Campylobacter*. *Zbl. Bakt.*, v. 283, p. 306-313, 1996.
- THOMPSON, A. S.; BLASER, M. Pathogenesis of *Campylobacter fetus* infections. In: Nachamkin, I., Blaser, M. J. *Campylobacter*. 2 ed, Washington: ASM PRESS, 2000. p.321-347.
- VANDAMME, P.; GOOSSENS, H. Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobater* and *Helicobacter*: a review. *Zbl. Bakt.*, v. 276, p. 447-472, 1992.
- WASSENAAR, T.M. Toxin production by *Campylobacter* spp. *Clin. Microbiol. Rev.* v. 10, p. 466-476, 1997.
- WOOLDRIDGE, K. G.; KETLEY, J. M. *Campylobacter*-host cell interactions. *Trends in Microbiology*, v. 5, n. 3, p. 96-102, 1997.
- WOOLDRIDGE, K. G.; WILLIAMS, P. H.; KETLEY, J. M. Host signal transduction and endocytosis of *Campylobacter jejuni*. *Microbial. Pathogenesis*, v. 21, p. 299-305, 1996.