

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Análise Filogenética do Gênero *Campylobacter*

Lúcia Cecília Nunes

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Biotecnologia, da
Universidade Federal de Uberlândia,
para obtenção do grau de Bacharel em
Biotecnologia.

Uberlândia – MG

Dezembro de 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Análise Filogenética do Gênero *Campylobacter*

Lúcia Cecília Nunes

Orientadora: Profa. Dra. Ana Laura Grazziotin

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia – MG

Dezembro de 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Análise Filogenética do Gênero *Campylobacter*

Lúcia Cecília Nunes

Orientadora: Profa. Dra. Ana Laura Grazziotin

Homologado pela coordenação do
Curso de Biotecnologia em ____/____ /

Prof. Dr. Edgar Silveira Campos

Uberlândia – MG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Análise Filogenética do Gênero *Campylobacter*

Lúcia Cecília Nunes

Aprovado pela Banca Examinadora em: ___/___/___ Nota: _____

Profa. Dra. Ana Laura Grazziotin

Uberlândia, ___ de _____ de 2019.

Dedico este trabalho aos meus pais que sempre me apoiaram e incentivaram a me dedicar pelos meus sonhos e abraçar novos horizontes e aos meus avós, que sempre torceram por mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu pai, Ricardo Nunes, pelo incentivo à leitura desde a infância, e por ser um exemplo de busca ao conhecimento. Esta busca me trouxe até aqui.

Agradeço a minha mãe, Edna Lúcia Peres Nunes, por sua paciência e amor, junto as infinitas novenas e orações com os amigos do Lar do Idoso e minha avó Maria. Vocês são muito especiais.

Agradeço a todas as professoras responsáveis pela minha alfabetização e a todos os outros que tanto me ensinaram.

Agradeço a todos que me apoiaram e me fizeram feliz durante a graduação: Pedro, Henrique, Ana Flávia, Mariele, Mirelle e Alice, Lara, os membros da Liga de Imunologia e da Liga de Bioinformática e Microbiologia e a todas as diversas pessoas que cruzaram meu caminho e me acrescentaram algo de bom, em especial o Gean, por seu enorme companheirismo e precioso dom culinário.

Agradeço a minha orientadora, Profa. Dra. Ana Laura Grazziotin, por me acolher e dividir seus conhecimentos, os quais são a base deste trabalho.

Agradeço também a Universidade Federal de Uberlândia e ao Instituto de Biotecnologia. Sem a Universidade Federal de Uberlândia, o sonho de fazer ciência não seria possível.

RESUMO

Normalmente as bactérias do gênero *Campylobacter* parasitam o trato gastrointestinal de diversos hospedeiros. Estes microrganismos são de grande interesse para a saúde pública e veterinária, podendo induzir desde enterites agudas em humanos a abortos em bovinos e caprinos. O avanço de diferentes técnicas de sequenciamento permitiu que diversos genes fossem analisados e estudados. A construção de árvores filogenéticas é um dos métodos de análise gênica que permite a compreensão das relações evolutivas entre as espécies. Para traçar e representar a história evolutiva de um grupo de organismos. O mais comum é a inferência de homologia entre sequências de genes conservados, como as sequências dos genes ribossomais em procariotos. O gene 16S rRNA está presente em grande parte das bactérias, sofre poucas variações e apesar de ser menor que o gene 23S rRNA, possui sequência longa o suficiente para armazenar informações evolutivas, diferente do gene 5S rRNA. A análise evolutiva desses genes individualmente, pode gerar árvores com classificações errôneas, pois a quantidade de informações evolutivas nestas sequências não é suficiente para uma comparação confiável, sendo necessário estudos como a filogenômica para informações mais detalhadas. Portanto, este trabalho analisa o poder de classificação e determinação evolutiva dos genes ribossomais 5S, 16S e 23S individualmente, de forma concatenada para 23 espécies do gênero *Campylobacter*. Os resultados serão comparados com os resultados da filogenômica de um grupo de 300 proteínas altamente conservadas em cada um dos genomas das 23 espécies, compreendendo e elucidando relações evolutivas que não foram bem esclarecidas pela filogenia dos genes ribossomais

Palavras-chave: *Campylobacter*, genes ribossomais, análise filogenética.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>O gênero Campylobacter</i>	1
1.2. <i>Características do gênero Campylobacter</i>	2
1.3. <i>Habitat e Patogenia</i>	3
1.4. <i>Estudos filogenéticos e marcadores evolutivos</i>	4
1.7 <i>Justificativa</i>	8
2. OBJETIVOS	10
3. METODOLOGIA	11
3.1. <i>Seleção de dados</i>	11
3.2. <i>Análise filogenética dos genes ribossomais estruturais</i>	11
3.3. <i>Análise filogenética dos genes ribossomais estruturais concatenados</i>	12
3.4. <i>Análise filogenômica do gênero Campylobacter</i>	13
4. RESULTADOS	15
4.1. <i>Análise dos genes ribossomais estruturais</i>	15
4.2 <i>Árvore filogenética dos genes 16S rRNA, 23S rRNA e 5S rRNA concatenados</i>	20
4.3 <i>Árvore Filogenômica</i>	22
5. DISCUSSÃO	26
6. CONCLUSÃO	42
7. REFERÊNCIAS	43
8. ANEXO	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tabela com as 39 espécies atuais do gênero <i>Campylobacter</i>	49
Tabela 2: Lista de patógenos mais comuns isolados de fezes de humanos com enterites.....	50
Tabela 3: Espécies de <i>Campylobacter</i> e número de genomas escolhidos para análise filogenética.....	51
Tabela 4: Espécies do gênero <i>Campylobacter</i> utilizadas e seus respectivos número de acesso no banco de dados NCBI.....	52

LISTA DE FIGURAS

<p>Figura 1: Varredura eletrônica de células de <i>Campylobacter</i>, mostrando sua forma. (a) Centro da colônia de <i>Campylobacter Coli</i>. (b) Extremidade de uma colônia de <i>Campylobacter jejuni</i>.</p>	47
<p>Figura 2: Principais componentes do flagelo da espécie <i>Campylobacter jejuni</i>.</p>	47
<p>Figura 3: Representação do ciclo de transmissão da <i>Campylobacter jejuni</i>.</p>	48
<p>Figura 4: Exemplo de estrutura de uma árvore filogenética.</p>	48
<p>Figura 5: Exemplo de uma sequência de nucleotídeos do gene 16S rRNA da espécie <i>Campylobacter jejuni</i> strain NCTC 11168 (CP000768.1) utilizada como <i>query</i> na busca por similaridade.</p>	49
<p>Figura 6: Exemplo de parte do alinhamento das sequências do gene 16S rRNA ribossomal dos genomas de <i>Campylobacter</i>. As sequências foram alinhadas pela ferramenta MUSCLE e visualizadas pela ferramenta SeaView.</p>	49
<p>Figura 7: Árvore filogenética do gênero <i>Campylobacter</i> com o gene 16S rRNA ribossomal, a espécie <i>Campylobacter jejuni</i> está marcada de vermelho, assim como a espécie <i>Campylobacter coli</i> está marcada de azul, as demais estão marcadas de preto, exceto as sequências sem espécie definida que estão marcadas de azul claro.</p>	16
<p>Figura 8: Árvore filogenética do gênero <i>Campylobacter</i> com o gene 23S rRNA ribossomal, a espécie <i>Campylobacter jejuni</i> está marcada de azul, assim como a espécie <i>Campylobacter coli</i> está marcada de vermelho, as demais espécies estão marcadas de preto e as sequências das espécies não definidas estão marcadas de azul claro.</p>	18
<p>Figura 9: Árvore filogenética do gênero <i>Campylobacter</i> com o gene 5S rRNA ribossomal, a espécie <i>Campylobacter jejuni</i> está marcada de azul, assim como a espécie <i>Campylobacter coli</i> está marcada de vermelho, as demais estão marcadas de preto e as sequências das espécies não identificadas estão marcadas de azul claro.</p>	20
<p>Figura 10: Árvore filogenética do gênero <i>Campylobacter</i> com os genes 16S rRNA, 23S rRNA e 5S rRNA ribossomal concatenados, a espécie <i>Campylobacter jejuni</i> está marcada de vermelho, assim como a espécie <i>Campylobacter coli</i> está marcada de azul, as demais estão marcadas de preto e as sequências das espécies não identificadas estão marcadas de azul claro.</p>	22

Figura 11: Árvore filogenômica do gênero *Campylobacter* baseada em 300 grupos de proteínas ortólogas presentes em cópia única. A espécie *Campylobacter jejuni* está marcada de azul, enquanto que a espécie *Campylobacter coli* está marcada de vermelho. As demais espécies estão marcadas de preto e as sequências das espécies não identificadas estão marcadas de azul claro. 25

Figura 12: Árvore filogenética do gênero *Campylobacter* baseada no gene 16S rRNA. A espécie *Campylobacter jejuni* está marcada de vermelho, enquanto que a espécie *Campylobacter coli* está marcada de azul..... 29

Figura 13: Árvore Filogenética do gênero *Campylobacter* com o gene 23S rRNA. A espécie *Campylobacter jejuni* está marcada de azul, enquanto que a espécie *Campylobacter coli* está marcada de vermelho. .. 30

Figura 14: Árvore filogenética do gênero *Campylobacter* baseada no gene 5S rRNA. A espécie *Campylobacter jejuni* está marcada de azul, enquanto a espécie *Campylobacter coli* está marcada de vermelho. 31

Figura 15: Árvore filogenética do gênero *Campylobacter* baseada nos genes ribossomais concatenados. A espécie *Campylobacter jejuni* está marcada de azul, enquanto a espécie *Campylobacter coli* está marcada de vermelho. 32

Figura 16: Árvore filogenômica do gênero *Campylobacter* baseada no concatenamento de 300 famílias proteicas de cópia única do gênero *Campylobacter*. *Campylobacter jejuni* está marcada de azul, enquanto a espécie *Campylobacter coli* está marcada de vermelho. 33

Figura 17: Árvore filogenética do gênero *Campylobacter* baseada nos genes ribossomais concatenados. A espécie Clar linhagem RM2100 (NC_012039.1) está dentro do retângulo de linhas pretas, a espécie *Campylobacter* spp. está marcada de azul claro, assim como a espécie *Campylobacter coli* está marcada de vermelho. 34

Figura 18: Árvore filogenética do gênero *Campylobacter* baseada no gene 16S rRNA. A espécie Clar linhagem RM2100 (NC_012039.1) está dentro do retângulo de linhas pretas e a espécie *Campylobacter* spp. está marcada de azul claro e as demais estão na cor preta. 35

Figura 19: Árvore filogenética do gênero *Campylobacter* baseado no gene 23S rRNA. A espécie Clar linhagem RM2100 (NC_012039.1) está dentro do retângulo de linhas pretas e a espécie *Campylobacter* spp. está marcada de azul claro e as demais estão na cor preta..... 35

Figura 20: <i>Árvore filogenômica do gênero Campylobacter baseada em 300 famílias proteicas de cópia única do gênero Campylobacter. A espécie Clar linhagem RM2100 (NC_012039.1) está dentro do retângulo de linhas pretas e a espécie Campylobacter spp. está marcada de azul claro e as demais estão na cor preta.</i>	36
Figura 21: <i>Árvore filogenética do gênero Campylobacter baseada no gene ribossomal 16S rRNA. As espécies Campylobacter spp. estão marcadas de azul claro, enquanto as espécies Campylobacter lanieane, Campylobacter fetus, Campylobacter hyointestinalis e Campylobacter iguaniorum estão marcadas de preto.</i>	37
Figura 22: <i>Árvore filogenômica do gênero Campylobacter baseada em 300 famílias proteicas de cópia única do gênero Campylobacter: As espécies C. iguaniorum e C. hyointestinalis estão marcadas de preto.....</i>	37
Figura 23: <i>Árvore filogenética do gênero Campylobacter baseada no gene ribossomal 15S rRNA.....</i>	38
Figura 24: <i>Árvore filogenética do gênero Campylobacter baseada no gene ribossomal 16S rRNA.....</i>	38
Figura 25: <i>Árvore filogenética do gênero Campylobacter baseada no gene ribossomal 23S rRNA.....</i>	39
Figura 26: <i>Árvore filogenética do gênero Campylobacter baseada nos genes ribossomais concatenados</i>	39
Figura 27: <i>Árvore filogenômica do gênero Campylobacter com 300 grupos de genes de cópia única de proteínas ortólogos pertencentes a espécie Campylobacter.....</i>	40
Figura 28: <i>Árvore filogenética do gênero Campylobacter com o gene ribossomal 16S rRNA, as espécies de Campylobacter sem espécie definida estão marcadas de azul claro na imagem.....</i>	40
Figura 29: <i>Árvore filogenética do gênero Campylobacter com o gene ribossomal 23S rRNA, as espécies de Campylobacter sem espécie definida estão marcadas de azul claro na imagem.....</i>	41
Figura 30: <i>Árvore filogenética do gênero Campylobacter com os genes ribossomais concatenados, as espécies de Campylobacter sem espécie definida estão marcadas de azul claro na imagem.....</i>	47
Figura 31: <i>Árvore filogenômica do gênero Campylobacter com 300 grupos de genes de cópia única de proteínas ortólogas pertencentes a espécie Campylobacter, as espécies de Campylobacter sem espécie definida estão marcadas de azul claro na imagem.....</i>	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

µm - micrômetro

pb – pares de base

RNA – Ácido Ribonucleico

rRNA – Ácido Ribonucleico Ribossômico

5S rRNA – Ácido Ribonucleico Ribossômico 5S

16S rRNA – Ácido Ribonucleico Ribossômico 16S

23S rRNA – Ácido Ribonucleico Ribossômico 23S

1. INTRODUÇÃO

1.1. O gênero *Campylobacter*

O gênero *Campylobacter* pertence à família *Campylobacteraceae*, à ordem *Campylobacterales*, à classe *Epsilonproteobacteria* e ao filo *Proteobacteria* (LASTOVICA et al., 2014). O primeiro registro de uma bactéria do gênero *Campylobacter* foi realizado em 1883 por Theodor Escherich. Escherich observou microrganismos de forma espiral na mucosa intestinal de crianças, as quais haviam falecido devido à cólera. Entretanto, à época, estes organismos foram identificados por Escherich como sendo do gênero *Vibrio*. Do mesmo modo, em 1913, McFadyean e Stockman isolaram microrganismos de fetos ovinos abortados, semelhantes aos relatados por Escherich, e que, portanto, foram identificados como pertencentes ao gênero *Vibrio* (NATSOS et al., 2019). A identificação da espécie foi feita posteriormente pelos pesquisadores Smith e Taylor, após isolarem um organismo semelhante, classificando-o como *Vibrius fetus* (VERON; CHATELAIN, 1973).

Somente em 1963 o gênero *Campylobacter* (nome de etimologia Grega, *kampulo* = curvado, e *bacter* = bastão) (GARÉNAUX et al., 2008) foi proposto pelos pesquisadores Sebalt e Véron. A mudança taxonômica foi proposta devido a observação de características como um DNA mais curto, às condições específicas de crescimento como a microaerofilia e a ausência de um metabolismo fermentativo. Nesta ocasião, os microrganismos anteriormente identificados no gênero *Vibrio*, que apresentavam as características do novo gênero *Campylobacter*, foram reclassificadas para este último gênero. As espécies *Vibrio fetus* e *Vibrio bubulus* foram transferidas para o gênero *Campylobacter*, recebendo os nomes de *Campylobacter fetus* e *Campylobacter sputorum bubulus*, respectivamente (DEBRUYNE, GEVERS, VANDAMME, 2008). Atualmente, estão identificadas 39 espécies pertencentes ao gênero *Campylobacter* (EUZÉBY, 2019) (**Tabela 1 em Anexo**).

1.2. Características gerais do gênero *Campylobacter*

As espécies do gênero *Campylobacter* apresentam tamanho de aproximadamente 0,5 a 5 µm de comprimento e cerca de 0,2 a 0,9 µm de largura (FISCHER; PATEREK, 2019). Morfologicamente, em sua maioria, as bactérias do gênero são bastonetes em forma curva ou espiral. O gênero compreende bactérias gram-negativas, não formadoras de esporos (**Figura 1 em Anexo**) e que não se desenvolvem em temperaturas abaixo de 30°C. Além disso, as bactérias não são capazes de fermentar ou oxidar carboidratos, são organismos quimiorganotróficos e obtêm sua energia por meio da metabolização de aminoácidos ou intermediários do ciclo de Krebs (VANDAMME et al., 2005). São microaerófilas (requerem uma quantidade reduzida de oxigênio), a maioria das espécies possui atividade da enzima oxidase e crescimento ótimo em pH 5,8 a 8,0 (NATSOS et al., 2019). Para a cultura de espécies intolerantes ou pouco tolerantes ao oxigênio, tais como *Campylobacter concisus*, *Campylobacter rectus* e *Campylobacter curvus*, é necessária uma fonte de hidrogênio como doadora de elétrons para que haja o crescimento das cepas (KAAKOUSH et al., 2015).

A presença de flagelos varia de acordo com a espécie. As espécies que apresentam flagelo, normalmente, possuem um único flagelo polar ou bipolar (LASTOVICA et al., 2014). O flagelo representa uma característica importante de virulência bacteriana, possuindo três partes principais: o complexo do corpo basal, o gancho e o filamento flagelar. Para a maior parte das espécies do gênero *Campylobacter*, o filamento flagelar é constituído por subunidades proteicas chamadas de flagelinas, sendo as principais as flagelinas FlaA e FlaB (RADOMSKA et al., 2017) (**Figura 2 em Anexo**). As flagelinas são importantes não só por facilitar a locomoção do patógeno na mucosa, mas também por secretarem, principalmente no caso da espécie *Campylobacter jejuni*, a flagelina FlaC que representa um fator de virulência para os seus hospedeiros. Estas proteínas constituintes do flagelo são as principais moduladoras da resposta imune do hospedeiro via Toll-like 5, no entanto, podem variar o padrão de ativação de resposta de acordo com o meio em que a bactéria se apresenta (FABER et al., 2016).

1.3. Habitat e Patogenia

As bactérias do gênero *Campylobacter*, em sua maioria, parasitam o trato gastrointestinal de diferentes hospedeiros. Espécies como *C. coli*, *C. jejuni*, *C. hyointestinalis*, *C. mucosalis* e *C. lari* atuam como patógenos no trato intestinal de animais como aves (galinhas, gaivotas, perus), bovinos, ovelhas, cabras, porcos, cavalos, cães, gatos, coelhos e furões (CABI, 2019). Algumas espécies do gênero são de alta relevância econômica devido à gravidade das infecções causadas, como por exemplo, a enfermidade causada por *Campylobacter fetus*. A subespécie *Campylobacter fetus venerealis* é responsável pela Campilobacteriose Genital Bovina, uma doença que desencadeia vários problemas reprodutivos em bovinos (FITZGERALD et al., 2014). Além disso, a subespécie *Campylobacter fetus fetus*, também é comumente conhecida por causar abortos e infertilidade em bovinos e ovinos, podendo ainda ser encontrada em alguns casos de infecção sistêmica em humanos imunocomprometidos (MOON et al., 2017).

Espécies como *Campylobacter concisus*, *Campylobacter curvus*, *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter hominis*, *Campylobacter reto* e *Campylobacter showae* também são, comumente, isoladas em humanos (**Tabela 2 em Anexo**) (LIU et al., 2018) no entanto, as espécies *Campylobacter coli* e *Campylobacter jejuni* são as mais frequentemente estudadas devido à alta incidência nos casos de infecções humanas (PITKANEN; HANNINEN, 2015). As bactérias *C. jejuni* e *C. coli* são responsáveis por gastroenterites, diarreia, náuseas, dores abdominais e febre, além de complicações, tais como hemorragia gastrointestinal maciça, pancreatite, peritonite e até meningite. Uma das mais graves complicações da infecção por *C. jejuni* é a síndrome de Guillain-Barré. A síndrome é resultado de um processo autoimune, no qual a pessoa infectada desenvolve resposta não apenas contra a bactéria, mas também contra seu próprio organismo, especificamente, contra a bainha de mielina dos neurônios. A bactéria apresenta antígenos que podem mimetizar a estrutura dos epítomos de gangliosídeos dos nervos periféricos, desencadeando assim uma resposta imune contra a bainha de mielina dos nervos (NACHAMKIN et al., 1998). Esse processo promove a desmielinização do sistema nervoso. Aproximadamente 25% a 40% dos pacientes acometidos pela

síndrome de Guillain-Barré no mundo apresentaram histórico de infecção prévia por *C. jejuni* (NYATI, 2013).

É importante ressaltar que nem todas as espécies do gênero *Campylobacter* são patogênicas a humanos, como por exemplo *C. avium*, *C. peloridis*, *C. subantarcticus* e *C. volucris* (KAAKOUSH et al., 2015). As espécies que são patógenos zoonóticos, infectam seres humanos por via oral, por meio, principalmente, da ingestão de carne crua ou malcozida. A carne de aves, por exemplo, é uma das principais fontes de campilobacteriose humana. A infecção também pode ocorrer por meio da ingestão de água potável contaminada com a bactéria, devido o escoamento de fezes na água, de leite contaminado e não pasteurizado e pelo contato com fezes ou com carcaças contaminadas (WIECZOREK; OSEK, 2013) (**Figura 3 em Anexo**). Após a ingestão, essas bactérias atravessam a mucosa gástrica do estômago e colonizam as células do epitélio do intestino, sendo o flagelo de extrema importância para esse processo de migração. Sua motilidade é regulada por um sistema de quimiotaxia, permitindo que o parasita encontre gradientes químicos favoráveis ao seu desenvolvimento (LERTSEHTAKARN et al., 2011). Durante o processo de migração e contaminação, são expressos pela *C. jejuni* alguns fatores de virulência relacionados em sua maioria ao flagelo, tal característica a diferencia de outros patógenos de intestino, que necessitam na maioria das vezes secretar várias toxinas para o processo de colonização (BURNHAM; HENDRIXSON, 2018).

1.4. Estudos filogenéticos e marcadores evolutivos

O desenvolvimento e o progresso das tecnologias de sequenciamento de DNA possibilitaram o conhecimento da sequência de genes e, mais recentemente, de genomas completos dos microrganismos. O grande volume de informações sobre as bases genéticas dos microrganismos gerado pelo avanço das técnicas moleculares foi acompanhado do desenvolvimento de métodos computacionais que permitiam a análise em larga-escala destes dados. A construção de árvores

filogenéticas é um dos métodos de análise de genes que contribui para a compreensão das relações evolutivas entre espécies. Apesar de aparente simplicidade, as árvores filogenéticas portam uma grande complexidade de informações, sendo possível explicar diversos cenários evolutivos, como estimar o tempo de divergência entre duas espécies a partir de seu ancestral comum, estimar quais e a quantidade de eventos evolutivos ocorridos na história de um gene, e estabelecer a proximidade evolutiva entre as espécies analisadas (JOHN, 2017). As informações acerca da evolução das espécies contribuem para o entendimento e estudo de epidemiologia, de biogeografia, de genômica comparativa, entre outros (MCTAVISH et al., 2017).

A árvore filogenética é basicamente a história evolutiva de um grupo de organismos que evoluiu de um mesmo ancestral comum, que normalmente é representada por um diagrama composto por nós e ramos (**Figura 4 em Anexo**). As extremidades dos ramos representam um conjunto biológico, a partir do qual pode-se inferir as relações evolutivas (**A, B, C, D e E**), seja ele um conjunto de espécies, de genes ou de proteínas. Os ramos representam o número de mudanças evolutivas entre os indivíduos do grupo analisado (espécies, genes, proteínas) e os nós internos representam eventos de especiação (QUEIROZ, 2013). O estudo da evolução entre as espécies tem se mostrado um processo complexo. No entanto, os avanços nas tecnologias de sequenciamento e de ferramentas matemáticas e estatísticas permitiram que as análises evolutivas se tornassem cada vez mais precisas.

As comparações passaram do aspecto fenotípico para o genotípico, permitindo, no processo de análise evolutiva, a observação tanto de características genéticas, quanto fenotípicas (tais como caracteres morfológicos e bioquímicos). O estudo da filogenia molecular se baseia na busca de homologia entre os genes, sendo necessárias sequências de ácidos nucleicos ou de aminoácidos para tal. Através da homologia das sequências, são estabelecidas hierarquias entre as relações evolutivas de uma espécie com a outra, levando à organização de uma árvore filogenética com muito mais informações do que uma árvore filogenética baseada somente em fósseis.

O sequenciamento e o estudo da homologia entre as sequências do gene 16S rRNA, altamente conservado em bactérias, permitiu um avanço na diferenciação de algumas espécies de *Campylobacter* nos últimos anos. Uma das diferenciações se refere a espécie *C. lari* que pode ser facilmente identificada por meio da construção da árvore filogenética fundamentada na homologia entre as sequências do gene 16S rRNA de outras espécies de *Campylobacter* (HANSSON, 2008). No entanto, existem alguns estudos sobre a filogenia do gênero *Campylobacter*, um deles de 2013 do grupo de Zhou, que relata sobre a dificuldade de se separar em grupos diferentes, espécies como *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* por meio de árvores filogenéticas fundamentadas em RNA ribossomal (ZHOU et al. 2013). Além disso, neste mesmo relato, Zhou e colaboradores evidenciam a existência de dois grandes ramos principais na árvore filogenética construída a partir do alinhamento das sequências gênicas da proteína *housekeeping* chaperona *GroEL*, pertencente as espécies do gênero *Campylobacter*. Um dos ramos da árvore compreendeu as espécies *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* e o outro, incluiu as espécies *C. fetus*, *C. concisus*, *C. gracilis*, *C. hominis*, *C. curvus*, *C. rectus* e *C. showae* (ZHOU et al. 2013). Os estudos de Korczak e colaboradores 2006, também relatam a dificuldade de se diferenciar evolutivamente as espécies *C. jejuni* e *C. coli* utilizando a comparação de sequências do gene 16S rRNA e da sequência da proteína *housekeeping rpoB* (KORCZAK et al. 2006).

Para a construção de árvores filogenéticas, sequências altamente conservadas no organismo, tais como os genes ribossomais e os genes das proteínas *housekeeping*, presentes em cópia única, têm sido os marcadores de escolha. Se as sequências forem muito distintas por possuírem grande número de mutações devido a pressões evolutivas, elas podem não se alinhar, sendo impossível inferir com precisão a homologia entre os organismos observados. Esta situação é passível de ocorrer principalmente no caso de procariotos, os quais estão sujeitos com maior frequência a mutações e a transferência gênica horizontal. Por esses motivos as sequências gênicas de genes ribossomais e de genes de proteínas *housekeeping* são as de escolha neste tipo de análise (PATWARDHAN et al., 2014).

Os procariotos possuem no seu genoma os genes 16S rRNA, 5S rRNA e 23S rRNA. Os genes ribossomais possuem sequências muito bem conservadas em sua maioria, assim como sua estrutura e função. As sequências gênicas utilizadas para filogenia devem ser de preferência de cópia única e não precisam ser codificadoras (AJAWATANAWONG et al., 2016). O gene 16S rRNA é o mais comum em análises filogenéticas de procariotos, os primeiros trabalhos do pesquisador Woese (1987) sobre este gene foram fundamentais para a história da taxonomia bacteriana e possuem grande relevância até os dias atuais. A sequência do 16S rRNA tem sido a de escolha ao longo do tempo nas análises filogenéticas por ser longa o suficiente para portar mais informações evolutivas do que o gene 5S rRNA, e por ser mais simples de sequenciar, no passado, do que a sequência do gene 23S rRNA (LUDWIG; GLÖCKNER; YILMAZ, 2011). O gene 16S rRNA é um gene que está presente em todas as bactérias, permitindo estudos evolutivos aprofundados entre espécies e gêneros distantes. Apesar de ser bem conservado, os genomas bacterianos apresentam números variáveis de cópias do gene 16S rRNA, as quais podem apresentar diferenças entre si, o que representa uma certa instabilidade para os estudos filogenéticos (VOS et al., 2012)

Uma grande variedade de genes têm sido analisados individualmente para inferir filogenias de espécies, gerando classificações muitas vezes errôneas, pois a informação evolutiva de um único gene não é suficiente para gerar uma análise evolutiva confiável. O objetivo principal da análise filogenômica é a inferência de informações detalhadas sobre as diversas relações evolutivas entre as espécies, buscando solucionar utilizando do genoma inteiro, conflitos de classificação entre filogenias construídas individualmente (PATANÉ; MARTINS; SETUBAL, 2018). Durante os últimos anos, as relações evolutivas têm sido inferidas a partir da análise entre alguns genes, através do concatenamento entre esses genes ou por meio do estudo do genoma inteiro. No entanto, utilizar o genoma inteiro pode ser inviável devido ao seu tamanho e sua complexidade para sequenciamento completo, sendo preferível o uso de grandes conjuntos de genes ou partes do genoma para as

análises. A filogenômica, portanto, se trata do estudo de relações evolutivas fundamentadas na comparação de dados genômicos, em larga-escala. (CHAN; RAGAN, 2013).

1.5. Justificativa

As infecções causadas pelo gênero *Campylobacter* são reconhecidas como uma das zoonoses mais comuns na União Europeia (ESSON et al., 2016). Nos Estados Unidos o número de casos de infecções por *Campylobacter* durante o período de 1998 a 2008 foi estimado em 845.024 casos e no Canadá durante os anos 1996 a 2006 foram registrados 28.521 casos. Ao avaliar a ocorrência de enterites agudas da América Latina, percebeu-se que na Argentina 4,6 a 30,1% destes casos tinham como causa da infecção as espécies *Campylobacter jejuni* ou *Campylobacter coli*. Já no Brasil, 5,8 a 9,6% destes casos de infecções detectados como enterites foram causados por *C. jejuni* (KAAKOUSH et al., 2015), um número que pode estar distante da realidade devido ao fato de que, no Brasil, o isolamento e a investigação da presença desta bactéria entre animais e em infecções humanas não é muito comum, dificultando a análise epidemiológica desta bactéria no país.

Com base nestes dados e na relevância epidemiológica de algumas espécies do gênero *Campylobacter*, tanto para a saúde humana quanto para a saúde animal, este trabalho se justifica pela necessidade de se certificar a real eficácia do uso dos genes ribossomais como marcadores genéticos, principalmente o gene 16S rRNA, que é o mais comum nas análises de homologia entre as espécies de procariontos. Além disso, recentemente pesquisadores tem demonstrado que algumas espécies de bactérias como *Aeromas*, *Bradyrhizobium* e *Streptococcus*, tem um histórico de transferência gênica horizontal do gene 16S rRNA, o que dificulta o processo de identificação e pode levar a erros de classificação (RAJENDHRAN; GUNASEKARAN, 2011).

Portanto se faz necessária a análise filogenética não só dos genes ribossomais, mas também da filogenômica das espécies bacterianas, evitando gerar erros de taxonomia. Os estudos

das relações evolutivas contribuem, juntamente com os testes diagnósticos, na identificação de sequências de patógenos e nos estudos epidemiológicos de surtos. É importante a compreensão das relações evolutivas presentes no gênero *Campylobacter* e a observação de suas semelhanças e variações genéticas, a fim de contribuir para os estudos que visam o manejo e o controle da bactéria.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo observar o poder de classificação e determinação da relação evolutiva do gene 16S rRNA para 226 genomas de *Campylobacter*, principalmente para espécies como *C. jejuni* e *C. coli*. assim como, analisar o potencial de classificação também dos genes ribossomais 23S rRNA e 5S rRNA, e todos os genes ribossomais concatenados, comparando todas essas árvores filogenéticas de genes únicos à uma árvore filogenômica de 300 proteínas presentes em cópia única no genoma completos da espécie *Campylobacter*. Com essas análises visamos também compreender e elucidar a classificação de algumas espécies já estabelecidas e outras que ainda não foram definidas.

3. METODOLOGIA

3.1. Seleção de dados

O estudo compreendeu todos os 226 genomas completos disponíveis no banco de dados público Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=campylobacter>) em novembro de 2018 de 22 espécies do gênero *Campylobacter* (**Tabela 3, em Anexo**). Os arquivos contendo as sequências de proteínas, de genes codificadores, de genes não codificadores e o arquivo genbank de cada genoma foram obtidos a partir do repositório online FTP do NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/all/GCF/001/643/955/>). Dentre os 226 genomas do gênero *Campylobacter*, 150 compreendem a espécie *Campylobacter jejuni* e 76 compreenderam as demais espécies (**Tabela 4, em Anexo**).

3.2. Análise filogenética dos genes ribossomais estruturais

Identificação de genes ortólogos: Os genes 16S rRNA (**Figura 5 em Anexo**), 5S rRNA e 23S rRNA foram considerados para esta análise. As sequências de cada um dos genes, obtidas a partir do genoma referência no Genbank, *Campylobacter jejuni* NCTC 1116 (número de acesso CP00076.1), foram utilizadas como entrada para a pesquisa de sequências ortólogas nos demais genomas.

A pesquisa de sequências ortólogas foi realizada por meio de análise de similaridade de sequências, utilizando o programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), versão local (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch). O programa BLASTn (a letra “n” para *nucleotides*, em inglês) realiza, de forma rápida, a comparação de uma sequência nucleotídica de interesse, chamada de *query* com as sequências nucleotídicas presentes no banco de dados. Em nosso caso, o banco de dados compreendeu todas as sequências gênicas dos 226

genomas de *Campylobacter*. A busca de similaridade realizada pelo BLASTn utiliza do parâmetro de confiabilidade denominado “*E-value*”, uma análise estatística de confiança. Este parâmetro avalia o número de combinações possíveis aleatórias quando se realiza uma pesquisa em um banco de dados. Quanto mais próximo de zero for o resultado deste parâmetro, maior a confiança e menor a probabilidade do resultado ser uma combinação ao acaso (ALTSCHUL et al., 1997). Neste trabalho o valor estabelecido para a análise foi $e\text{-value} \leq 10e^{-5}$.

Alinhamento múltiplo de sequências: Para realizar o alinhamento entre as sequências nucleotídicas, foi utilizado o software MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation). Esta ferramenta foi desenvolvida para realizar alinhamentos múltiplos de sequências, seja de aminoácidos ou nucleotídeos (EDGAR, 2004), buscando sequências de aminoácidos conservadas entre si, mas com certa variação para que seja possível realizar uma árvore filogenética. Foram realizados alinhamentos múltiplos, separadamente, para cada uma das famílias gênicas (5S rRNA, 16S rRNA e 23S rRNA) como exemplificado na **Figura 6 em Anexo**.

Construção e visualização da árvore filogenética: Os arquivos de cada uma das famílias gênicas com as sequências alinhadas foram utilizados como entrada para o software FastTree 2 (Price et al., 2010). O programa FastTree infere a árvore filogenética usando o método de máxima verossimilhança a partir dos alinhamentos de sequências nucleotídicas ou proteicas. O método de máxima verossimilhança é baseado em caracteres e, portanto, compara simultaneamente todas as sequências alinhadas, considerando uma característica (por exemplo, um nucleotídeo da sequência) por vez para calcular a pontuação (ou score) da árvore. Cada uma das árvores filogenéticas foi visualizada no programa FigTree (tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree).

3.3. Análise filogenética dos genes ribossomais estruturais concatenados

A metodologia para a construção da árvore filogenética dos três genes ribossomais (5S, 16S e 23S rRNA) foi semelhante ao descrito anteriormente para as árvores individuais. Portanto,

apenas as diferenças serão destacadas nesta seção. Após o alinhamento múltiplo de cada uma das famílias gênicas pelo MUSCLE, os arquivos de sequências alinhadas foram concatenados (ou seja, as sequências alinhadas do gene 16S rRNA foram unidas, sequencialmente, às sequências alinhadas do gene 5S e 23S rRNA, de acordo com a respectivo genoma de origem de cada sequência). O concatenamento foi realizado por meio do *script* FASconCAT-G (Kuck e Longo, 2014). A árvore filogenética a partir do arquivo alinhado concatenado foi inferida pelo programa FastTree e a árvore foi visualizada no programa Figtree.

3.4. Análise filogenômica do gênero Campylobacter

Identificação das proteínas ortólogas: Para a construção da árvore filogenômica, nós utilizamos a coleção de sequências de proteínas dos 226 genomas. O *software* FastOrtho (<https://github.com/olsonanl/FastOrtho>) foi utilizado para a obtenção das sequências ortólogas entre todos os genomas. O programa FastOrtho é uma implementação do OrthoMCL (Chen et al., 2006), que constrói grupos de proteínas ortólogas baseado na análise de BLAST, todos contra todos (*all-against-all*). Em outras palavras, cada sequência de proteína é comparada a todas as outras sequências presentes no banco, ou seja, cada proteína dos 226 genomas será comparada, por análise de similaridade, à cada uma das sequências de todos os 226 genomas. Em seguida, foram selecionados os grupos de ortólogos que apresentaram sequências de todos os 226 genomas em cópia única. Um total de 300 grupos de ortólogos, compreendendo 67.800 proteínas, foram usados para a árvore filogenômica.

Alinhamento múltiplo de sequências: Cada um dos grupos de ortólogos, ou seja, cada família de proteínas, foi alinhado, individualmente, por meio do programa MUSCLE.

Concatenamento das sequências ortólogas: os arquivos alinhados de cada uma das famílias proteicas foram concatenados, utilizando o programa FASconCAT-G.

Construção e visualização da árvore filogenômica: a árvore foi calculada a partir do alinhamento concatenado de todas as famílias proteicas para os 226 genomas no programa FastTree, utilizando o modelo evolutivo WAG. A árvore filogenômica foi visualizada no programa Figtree.

4. RESULTADOS

4.1. Análise dos genes ribossomais estruturais

Árvore filogenética do gene 16S rRNA: A árvore filogenética do gene 16S rRNA (**Figura 7**) é dividida em dois grandes ramos que separam as 22 espécies estudadas do gênero *Campylobacter*. O primeiro ramo (A) compreende 7 espécies, sendo *C. concisus* (Ccon), *C. pinnipediorum* (Cpin), *C. gracilis* (Cgra), *C. curvus* (Ccur), *C. ureolyticus* (Cure), *C. sputorum* (Cspu), *C. hominis* (Chom), enquanto que o segundo ramo (B) compreende as demais espécies, incluindo *C. jejuni* (Cjej) e *C. coli* (Ccoli). No ramo A, os genes 16S rRNA foram agrupados de acordo com a espécie, por exemplo, todas as 5 sequências de Cpin agruparam juntas assim como as 3 sequências de Ccon e as 4 sequências de Cspu. No ramo B, destaca-se que as sequências de *C. fetus* (Cfet) foram agrupadas em dois ramos distintos. Existem três subespécies de *C. fetus* (Fetus, Venerealis e Testudinum), sendo que as subespécies Fetus e Venerealis agruparam juntas enquanto Testudinum formou um ramo a parte. Das 5 sequências sem espécie definida (Cspp), 3 sequências (dos genomas NZ_CP018789.1, NZ_CP018791.1 e NZ_CP018793.1) foram agrupadas entre si e 1 sequência (do genoma NZ_CP018788.1) agrupou com *C. lanienae* (Clan). Estas 4 sequências Cspp estão presentes em um mesmo ramo, que também inclui a sequência de *C. hyointestinalis* (Chyo, NZ_CP015576.1). A quinta sequência Cspp (do genoma NZ_CP007769.1), por outro lado, agrupou com as espécies *C. volucris* (Cvol) e *C. lari* (Clar) em outro ramo, distante das demais Cspp. Cjej e Ccol foram agrupadas em vários subgrupos. Cjej tem uma diversidade maior de subgrupos enquanto Ccol possui a distribuição mais restrita. A maior parte das sequências de Ccol agruparam juntamente com as sequências de Cjej, exceto Ccol linhagem ZV1224 (NZ_CP017875.1) e Ccol linhagem RM1875 (NZ_CP007183.1), mostrando que a variação no gene 16S não serve para diferenciar essas duas espécies (Ccol e Cjej).

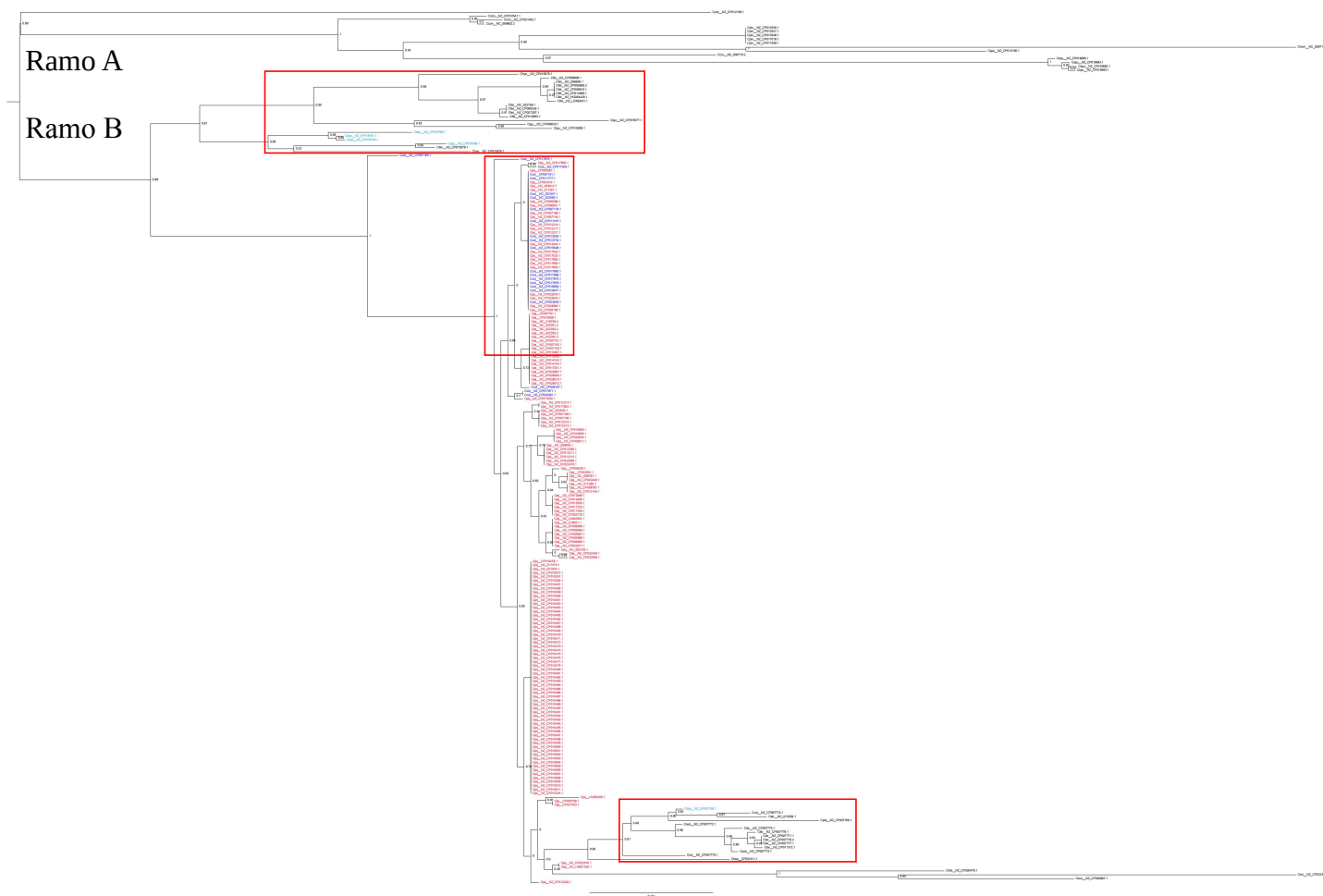


Figura 7: Árvore filogenética do gênero *Campylobacter* com o gene 16S rRNA ribossomal, a espécie *Campylobacter jejuni* está marcada de vermelho, assim como a espécie *Campylobacter coli* está marcada de azul, as demais estão marcadas de preto, exceto as sequências sem espécie definida que estão marcadas de azul claro.

Árvore filogenética do gene 23S rRNA: A árvore filogenética do gene 23S rRNA (**Figura 8**) se divide em dois grandes ramos (A e B), os quais separam as 22 espécies estudadas do gênero *Campylobacter*. O primeiro ramo (A) compreende 11 espécies, sendo elas: *C. helveticus* (Chel), *C. cuniculorum* (Ckun), *C. insulaenigra* (Cins), *C. subantarcticus* (Csub), *C. lari* (Clar), *C. peloridis* (Cpel), *C. volucris* (Cvol), *C. avium* (Cavi), *C. hepaticus* (Chep), *C. coli* (Ccol) e *C. jejuni* (Cjej). Observa-se que no ramo (A) as espécies mais derivadas são Cjej e Ccol, que formam um grupo monofilético. Entretanto, em contraste com a filogenia do gene 16S rRNA, na qual ambas as espécies se apresentaram intercaladas em vários grupos, na filogenia do gene 23S rRNA observou-se melhor separação de Cjej e Ccol, exceto pela presença de Ccol linhagem RM4661 (CP007181.1)

que foi agrupada entre os ramos de Cjej. As espécies Cins, Clar, Cpel, Csub, Cvol e Cspp (NZ_CP007769.1) formaram um grupo monofilético no ramo A para a filogenia do gene 23S rRNA, assim como observado na filogenia do gene 16S rRNA. Destaca-se que, também para a filogenia do gene 23S rRNA, o genoma de Cspp (NZ_CP007769.1) foi proximalmente relacionado à Cvol (NZ_CP007774.1), assim como observado na filogenia do gene 16S rRNA.

No segundo ramo (B) foram agrupadas as 11 espécies restantes. Assim como observado para a filogenia do gene 16S rRNA, as espécies Cpin, Ccon, Cfet e Cspu foram agrupadas em ramos próprios da espécie de acordo com as sequências do gene 23S rRNA. Novamente, as sequências de Cfet foram agrupadas de acordo com a subsespécie, como observado anteriormente. Enquanto a sequência Cspp (NZ_CP007769.1) apresentou-se no ramo A da filogenia do gene 23S rRNA, as outras 4 sequências Cspp (NZ_CP018789.1, NZ_CP018788.1, NZ_CP018791.1 e NZ_CP018793.1) formaram um grupo no ramo B. Novamente, estas 4 sequências foram agrupadas em um mesmo ramo, o qual também inclui as espécies Clan (NZ_CP015578.1) e Chyo (NZ_CP015576.1). Já o isolado Chyo linhagem LMG 9260 (NZ_CP015575.1), ao invés de agrupar juntamente com o outro isolado Chyo (NZ_CP015576.1), foi encontrado em outro ramo, que inclui os isolados da espécie *C. iguaniorum* (Cigu) e de *C. fetus*, assim como observado na filogenia do gene 16S rRNA.



Figura 8: Árvore filogenética do gênero *Campylobacter* com o gene 23S rRNA ribossomal, a espécie *Campylobacter jejuni* está marcada de azul, assim como a espécie *Campylobacter coli* está marcada de vermelho, as demais espécies estão marcadas de preto e as sequências das espécies não definidas estão marcadas de azul claro.

Árvore filogenética do gene 5S rRNA: A árvore filogenética do gene 5S rRNA (**Figura 9**) apresenta as sequências das 22 espécies distribuídas em dois grandes ramos (A e B), porém, em uma topologia distinta das árvores filogenéticas dos genes 16S rRNA e 23S rRNA. Ressalta-se que para o genoma de Cjej linhagem CJ677CC010 (CP010478.1) não foi identificada sequência do gene 5S rRNA e por este motivo, a análise filogenética do gene 5S rRNA apresenta 225 genomas. No ramo A foram distribuídas 12 espécies. A sequência de *C. hominis* (Chom) linhagem ATCC BAA-381 (NC_009714.1) foi separada, em um subramo, de todas as demais sequências do ramo A. A maioria (144/150) das sequências 5S rRNA de Cjej, todas as sequências de Ccol (exceto uma: NZ_CP007183.1), uma sequência de Chel (NZ_CP020478.1) e uma de Cavi (NZ_CP022347.1) foram idênticas entre si e, conseqüentemente, foram agrupadas em um mesmo ramo. Ainda no ramo A, seis sequências de Cjej (NZ_CP022470.1, NC_017279.1, NZ_CP017856.1, NZ_CP017862.1, NZ_CP012216.1 e LS483295.1) apresentaram alguma dissimilaridade em relação as demais sequências da espécie e por isso, apresentaram-se em diversos outros subramos do ramo A. As demais espécies (Clar, Cpel, Cins, Cvol, Csub e uma sequência Cspc – NZ_CP007769.1) foram agrupadas em um ramo monofilético. Assim como nas demais árvores (dos genes 16S e 23S rRNA), o isolado sem espécie definida Cspc linhagem RM16704 (NZ_CP007769) foi o único isolado Cspc no ramo A, agrupado junto as espécies Cvol linhagem LMG 24379 (NZ_CP007774.1), Clar linhagem RM2100 (NC_012039.1), Cpel LMG 23910 (NZ_CP007766.1) e Cins linhagem NCTC 12927 (NZ_CP007770.1).

O ramo B reuniu as 10 espécies restantes. Os isolados de Cspu, Cfet, Cpin, Cigu, e Ccon foram agrupados de acordo com as espécies. As 4 sequências sem espécie definida (Cspc) foram, também na filogenia do gene 5S rRNA, agrupadas com a espécie Clan linhagem NCTC 13004 (NZ_CP015578.1) e próximas aos ramos de Cspu e Cfet.



Figura 9: Árvore filogenética do gênero *Campylobacter* com o gene 5S rRNA ribossomal, a espécie *Campylobacter jejuni* está marcada de azul, assim como a espécie *Campylobacter coli* está marcada de vermelho, as demais estão marcadas de preto e as sequências das espécies não identificadas estão marcadas de azul claro.

4.2. Árvore filogenética dos genes ribossomais estruturais concatenados

A árvore filogenética dos genes concatenados 16S rRNA, 23S rRNA e 5S rRNA (**Figura 10**) compreende 22 espécies do gênero *Campylobacter* e se divide em dois ramos principais. Assim como para a filogenia do gene 5S rRNA, a árvore filogenética concatenada não apresenta as sequências dos genes de Cjej linhagem CJ677CC010 (CP010478.1), uma vez que a sequência do gene 5S rRNA não foi identificada para este genoma. No ramo A estão distribuídas 11 espécies, sendo elas *C. helveticus* (Chel), *C. avium* (Cavi), *C. cuniculorum* (Ckun), *C. volucris* (Cvol), *C. lari* (Clar), *C. insulaenigre* (Cins), *C. subantarcticus* (Csub), *C. peloridis* (Cpel), *C.*

hepaticus (Chep), *C. coli* (Ccol) e *C. jejuni* (Cjej), além de um isolado sem espécie definida (Cspp). As espécies que possuem um único exemplar (Chel, Cavi e Ccun) foram agrupadas juntas em um mesmo ramo. A sequência de Cspp linhagem RM16704 (NZ_CP007769) foi agrupada com as sequências das espécies Clar linhagem RM2100 (NC_012039.1), Cpel linhagem LMG 23910 (NZ_CP007766.1) e Cvol (NZ_CP007774.1). Ainda no ramo A, Cjej e Ccol são as espécies mais derivadas. As sequências de Ccol e Cjej foram agrupadas de acordo com a espécie, exceto por uma sequência de Ccol linhagem RM4661 (CP007181.1), que agrupou entre as sequências de Cjej, em particular com Cjej linhagem MTVDSCj16 (NZ_CP017033.1).

No ramo B encontram-se as demais espécies: *C. iguaniorum* (Cigu), *C. hyointestinalis* (Chyo), *C. fetus* (Cfet), *C. larienea* (Clan), *C. curvus* (Ccur), *C. pinnipediorum* (Cpin), *C. concisus* (Ccon), *C. hominis* (Chom), *C. sputorum* (Cspu), *C. ureolyticus* (Cure) e *C. gracilis* (Cgra), além dos 4 isolados sem espécie definida (Cspp). O ramo B, apresenta uma grande subramificação (C e D). No subramo C, as sequências de Cigu e de Cfet foram agrupadas de acordo com cada espécie. Novamente, assim como apresentado na filogenia do gene 16S rRNA, as sequências de Cfet foram separadas de acordo com a subespécie. Ainda no ramo C, as 4 sequências Cspp (NZ_CP018788.1, NZ_CP018789.1, NZ_CP018791.1 e NZ_CP018793.1) foram agrupadas entre si e juntamente com Clan (NZ_CP015578.1) e Chyo (NZ_CP015576.1) externamente. Embora com algumas diferenças de topologia interna no ramo, o padrão de agrupamento das 4 sequências de Cspp com Clan (NZ_CP015578.1) e Chyo (NZ_CP015576.1) foi observado na filogenia dos genes 16S e 23S rRNA. Enquanto a subespécie Chyo Lawsonii (NZ_CP015576.1) foi agrupada com a espécie Clan e as demais sequências de espécies não definidas, a subespécie de Chyo hyointestinalis (NZ_CP015575.1) foi agrupada junto ao ramo da espécie Cfet. No ramo D, as sequências de Ccon, Cspin e Cspu formaram grupos de acordo com as espécies.

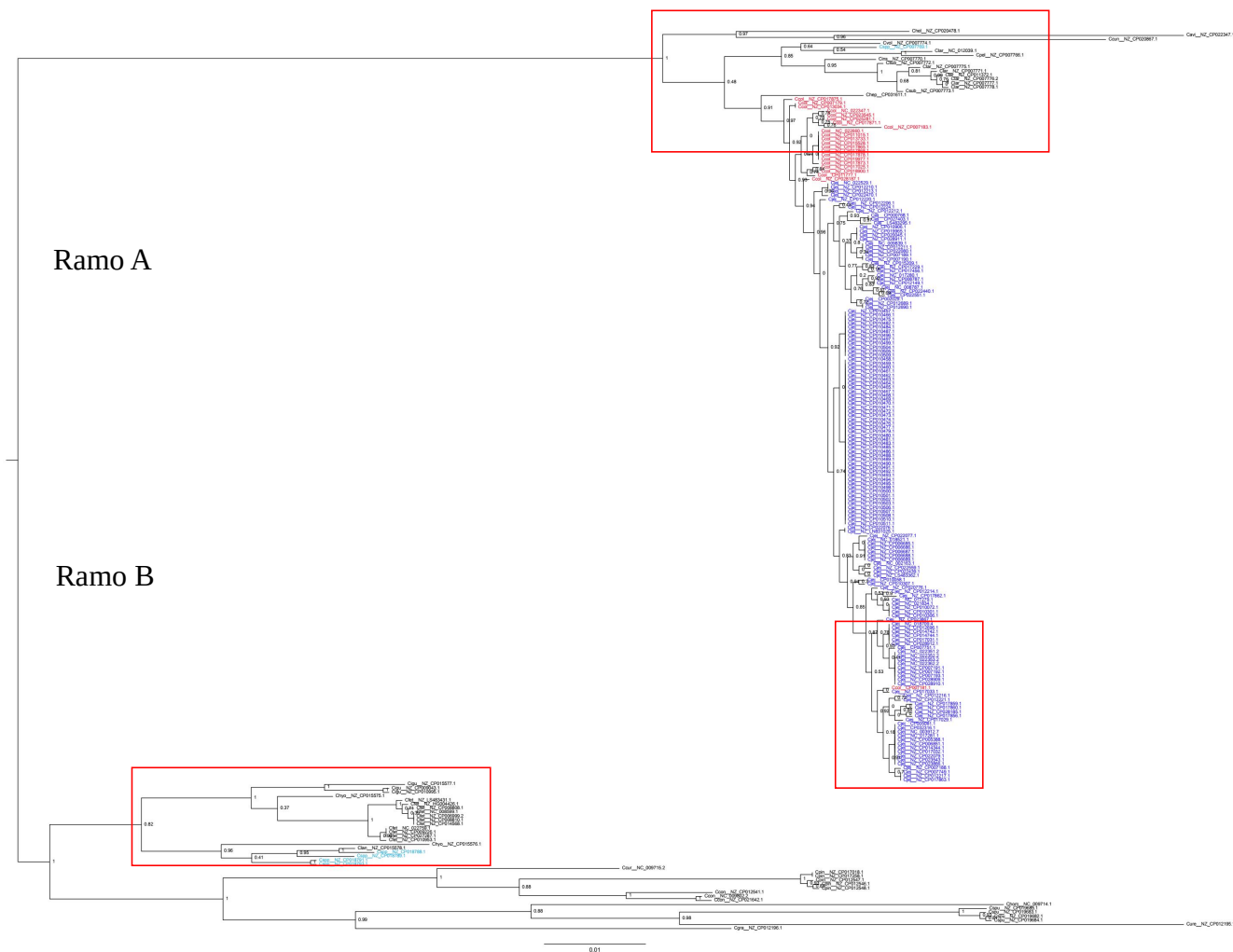


Figura 10: Árvore filogenética do gênero *Campylobacter* com os genes 16S rRNA, 23S rRNA e 5S rRNA ribossomal concatenados, a espécie *Campylobacter jejuni* está marcada de vermelho, assim como a espécie *Campylobacter coli* está marcada de azul, as demais estão marcadas de preto e as sequências das espécies não identificadas estão marcadas de azul claro.

4.3. Árvore Filogenômica

Assim como as demais árvores, a árvore filogenômica se divide em dois grandes ramos (**Figura 11**) denominados de ramo A e Ramo B. O ramo A compreende 12 espécies: *C. peloridis* (Cpel), *C. subantarcticus* (Csub), *C. lari* (Clar), *C. volucris* (Cvol), *C. insulaenigra* (Cins), *C. coli*

(Ccol), *C. jejuni* (Cjej), *C. hepaticus* (Chep), *C. avium* (Cavi), *C. helveticus* (Chel), *C. cuniculorum* (Ccun) e um isolado sem espécie definida (Csp) linhagem RM16704 (NZ_CP007769). As espécies Cpel, Csub, Clar, Cvol, Cins, Cavi e Csp (NZ_CP007769.1) foram presentes em um subramo distinto das espécies Ccol e Cjej, assim como observado nas demais árvores. A espécie Clar foi agrupada em um ramo monofilético. Todos os isolados de Ccol foram agrupados (monofileticamente) em um ramo distinto de todos os isolados Cjej. Portanto, diferentemente das árvores filogenéticas baseadas em genes ribossômicos estruturais e da árvore baseada no concatenamento destes, a árvore filogenômica separou adequadamente os indivíduos destas duas espécies. Diferente de todas as demais árvores filogenéticas, o isolado sem espécie definida (Csp) linhagem RM16704 (NZ_CP007769) apresentou-se sozinho em um ramo, próximo das espécies Cpel e Csub.

No segundo ramo (B) foram agrupadas as 10 espécies restantes: *C. pinnipediorum* (Cpin), *C. curvus* (Ccur), *C. concisus* (Ccon), *C. lanieane* (Clan), *C. iguaniorum* (Cigu), *C. hyointestinalis* (Chyo), *C. fetus* (Cfet), *C. sputorum* (Cspu), *C. ureolyticus* (Cure), *C. gracilis* (Cgra), *C. hominis* (Chom) e as outras 4 linhagens de *Campylobacter* sem espécie definida (Csp). A árvore filogenômica resolveu a posição das espécies, sendo que todas as espécies com pelo menos dois isolados (Cpin, Ccon, Cigu, Cfet, Chyo e Cspu) foram agrupadas de acordo com seu respectivo táxon (nível de espécie). Destaca-se que os isolados Chyo (Lawsonii - NZ_CP015576 e LMG 9260 - NZ_CP015575.1), que nas demais árvores apresentaram-se em ramos distintos, foram agrupados somente na árvore filogenômica. A filogenômica confirmou a separação das subespécies *C. fetus* Venerealis e *C. fetus* Fetus da subespécie *C. fetus* Testudinum, assim como observado na filogenia do gene 23S rRNA. Enquanto o gene 16S rRNA foi incapaz de diferenciar estas subespécies. Dos quatro isolados sem espécie definida (Csp), três foram (NZ_CP018788.1, NZ_CP018793.1, NZ_CP018791.1) agrupados em um mesmo ramo, enquanto, o isolado Csp -NZ_CP018789.1, apesar de proximamente relacionado aos demais isolados Csp, foi agrupado junto a espécie Clan (NZ_CP015578.1). Estas relações dos isolados Csp foram distintas das observadas nas filogenias

dos genes 23S rRNA, 16S rRNA, 5S rRNA e na filogenia concatenada destes genes. As espécies Chom, Cgra e Cure, que apresentam apenas um isolado de cada espécie na análise, foram agrupadas juntas, possivelmente por que suas sequências foram mais distintas às das demais espécies na análise do que por serem mais próximas entre si (haja visto o longo comprimento dos ramos no grupo).

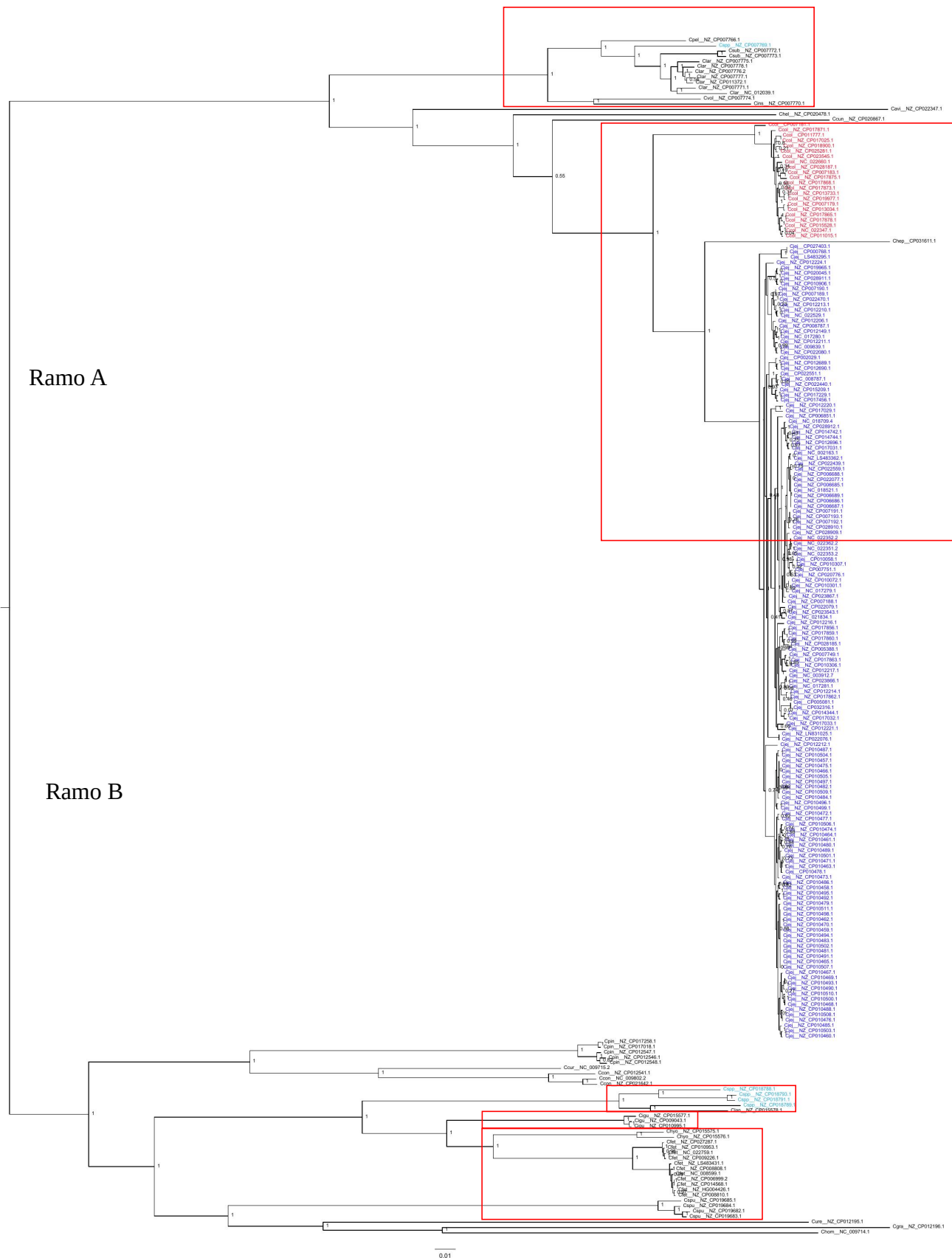


Figura 11: Árvore filogenômica do gênero *Campylobacter* baseada em 300 grupos de proteínas ortólogas presentes em cópia única. A espécie *Campylobacter jejuni* está marcada de azul, enquanto que a espécie *Campylobacter coli* está marcada de vermelho. As demais espécies estão marcadas de preto e as sequências das espécies não identificadas estão marcadas de azul claro.

5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Para o processo evolutivo, é imprescindível para as bactérias a capacidade de realizar modificações em seu genoma enquanto se adaptam a diferentes meios, sendo necessárias algumas estratégias naturais para realização destas alterações. De forma geral, podemos citar como principais estratégias evolutivas: as pequenas alterações de nucleotídeos no genoma, o rearranjo de segmentos intragenômicos no DNA e a aquisição de sequências gênicas de outros organismos (ARBER, 2000). Estas estratégias que tendem a se tornar marcas evolutivas ao longo do tempo, são neste caso, as responsáveis por revelar não só no gênero *Campylobacter*, mas também em outros gêneros bacterianos, uma estrutura populacional complexa quando agrupados em uma filogenia, por exemplo (SHEPPARD; MAIDEN, 2015). Embora os genomas bacterianos demonstrem ser consideravelmente estáveis de uma geração para a outra, vários eventos ou mecanismos genéticos permitem a variabilidade dos indivíduos, que pode ser observada quando analisados comparativamente sob uma perspectiva evolutiva (DARMON; LEACH, 2014).

Dentre todos os mecanismos que contribuem para a diversidade entre as populações bacterianas, a transferência gênica horizontal é um dos principais responsáveis pela biodiversidade dos microrganismos patogênicos. Para comprovar esta afirmação, Boer e sua equipe inseriram genes de resistência a antibióticos em uma linhagem de *Campylobacter jejuni* (BOER et al., 2002). Após a inserção, observaram se havia transferência dos genes inseridos no mutante para diferentes linhagens da espécie de *Campylobacter jejuni* em seu habitat natural, o intestino de galinhas. A partir deste estudo, Boer provou que a transferência gênica horizontal entre as cepas de *C. jejuni* foi estabelecida naturalmente, por meio da incorporação de DNA durante a infecção *in vivo* do intestino de aves. Boer também observou a presença de alterações intragenômicas no genoma de algumas cepas de *Campylobacter jejuni*, ou seja, mais uma estratégia evolutiva do gênero (BOER et al., 2002).

As observações acerca da transferência gênica horizontal explicam em parte a diversidade das espécies do gênero *Campylobacter*, fornecendo algumas informações sobre as diferenças entre as linhagens (PASCOE et al., 2017). No entanto, apesar de toda a relevância genética dos mecanismos de transferência gênica horizontal para aquisição de genes, principalmente a vantagem da aquisição de genes de resistência aos antibióticos pelos patógenos, algumas sequências genéticas adquiridas podem ser de efeito neutro ou deletério, e nestes casos, podem ser perdidos após a aquisição (Oliveira et al., 2017). Portanto, a transferência gênica horizontal possui um papel fundamental na biodiversidade de uma população bacteriana, como as espécies do gênero *Campylobacter*, mas não serve para análises de ancestralidade por apresentar muitas variações nas sequências transferidas (SHEPPARD; MAIDEN, 2015).

Sabemos, portanto, que aquisição de DNA por meio da transferência gênica horizontal permite uma vasta diferença genética entre as cepas bacterianas, no entanto, para análises evolutivas seria necessário o sequenciamento de genomas inteiros, um esforço limitado por seu preço (CHAMPION et al., 2008). Com o objetivo de contornar essa situação e o fato de que no genoma, são utilizados alguns genes com sequências altamente conservadas como marcadores evolutivos. Para estabelecer uma relação entre as espécies de bactérias são realizados alinhamentos principalmente entre as sequências RNA ribossomais altamente conservadas (CARRO; NOUIOUI, 2017), como as sequências do gene 16S, 23S e 5S rRNA, comumente encontradas nos estudos de filogenias e táxons de bactérias.

Apesar do gene 16S rRNA ter se estabelecido como melhor marcador evolutivo, com o avanço dos estudos e classificações de táxons, foi notado por Rajendhran e sua equipe, 2011 que algumas espécies possuíam cerca de 99% de similaridade entre seus genes 16S rRNA, ao passo que os seus genomas completos possuíam, quando comparados, em torno de 23 a 50% de similaridade. Essas variações nos permitem perceber que os estudos fundamentados em apenas um marcador evolutivo, não são suficientes para representar as características morfológicas e genômicas de um organismo, ou seja, o estudo filogenético através do gene 16S rRNA por si só não é suficiente e

pode gerar erros (RAJENDHRAN, 2011). Além disso, a presença de cópias dos genes 16S rRNA em um genoma procarioto também é um fator limitante para os estudos filogenéticos. Estes obstáculos nos levam a busca por sequências que possuem cópias únicas e que são fundamentais a maquinaria de sobrevivência das células.

Em nosso estudo, foram realizadas análises evolutivas que compararam sequências ribossomais altamente conservadas entre as espécies do gênero *Campylobacter*. Alinhamos e montamos árvores filogenéticas separadamente para os genes 16S, 23S e 5S rRNA ribossomal, com o propósito de avaliar por meio de comparações entre as árvores filogenéticas formadas, o potencial destes genes como marcadores evolutivos. Embora espécies como *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* apresentem semelhanças quanto aos seus processos de infecção e seus fenótipos, a estrutura genética destas duas populações é notavelmente diferente (SHEPPARD; MAIDEN, 2015).

Sem as análises dos genomas, o teste fenotípico mais tradicional para a diferenciação das espécies *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* é a hidrólise do composto hipurato, que depende da atividade de uma enzima característica da espécie *Campylobacter jejuni*, a hipurase. No entanto, algumas cepas da espécie *C. jejuni* se mostraram negativas para essa característica, demonstrando a dificuldade de se separar estas duas espécies por meio desta técnica (KÄRENLAMPI; TOLVANEN; HÄNNIEN, 2004). O uso do método de alinhamento do gene 16S rRNA também não se mostra eficiente na separação das espécies *C. jejuni* e *C. coli*, como é possível observar na **Figura 12**, na qual as espécies de Cjej e Ccol estão misturadas, e é possível observar uma separação mais basal de Ccol linhagem ZV1224 (NZ_CP017875.1) das demais. Isso ocorre devido à baixa quantidade de polimorfismo entre as sequências deste gene, sendo possível observar grandes semelhanças entre as sequências de nucleotídeos das diferentes espécies quando alinhadas, o que dificulta reconhecer variações que as separem evolutivamente (KORCZAK et al., 2006).

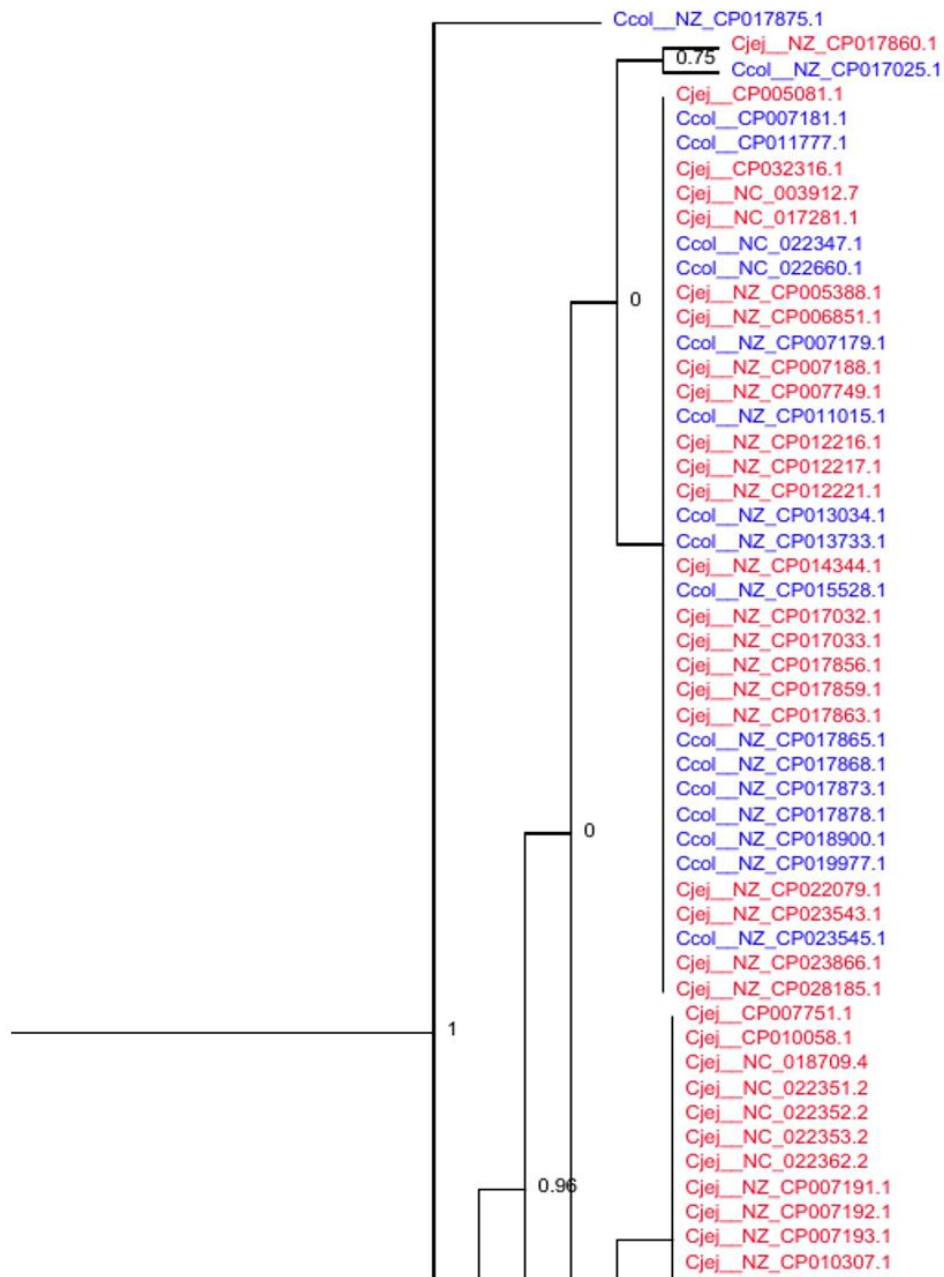


Figura 12: Árvore filogenética do gênero *Campylobacter* baseada no gene 16S rRNA. A espécie *Campylobacter jejuni* está marcada de vermelho, enquanto que a espécie *Campylobacter coli* está marcada de azul.

Apesar das dificuldades encontradas na diferenciação das espécies *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* utilizando o gene 16S rRNA, é possível perceber uma alteração na distribuição das sequências destas duas espécies quando a filogenia é fundamentada principalmente na análise evolutiva dos genes concatenados, na filogenômica e na filogenia do gene 23S rRNA. Como podemos observar na **Figura 13**, há formação de grupos espécie-específicos na filogenia do gene 23S rRNA, sem mesclar as sequências das duas espécies. Apenas duas exceções foram identificadas: Ccol linhagem CFSAN054106 (NZ_CP028187.1) e Ccol linhagem RM4661

(CP007181.1) foram agrupadas aos demais genes de *Cjej*. Quando os estudos evolutivos são realizados considerando microrganismos muito próximos filogeneticamente, é preferível utilizar sequências gênicas conservadas nos genomas dos indivíduos, mas que ainda permitam variações suficientes para a diferenciação. Este parece ser o caso do gene 23S rRNA, que na análise entre as espécies do gênero *Campylobacter* tende a se mostrar mais variável devido às características das sequências gênicas espaçadoras internas (KHAN; EDGE, 2007). Estas sequências são fragmentos ricos em informações e estão presentes na hélice 45, estrutura mais variável do gene 23S rRNA (CAMP et al., 1993) e é, provavelmente, devido a essa variabilidade que foi possível separar as espécies *C. jejuni* e *C.coli* a partir da análise evolutiva deste gene ribossomal.

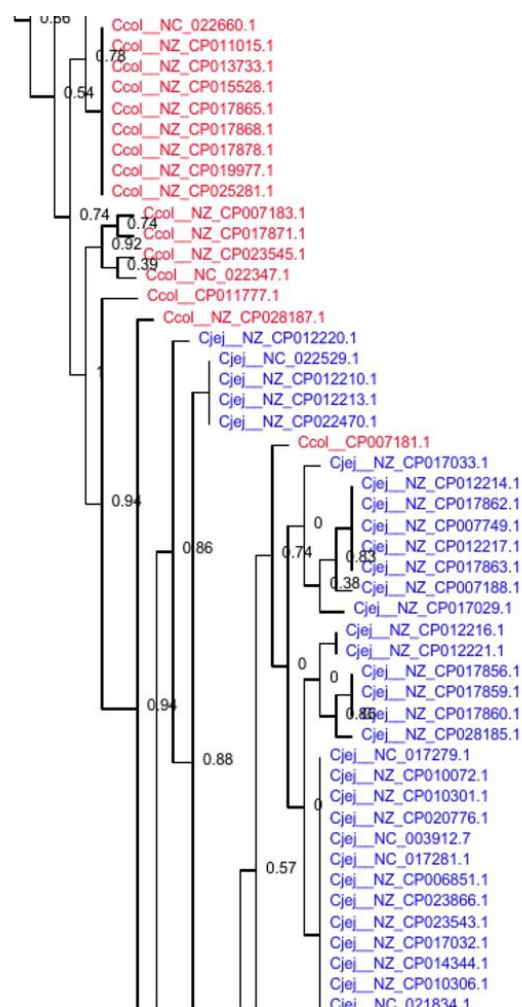


Figura 13: Árvore Filogenética do gênero *Campylobacter* com o gene 23S rRNA. A espécie *Campylobacter jejuni* está marcada de azul, enquanto que a espécie *Campylobacter coli* está marcada de vermelho.

A filogenia baseada no gene ribossomal 5S rRNA, assim como a filogenia do gene 16S rRNA, não foi capaz de realizar a distinção adequada entre *C. coli* e *C. jejuni*. Este fato pode ser observado na *Figura 14*, na qual as espécies *C. jejuni* e *C. coli* se mantêm juntas em um ramo monofilético. Isso ocorre devido ao fato de que as sequências gênicas do gene 5S rRNA são i. curtas, apresentando em torno de 115 a 143 nucleotídeos; ii. as sequências se originaram mais tardiamente na evolução das bactérias, em relação aos genes 16 e 23S rRNA (SUN e CAETANO-ANOLLÉS, 2009) e iii. devido à alta conservação nucleotídica entre as sequências 5S rRNA (MARTINS e WASKO, 2004).

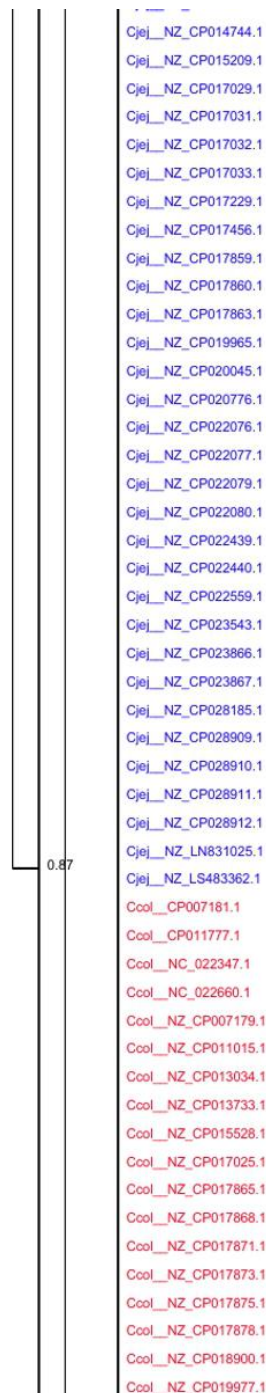


Figura 14: Árvore filogenética do gênero *Campylobacter* baseada no gene 5S rRNA. A espécie *Campylobacter jejuni* está marcada de azul, enquanto a espécie *Campylobacter coli* está marcada de vermelho.

Ainda comparando as espécies *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*, podemos observar na Figura 14, que mesmo a filogenia das três sequências ribossomais concatenadas não ofereceu resolução suficiente para separar a espécie *Campylobacter coli* linhagem *RM4661* (CP007181.1) de *Campylobacter jejuni*. Assim como observado na árvore filogenética do gene 23S rRNA (Figura 13). Portanto, enquanto a sequência 23S rRNA dos demais isolados Ccol mostram variação suficiente para diferenciar de Cjej, o mesmo não ocorre com a sequência 23S rRNA do isolado *Campylobacter coli* linhagem *RM4661* (CP007181.1) cuja sequência é mais similar a Cjej. O sinal do gene 23S rRNA deste isolado é tão evidente que predomina até mesmo na análise das sequências concatenadas (mesmo porque a sequência do gene 23S rRNA é a mais longa das três).

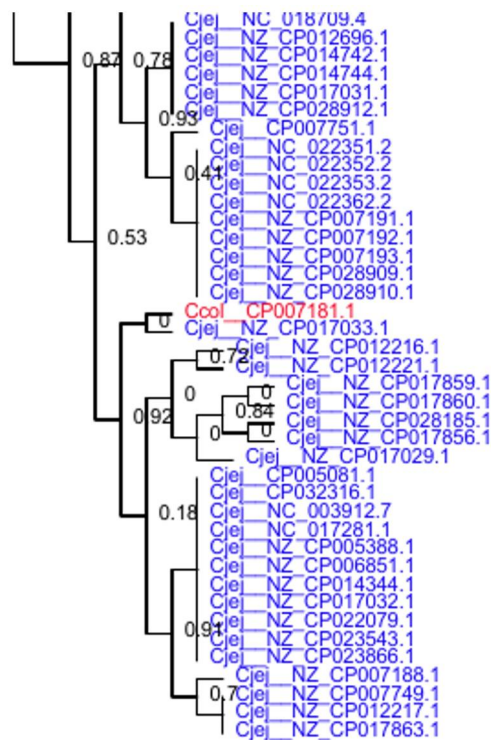


Figura 15: Árvore filogenética do gênero *Campylobacter* baseada nos genes ribossomais concatenados. A espécie *Campylobacter jejuni* está marcada de azul, enquanto a espécie *Campylobacter coli* está marcada de vermelho.

A diferenciação de algumas espécies de Ccol das espécies de Cjej se mostra falha quando feita somente por genes ribossomais, no entanto, quando feita a filogenômica das sequências de proteínas ortólogas de cópia única, a distinção entre as duas espécies é evidente, mostrando que a análise filogenômica é mais eficaz para a identificação e classificação taxonômica das duas espécies (**Figura 16.**)

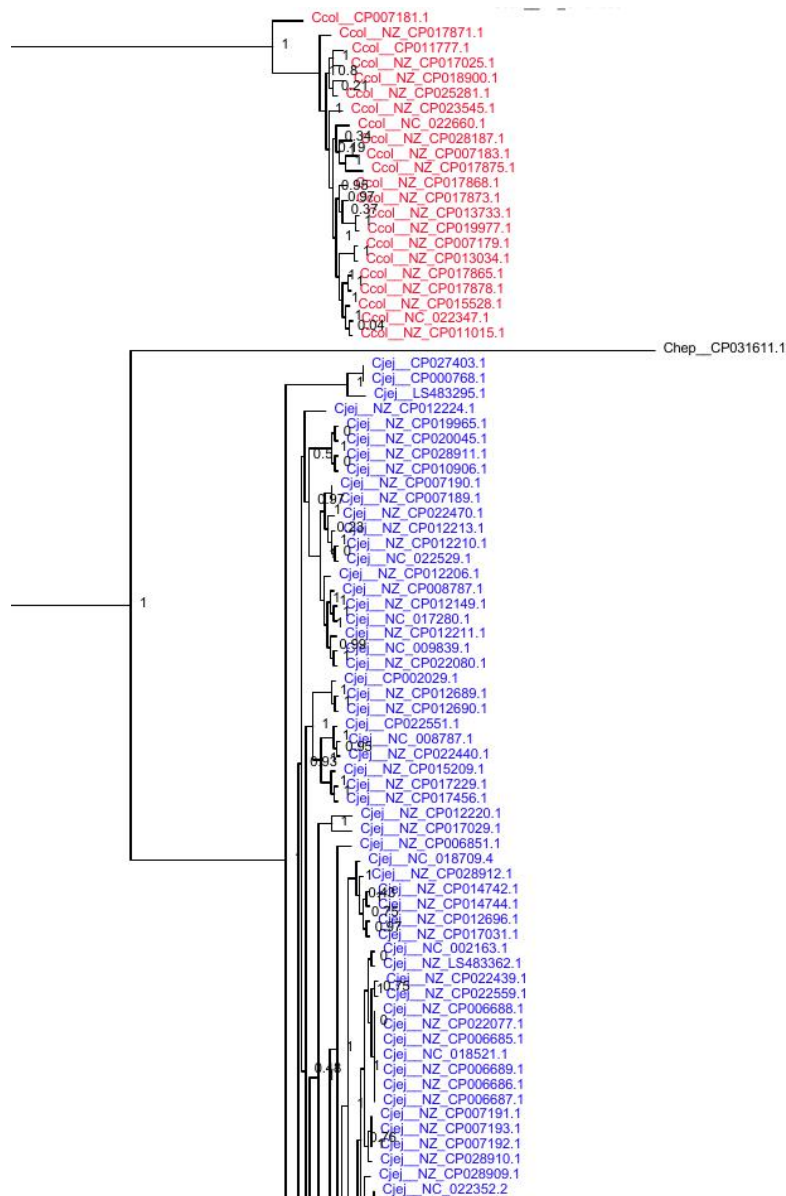


Figura 16: Árvore filogenômica do gênero *Campylobacter* baseada no concatenamento de 300 famílias proteicas de cópia única do gênero *Campylobacter*. *Campylobacter jejuni* está marcada de azul, enquanto a espécie *Campylobacter coli* está marcada de vermelho.

Analisando o agrupamento da espécie *Clar* na árvore filogenética dos genes ribossomais concatenados (**Figura 17**), chama a atenção que *Clar* linhagem RM2100 (NC_012039.1) não foi agrupada com as demais linhagens da espécie *C. lari*, como pode ser observado na filogenia do gene 16S rRNA (**Figura 18**) e 23s rRNA (**Figura 19**). No entanto, mais uma vez a filogenômica se mostrou eficaz no agrupamento das espécies (**Figura 20**).

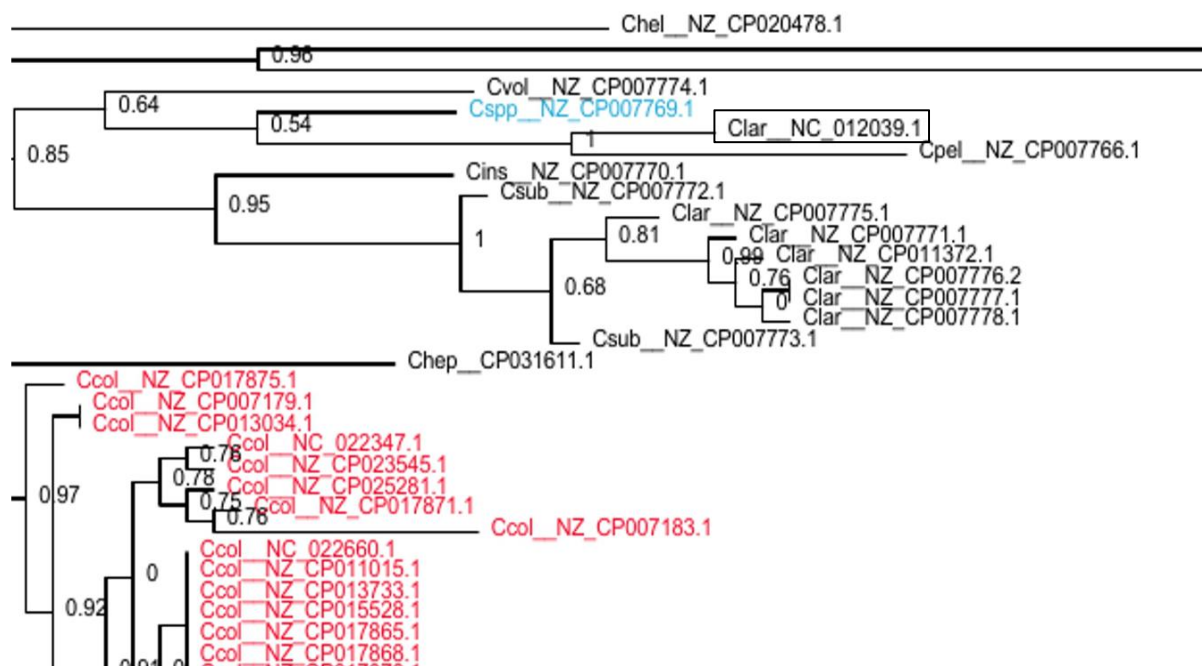


Figura 17: Árvore filogenética do gênero *Campylobacter* baseada nos genes ribossomais concatenados. A espécie *Clar* linhagem RM2100 (NC_012039.1) está dentro do retângulo de linhas pretas, a espécie *Campylobacter* spp. está marcada de azul claro.

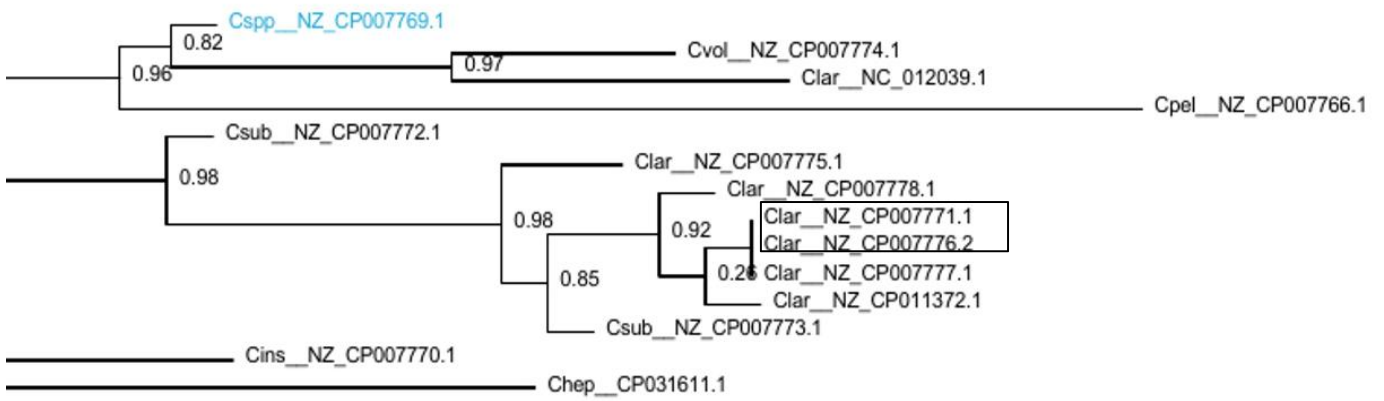


Figura 18: Árvore filogenética do gênero *Campylobacter* baseada no gene 16S rRNA. A espécie Clar linhagem RM2100 (NC_012039.1) está dentro do retângulo de linhas pretas e a espécie *Campylobacter* spp. está marcada de azul claro e as demais estão na cor preta.

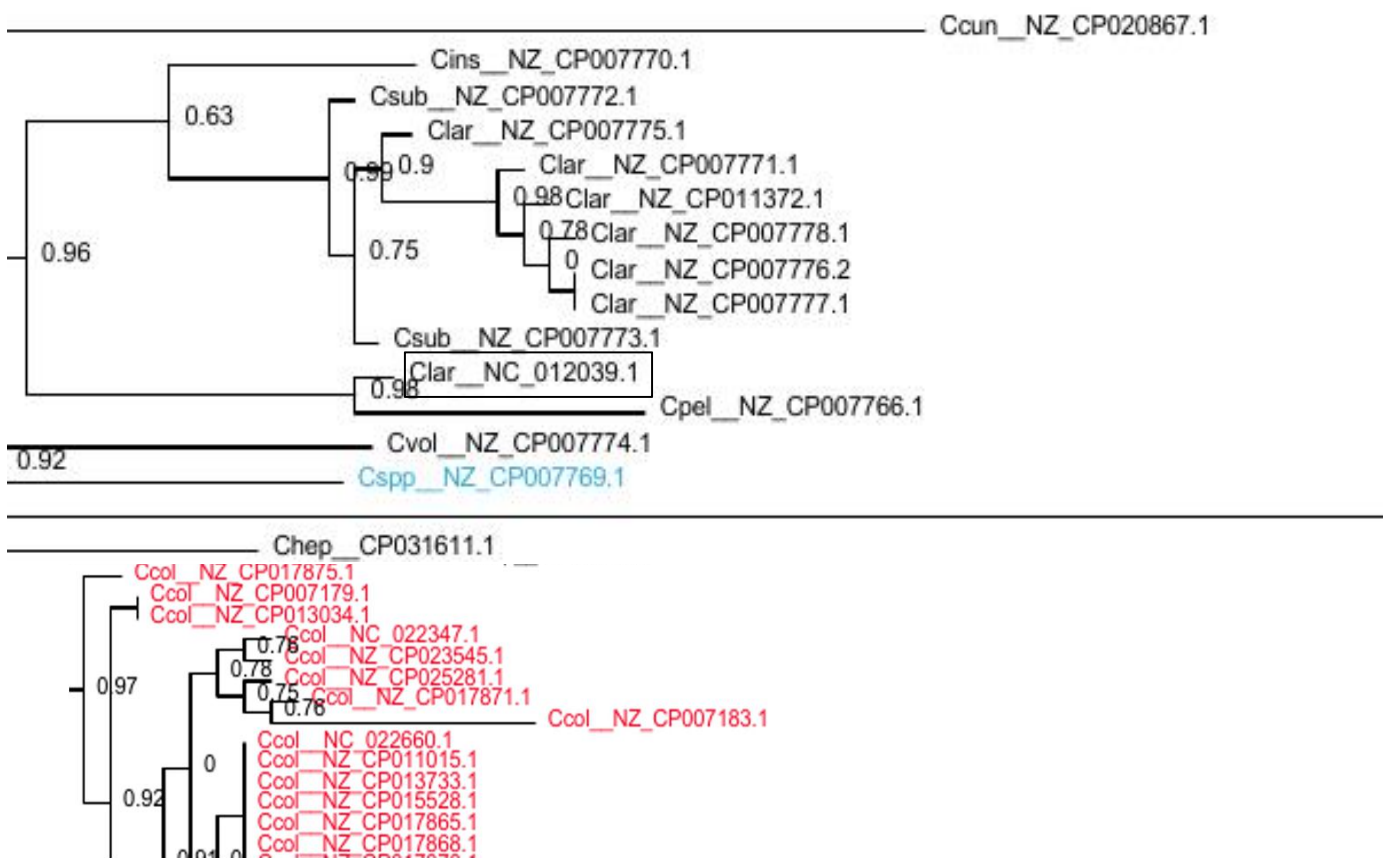


Figura 19: Árvore filogenética do gênero *Campylobacter* baseado no gene 23S rRNA. A espécie Clar linhagem RM2100 (NC_012039.1) está dentro do retângulo de linhas pretas e a espécie *Campylobacter* spp. está marcada de azul claro e as demais estão na cor preta.

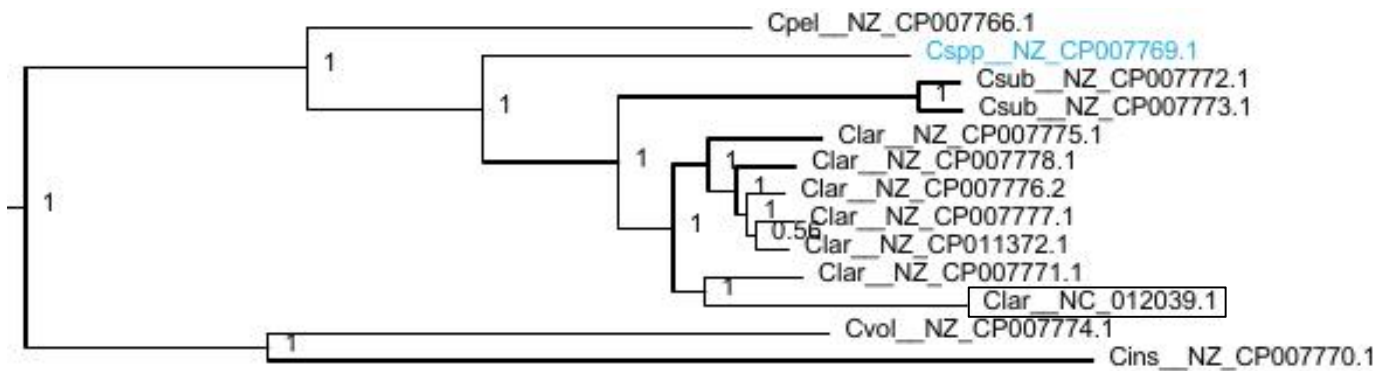


Figura 20: Árvore filogenômica do gênero *Campylobacter* baseada em 300 famílias proteicas de cópia única do gênero *Campylobacter*. A espécie *Clar* linhagem RM2100 (NC_012039.1) está dentro do retângulo de linhas pretas e a espécie *Campylobacter* spp. está marcada de azul claro e as demais estão na cor preta.

A disposição alternada das espécies *C. lari*, *C. insulaenigrae*, *C. peloridis*, *C. subantarcticus* e *C. volucris* nas demais filogenias (**Figuras 17, 18 e 19**) também chama atenção. Estas espécies são encontradas em sua maioria em mariscos e intestino de aves marinhas (GILBERT et al., 2017). Existe uma proximidade muito grande entre essas espécies de *Campylobacter*, tendo sido a espécie *C. peloridis* - comum em mariscos e isolada também de fezes humanas após gastroenterite aguda - diferenciada da espécie *C. lari* há cerca de dez anos, sendo que a filogenia do gene 16S rRNA contribuiu para tal processo de identificação (DEBRUYNE et al., 2009).

Já para a identificação da espécie *C. volucris*, a filogenia do gene 16S rRNA não se mostrou muito relevante durante a classificação da espécie. Para realizar a diferenciação dessa espécie com as demais é necessária a busca por outros genes conservados, tais como os genes *hsp60*, 23S rRNA, *rpoB*, *groEL*, *gyrA*, *gyrB* entre outros, pois possuem uma taxa de similaridade menor entre suas sequências (KWEON et al., 2015) ou o estudo da filogenômica de genes ou proteínas conservadas, como possível observar na **Figura 20**, que agrupou adequadamente os isolados de acordo com suas espécies. Assim como a espécie *Clar* linhagem RM2100 (NC_012039.1) só foi agrupada no ramo monofilético da espécie por meio da filogenômica, as linhagens *Csub* linhagem

LMG 24374 (NZ_CP007772.1) e Csub linhagem LMG 24377 (NZ_CP007773.1) só foram arrançadas no mesmo ramo através da filogenômica, provando assim serem da mesma espécie.

Apesar de falhar na discriminação de algumas espécies do gênero *Campylobacter*, a filogenia do 16S rRNA mostrou-se de extrema importância no processo de identificação de algumas espécies, justamente por seu considerável poder de discriminação, a filogenia foi organizada de tal forma como na filogenômica, no caso da espécie *C. iguaniorum* (**Figuras 21 e 22**). Os isolados Cigu linhagem 1485E (NZ_CP009043.1) - isolada do lagarto “dragão barbudo”, espécie comum na Austrália - e Cigu linhagem 2463D (NZ_CP010995.1) - isolada de iguana verde em 2015 por Gilbert e equipe -, foram devidamente agrupadas.

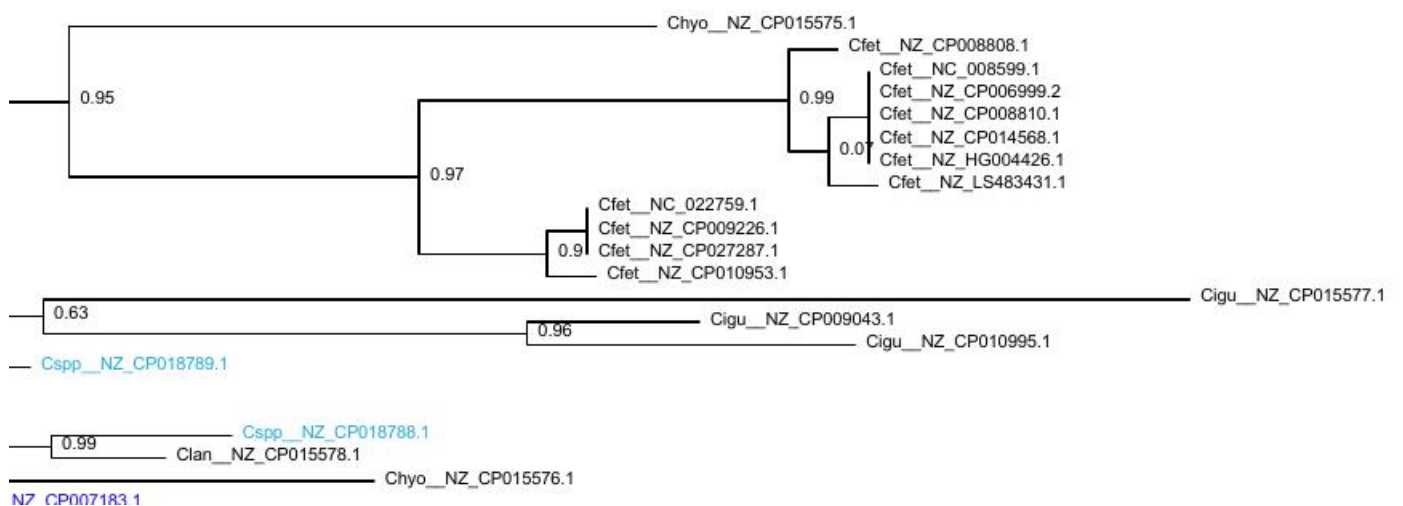


Figura 21: Árvore filogenética do gênero *Campylobacter* baseada no gene ribossomal 16S rRNA. As espécies *Campylobacter* spp. estão marcadas de azul claro, enquanto as espécies *Campylobacter lanieane*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter hyointestinalis* e *Campylobacter iguaniorum* estão marcadas de preto.

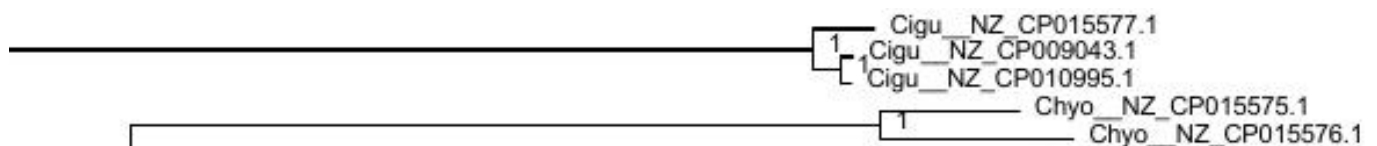


Figura 22: Árvore filogenômica do gênero *Campylobacter* baseada em 300 famílias proteicas de cópia única do gênero *Campylobacter*. As espécies *C. iguaniorum* e *C. hyointestinalis* estão marcadas de preto.

Quanto a espécie *C. hyointestinalis* as filogenias 5S rRNA, 16S rRNA, 23S rRNA e genes ribossomais concatenados foram incapazes de agrupar as linhagens Chyo subsp. Lawsonii CCUG 27631 (NZ_CP015576.1) e Chyo subsp. Hyointestinalis LMG 9260 (NZ_CP015575.1), como possível observar comparando as **Figuras 23, 24, 25 e 26** com a **Figura 22**. Essa dificuldade provavelmente ocorre devido ao fato de serem subespécies distintas e por possuírem variações suficientes em seus genes ribossomais por pressões evolutivas diferentes. Por exemplo, o isolado Chyo linhagem LMG 9260 foi identificado em bovinos enquanto o isolado Chyo linhagem LMG 15993 foi identificado em suínos, segundo os dados do NCBI.

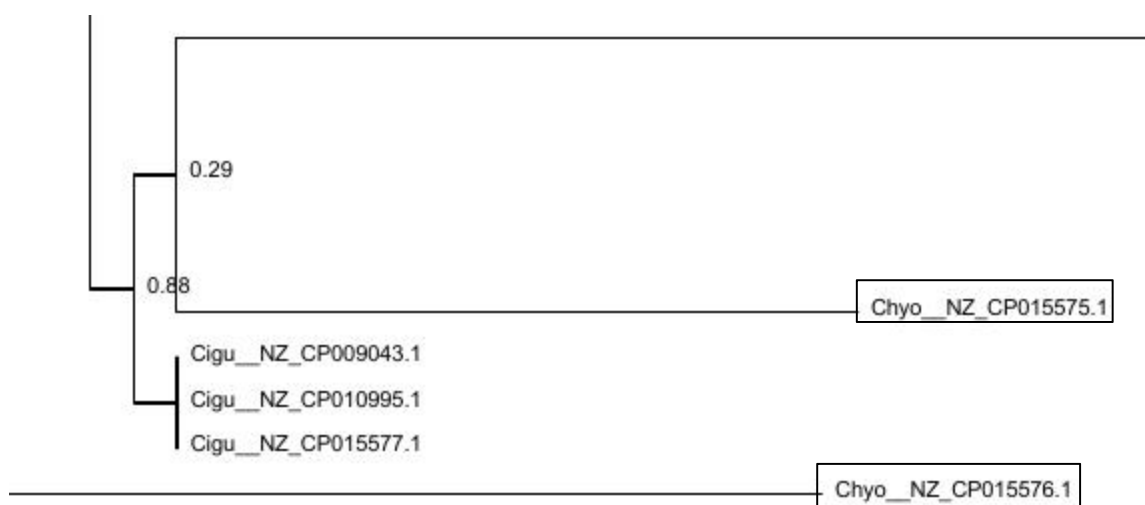


Figura 23: Árvore filogenética do gênero *Campylobacter* baseada no gene ribossomal 5S rRNA.

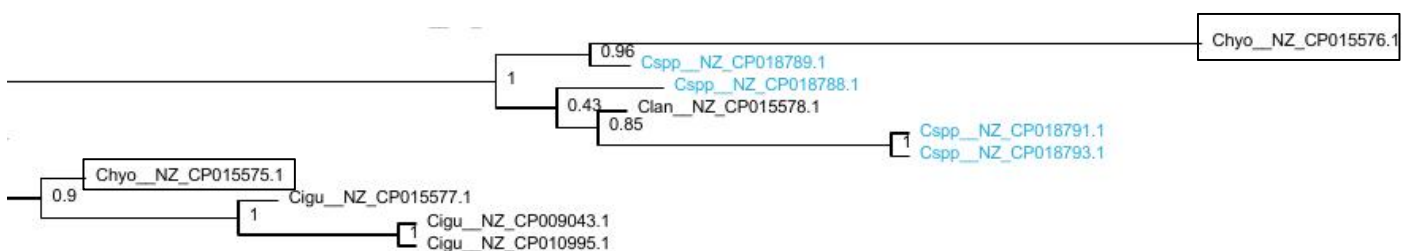


Figura 24: Árvore filogenética do gênero *Campylobacter* baseada no gene ribossomal 16S rRNA.

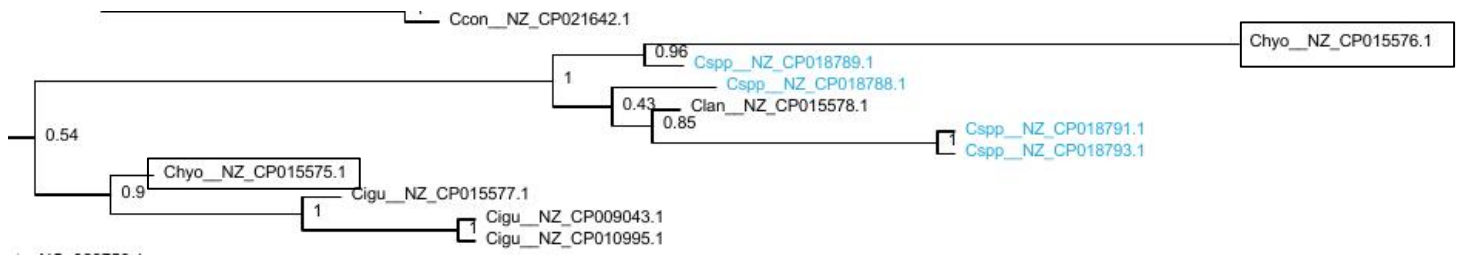


Figura 25: Árvore filogenética do gênero *Campylobacter* baseada no gene ribossomal 23S rRNA.

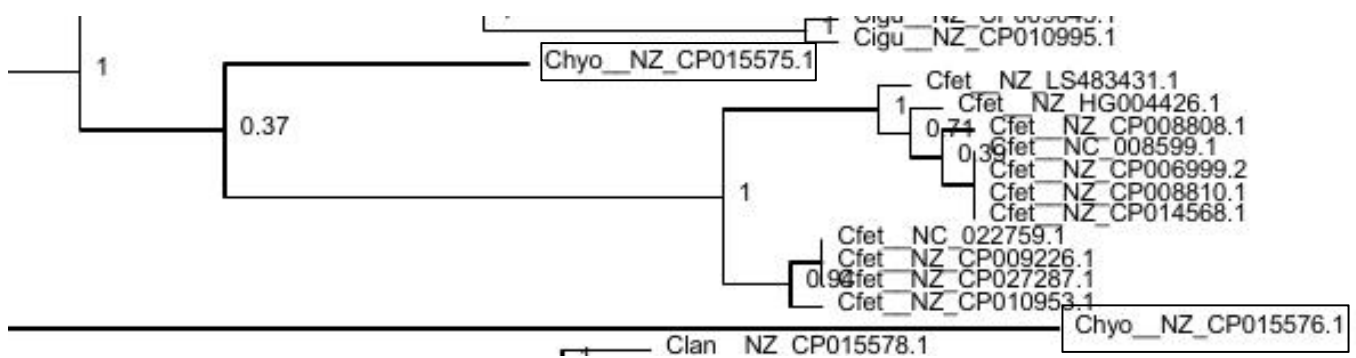


Figura 26: Árvore filogenética do gênero *Campylobacter* baseada nos genes ribossomais concatenados.

A filogenia do gene 16S rRNA também foi incapaz de separar as subespécies da espécie *C. fetus*, como é possível observar na **Figura 21**. A filogenia dos genes concatenados (**Figura 26**) foi a mais próxima do agrupamento correto, correspondente a filogenômica. A filogenômica separa as subespécies Testudinum em um ramo (o ramo menor número de espécies) e as subespécies Venerealis e Fetus em outro ramo (com maior número de espécies) (**Figura 27**).

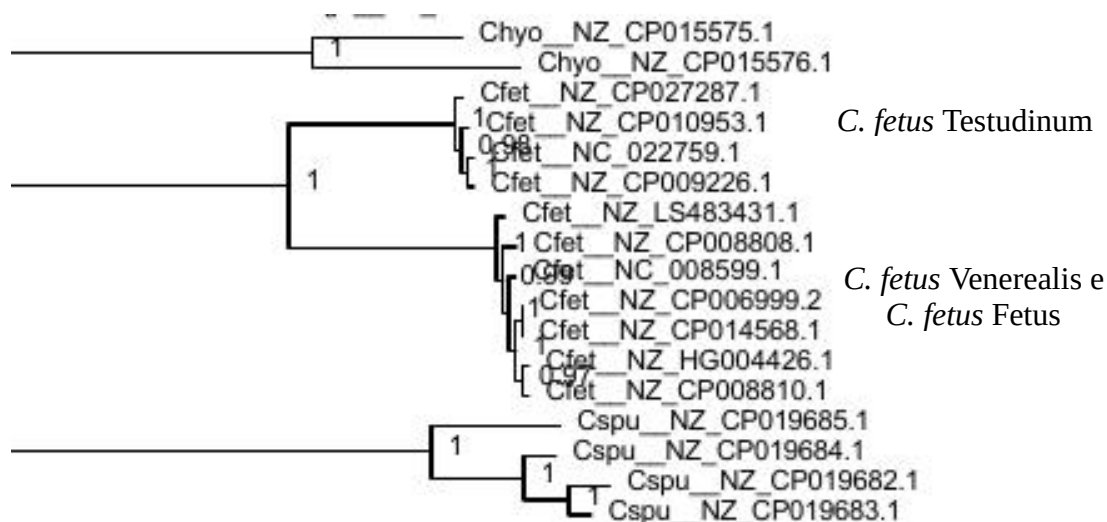


Figura 27: Árvore filogenômica do gênero *Campylobacter* com 300 grupos de genes de cópia única de proteínas ortólogas pertencentes a espécie *Campylobacter*.

Quanto as linhagens de *Campylobacter* sem espécie definida, voltamos a atenção para a NZ_CP018789.1 que em todas as filogenias sempre esteve em ramos próximos, porém sempre variados, ao da espécie *C. lanieane* como possível observar nas **Figuras 28, 29, 30 e 31**. No entanto a filogenômica nos permite observar que por fim, as duas compartilharam o mesmo ramo, demonstrando que existe a possibilidade de pertencerem a mesma espécie. As demais linhagens de *Campylobacter* sem espécie definida NZ_CP018788.1, NZ_CP018791.1, NZ_CP007769.1 e NZ_CP018793.1 formaram um grupo monofilético na árvore filogenômica, resolvendo principalmente a questão do agrupamento da Cspn NZ_CP007769.1 que diversas vezes foi colocada junto aos ramos das espécies de Chel, Ccun, Cins, Csub, Clar, Cpel e Cpel.

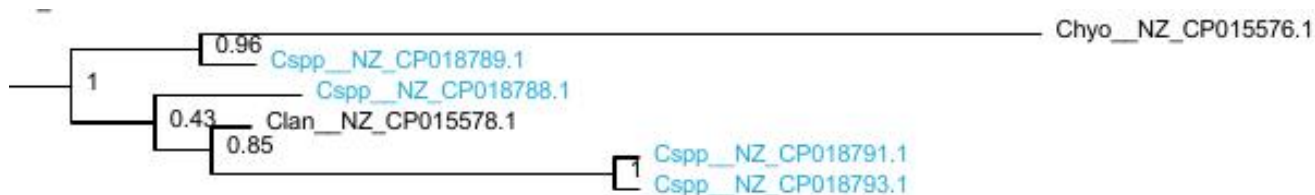


Figura 28: Árvore filogenética do gênero *Campylobacter* com o gene ribossomal 16S rRNA, as espécies de *Campylobacter* sem espécie definida estão marcadas de azul claro na imagem.

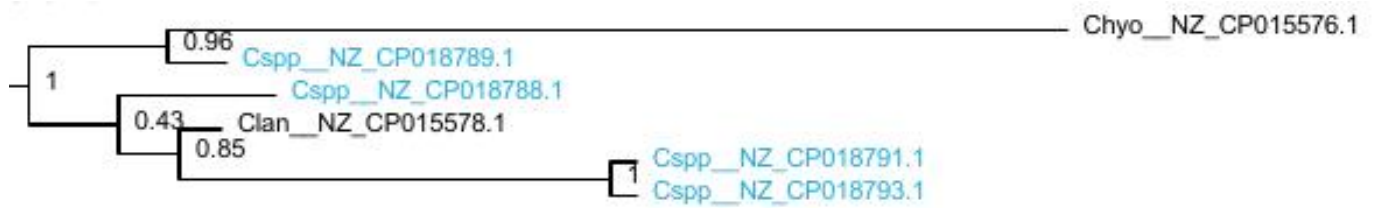


Figura 29: Árvore filogenética do gênero *Campylobacter* com o gene ribossomal 23S rRNA, as espécies de *Campylobacter* sem espécie definida estão marcadas de azul claro na imagem.

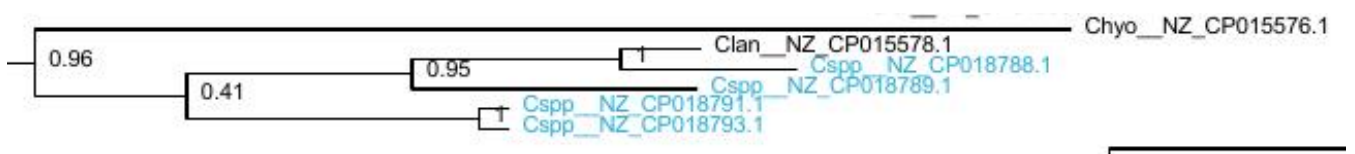


Figura 30: Árvore filogenética do gênero *Campylobacter* com os genes ribossomais concatenados, as espécies de *Campylobacter* sem espécie definida estão marcadas de azul claro na imagem.

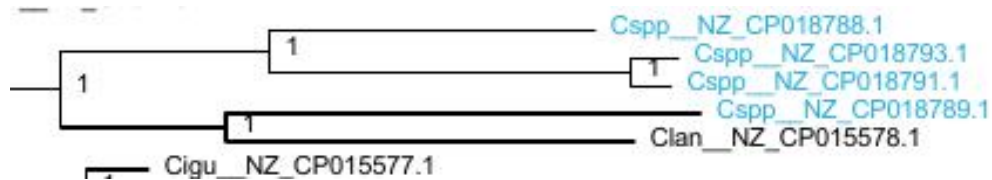


Figura 31: Árvore filogenômica do gênero *Campylobacter* com 300 grupos de genes de cópia única de proteínas ortólogas pertencentes a espécie *Campylobacter*, as espécies de *Campylobacter* sem espécie definida estão marcadas de azul claro na imagem.

6. CONCLUSÃO

Analisando os resultados obtidos por meio da discussão, é possível concluir que se tratando de estratégias de análises filogenéticas, a análise filogenômica se mostra a mais adequada para diferenciar as espécies do gênero *Campylobacter*. A filogenia do gene 16S rRNA provou ser boa para diferenciar algumas espécies, mas não cumpre esse papel em todas as análises, demonstrando que podem haver erros se o estudo de relações evolutivas for fundamentado somente em sua sequência. O gene 23S rRNA demonstra ser um marcador um pouco melhor que o 16S rRNA, sendo capaz de diferenciar um número maior de espécies, assim como a filogenia dos genes concatenados. A filogenia do gene 5S rRNA, se mostrou a mais ineficiente e de menor interesse, sendo para este gênero pouco relevante sua análise evolutiva individual.

A filogenômica se mostrou no geral muito eficaz, resolvendo de fato, conflitos de agrupamentos entre as espécies de *Campylobacter* que surgiram com as filogenias fundamentadas em genes ribossomais e genes ribossomais concatenados. Dentre as principais questões de classificação resolvidas com a filogenômica, fica em aberto o possível estudo e classificação de novas espécies do gênero *Campylobacter*.

7. REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S F *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, [S. l.], p. 3389–3402., 1 set. 1997.

AJAWATANAWONG, Pravech *et al.* Molecular Phylogenetics: Concepts for a Newcomer. *Network Biology*, [S. l.], p. 185-196, 26 out. 2016.

BAUM, David. Nature Education. [S. l.: s. n.], 2008. Disponível em: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/reading-a-phylogenetic-tree-the-meaning-of-41956/>. Acesso em: 26 nov. 2019.

BOER, Paulo de. Generation of *Campylobacter jejuni* genetic diversity in vivo. *Molecular Microbiology*, [S. l.], v. 44, p. 1-39, 2 abr. 2002.

BURNHAM, P. M.; HENDRIXSON, D. R. *Campylobacter jejuni*: collective components promoting a successful enteric lifestyle: *Nature Reviews Microbiology*. Biomed Research International, [S. l.], p. 551–565., 1 out. 2018.

CABI, Invasive Species Compendium *et al.* *Campylobacter* infections. *In: Annual Review of Microbiology*. [S. l.], 24 nov. 2019. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/90245>. Acesso em: 27 nov. 2019.

CAMP, Guy Van. Structure of 16S and 23S Ribosomal RNA Genes in *Campylobacter* Species: Phylogenetic Analysis of the Genus *Campylobacter* and Presence of Internal Transcribed Spacers. *Systematic and Applied Microbiology*, [S. l.], p. 361-3368, 17 nov. 1993.

CARRO, Lorena; NOUIOUI, Imen. Taxonomy and systematics of plant probiotic bacteria in the genomic era. *AIMS Microbiology*, [S. l.], p. 1-30, 31 maio 2017.

CHAN, CX; RAGAN, MA. Next-generation phylogenomics. *Biol Direct*, [S. l.], p. 1-6, 22 jan. 2013.

CHEN, Feng. OrthoMCL-DB: querying a comprehensive multi-species collection of ortholog groups. *Nucleic Acids Research*, [S. l.], v. 34, p. 1-6, 1 jan. 2006.

DARMON, Elise; LEACH, David R. F. Bacterial Genome Instability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, [S. l.], v. 78, p. 1-39, 1 mar. 2014.

DEBRUYNE, Lies; GEVERS, Dirk; VANDAMME, Peter. *Campylobacter*: Taxonomy of the Family *Campylobacteraceae*. 3. ed. New York: Nova Science Publishers, 2008.

EDGAR, Robert C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, [S. l.], p. 1792-1797, 19 mar. 2004.

ESSON, Diane *et al.* Genomic variations leading to alterations in cell morphology of *Campylobacter* spp. *Scientific Reports*, [S. l.], ed. Article number: 38303, 2 dez. 2016.

EUZÉBY, J.P. List of prokaryotic names with standing in nomenclature: genus *Campylobacter* 2019. Disponível em <http://www.bacterio.net/campylobacter.html>: Acesso em: 25 nov. 2019.

FABER, Eugenia *et al.* Novel Immunomodulatory Flagellin-Like Protein FlaC in *Campylobacter jejuni* and Other *Campylobacteriales*. *Host-Microbe Biology*, [S. l.], p. 1-24, 2 dez. 2015.

FISCHER, Greg H.; PATEREK, Elizabeth. *Campylobacter*. *StatPearls*, [S. l.], p. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537033/>, 2 jan. 2019.

GARENAUX, Amelie *et al.* Better understanding of the *Campylobacter* Conundrum. New York: Nova Science Publishers, cap. 1, p. 3-26, 2008.

HANSSON, Ingrid *et al.* Identification of nine sequence types of the 16S rRNA genes of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* isolated from broilers. *Acta Veterinaria Scandinavica*, [S. l.], p. 1-10, 21 maio 2008. DOI [doi:10.1186/1751-0147-50-10](https://doi.org/10.1186/1751-0147-50-10). Disponível em: <https://actavetscand.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1751-0147-50-10>. Acesso em: 25 nov.2019.

JOHN, Katherine St. Review Paper: The Shape of Phylogenetic Treespace. *Systematic Biology*, [S. l.], p. 83-94, 1 jan. 2017.

KAAKOUSH, Nadeem O *et al.* Global Epidemiology of *Campylobacter* Infection. *Clin Microbiol Rev*, [S. l.], p. 687-720, 28 jul. 2015.

KÄRENLAMPI, R. I.; TOLVANEN, T. P.; HÄNNINEN, M.-L. Phylogenetic Analysis and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Identification of *Campylobacter* Species Based on Partial *groEL* Gene Sequences. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, [S. l.], p. 5731-5738, 17 ago. 2004.

KHAN , I.U.H.; EDGE, T.A. Development of a novel triplex PCR assay for the detection and differentiation of thermophilic species of *Campylobacter* using 16S-23S rDNA internal transcribed spacer (ITS) region. *Journal of Applied Microbiology*, [S. l.], p. 361-3368, 30 ago. 2007.

KORCZAK, Bozena M. *et al.* Genetic relatedness within the genus *Campylobacter* inferred from *rpoB* sequences. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, [S. l.], v. 56, p. 1-9, 1 maio 2006. DOI [10.1099/ijms.0.64109-0](https://doi.org/10.1099/ijms.0.64109-0). Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/56/5/937.pdf?expires=1574913066&id=id&accname=guest&checksum=7F5AB6FD80C62B7824FC8DB748F547FE>. Acesso em: 25 nov. 2019.

KUCK, Patrick; LONGO, Gary C. FASconCAT-G: extensive functions for multiple sequence alignment preparations concerning phylogenetic studies. *Frontiers in Zoology*, [S. l.], 18 nov. 2014.

KWEON, Oh Joo *et al.* First Case Report of *Campylobacter volucris* Bacteremia in an Immunocompromised Patient. *Journal of Clinical Microbiology*, [S. l.], p. 1976-19978, 1 abr. 2015.

LASTOVICA, Albert J. *et al.* The Family Campylobacteraceae. The Prokaryotes, [S. l.], p. 307-335, 20 nov. 2014.

LERTSEHTAKARN, Paphavee *et al.* Motility and Chemotaxis in Campylobacter and Helicobacter. Annual Review of Microbiology, [S. l.], p. 389-410, 1 out. 2011.

LIU, Fang *et al.* The Clinical Importance of Campylobacter concisus and Other Human Hosted Campylobacter Species. Front. Cell. Infect. Microbiol., [S. l.], p. 1-22, 28 ago. 2018.

LUDWIG, W. *et al.* The Use of rRNA Gene Sequence Data in the Classification and Identification of Prokaryotes. Methods in Microbiology, [S. l.], p. 349-384, 6 dez. 2011.

MARTINS, C.; WASKO, A.P. ORGANIZATION AND EVOLUTION OF 5S RIBOSOMAL DNA IN THE FISH GENOME. Focus in Genome Research, [S. l.], p. 335-363, 2004.

MCTAVISH, Emily Jane *et al.* How and Why to Build a Unified Tree of Life. BioEssays, [S. l.], v. 39, p. 1-8, 5 out. 2017.

MOON, Jangsup *et al.* Campylobacter fetus meningitis confirmed by a 16S rRNA gene analysis using the MinION nanopore sequencer, South Korea, 2016. Emerging Microbes & Infections, [S. l.], p. 1-3, 13 ago. 2017.

NACHAMKIN, Irving *et al.* Campylobacter Species and Guillain-Barré Syndrome. Clin Microbiol Rev, [S. l.], p. 555-567, 11 jul. 1998.

NATSOS, G. *et al.* The genus Campylobacter: detection and isolation methods, species identification & typing techniques. Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society, [S. l.], p. 1327-1338, 13 maio 2015.

NG, L K *et al.* Morphological forms and viability of Campylobacter species studied by electron microscopy. J Bacteriol. , [S. l.], p. 338-343, 1 out. 1985.

NYATI, Kishan Kumar *et al.* Role of Campylobacter jejuni Infection in the Pathogenesis of Guillain-Barré Syndrome: An Update. Biomed Research International, [S. l.], p. 1-13, 13 ago. 2013.

OLIVEIRA, Pedro H. The chromosomal organization of horizontal gene transfer in bacteria. Nature Communications, [S. l.], v. 8, p. 1-11, 10 out. 2017.

QUEIROZ, Kevin de. How and Why to Build a Unified Tree of Life. Systematic Biology, [S. l.], v. 62, p. 625-632, 4 jul. 2013.

PASCOE, Ben. Local genes for local bacteria: Evidence of allopatry in the genomes of transatlantic Campylobacter populations. Molecular Ecology, [S. l.], v. 26, p. 1-12, 10 maio 2017.

PATANÉ, José S. L.; MARTINS, Joaquim; SETUBAL, João C. Phylogenomics. Network Biology, [S. l.], p. 103-108, 26 dez. 2017.

PATWARDHAN, Anand *et al.* Molecular Markers in Phylogenetic Studies-A Review. Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology, [S. l.], p. 1-9, 29 ago. 2014. DOI 0.4172/2329-

9002.1000131. Disponível em: <https://www.omicsonline.org/open-access/molecular-markers-in-phylogenetic-studiesa-review-2329-9002-2-131.pdf>. Acesso em: 27 nov. 2019.

PITKANEN, Tarja *et al.* MEMBERS OF THE FAMILY CAMPYLOBACTERACEAE: CAMPYLOBACTER JEJUNI, CAMPYLOBACTER COLI. GLOBAL WATER PATHOGEN PROJECT, [S. l.], 15 jan. 2015. PART THREE. SPECIFIC EXCRETED PATHOGENS: ENVIRONMENTAL AND EPIDEMIOLOGY ASPECTS, p. 3-39.

PRICE, Morgan N.; DEHAL, Paramvir S.; ARKIN, Adam P. FastTree 2 – Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. PLoS One. , [S. l.], 10 mar. 2010

RADOMSKA, Katarzyna A *et al.* Importance of Campylobacter jejuni FliS and FliW in Flagella Biogenesis and Flagellin Secretion. Front. Microbiol, [S. l.], p. 1-14, 12 jun. 2017.

RAJENDHRAN, J.; GUNASEKARAN, P. Microbial phylogeny and diversity: Small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. Microbiological Research, [S. l.], p. 99-110, 20 fev. 2011.

SHEPPARD, Samuel K. *et al.* The Evolution of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, [S. l.], p. 1-13, 22 jun. 2015.

SUN, F.j.; CAETANO-ANOLLÉS, G. The evolutionary history of the structure of 5S ribosomal RNA. J Mol Evol, [S. l.], p. 430-443, 29 jul. 2009.

VANDAMME, P *et al.* Campylobacteraceae. Bergey's manual of systematic bacteriology: Part C, The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilon Proteobacteria, New York, v. 2, p. 1147-1160, 2005.

VÉRON, M.; CHATELAIN, R. Taxonomic Study of the Genus Campylobacter. INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, U.S.A., v. Vol. 23, p. 122-134, 1 abr. 1973.

VOS, Michiel *et al.* A Comparison of rpoB and 16S rRNA as Markers in Pyrosequencing Studies of Bacterial Diversity. Network Biology, [S. l.], p. 1-8, 15 fev. 2012.

ZHOU, Yizhuang *et al.* Comprehensive Genomic Characterization of Campylobacter Genus Reveals Some Underlying Mechanisms for its Genomic Diversification. PLoS One, [S. l.], p. 1-13, 5 ago. 2013. DOI 10.1371/journal.pone.0070241. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3734277/>. Acesso em: 25 nov. 2019.

WIECZOREK, Kinga *et al.* Antimicrobial Resistance Mechanisms among Campylobacter. BioMed Research International, [S. l.], p. 1-12, 11 jun. 2013. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/90245>. Acesso em: 27 nov. 2019.

YOUNG, KATHRYN; DAVIS, LINDSAY M.; DIRITA, VICTOR J. Campylobacter jejuni: molecular biology and pathogenesis: Nature Reviews Microbiology. Nature Reviews Microbiology, [S. l.], p. 666-677, 14 out. 2007.

8. ANEXO

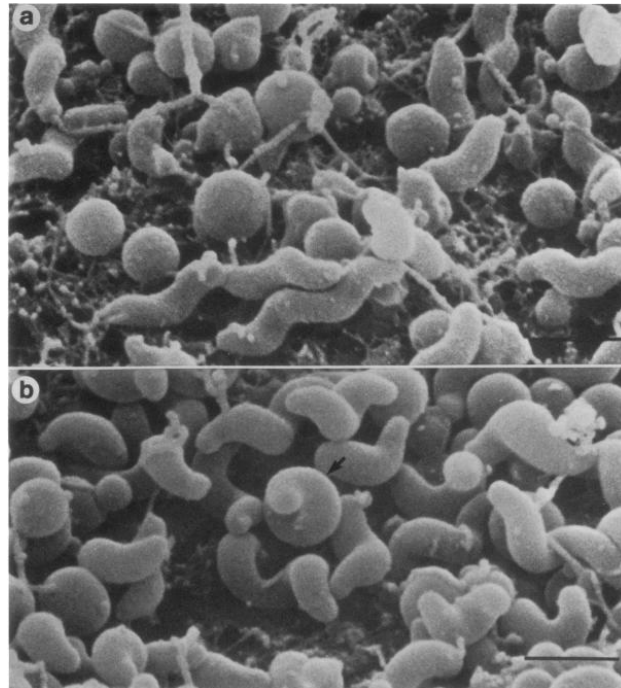


Figura 1: Varredura eletrônica de células de *Campylobacter*, mostrando sua forma. (a) Centro da colônia de *Campylobacter coli*. (b) Extremidade de uma colônia de *Campylobacter jejuni*. Fonte: NG et al., 1985.

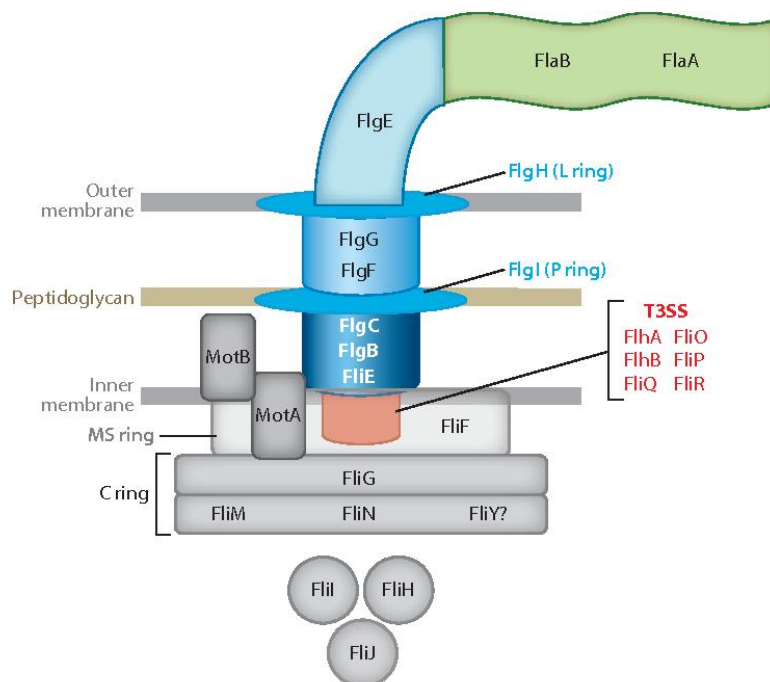


Figura 2: Principais componentes do flagelo da espécie *Campylobacter jejuni*. Fonte: LERTSEHTAKARN; OTTEMANN; HENDRIXSON, 2011.

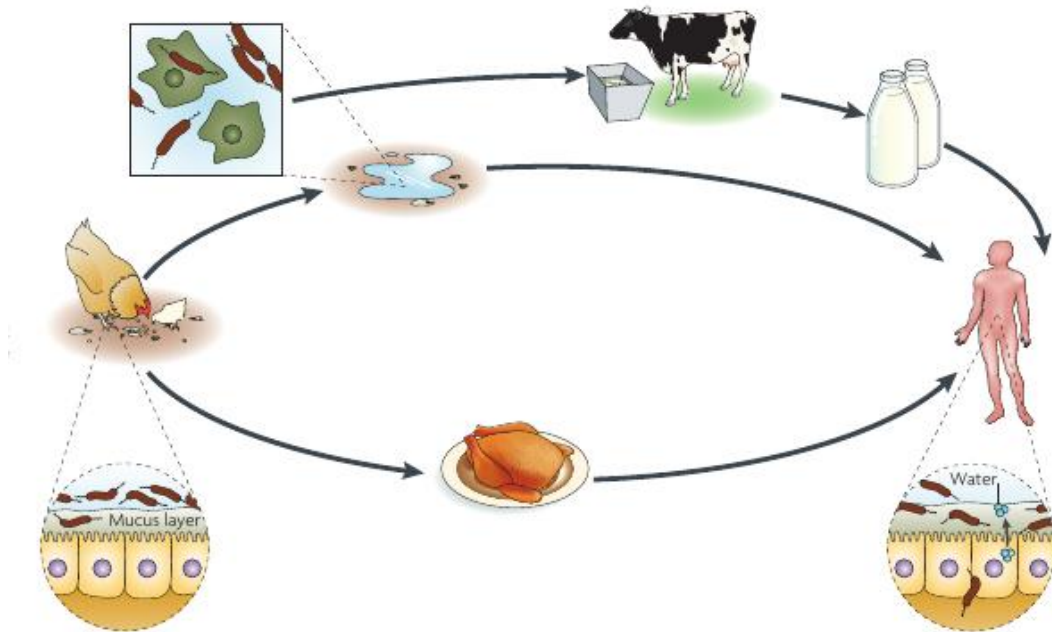


Figura 3: Representação do ciclo de transmissão da *Campylobacter jejuni*. Fonte: YOUNG; DAVIS; DIRITA, 2007.

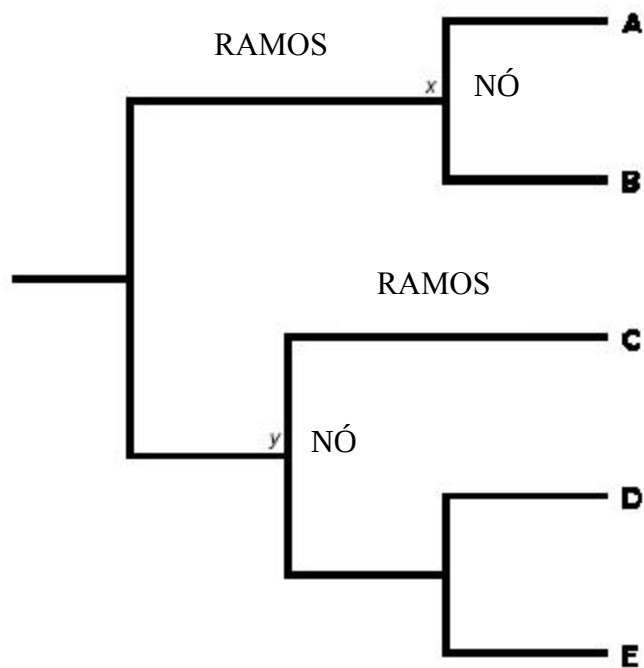


Figura 4: Exemplo de estrutura de uma árvore filogenética. Fonte: Nature Education, 2008.


```

>CP000768.1|JJD26997_RS00155|16S ribosomal RNA
TTTTTATGGAGAGTTTGTCTGGCTCAGAGTGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCAACGATGAAGCTTC
TAGCTTGCTAGAAGTGGATTAGTGGCGCACGGGTGAGTAAAGTATAGTTAATCTGCCCTACACAAGAGGACAAACAGTTGG
AAACGACTGCTAATACTCTATACTCCTGCTTAACACAAGTTGAGTAGGGAAAGTTTTTTCGGTGTAGGATGAGACTATATA
GTATCAGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCTATGACGCTTAAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGA
ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATATTGCGCAATGGGGGAAACCCCTGACGCAGCAACGC
CGCGTGGAGGATGACACTTTTCGGAGCGTAAACCTTTTCTTAGGGAAGAATTCTGACGGTACCTAAGGAATAAGCACC
GGCTAATCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAACGCTTACTCGGAATCACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAG
GCGGATTATCAAGTCTCTTGTGAAATCTAATGGCTTAACCATTAACCTGCTTGGGAAACTGATAGTCTAGAGTGAGGGAG
AGGCAGATGGAATTGGTGGTGTAGGGGTAATCCGTAGATATCACCAAGAATACCCATTGCGAAGGCGATCTGCTGGAA
CTCAACTGACGCTAAGGCGCAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTAC
ACTAGTTGTTGGGGTGTAGCCATCTCAGTAATGCAGCTAACGCATTAAGTGTACCGCTGGGAGTACGGTGCAGAT
TAAAACCAAAGGAATAGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGATACGGGAAGAACCTTAC
CTGGGCTTGATATCCTAAGAACCTTATAGAGATATGAGGGTGTAGCTTGCTAGAACTTAGAGACAGGTGCTGCACGGCT
GTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCACGTATTTAGTTGCTAACGGTTCGGC
CGAGCACTCTAAATAGACTGCCTTCGTAAGGAGGAGGAAGGTGTGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTATGCCAGG
GCGACACACGTGCTACAATGGCATATACAATGAGACGCAATACCGCGAGGTGGAGCAAATCTATAAAATATGTCCCAGTT
CGGATTGTTCTCTGCAACTCGAGAGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGCCATGCTACGGTGAATACGTT
CCCGGGTCTTGTACTCACCGCCGTACACCATGGGAGTTGATTTCACTCGAAGCCGGAATACTAAACTAGTTACCGTCC
ACAGTGAATCAGCGACTGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACCGTAGGAGAACCTGCGGTTGGATCACCTCTTTCTA

```

Figura 5: Exemplo de uma sequência de nucleotídeos do gene 16S rRNA da espécie *Campylobacter jejuni* strain NCTC 11168 (CP000768.1) utilizada como *query* na busca por similaridade.

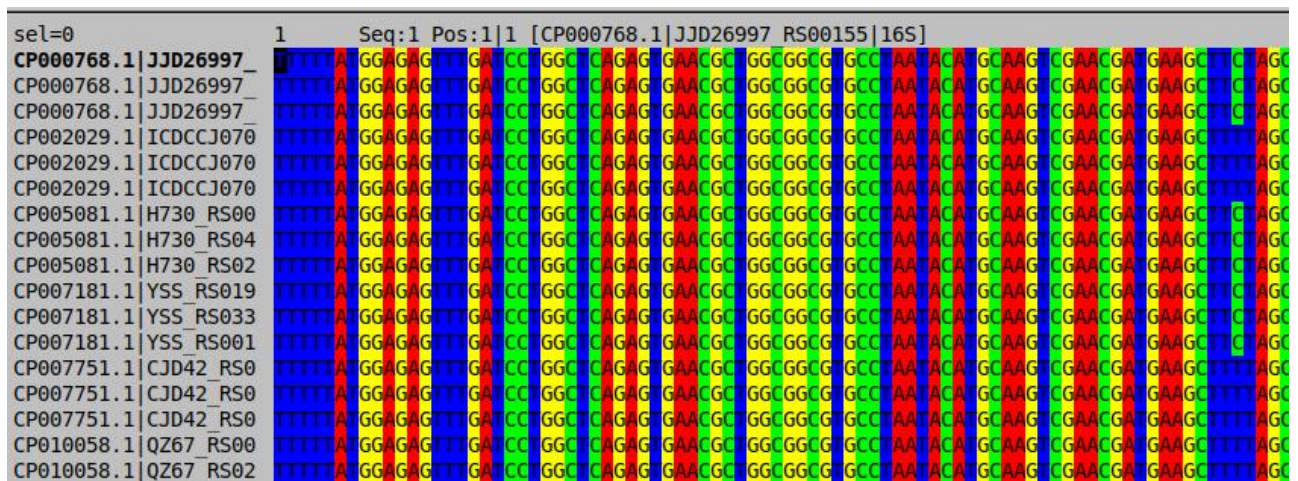


Figura 6: Exemplo de parte do alinhamento das sequências do gene 16S rRNA ribossomal dos genomas de *Campylobacter*. As sequências foram alinhadas pela ferramenta MUSCLE e visualizadas pela ferramenta SeaView.

Tabela 1: Tabela com as 39 espécies atuais do gênero *Campylobacter*:

<i>Campylobacter avium</i>	<i>Campylobacter iguaniorum</i>
<i>Campylobacter blaseri</i>	<i>Campylobacteri insulaenigrae</i>
<i>Campylobacter butzleri</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>

<i>Campylobacter canadensis</i>	<i>Campylobacter lanienae</i>
<i>Campylobacter cinaedi</i>	<i>Campylobacter lari</i>
<i>Campylobacter coli</i>	<i>Campylobacter mucosalis</i>
<i>Campylobacter concisus</i>	<i>Campylobacter mustelae</i>
<i>Campylobacter corcagiensis</i>	<i>Campylobacter nitrofigilis</i>
<i>Campylobacter cryaerophilus</i>	<i>Campylobacter ornithocola</i>
<i>Campylobacter cuniculorum</i>	<i>Campylobacter peloridis</i>
<i>Campylobacter curvus</i>	<i>Campylobacter pinnipediorum</i>
<i>Campylobacter fennelliae</i>	<i>Campylobacter pylori</i>
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>Campylobacter rectus</i>
<i>Campylobacter geochelonis</i>	<i>Campylobacter showae</i>
<i>Campylobacter gracilis</i>	<i>Campylobacter sputorum</i>
<i>Campylobacter helveticus</i>	<i>Campylobacter subantarcticus</i>
<i>Campylobacter hepaticus</i>	<i>Campylobacter upsaliensis</i>
<i>Campylobacter hominis</i>	<i>Campylobacter ureolyticus</i>
<i>Campylobacter hyoilei</i>	<i>Campylobacter volucris</i>
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	

Tabela 2: Lista de patógenos mais comuns isolados de fezes de humanos com enterites.

<i>C. coli</i>
<i>C. concisus</i>
<i>C. curvus</i>
<i>C. fetus</i>

<i>C. gracilis</i>
<i>C. hominis</i>
<i>C. helveticus</i>
<i>C. hyointestinalis</i>
<i>C. insulaenigrae</i>
<i>C. jejuni</i>
<i>C. lari</i>
<i>C. mucosalis</i>
<i>C. rectus</i>
<i>C. showae</i>
<i>C. sputorum</i>

Fonte: KAAKOUSH et al., 2015

Tabela 3: Espécies de *Campylobacter* e número de genomas escolhidos para análise filogenética.

Espécie	Número de sequência de genomas por espécie
<i>Campylobacter avium</i>	1
<i>Campylobacter coli</i>	22
<i>Campylobacter concisus</i>	3
<i>Campylobacter cuniculorum</i>	1
<i>Campylobacter curvus</i>	1
<i>Campylobacter fetus</i>	11
<i>Campylobacter gracilis</i>	1
<i>Campylobacter helveticus</i>	1
<i>Campylobacter hepaticus</i>	1
<i>Campylobacter hominis</i>	1
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	2
<i>Campylobacter iguaniorum</i>	3
<i>Campylobacter insulaenigrae</i>	1
<i>Campylobacter jejuni</i>	150
<i>Campylobacter lanienae</i>	1
<i>Campylobacter lari</i>	7
<i>Campylobacter peloridis</i>	1
<i>Campylobacter pinnipediorum</i>	5
<i>Campylobacter spp</i>	5
<i>Campylobacter sputorum</i>	4
<i>Campylobacter subantarcticus</i>	2
<i>Campylobacter ureolyticus</i>	1

Tabela 4: Espécies do gênero *Campylobacter* utilizadas e seus respectivos número de acesso no banco de dados NCBI.

Espécie	Acesso NCBI
Cavi	
Campylobacter avium	NZ_CP022347.1
Ccol	
Campylobacter coli	NZ_CP019977.1
Campylobacter coli	NZ_CP011015.1
Campylobacter coli	NZ_CP013034.1
Campylobacter coli	NZ_CP013733.1
Campylobacter coli	NZ_CP015528.1
Campylobacter coli	NZ_CP017025.1
Campylobacter coli	NZ_CP017865.1
Campylobacter coli	NZ_CP017868.1
Campylobacter coli	NZ_CP017871.1
Campylobacter coli	NZ_CP017873.1
Campylobacter coli	NZ_CP017875.1
Campylobacter coli	NZ_CP017878.1
Campylobacter coli	NZ_CP018900.1

Campylobacter coli	NZ_CP023545.1
Campylobacter coli	NZ_CP025281.1
Campylobacter coli	NZ_CP028187.1
Campylobacter coli	CP011777.1
Campylobacter coli	NC_022660.1
Campylobacter coli	NC_022347.1
Campylobacter coli	NZ_CP007183.1
Campylobacter coli	CP007181.1
Campylobacter coli	NZ_CP007179.1

Ccon

Campylobacter concisus	NZ_CP012541.1
Campylobacter concisus	NZ_CP021642.1
Campylobacter concisus	NC_009802.2

Ccun

Campylobacter cuniculorum	NZ_CP020867.1
---------------------------	---------------

Ccur

Campylobacter curvus	NC_009715.2
----------------------	-------------

Cfet

Campylobacter fetus subsp. fetus	NZ_LS483431.1
Campylobacter fetus subsp. fetus	NZ_CP008808.1
Campylobacter fetus subsp. fetus	NC_008599.1
Campylobacter fetus subsp. testudinum	NZ_CP009226.1
Campylobacter fetus subsp. testudinum	NZ_CP027287.1
Campylobacter fetus subsp. testudinum	NC_022759.1
Campylobacter fetus subsp. testudinum	NZ_CP010953.1
Campylobacter fetus subsp. venerealis	NZ_CP014568.1
Campylobacter fetus subsp. venerealis	NZ_CP008810.1
Campylobacter fetus subsp. venerealis	NZ_CP006999.2
Campylobacter fetus subsp. venerealis	NZ_HG004426.1

Cgra

Campylobacter gracilis	NZ_CP012196.1
------------------------	---------------

Chel

Campylobacter helveticus	NZ_CP020478.1
--------------------------	---------------

Chep

Campylobacter hepaticus	CP031611.1
-------------------------	------------

Chom

Campylobacter hominis NC_009714.1

Chyo

Campylobacter hyointestinalis subsp. hyointestinalis NZ_CP015575.1

Campylobacter hyointestinalis subsp. lawsonii NZ_CP015576.1

Cigu

Campylobacter iguaniorum NZ_CP009043.1

Campylobacter iguaniorum NZ_CP010995.1

Campylobacter iguaniorum NZ_CP015577.1

Cins

Campylobacter insulaenigrae NZ_CP007770.1

Cjej

Campylobacter jejuni NZ_CP012696.1

Campylobacter jejuni NZ_CP012149.1

Campylobacter jejuni NZ_LN831025.1

Campylobacter jejuni NZ_CP010471.1

Campylobacter jejuni	NZ_CP010472.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010473.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010474.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010475.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010476.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010477.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010479.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010480.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010481.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010482.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010483.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010488.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010489.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010490.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010491.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010492.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010493.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010494.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010496.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010497.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010498.1

Campylobacter jejuni	NZ_CP010499.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010500.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010495.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010501.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010502.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010503.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010504.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010505.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010506.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010507.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010508.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010509.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010510.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010511.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010457.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010458.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010459.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010460.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010461.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010462.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010463.1

Campylobacter jejuni	NZ_CP010464.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010465.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010466.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010467.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010468.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010469.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010470.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010484.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010485.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010486.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010487.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP014344.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP014744.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP014742.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP017862.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP017860.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP017863.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP017859.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP017856.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP007188.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP007189.1

Campylobacter jejuni	NZ_CP007190.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP007191.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP007192.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP007193.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP019965.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP020776.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP017229.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP022439.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP022440.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP022470.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP022559.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP023543.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP023867.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP023866.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP028185.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP028909.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP028910.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP028911.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP028912.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP012206.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP012210.1

Campylobacter jejuni	NZ_CP012211.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP012212.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP012213.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP012214.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP012216.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP012217.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP012220.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP012221.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP012224.1
Campylobacter jejuni	CP010478.1
Campylobacter jejuni	CP022551.1
Campylobacter jejuni	NC_021834.1
Campylobacter jejuni	NC_022529.1
Campylobacter jejuni	NC_003912.7
Campylobacter jejuni supsp. doylei	CP027403.1
Campylobacter jejuni supsp. doylei	LS483295.1
Campylobacter jejuni supsp. doylei	CP000768.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP008787.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010306.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010307.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010072.1

Campylobacter jejuni	NZ_CP010301.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP010906.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP012689.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP012690.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP015209.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP017029.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP017031.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP017032.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP017033.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP020045.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP022076.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP022077.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP022079.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP022080.1
Campylobacter jejuni	CP032316.1
Campylobacter jejuni	NZ_LS483362.1
Campylobacter jejuni	CP010058.1
Campylobacter jejuni	NC_022362.2
Campylobacter jejuni	NC_022352.2
Campylobacter jejuni	NC_022351.2
Campylobacter jejuni	NC_022353.2

Campylobacter jejuni	NC_008787.1
Campylobacter jejuni	NC_009839.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP005388.1
Campylobacter jejuni	CP007751.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP006851.1
Campylobacter jejuni	NC_017279.1
Campylobacter jejuni	CP002029.1
Campylobacter jejuni	NC_017280.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP007749.1
Campylobacter jejuni	NC_002163.1
Campylobacter jejuni	NC_018521.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP006689.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP006685.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP006686.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP006687.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP006688.1
Campylobacter jejuni	NC_018709.4
Campylobacter jejuni	CP005081.1
Campylobacter jejuni	NC_017281.1
Campylobacter jejuni	NZ_CP017456.1

Clan

Campylobacter lanienae NZ_CP015578.1

Clar

Campylobacter lari NZ_CP011372.1

Campylobacter lari NZ_CP007776.2

Campylobacter lari NZ_CP007775.1

Campylobacter lari NZ_CP007777.1

Campylobacter lari NZ_CP007778.1

Campylobacter lari NC_012039.1

Campylobacter lari subsp. concheus NZ_CP007771.1

Cpel

Campylobacter peloridis NZ_CP007766.1

Cpin

Campylobacter pinnipediorum subsp. caledonicus NZ_CP017018.1

Campylobacter pinnipediorum subsp. caledonicus NZ_CP017258.1

Campylobacter pinnipediorum subsp. pinnipediorum NZ_CP012546.1

Campylobacter pinnipediorum subsp. pinnipediorum NZ_CP012547.1

Campylobacter pinnipediorum subsp. pinnipediorum NZ_CP012548.1

Cspp

Campylobacter sp.	NZ_CP018788.1
Campylobacter sp.	NZ_CP018793.1
Campylobacter sp.	NZ_CP007769.1
Campylobacter sp.	NZ_CP018789.1
Campylobacter sp.	NZ_CP018791.1

Cspu

Campylobacter sputorum	NZ_CP019685.1
Campylobacter sputorum bv. faecalis	NZ_CP019683.1
Campylobacter sputorum bv. paraureolyticus	NZ_CP019684.1
Campylobacter sputorum bv. sputorum	NZ_CP019682.1

Csub

Campylobacter subantarcticus	NZ_CP007772.1
Campylobacter subantarcticus	NZ_CP007773.1

Cure

Campylobacter ureolyticus	NZ_CP012195.1
---------------------------	---------------

Cvol

Campylobacter volucris

NZ_CP007774.1
