

FABIOLA RIBEIRO CAMPOS

Isolamento e caracterização de *Campylobacter* spp. em amostras de fezes e carcaças de suínos provenientes de abatedouros do Estado de São Paulo

São Paulo

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DEDALUS - Acervo - FMVZ



11300030681

FABIOLA RIBEIRO CAMPOS

Isolamento e caracterização de *Campylobacter* spp. em amostras de fezes e carcaças de suínos provenientes de abatedouros do Estado de São Paulo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador(a):

Profa. Dra. Andrea Mike Moreno

São Paulo

2006

ID 3528

N.º CLASSIFICAÇÃO
T.1825
Fm02
e.1
N.º TOMBO:
027123

Sumário 1611460

DEDALUS - Acervo - FMVZ



11300030681

FABIOLA RIBEIRO CAMPOS

Isolamento e caracterização de *Campylobacter* spp. em amostras de fezes e carcaças de suínos provenientes de abatedouros do Estado de São Paulo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador(a):

Profa. Dra. Andrea Mike Moreno

São Paulo

2006

ID 3528

N.º CLASSIFICAÇÃO
T.1825
Fm02
e.1
N.º TOMBO:
027123

Sumário 1611460

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

8/1
BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
18/12/06

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1825
FMVZ

Campos, Fabiola Ribeiro

Isolamento e caracterização de *Campylobacter* spp. em amostras de fezes e carcaças de suínos provenientes de abatedouros do Estado de São Paulo. / Fabiola Ribeiro Campos. – São Paulo : F. R. Campos, 2006. 47 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2006.

Programa de Pós-graduação: Patologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Patologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Andréa Micke Moreno.

1. Suíno. 2. *Campylobacter*. 3. Carcaças. 4. Fezes. 5. Abatedouro. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Assistência Acadêmica


Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Isolamento e caracterização de *Campylobacter spp.* em amostras de fezes e carcaças de suínos provenientes de abatedouros do Estado de São Paulo", protocolo nº675/2005, utilizando 100 peças de abatedouro de suínos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Andréa Micke Moreno, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendun".

(We certify that the Research "Isolation and characterization of *Campylobacter spp.* In feces and carcass of pigs from slaughter houses of São Paulo State", protocol number 675/2005, utilizing 100 parts from slaughterhouse (swine), under the responsibility of Profa. Dra. Andréa Micke Moreno, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendun", meeting).

São Paulo, 06 de outubro de 2005


Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: CAMPOS, Fabíola Ribeiro

Título: Isolamento e caracterização de *Campylobacter* spp. em amostras de fezes e carcaças de suínos provenientes de abatedouros do Estado de São Paulo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: 15 / 02 / 2007

Banca Examinadora

Prof. Dr.: Andréa Midei Nogueira Instituição: FMVZ-USP

Assinatura: Andréa Midei Nogueira Julgamento: Aprovada

Prof. Dr.: Antonio J.P. Ferraz Instituição: FMVZ-USP

Assinatura: [Assinatura] Julgamento: Aprovada

Prof. Dr.: Elaine Sampaio Pinheiro Instituição: Instituto Biológico

Assinatura: [Assinatura] Julgamento: APROVADA

DEDICATÓRIA

A minha mãe, meu pai e minha irmã por me apoiarem em tudo que eu acredito. A Deus por me dar essa família maravilhosa.

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Andréa Micke Moreno, pela orientação e apoio.

À toda a equipe do Laboratório de Sanidade Suína da FMVZ/USP, pelo apoio na colheita e processamento das amostras.

À equipe do Laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução do Instituto Biológico, Dra. Margareth Genovez, Dra Lília Paulin, Vanessa Castro, Simone Miyashiro, Carolina Américo, Aline, Jessica, Maria Antera, Maria Franco e a todos os estagiários.

À Dra. Eliana Scarcelli Pinheiro por tudo o que tem feito por mim desde que cheguei ao laboratório, todos os ensinamentos, apoio, e sua amizade.

À Dra. Rosa Maria Piatti, pelas aulas, por sua grande atenção, carinho e apoio.

À Bióloga Solange Rosa Teixeira e Silva por sua sua amizade, por me ajudar em tudo que preciso desde profissionalmente até pela paciência em ouvir todos os meus problemas, obrigada.

À Dra. Maristela Vasconcellos Cardoso, por se preocupar comigo, por todos esses anos de amizade e pelas boas risadas que demos juntas.

À Wanessa Pacheco pelo apoio desde o começo deste projeto.

À minha vózinha querida Ditinha, à todas as minhas tias e tios, às minhas primas e primos, à todos os mês amigos, minha mãe, meu pai e minha irmã, por sempre torcerem por mim.

À minha prima Mariana e minha tia Maria Silvia pelo apoio nas traduções.

Às minhas "irmãzinhas" Simone, Viviane e Lídia por esses anos de casa.

Ao Cláudio por seu amor e carinho.

Aos meu sogros Maurício e Maria Tereza por me acolherem em sua casa.

Ao Instituto Biológico, por todos esses anos e aos anos que ainda viram.

RESUMO

CAMPOS, F. R. **Isolamento e caracterização de *Campylobacter* spp. em amostras de fezes e carcaças de suínos provenientes de abatedouros do Estado de São Paulo.** [Isolation and characterization of *Campylobacter* spp. in samples of swine feces and carcasses collected in São Paulo State slaughterhouses]. 2006. 47 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

A importância da espécie suína na transmissão de *Campylobacter* spp. assemelha-se aos demais grupos de animais que se destinam à produção de carne, incluindo aves, bovinos e ovinos. Os objetivos deste estudo foram isolar *Campylobacter* spp. a partir de fezes e carcaças de suínos abatidos no Estado de São Paulo; identificar as espécies de *Campylobacter* spp. presentes nos animais abatidos; caracterizar os isolados obtidos através do Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP). Para tal, foram utilizadas 120 amostras de fezes e 120 suabes de carcaças de suínos, colhidas de quatro diferentes abatedouros do Estado de São Paulo. Das 120 amostras de fezes analisadas, 30 foram positivas para o isolamento de *Campylobacter coli* (25%) e duas foram positivas para isolamento de *Campylobacter jejuni* (1,6%). Todas as amostras analisadas de suabes de carcaça foram negativas para *Campylobacter* spp. As estirpes isoladas que apresentaram características bioquímicas sugestivas de *Campylobacter* spp. foram submetidas ao teste de susceptibilidade ao ácido nalidixico e cefalotina, destas 19,16% (23/120) apresentaram resistência ao ácido nalidixico apesar de todas as características bioquímicas indicarem se tratar de *Campylobacter coli*. Foram selecionadas para a análise genotípica 38 amostras isoladas, sendo 36 de *C. coli* e dois de *C. jejuni*. A análise dos isolados através do AFLP revelou a presença de 28 perfis que foram designados P1 a P28. A técnica discriminou as cepas de acordo com a espécie, porém, uma cepa previamente caracterizada como *C. coli* foi agrupada com isolados de *C. jejuni*. Não foi possível estabelecer a correlação entre os isolados e o abatedouro de origem, no entanto observa-se uma forte tendência dos isolados resistentes ao ácido nalidixico em formar grupamentos de maior similaridade.

Palavras-chave: Suíno. *Campylobacter*. Carcaças. Fezes. Abatedouro.

ABSTRACT

CAMPOS, F. R. **Isolation and characterization of *Campylobacter* spp. in samples of swine feces and carcasses collected in São Paulo State slaughterhouses.** [Isolamento e caracterização de *Campylobacter* spp. em amostras de fezes e carcaças de suínos provenientes de abatedouros do Estado de São Paulo]. 2006. 47 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

The importance of swine species in the transmission of *Campylobacter* spp. resembles to the other groups of animals that are destined to the meat production, including bovine and ovine animals. The objectives of this study were to isolate *Campylobacter* spp. from swine feces and carcasses slaughtered in São Paulo State; to identify the *Campylobacter* spp. species presents in the slaughtered animals; to characterize the isolated samples by amplified fragment length polymorphism (AFLP), for this, 120 swine feces samples and the same number of carcasses swabs were collected of four different slaughterhouses in São Paulo State. From 120 feces samples, 30 (25%) were positive for *Campylobacter coli* isolation and two (1,6%) were positive for *Campylobacter jejuni*. All the analyzed carcass swabs samples were negatives for *Campylobacter* spp. The isolated samples that presented suggestive biochemical characteristics of *Campylobacter* spp. were submitted to the susceptibility test to the nalidixic acid and cefalotine, from that 19.16% (23/120) presented resistance to the nalidixic acid in spite of all the biochemical characteristics indicate that they were *Campylobacter coli*. They were selected for the genotypic analysis 38 isolated samples, being 36 of *C. coli* and two of *C. jejuni*. The analysis of the 38 tested samples by AFLP showed the presence of 28 profiles that had been assigned P1 to P28. The technique discriminated the samples in agreement with the species, however, one sample previously characterized as *C. coli* was clustered as *C. jejuni*. It was not possible to establish the correlation between the isolated samples and the origin slaughterhouse, however a strong tendency of the isolated samples acid nalidixic resistant to create clusters with more similarity.

Key Words: Swine. *Campylobacter*. Carcass. Feces. Slaughterhouse.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Ocorrência de *Campylobacter* spp. em fezes e esfregaço de carcaça de suínos em quatro abatedouros do Estado de São Paulo, no período de 2004-2005, através de isolamento bacteriológico29
- Tabela 2 - Frequência de isolados de *C. coli* resistentes ao ácido nalidixico31

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Frequência de *Campylobacter coli* e *Campylobacter jejuni* em fezes de suínos em quatro abatedouros do Estado de São Paulo, no período de 2004-2005, através de isolamento bacteriológico.....30

Gráfico 2 - Frequência de isolados de *C. coli* resistentes ao ácido nalidixico31

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Sítio de restrição da enzima *Hind*III, adaptadores e seqüência de *primers* para tipagem de *Campylobacter spp.* através da AFLP27
- Figura 2 - Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP).
Colunas 1 a 7, 9 a 19 – Amostras de *C. coli* e *C. jejuni* isoladas de fezes.
M - 100bp DNA Ladder33
- Figura 3 - Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP).
Colunas 1 a 20 - Amostras de *C. coli* isoladas de fezes. M - 100bp DNA
Ladder34
- Figura 4 - Dendrograma baseado em UPGMA a partir da análise de agrupamento do coeficiente de Jaccard pela técnica de AFLP com amostras de *C. coli* e *C. jejuni* isolados de fezes de suínos35

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
3	OBJETIVOS.....	22
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1	Amostras.....	23
4.2	Isolamento Bacteriológico.....	23
4.2.1	Fezes.....	23
4.2.2	Suabe de Carcaças.....	24
4.3	Extração do DNA bacteriano.....	25
4.4	Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP).....	26
4.5	Determinação do Índice Discriminatório (DI).....	27
4.6	Análise Estatística dos Fragmentos Amplificados.....	28
5	RESULTADOS.....	29
6	DISCUSSÃO.....	36
7	CONCLUSÕES.....	40
	REFERÊNCIAS.....	41

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, o rebanho suíno tem a sua maior representação numérica, econômica e tecnológica na região Sul, seguida pelas regiões Sudeste, Centro Oeste e Norte. Tendo em vista o tamanho continental do nosso país e a influência européia na criação de suínos, o Brasil classifica-se como o quinto maior produtor de carne suína do mundo (ABCS, 2004).

As regiões Sudeste e Centro Oeste também têm se destacado na suinocultura brasileira, devido aos grandes investimentos que estão sendo implantados em Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, principalmente (ABCS, 2004).

As regiões Norte e Nordeste, que detêm um rebanho muito extenso, têm uma importância social e econômica expressiva para estes Estados (ABCS, 2004).

A carne suína é a mais consumida no mundo, mas no Brasil ela perde em preferência para a carne bovina e a de frango (MOREIRA, 2003). As exportações brasileiras de carne suína têm mostrado um grande crescimento nos últimos anos, devido à excelente competitividade do nosso produto no exterior, perdendo para o Canadá, Estados Unidos e Dinamarca (MOREIRA, 2003).

A globalização de economia exige da suinocultura refinamento tecnológico para aumentar o desempenho dos animais, reduzir custos e melhorar a qualidade do produto. A nutrição, a genética, a sanidade, as instalações e o manejo são grandes áreas que devem ser consideradas em conjunto para maximizar resultados qualitativos e econômicos (MOREIRA, 2003).

A seleção genética, procurando aumentar o potencial biológico, os progressos na nutrição, instalações e manejo, viabiliza produzir mais animais por área, exigindo dessa forma cuidado especial com a sanidade. A prevenção, erradicação de doenças transmissíveis e controle rigoroso sobre os insumos veterinários utilizados na produção animal constituem um elenco de medidas essenciais para garantir níveis seguros e competitivos na produção de alimentos de origem animal (MOREIRA, 2003).

Os clássicos agentes infecciosos, vírus, bactérias, fungos, espiroquetas, protozoários e helmintos ainda estão presentes e são motivos de preocupação na

exploração moderada dos animais, principalmente quando se está aumentando, cada vez mais, a densidade animal por área. (MOREIRA, 2003).

A densidade populacional deve ser vista em todo o território nacional e não só na propriedade. Os países com uma população animal altamente concentrada possuem condições favoráveis para a propagação desses agentes, desencadeando epidemias de grande porte e longa duração. Outro aspecto a considerar é a transformação em escala mundial de um grande número de rebanhos pequenos em um número pequeno de propriedades com grandes rebanhos, o que favorece a manutenção de determinadas doenças transmissíveis, principalmente as respiratórias, digestivas e por contato direto (Moreira, 2003). A incidência global de doenças causadas por alimentos é de difícil estimativa. No entanto no ano de 2000, cerca de 2,1 milhões de pessoas morreram por doenças diarréicas e em alta proporção destes casos a causa é atribuída a alimentos e água contaminados (WHO, 2002).

2 REVISÃO DE LITERATURA

As bactérias do gênero *Campylobacter* são amplamente distribuídas na natureza, sendo isoladas de diversas espécies animais, tanto domésticas quanto silvestres, ocasionando um grande número de patologias que variam de abortamento e infertilidade à enterite, gastrite e mastite (SCARCELLI et al., 2001).

O gênero *Campylobacter* constitui-se de bastonetes curvos em forma de vírgula, "S", asa de gaivota ou espiral, cujas dimensões variam entre 0,2 a 0,9 μm de largura por 0,5 a 5 μm de comprimento. São bactérias gram-negativas, microaerófilas, não hemolíticas, não esporuladas e as colônias freqüentemente não são pigmentadas. Células em culturas com mais de 48 horas tendem a assumir formas esféricas ou cocóides. Móveis por meio de flagelo único em uma ou ambas extremidades, possuem movimento característico em "serrote" ou "saca-rolha", que pode ser observado claramente em microscópio de contraste de fase ou de campo escuro. Apresentam metabolismo do tipo respiratório e não utilizam carboidratos como fonte de carbono (VANDAMME; DE LEY, 1991; HOLT et al., 1994).

A campilobacteriose é uma zoonose de distribuição mundial, tendo como via de transmissão para o ser humano o contato direto com animais portadores e o consumo de água e alimentos de origem animal contaminados, como carnes mal processadas e a ingestão de leite não pasteurizado (ALTEKRUSE, 1998; SKIROW, 1991).

O primeiro relato sobre o isolamento de bactérias curvas ou espiraladas de animais foi feito por Mac Fadyen e Stockman¹ (1909 apud PINHEIRO, 2003, p. 1) na Inglaterra, a partir de fetos ovinos abortados. Anos mais tarde Smith² (1918 apud PINHEIRO, 2003, p. 1), nos Estados Unidos, descreveu a participação de bactérias microaerófilas de morfologia semelhante ao gênero *Vibrio* em abortamentos bovinos e ovinos. Um ano depois, foram denominados "*Vibrio fetus*", por Smith e Taylor³

¹ MAC FADYEN, J.; STOCKMAN, S., 1909 apud KIST, M. Who discovered *Campylobacter jejuni/coli*? A historical review. *Zent. Bakteriol. Microbiol. Hyg.*, v. 261, p. 177-186, 1986. Abt., 1 Orig. A.

² SMITH, T. Spirilla associated with disease of the fetal membranes in cattle (infectin abortion) *J. Exp. Med.*, v. 28, p. 701-719, 1918.

³ SMITH, T.; TAYLOR, M. S. Some morphological and biological characters of the spirilla (*vibrio fetus* n.sp) Associated with disease of the fetal membranes in cattle. *J. Exp. Med.*, v. 30, p. 299-311, 1919.

(1919 apud PINHEIRO, 2003, p.1), após isolá-las a partir de fetos bovinos abortados.

Doyle (1944) obteve o isolamento de bactérias curvas microaerófilas a partir de casos de diarreia suína, cujas características fenotípicas não se assemelhavam totalmente ao *Vibrio fetus* nem ao *Vibrio jejuni*, denominando-o *Vibrio coli* e sugerindo-o como agente etiológico da disenteria suína (PINHEIRO, 2003).

Levy (1946) descreveu um surto de diarreia em humanos, verificando em amostras de fezes e de sangue a presença de formas curvas e espiraladas de vibriões, sugerindo que a ingestão de leite cru teria sido a provável fonte de contaminação, estabelecendo, assim, a primeira infecção humana relacionada a este grupo de bactérias (PINHEIRO, 2003).

Até 1963, a espécie *C. jejuni* era denominada como *Vibrio jejuni*, quando Sebald e Vèron (1963) propuseram a criação do gênero *Campylobacter* (do grego campylo=cruvo e bacter=bacilo). Com base em estudos filogenéticos, Vèron e Chateleine (1966) propuseram a inclusão do gênero *Campylobacter* na família *Spirillaceae*. Em 1973, Vèron e Chateleine consideraram as bactérias *Vibrio jejuni* e *Vibrio coli* como duas espécies diferentes denominando-as *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*, respectivamente.

Na atualidade, o gênero *Campylobacter* engloba 17 diferentes espécies: *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, *Campylobacter concisus*, *Campylobacter curvus*, *Campylobacter helveticus*, *Campylobacter hyointestinalis*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter mucosalis*, *Campylobacter sputorum*, *Campylobacter upsaliensis*, *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter hominis*, *Campylobacter insulaenigrae*, *Campylobacter lanienae*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, sendo que o *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni*, *Campylobacter coli* e *Campylobacter lari* representam o grupo de bactérias termofílicas, devido à temperatura ótima de incubação oscilar entre 42°C e 43°C, e constituem-se nas espécies mais frequentemente isoladas de enterites humanas e animais (WOO et al., 2002).

As espécies *C. jejuni* e *C. coli* são estreitamente correlatas, sendo seus mecanismos de patogenicidade muito semelhantes. A única diferença entre as duas espécies, que pode ser observada bioquimicamente, revela-se através da prova da hidrólise do hipurato. Devido à presença do gene da hipuricase (*hip*), codificante

para a enzima hipuricase, *C. jejuni* é a única espécie capaz de hidrolizar o hipurato de sódio (LINTOM et al., 1997).

Até o início da década de 70, os poucos isolados de *Campylobacter jejuni* eram provenientes de materiais clínicos como sangue, líquido sinovial e líquor, em que não havia a interferência de outros microrganismos. Através dos estudos de Dekeyser et al. (1972) estas bactérias puderam ser isoladas a partir de fezes de pacientes com diarreia, através do emprego de filtração da suspensão de fezes em membranas de poro de 0,65µm, e posterior semeadura em meio seletivo. Esta técnica permitiu que o *Campylobacter* spp. crescesse sem o desenvolvimento exacerbado dos outros microrganismos fecais (PINHEIRO, 2003).

Desde então diversos autores passaram a modificar os meios de cultura seletivos que viabilizaram o isolamento de *Campylobacter* spp. de indivíduos com diarreia aguda, permitindo a verificação de sua participação tanto nas enfermidades humanas (BOLTON; ROBERTSON, 1982; BUTZLER; SKIROW, 1979; SKIROW, 1977), como nas animais (GENOVEZ et al., 1989; SCARCELLI et al., 1998) (PINHEIRO, 2003).

Pesquisas realizadas em várias espécies animais também demonstraram que diferentes espécies de *Campylobacter* podem colonizar diferentes segmentos intestinais (GRIFFITHS et al., 1990; SALA et al., 1986; SMIBERT, 1984; TAYLOR et al., 1981; THE NATIONAL ADVISORY COMMITTEE ON MICROBIOLOGICAL CRITERIA FOR FOODS, 1994; VITOVEC et al., 1989; WALKER et al., 1986; WALZI et al., 1957).

Os intestinos delgado e grosso são os órgãos colonizados pelo *C. jejuni*, observando-se inflamação da lâmina própria com a presença de neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares, ocorrendo destruição das células epiteliais das criptas nos casos mais severos (BLASER, 1990; PEREZ-PEREZ; BLASER, 1991).

Os mecanismos pelos quais *C. jejuni* pode desencadear diarreia aquosa ou disenteria muco-hemorrágica são baseados em quatro principais propriedades de virulência: motilidade, aderência, invasão e produção de toxina (WASSENAAR, 1997).

A grande maioria das enterites observadas em países desenvolvidos está associada à febre e à presença de leucócitos e sangue nas fezes, características que sugerem a capacidade invasora do microrganismo. *C. jejuni* é capaz de invadir e provocar a lise "in vitro" de células de embrião de galinha, assim como células de

linhagem HeLA, e de causar bacteremia em animais experimentalmente infectados como ratos, coelhos, bovinos e galinhas (PINHEIRO, 2003). As diarreias aquosas e profusas, acompanhadas de desidratação, são associadas à elaboração de uma enterotoxina termolábil semelhante à toxina da cólera e da toxina termolábil (LT) de *Escherichia coli* (PINHEIRO, 2003). Por sua vez, as disenterias são relacionadas à produção de citotoxina similar à toxina de Shiga (BLASER, 1990; BUTZLER; KLIPSTEIN et al., 1985; PEREZ-PEREZ; BLASER, 1991; RUIZ-PALACIOS et al., 1983; SKIRROW, 1979; WASSENAAR, 1997).

C. jejuni e *C. coli* não apresentam fímbrias, utilizando como adesinas o flagelo e os lipopolissacarídeos (MCSWEEGAN; WALKER, 1986; WASSENAAR, 1997).

Nos últimos anos, tem sido demonstrada associação entre a infecção por *C. jejuni* e duas doenças neurológicas emergentes: polineuropatia desmielizante inflamatória aguda, a Síndrome de Guillain-Barré (GBS), e a Síndrome Paralítica Chinesa, mais recentemente denominada de neuropatia axonal motora (DUIM et al., 2000; PINHEIRO, 2003).

Relatos no Brasil de isolamentos de *C. jejuni* e *C. coli* de casos de diarreia em animais como bovinos, suínos, frangos de corte, cães, gatos e primatas são constantemente apresentados (CARVALHO et al., 1993; JARAMILLO, 1983; LAGE, 1992; MAMIZUKA et al., 1993; PINHEIRO et al., 1993; SCARCELLI et al., 1991; SCARCELLI et al., 1998). Ao mesmo tempo, o aumento das taxas de isolamento desse microrganismo, de animais aparentemente saudáveis, enfatiza a necessidade de um melhor conhecimento das campilobacterioses nas suas várias formas (LANDER, 1985; PINHEIRO, 2003).

O substancial aumento na frequência de isolamento de *Campylobacter* spp. de casos de diarreia humana e as altas taxas de portadores animais destes microrganismos, tornam necessárias a identificação e a caracterização de novos marcadores que dêem suporte às investigações epidemiológicas (LIOR, 1994; PINHEIRO, 2003).

O uso de técnicas moleculares vem ganhando cada vez mais destaque na pesquisa de microrganismos enteropatógenos devido às suas vantagens, como a possibilidade de pesquisar um grande número de amostras em um curto intervalo de tempo e a sensibilidade dos testes. No Brasil há poucos estudos empregando essas técnicas na pesquisa de *Campylobacter* spp (CORTEZ, 2006).

Dentre os métodos empregados na subtipagem de *Campylobacter* spp., destacam-se as técnicas: eletroforese em campo pulsátil (“pulsed-field gel electrophoresis” – PFGE) (NIELSEN et al., 2000), polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição do DNA (“restriction fragment length polymorphism” – RFLP) (FRASER et al., 1992), DNA polimórfico amplificado ao acaso (“random amplified polymorphic DNA” – RAPD) (LAM et al., 1995) e polimorfismo de tamanho de fragmentos amplificados (“amplified fragment length polymorphism” – AFLP) (DUIM et al., 2000; PINHEIRO, 2003).

AFLP é uma combinação de RFLP e RAPD, incorporando-se ainda alguns passos experimentais. A técnica envolve a digestão de DNA com enzima de restrição, conforme requer uma análise de RFLP. Neste caso, porém, o DNA é digerido com dois tipos de endonucleases (corte raro e corte freqüente), gerando fragmentos de diferentes tamanhos. Os passos seguintes assemelham-se aos princípios da técnica RAPD: adicionam-se adaptadores, que complementam as seqüências do sítio de restrição e *primers* complementares aos adaptadores (CHAVES, 2002).

O ensaio de AFLP combina especificidade, resolução e poder de amostragem da digestão de enzimas de restrição com a velocidade de detecção do polimorfismo via PCR. AFLP é a tecnologia mais recente para obtenção de um grande número de marcadores moleculares distribuídos em genomas de eucariotos e procariotos (GRAÇA, 2002).

A importância da espécie suína na transmissão de *Campylobacter* spp. assemelha-se aos demais grupos de animais que se destinam à produção de carne, incluindo bovinos e ovinos. Estes agentes podem ser isolados em proporções elevadas de carcaças destas espécies logo após o abate, no qual a evisceração se constitui no ponto crítico de contaminação; embora o resfriamento e a secagem da carcaça por ventilação forçada reduzam significativamente a carga bacteriana (ALTEKRUSE et al., 1999; PINHEIRO, 2003).

Campylobacter é um agente que representa um papel muito importante no aparecimento de diarreia e/ou enterites em animais, condicionando grandes perdas econômicas aos suinocultores. (ALMEIDA et al., 1987; BLASER, 1982; CASON et al., 1997; DAPPLER, 1953; DOYLE, 1944; FRANCO, 1995; GRIFFITHS et al., 1990; KETTLEY, 1997; MAFU et al., 1989; SKIRROW, 1994; THE NATIONAL ADVISORY COMMITTEE ON MICROBIOLOGICAL CRITERIA FOR FOODS, 1994).

Nos estudos realizados por Kettley (1997) sobre a patogênese da infecção entérica por *Campylobacter*, há a indicação de que a colonização de espécies de *Campylobacter* na mucosa entérica de diferentes animais, incluindo o suíno, resulta na interferência da absorção intestinal, que em consequência, afeta o desenvolvimento dos animais.

Segundo Caramori-Júnior et al. (2002), *Campylobacter coli* é a espécie com maior frequência em suínos.

As enfermidades diarréicas em seres humanos constituem um problema de saúde pública mundial. Especialmente em países em desenvolvimento, espécies de *Campylobacter* spp. têm sido responsabilizadas como um dos agentes etiológicos que mais tiveram destaque em doenças veiculadas por alimentos (FITZGERALD et al., 2001; ZORMAN; MOZINA, 2002).

No Brasil, a escassez de estudos empregando técnicas moleculares, aplicadas à epidemiologia das campilobacterioses intestinais humanas e animais, torna necessária a implantação dessas metodologias para dar maior suporte à investigação de surtos de gastroenterites, em crianças e adultos, veiculados por alimentos de origem animal contaminado pelo gênero *Campylobacter* (SCARCELLI et al., 2005).

3 OBJETIVOS

- Isolar *Campylobacter* spp. a partir de fezes e carcaças de suínos abatidos no Estado de São Paulo.
- Identificar as espécies de *Campylobacter* spp. presentes nos animais abatidos.
- Caracterizar os isolados obtidos através do Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram selecionados quatro abatedouros do Estado de São Paulo para coleta de amostras no período de março a agosto de 2005.

4.1 Amostras

Foram utilizadas 120 amostras de fezes e 120 suabes de carcaças de suínos, colhidas de quatro diferentes abatedouros do Estado de São Paulo.

As amostras de fezes foram colhidas diretamente do intestino dos animais e os suabes foram realizado na região dorsal do suíno atingindo todo o comprimento da carcaça.

4.2 Isolamento Bacteriológico

As amostras de fezes e de carcaças foram submetidas ao seguinte processamento bacteriológico, segundo Scarcelli et al. (1998):

4.2.1 Fezes

a) Um grama das fezes foi pesado e utilizado no preparo de suspensão em 10 mL de solução salina esterilizada (0,9%). A suspensão de fezes foi deixada em repouso para decantar por cerca de 5 minutos.

b) Um volume de 100 μ L (2 gotas) do sobrenadante foi semeado em Agar Brucella (DIFCO) acrescido de 10% de sangue desfibrinado de carneiro (meio ABS) e suplementado com mistura antibiótica (GENOVEZ et al., 1986) composta por

Polimixina B (1.000 UI/L), Cicloheximide (20 mg/L), Novobiocina (5 mg/L) e Bacitracina (15.000 UI/L).

c) Um volume de 2 ml da suspensão foi filtrado em membrana de poliestireno (MILLIPORE) com poro de 0,65 μm , utilizando suporte plástico ("swinex" - MILLIPORE) e seringas estéreis sendo 100 μL do filtrado semeado em meio ABS e em caldo Tioglicolato (DIFCO).

d) As placas foram incubadas por 48-72 horas a 37°C em estufa com atmosfera de 5% CO_2 . Os tubos foram incubados por 48-72 horas a 37°C em aerobiose.

4.2.2 Suabe de Carcaças

Os suabes (tipo esponja 10 cm X 5 cm) umedecidos com meio Lethin (Difco) foram friccionados na região dorsal das carcaças. Após a chegada no laboratório os mesmos foram embebidos em 10 mL de caldo BHI (Infusão Cérebro Coração) (DIFCO) e glicerol (Merck) a 20%.

As bolsas plásticas contendo os suabe foram submetidas à homogeneização por 60 seg. em triturador mecânico (STOMACHER 80 – LAB SYSTEM). Uma alíquota de 100 μL (2 gotas) da suspensão resultante foi semeada em Agar Brucella (DIFCO) acrescido de 10% de sangue desfibrinado de carneiro (meio ABS) e suplementado com mistura antibiótica (GENOVEZ et al., 1986) composta por Polimixina B (1.000 UI/L), Cicloheximide (20 mg/L), Novobiocina (5 mg/L) e Bacitracina (15.000 UI/L). As placas foram incubadas por 48-72 horas a 37°C em estufa de com atmosfera de 5% CO_2 .

Após o período de incubação, as colônias suspeitas foram identificadas através de métodos presuntivos como coloração de Gram, observação de mobilidade em microscópio de campo escuro e teste de oxidase. Uma vez caracterizada a presença de colônias bacterianas do gênero *Campylobacter*, foram

determinadas as espécies e as subespécies por provas bioquímicas: catalase, formação de H₂S em meio de Tríplice Açúcar Ferro (TSI), hidrólise do hipurato, crescimento à temperatura de 25 e 42 °C, sensibilidade ao ácido nalidíxico (30 µg) e à cefalotina (30 µg) (HOLT et al., 1994). Os isolados positivos para hidrólise do hipurato foram caracterizados como *C. jejuni*, sendo os negativos para esta prova classificados como *C. coli*.

4.3 Extração do DNA bacteriano

A extração do DNA bacteriano foi realizada a partir de um raspado da placa contendo colônias de gênero *Campylobacter* resultantes de culturas de 2 a 3 dias ABS. O protocolo para extração de DNA detalhado a seguir foi realizado segundo descrito por Boom et al. (1990).

O suabe contendo o raspado da placa foi adicionado a um microtubo contendo 1ml do tampão de lise (Tiocianato de Guanidina 120g; Triton 100X 1ml; Tris-HCl 0,1M [pH 6,4] 111,2ml; EDTA 0,5M 8,8ml) e 40µl da suspensão carreadora (Terra Diatomácea 1gr; HCl 50µl; água ultrapura 5ml).

O microtubo contendo a amostra foi agitado por um minuto e deixado sobre a bancada por dez minutos. Passado este período o microtubo foi centrifugado por dois minutos a 14.000rpm. O sobrenadante obtido foi descartado e ao pélete formado foi adicionado 1ml do tampão de lavagem (Tiocianato de Guanidina 120g, Tris-HCl 0,1M [pH 6,4] 100ml). O microtubo foi então agitado por 30 segundos e centrifugado por dois minutos, o sobrenadante obtido foi descartado e o pélete novamente submetido a este procedimento. O pélete obtido após esta etapa foi submetido a duas lavagens com 500µl de etanol 70% (dois minutos a 14.000rpm) e uma lavagem com 500µl de acetona (dois minutos a 14.000rpm). Os microtubos contendo o pélete tratado com acetona foram mantidos em estufa a 37°C por 20 minutos. Após a completa secagem do pélete foram adicionados 100µl de tampão de eluição (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA [pH 8,0]) ao microtubo e este, agitado por um minuto e mantido a 56°C por dez minutos. Passado este tempo o microtubo foi centrifugado por cinco minutos a 14.000rpm e o sobrenadante contendo o DNA,

armazenado em tubos limpos e numerados. As amostras de DNA foram mantidas a -20°C até sua utilização na PCR.

4.4 Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP)

O AFLP foi realizado segundo protocolo descrito por Mclauchlin et al. (2000) utilizando-se a endonuclease de restrição *Hind* III como única enzima.

Para clivagem do DNA bacteriano, 4 μg de DNA foram adicionados a um microtubo contendo 24U de *Hind* III (Invitrogen, São Paulo), tampão da enzima (1X) e água até o volume final de 20 μl . O tubo foi incubado a 37°C por 12 a 18 horas.

Uma alíquota de 5 μl do DNA clivado foi adicionada a um microtubo contendo 0,2 μg dos adaptadores ADH1 e ADH2, 1U de T4 DNA ligase, tampão ligase e água até o volume final de 20 μl . Esta reação foi incubada à temperatura ambiente por 3 horas. O DNA ligado foi aquecido a 80°C por 10 minutos.

Para realização da PCR foram testados *primers* seletivos com variações no nucleotídeo terminal, sendo utilizada a seqüência HI-G no decorrer do trabalho. A seqüência de bases dos *primers* utilizados para ligação e amplificação e sua posição relativa ao sítio de restrição da enzima *Hind*III esta apresentado na figura 1.

A PCR foi realizada utilizando-se 2 μl do DNA ligado diluído, 2,5 mM de MgCl_2 , 300 ng do *primer* (HI-X), 1,0 U de Taq DNA polimerase, 1 X tampão de PCR e água até o volume final de 50 μl . A reação foi submetida à denaturação a 94°C por 4 minutos seguido por 35 ciclos de 1 minuto a 94°C , 1 minuto a 60°C e 2,5 minutos a 72°C .



(1) Sítios de restrição da endonuclease *Hind*III, (2) Seqüência dos dois oligonucleotídeos complementares que formam os adaptadores que se ligam às extremidades dos fragmentos de restrição, (3) Seqüência do *primer* utilizado na amplificação dos fragmentos. O X indica o local em que é inserida a base seletiva (A, T, G ou C).

Figura 1 - Sítio de restrição da enzima *Hind*III, adaptadores e seqüência de *primers* para tipagem de *Campylobacter spp.* através da AFLP

4.5 Determinação do Índice Discriminatório (DI)

Os resultados obtidos através da caracterização genotípica foram analisados segundo o método numérico descrito por Hunter e Gaston (1988), com a seguinte fórmula:

$$DI = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s n_j(n_j-1)$$

Onde N é o número de amostra da população teste, s é o número de diferentes tipos e n_j é o número de amostras representando cada tipo. O valor DI

indica a probabilidade de dois isolados selecionados ao acaso em uma população teste serem alocadas em diferentes grupos.

4.6 Análise Estatística dos Fragmentos Amplificados

Para análise estatística dos fragmentos amplificados pelo AFLP foi utilizado o programa NTSYS ("Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System"). A similaridade das amostras foi estimada através do coeficiente de Jaccard, representado pela seguinte fórmula:

Jaccard: $S_j = (a/n-d)$

Onde a, b, c e d são possíveis de serem visualizados quanto ao seu significado na forma de uma tabela de freqüência para os dois objetos α e β :

		α	
		+	-
β	+	a	b
	-	c	d

Sendo que, $n=u+m$ é o número total de bandas, $m=a+d$ é o número de bandas compartilhadas e $u=b+c$ é o número de bandas não compartilhadas.

Com a matriz de similaridade gerada pelo coeficiente de Jaccard foi possível determinar os grupos pelo método de "Unweighthed Pair-Group Method Using Arithmetic Average" (UPGMA), que foi representado pela forma de dendrograma.

5 RESULTADOS

Das 120 amostras de fezes analisadas, 30 foram positivas para o isolamento de *Campylobacter coli* (25%) e duas foram positivas para isolamento de *Campylobacter jejuni* (1,6%). Todas as amostras analisadas de esfregaço de carcaça foram negativas para *Campylobacter* spp.

Os resultados obtidos através do isolamento bacteriano são apresentados na tabela 1 e gráfico 1.

Tabela 1 - Ocorrência de *Campylobacter* spp. em fezes e esfregaço de carcaça de suínos em quatro abatedouros do Estado de São Paulo, no período de 2004-2005, através de isolamento bacteriológico

ORIGEM	ISOLAMENTO			
	FEZES		ESFREGAÇO DE CARÇAÇA	
	<i>C. coli</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. jejuni</i>
Abatedouro 1	04/30	0/30	0/30	0/30
Abatedouro 2	19/30	0/30	0/30	0/30
Abatedouro 3	05/30	0/30	0/30	0/30
Abatedouro 4	02/30	02/30	0/30	0/30
Total	30/120	02/120	0/120	0/120

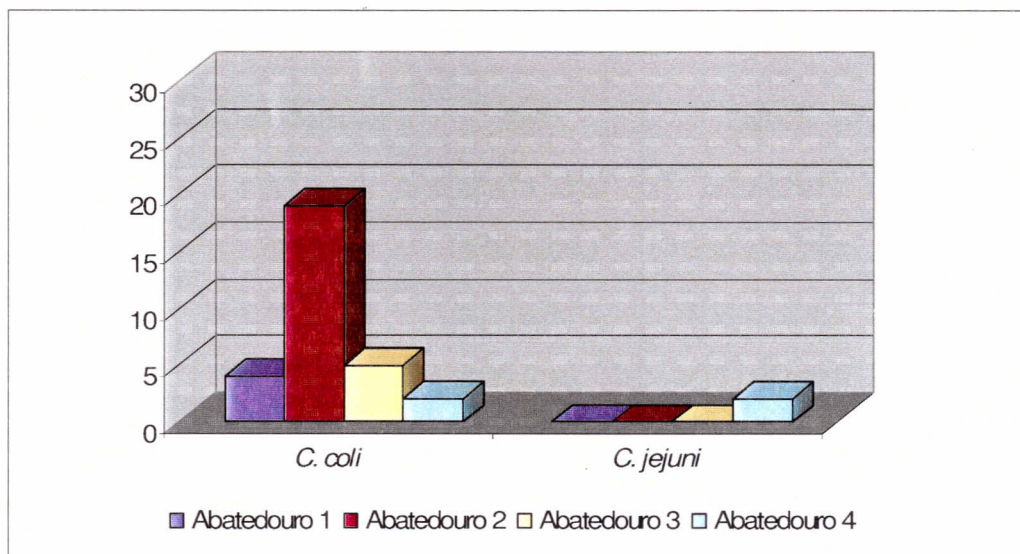


Gráfico 1 - Frequência de *Campylobacter coli* e *Campylobacter jejuni* em fezes de suínos em quatro abatedouros do Estado de São Paulo, no período de 2004-2005, através de isolamento bacteriológico

Os isolados com características bioquímicas sugestivas de *Campylobacter spp.* foram submetidos ao teste de susceptibilidade ao ácido nalidixico e cefalotina. Algumas amostras apresentaram resistência ao ácido nalidixico apesar de todas as características bioquímicas indicarem se tratar de *Campylobacter coli*. A tabela 2 e o gráfico 2 apresentam a frequência de isolados resistentes ao ácido nalidixico nos quatro abatedouros examinados.

Foram selecionadas para a caracterização genotípica através do AFLP 38 estirpes de *Campylobacter* isolados dos trinta animais positivos, sendo 36 de *C. coli* e 2 de *C. jejuni*.

Tabela 2 - Frequência de isolados de *C. coli* resistentes ao ácido nalidixico – São Paulo – 2005

ABATEDOUROS	RR	SNRC
A1	4/30 (13,33%)	0/30 (0%)
A2	15/30 (50%)	10/30 (33,33%)
A3	4/30 (13,33%)	1/30 (3,33%)
A4	0/30 (0%)	4/30 (13,33%)
TOTAL	23/120 (19,16%)	15/120 (12,50%)

Legenda: RR= resistente ao ácido nalidixico e à cefalotina /
SNRC= sensível ao ácido nalidixico e resistente à cefalotina

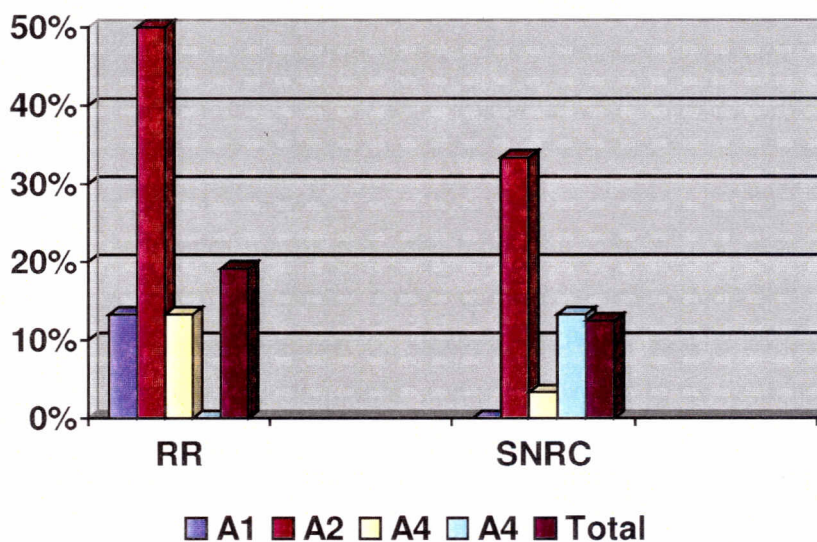


Gráfico 2 - Frequência de isolados de *C. coli* resistentes ao ácido nalidixico

A análise das 38 amostras testadas através do AFLP revelou a presença de 28 perfis que foram designados P1 a P28 (Figuras 2 e 3). Cada perfil foi caracterizado por 5 a 11 fragmentos de DNA com tamanho entre 300-1500 pb. Os perfis observados foram diferentes entre si pela presença ou ausência de pelo menos uma banda. O índice discriminatório obtido através AFLP foi de 0,96.

A partir da análise dos perfis obtidos no AFLP foi criado o dendrograma apresentado na figura 4, onde pode-se observar a formação de dois grupamentos principais denominados Ia e Ib. O grupamento menor (Ia) foi constituído de 3 isolados com similaridade inferior a 25% em relação ao resto das amostras. Dois destes isolados foram caracterizados como *C. jejuni* através das provas bioquímicas.

O subgrupo Ib reuniu a maior parte das amostras e pode ser dividido em dois grupamentos principais denominados IIa e IIb com cerca de 30% de similaridade entre os isolados. O Grupamento IIb foi subdividido em IIIa e IIIb. No subgrupo IIIa observa-se a presença de isolados de três abatedouros diferentes.

O subgrupo IIIb foi dividido em dois agrupamentos principais, IVa e IVb. O subgrupo IV a é formado apenas por amostras isoladas no abatedouro 2, apresentando amostras isoladas de animais diferentes com características idênticas e amostras isoladas do mesmo animal com características diferentes.

No subgrupo IVb, encontram-se agrupadas 23 das 38 amostras analisadas sendo a maior parte delas (16/22) resistente ao ácido nalidixico. Os grupamentos Va e Vb formados apresentam amostras de três abatedouros diferentes, destacando-se no grupamento Vb um grupo de 5 amostras clonais resistentes ao ácido nalidixico e isoladas de dois abatedouros distintos.

Observa-se, avaliando os grupos de amostras clonais a ocorrência de amostras com o mesmo perfil genotípico e com características fenotípicas diferentes (resistência/ sensibilidade ácido nalidixico). Isolados de mesmo animal distribuídos em agrupamentos distintos no dendrograma, como por exemplo, as amostras 11aA2 (subgrupo Vb) e 11bA2 (subgrupo IVa).

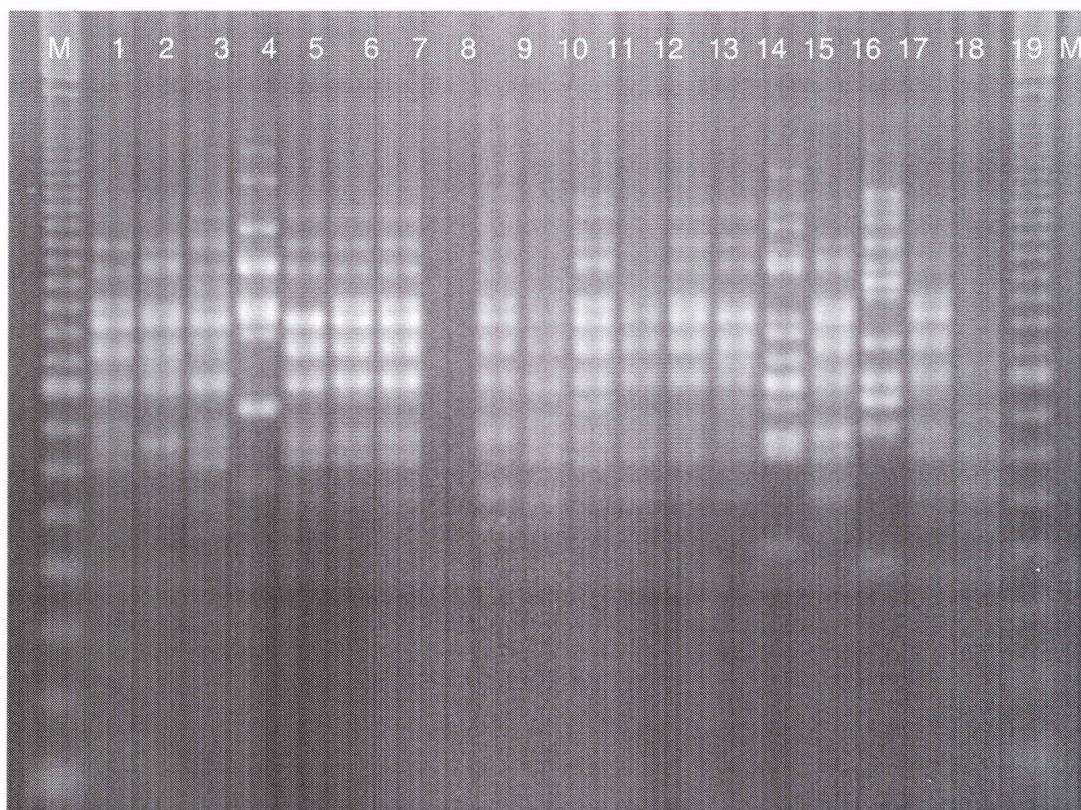


Figura 2 - **Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP).**
Colunas 1 a 7, 9 a 19 – Amostras de *C. coli* e *C. jejuni* isoladas de fezes.
M - 100bp DNA Ladder

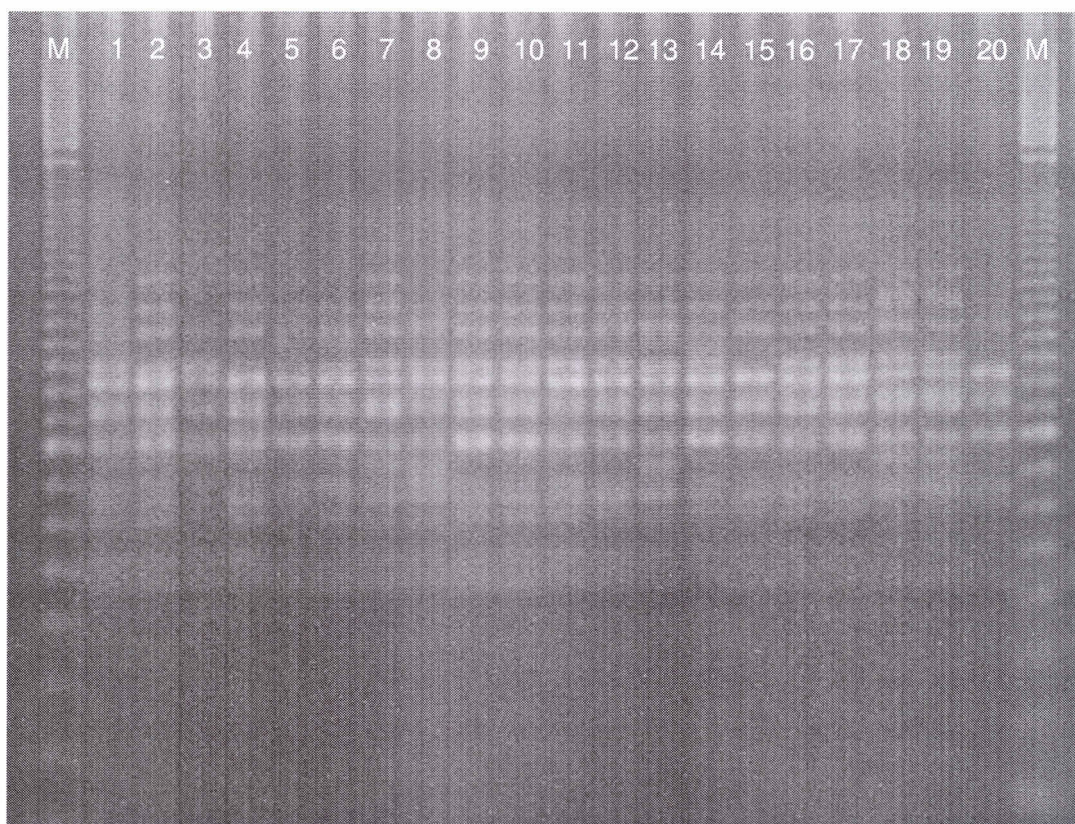
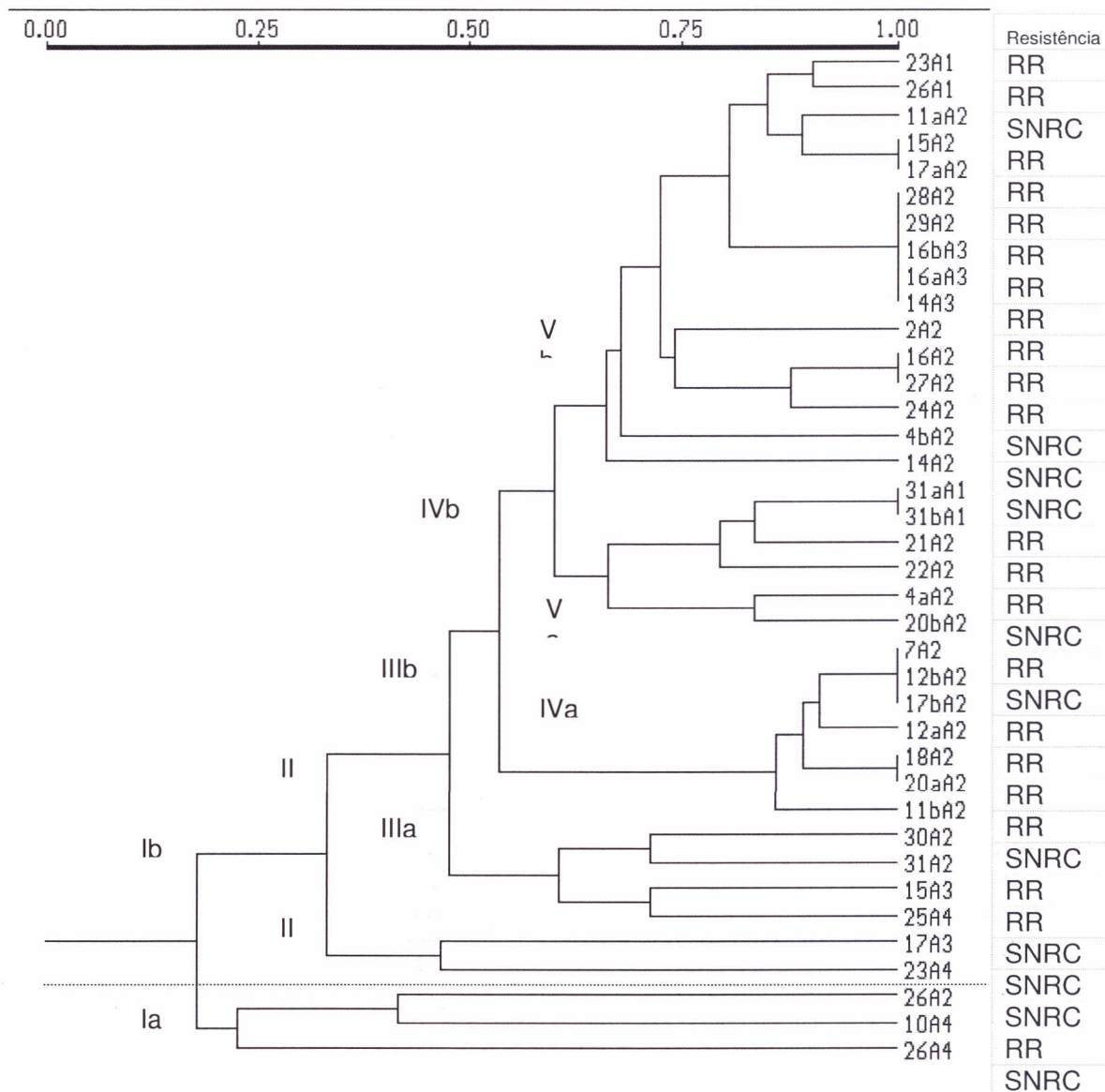


Figura 3 - **Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP).**
Colunas 1 a 20 – Amostras de *C. coli* isoladas de fezes. M - 100bp DNA Ladder



Legenda: RR= resistente ao ácido nalidixico e à cefalotina / SNRC= sensível ao ácido nalidixico e resistente à cefalotina

Figura 4 - Dendrograma baseado em UPGMA a partir da análise de agrupamento do coeficiente de Jaccard pela técnica de AFLP com amostras de *C. coli* e *C. jejuni* isolados de fezes de suínos

6 DISCUSSÃO

A Campilobacteriose é uma zoonose de distribuição mundial, sendo *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* considerados microrganismos ubiqüitários, encontrando-se dispersos no ambiente, como também se comportando como agentes patogênicos ou comensais do trato gastrointestinal de animais domésticos e selvagens. (SCARCELLI et al., 1998)

No presente estudo 120 amostras de fezes de suíno foram analisadas e o *C. coli* foi isolado de 30 amostras (25%) e *C. jejuni* de 2 amostras (1,6%), ressaltando-se a elevada freqüência de *C. coli* nesta espécie como verificado na tabela 1.

Em estudo realizado por Boes et al. (2005) analisando 480 amostras de fezes de suínos de 24 propriedades, *C. coli* foi isolado em 92% das amostras, e *C. jejuni* em 0,8%. Estes autores avaliaram a prevalência das duas espécies de *Campylobacter* em propriedades com produção exclusivamente de suínos e propriedades produziam também bovinos e frangos e verificaram que o *C. jejuni* ocorreu em suínos apenas nas propriedades em que havia também criação de bovinos ou aves. As amostras de fezes de bovinos apresentaram uma freqüência de isolamento de *C. jejuni* de 42,7% e *C. coli* de 6,8%, enquanto as amostras de aves apresentaram 31,6% de positividade para *C. jejuni* e 3,8% para *C. coli*. Apesar dos dados descritos os autores sugerem que não há uma relação direta entre criações mistas e a ocorrência de *C. jejuni* na espécie suína.

No presente estudo observou-se que nenhuma das 120 amostras de esfregaço de carcaça foi positiva para *Campylobacter* spp. Estes dados diferem dos obtidos por Malakauskas et al. (2006), os quais descrevem uma freqüência de isolamento do agente em 62% das carcaças examinadas. Estes autores descrevem, na Dinamarca, uma alta freqüência deste agente em fezes de suínos e em casos de infecções de origem alimentar em humanos.

Apesar do resultado obtido no Brasil, deve-se ter em mente que a freqüência de isolamento de *Campylobacter* em amostras de fezes suína foi elevada, sendo que o risco de contaminação da carcaça no processo de abate existe e não deve ser desconsiderado. Neste caso, é provável que o número de bactérias viáveis na superfície da carcaça tenha sido significativamente reduzido pela escalda seguida

da exposição a baixas temperaturas e dissecação durante o processamento da mesma além da influência do método de cultivo (BOES et al., 2005; SCARCELLI et al., 1998).

Ao exame bioquímico verificou-se que das 36 amostras isoladas, 23 amostras de *C. coli* foram resistentes ao ácido nalidixico. Em estudo conduzido por Thakur et al. (2005), de 542 isolados de *C. coli* avaliados, 58 foram resistentes ao ácido nalidixico. Nachamkin (1993) descreve que o isolamento de estirpes de *C. coli* e *C. jejuni* resistentes ao ácido nalidixico é crescente, sugerindo que esta ocorrência pode dificultar o processo de identificação destes microrganismos. A resistência ao ácido nalidixico, eritromicina e tetraciclina tem se mostrado presente em vários estudos e pode estar indicando a utilização excessiva de antimicrobianos nesta espécie animal.

Várias técnicas têm sido descritas para caracterização molecular das diferentes espécies de *Campylobacter* como ribotipagem, eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) e polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (AFLP). Estes métodos têm apresentado bons resultados com especificidade e poder discriminatório variáveis, mas em alguns casos são demorados, exigem equipamentos especiais e alto grau de padronização para obtenção de resultados confiáveis (DE ZOYZA; EFSTRATIOU, 2000).

Para diferenciação de amostras de *Campylobacter* spp. no presente estudo optou-se por uma técnica de baixo custo, que não exige equipamentos sofisticados e com alto poder discriminatório, como é caso do AFLP. Assim como outras técnicas de tipagem, as variações nos resultados do AFLP são baseadas em mutações nos sítios de restrição ou variação dos fragmentos de restrição (VANEECHOUTTE, 1996). A limitação básica do AFLP e de outros procedimentos de tipagem genômica consiste na necessidade de isolamento do microrganismo a ser testado, já que o DNA de outras fontes interfere nos resultados (SAVELKOUL et al., 1999).

Através do AFLP foi possível separar as amostras de *C. jejuni* dos isolados de *C. coli* em um subgrupo com baixa similaridade em relação aos outros isolados. Uma amostra caracterizada bioquimicamente como *C. coli* foi reunida neste subgrupo. A discriminação de isolados das duas espécies em dois clusters distintos é descrita por outros autores através da PFGE e do AFLP (DUIM et al., 2001; GE et al., 2006; MALAKAUSKAS et al., 2006).

Siemer et al. (2005) descreve em estudo realizado com 177 isolados de *Campylobacter* de diferentes origens, que 12% dos isolados caracterizados previamente com *C. coli*, foram caracterizados através de provas moleculares como *C. jejuni*. No presente estudo um isolado de *C. coli* foi agrupado junto aos dois de *C. jejuni*.

As espécies *C.coli* e *C. jejuni* são estreitamente correlatas, sendo seus mecanismos de patogenicidade muito semelhantes. A única diferença entre as duas espécies, que pode ser observada bioquimicamente, revela-se através da prova da hidrólise do hipurato. *C. jejuni* é capaz de hidrolisar o hipurato de sódio, enquanto que *C.coli*, assim como todas as outras estirpes do gênero *Campylobacter* que não possuem o gene da hipuricase (hip), que codifica para a enzima hipuricase, não são capazes de hidrolisar o mesmo substrato (SCARCELLI et al., 2005).

Em função desta diferença bioquímica entre as espécies *C. coli* e *C.jejuni*, Linton et al. (1997) descreveram um conjunto de oligonucleotídeos iniciadores específicos para *C. jejuni*, baseadas na identificação da seqüência do gene hip, para a detecção de *C. jejuni* pela reação de polimerase em cadeia (PCR) a partir de amostras fecais e, também, para a identificação entre *C.coli* e *C. jejuni* de estirpes isoladas, quando a prova bioquímica tradicional da hidrólise do hipurato apresentasse resultados inconclusivos (SCARCELLI et al., 2005).

Não foi possível observar o agrupamento das amostras de acordo com abatedouro de origem, observa-se a ocorrência de isolados clonais em diferentes abatedouros, assim como é possível identificar amostras diferentes isoladas do mesmo animal. Malakauskas et al. (2006) descrevem a ocorrência de diferentes perfis em isolados de fezes de um mesmo suíno, e ressalta a importância de que sempre que possível sejam avaliadas mais de uma colônia de *Campylobacter* por animal.

A técnica apresentou um índice discriminatório alto, 0,96. Apesar de não terem sido observadas na literatura consultada, referencias citando este índice para as diferentes técnicas descritas, pode-se dizer que este resultado é bastante satisfatório, uma vez que significa que ao serem escolhidas ao acaso, duas cepas de *Campylobacter* têm 96% de probabilidade de serem alocadas em perfis diferentes.

Avaliando-se o dendrograma é possível observar uma tendência de amostras resistentes para o ácido nalidixico estarem agrupadas com maior grau de similaridade. Esta correlação também é descrita por Keller et al. (2006) ao avaliarem

geneticamente amostras resistentes para macrolídeos e fluoroquinolonas através da PFGE. O surgimento de cepas resistentes a estas drogas geralmente ocorre por mutações pontuais que podem ser disseminadas através de clones predominantes ou estar ocorrendo de forma independente de acordo com a pressão de seleção nos rebanhos.

Siemer et al. (2005) em estudo comparativo entre isolados de *Campylobacter* de origem humana, suína, aviária e bovina realizado na Dinamarca em 2005, indica uma baixa correlação entre as amostras de origem suína e infecções em humanos neste país, sendo as amostras de origem aviárias geneticamente mais próximas das causadoras de infecções de origem alimentar.

Apesar destes dados, o presente estudo indica a necessidade de avaliações freqüentes sobre a importância do suíno como reservatório de *C. coli* e *C. jejuni* no Brasil, uma vez que a maior parte dos casos de infecções de origem alimentar não é estudada e o agente não é identificado pelo sistema de saúde, o que torna difícil a correlação entre os isolados de origem humana e animal.

7 CONCLUSÕES

- Os suínos abatidos no Estado são reservatórios de *C. coli* e *C. jejuni*.
- A ocorrência de isolados de *C. coli* resistentes ao ácido nalidixico é alarmante.
- O AFLP apresentou bons resultados na genotipagem de amostras de *Campylobacter spp.*

REFERÊNCIAS

- ABCS – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE SUÍNOS. **Rebanho suíno**. Disponível em: <<http://www.abcs.com.br/rebsuin.html>>. Acesso em: 16 jul. 2004.
- ALMEIDA, P. F.; SERRANO, A. M. Ocorrência de *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* em carcaças de frangos e suínos. **Review of Microbiology**, v. 18, p. 279-283, 1987.
- ALTEKRUSE, S. F.; STERN, N. J.; FIELDS, P. I.; SWERDLOW, D. L. *Campylobacter jejuni* an emerging foodborne pathogen. **Emerging Infectious Diseases Review**, v. 5, p. 28-35, 1999.
- ALTEKRUSE, S. F.; SWERDLOW, D. L.; STERN, N. J. Microbial food borne pathogens. *Campylobacter jejuni*. **Veterinary Clinical North American Food Animal Practice**, Review, v. 14, p. 31-40, 1998.
- BLASER, M. J. *Campylobacter jejuni* and food. **Food Technology**, v. 36, p. 89-92, 1982.
- BLASER, M. J. *Campylobacter* species In: MANDELL, L. G.; DOUGLAS, R. G.; BENNETT, J. E. ed. **Principles and practice of infections diseases**., New York: Churchill Livingstone, 1990. p. 1649-1658.
- BOES, J.; NIELSEN, E. M.; BAGGESEN, D. L. Prevalence and diversity of *Campylobacter* in pig herds with and without cattle or poultry. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM, 6., 2005, California. **Anais...** 2005. p. 180-182.
- BOES, J.; NIELSEN, E. M.; BAGGESEN, D. L. *Campylobacter* in finisher pigs from farm to slaughter. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM, 6., 2005, California. . **Anais...**2005. p. 180-182.
- BOLTON, F. J.; ROBERTSON, L. A selective medium for isolating *Campylobacter jejuni/coli*. **Journal Clinical Pathology**, v. 35, p. 462-467, 1982.
- BUTZLER, J. P.; SKIROW, M. B. *Campylobacter* enteritis. **Clinical Gastroenterology**, v. 8, p. 737-765, 1979.
- CARAMORI-JÚNIOR, J. G.; MODOLO, J. R.; PADOVANI, C. R.; LOPES, C. A. M. Presença de espécies de *Campylobacter* na mucosa dos segmentos intestinais de suínos com enterite/diarréia. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, p. 13-17, 2002.
- CARVALHO, A. C. F. B.; MOS, E. N.; SHOCKEN-ITURRINO, R. P. I. Enterotoxin production in strains of *Campylobacter jejuni* isolated from swine diarrhea. **Review of Microbiology**, v. 24, p. 78-83, 1993.

CASON, J. A.; BAILEY, J. S.; STERN, N. J.; WHITTEMORE, A. D.; COX, N. A. Relationship between aerobic bacteria, *Salmonellae*, and *Campylobacter* on broiler carcasses. **Poultry Science**, v. 76, p. 1037-1041, 1997.

CHAVES, R. A. **Marcadores Moleculares**. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dbq/trab2002/GMOL/GMOL008.htm>>. Acesso em: 31out. 2006.

CORTEZ, A. L. L. **Disseminação de bactérias dos gêneros *Campylobacter* e *Salmonella* em linhas de abate de aves**. 2006. 22 p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

DAPPLER, C. H. S.; DBROT, S. Contribution attitude la dysenterie a *vibrions* du porc. **Schweizer Archiv Tierheilkunde**, v. 95, p. 279-281, 1953.

DEKEYSER, P.; GOSSUIN-DETRAIN, M.; BUTZLER, J. P.; STERNON, J. Acute enteritis due to related vibrio. First positive stool cultures. **Journal Infection Disease**, v. 125, p. 390-392, 1972.

DE ZOYZA, A.; EFTRATIOU, A. Use of amplified fragment length polymorphisms for typing *Corynebacterium diphtheriae*. **Journal Clinical Microbiology**, v. 38, p. 3843-3845, 2000.

DOYLER, L. P. A. *Vibrio* associated with swine dysentery. **American Journal Veterinary Research**, v. 5, p. 3-5, 1944.

DUIM, B.; VANDAME P. A. R.; RIGTER, A.; LAEVENS, S.; DIJKSTRA, J. R.; WAGENAAR, J. A. Differentiation of *Campylobacter* species by AFLP fingerprinting. **Microbiology**, v. 147, p. 2729-2737, 2001.

DUIM, B.; WIN ANG, C.; VAN BELLKUM, A.; RIGTER, A.; VAN LEEUWEN, N. W. J.; ENDTZ, H. P.; WAGENAAR, J. A. Amplified fragment length polymorphism analysis of *Campylobacter jejuni* strains isolated from chickens and patients with gastroenteritis or Guillain-Barré or Miller Fisher syndrome. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 3917-3923, 2000.

FITZGERALD, C.; HELSEL, L. O.; NICHOLSON, M. A.; OLSEN, S. J.; SWERDLOW, D. L.; FLAHART, R.; SEXTON, J.; FIELDS, P. I. Evaluation of methods for subtyping *Campylobacter jejuni* during an outbreak involving a food handler. **Journal Clinical Microbiology**, v. 39, n. 7, p. 2386-2390, 2001.

FRANCO, R. M. Revisão: diferentes métodos de isolamento de *Campylobacter jejuni* em alimentos. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 2, p. 91-96, 1995.

FRASER, A. D. E.; BROOKS, B. W.; GARCIA, M. M.; LIOR, H. Molecular discrimination of *Campylobacter coli* serogroup 20 biotype I (Lior) strains. **Veterinary Microbiology**, v. 30, p. 267-280, 1992.

GENOVEZ, M.E.; SCARCELLI, E.; ROJAS, S. Campilobacteriose genital: proposta de diagnóstico mais sensível em touros. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 56, p. 5-7, 1989.

GRAÇA, R. N. **Marcadores moleculares**. Disponível em:
<<http://www.ufv.br/dbq/trab2002/GMOL/GMOL006.htm>>. Acesso em: 31 out. 2006.

GRIFFITHS, P. L.; PARK, R. W. A. A review: *Campylobacter* associated with human diarrhoeae disease. **Journal Applied Bacteriology**, v. 69, p. 281-301, 1990.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams e Wilkins, 1994. 789 p.

HUNTER, P. R.; GASTON, M. A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **Journal Clinical Microbiology**, v. 26, p. 2465-2466, 1988.

JARAMILLO, H. F. **Espécies termofílicas de *Campylobacter*; aspectos bacteriológicos, epidemiológicos e patogênicos**. 1983. 144 p. Tese (Doutorado) - Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1983.

KELLER, J.; PERRETTEN, V. Genetic diversity in fluoroquinolone and macrolide – resistant *Campylobacter coli* from pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 113, p. 103, 2006.

KETTLEY, J. M. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. **Microbiology**, v. 143, p. 5-21, 1997.

KLIPSTEIN, F. A.; ENGERT, R. F.; SHORT, H.; SCHENK, E. A. Pathogenic properties of *Campylobacter jejuni*; assay and correlation with clinical manifestations. **Infection Immunity**, v. 50, p. 43-49, 1985.

LAGE, A. P. Thermotolerant *Campylobacter* in calves with and without diarrhoea. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 44, p. 557-558, 1992.

LAM, K. M.; YAMAMOTO, R.; DAMASSA, A. J. DNA diversity among isolates of *Campylobacter jejuni* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. **Veterinary Microbiology**, v. 45, p. 269-274, 1995.

LANDER, K. P. **Campylobacter**: Proceedings of a conference held in Brussels New Haw: Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1985. 145 p.

LEVY, A.J. A Gastro-enteritis outbreak probably due to a bovine strain of vibrio. **Yale Journal Biology Med.**, v. 18, p. 24-258, 1946.

LINTON, D.; LAWSON, A. J.; OWEN, R. J.; STANLEY, J. PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. **Journal Clinical Microbiology**, v. 35, p. 2568-2572, 1997.

LIOR, H. *Campylobacters* - epidemiological markers. **Dairy Food Environmental Sanit.**, v. 14, p. 317-324. 1994.

MAFU, A. A.; HIGGINS, R.; NADEU, M.; COUSINEAU, G. The incidence of *Salmonella*, *Campylobacter* and *Yersinia enterocolitica* in swine carcasses and the slaughterhouse environment. **Journal Food Protection**, v. 52, p. 642-645, 1989.

MALAKAUSKAS, M.; JORGENSEN, K.; NIELSEN, M. E.; OJENIYI, B.; OLSEN, E. J. Isolation of *Campylobacter* spp. From a pig slaughterhouse and analysis of cross-contamination. **International Journal of Microbiology**, v. 108, p. 295-300, 2006.

MALAUCHLIN, J.; RIPABELLI, G.; BRETT, M. M.; THRELFALL, E. J. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Clostridium perfringens* for epidemiological typing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, p. 21-28, 2000.

MAMIZUKA, E. M.; SCHWARTZ, D. S.; PAVAN, M. F. B.; HAGIWARA, M. K. Isolation of *Campylobacter jejuni* from dogs with diarrhea. **Review Microbiology**, v. 24, p. 84-87, 1993.

MCSWEEGAN, E.; WALKER, R. I. Identification and characterization of two *Campylobacter jejuni* adhesins for cellular and mucous substrates. **Infection Immunity**, v. 53, p. 141-148, 1986.

MOREIRA, E.C. **Importância do controle da sanidade animal sobre produtos de origem animal**. Disponível em: <<http://www.saudeanimal.org.br/trabcientifico/sincorte/sincorte.pdf>>. Acesso em: 14 maio 2003.

NACHAMKIN, I. *Campylobacter* infections. **Curr. Op. Microbiol. Infection Disease** v. 6, p. 72-76. 1993.

NIELSEN, E. M.; ENGBERG, J.; FUSSING, V.; PETERSEN, L.; BROGREN, C. H.; ON, S. L. Evaluation of phenotypic and genotypic methods for subtyping *Campylobacter jejuni* isolates from humans, poultry, and cattle. **Journal Clinical Microbiology**, v. 38, n. 10, p. 3800-3810, 2000.

PEREZ-PEREZ, G. I.; BLASER, M. J. *Campylobacter and Helicobacter*. In: Baron, S. **Medical Microbiology**. New York: Churchill Livingstone, 1991, p. 337-349.

PINHEIRO, E. S. **Caracterização genética de estirpes de *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* isoladas de diferentes espécies animais**. 2003. 69 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

PINHEIRO, E. S.; SIMON, F.; CASSARO, K.; SOARES, M. E. G. Outbreak of diarrhoea due to *Campylobacter jejuni* in lion-tamarins (*Leontopithecus* spp.) in captivity. **Verh. ber Erkr. Zootiere**, v. 35, p. 159-161, 1993.

RUIZ-PALACIOS, G. M.; TORRES, J.; TORRES, N. I.; ESCAMILLA, E.; TAMAYO, J.; RUIZ-PALACIOS, B. Cholera-like enterotoxin produced by *Campylobacter jejuni*. **Lancet**, v. 2, p. 250-253, 1983.

SALA, V.; PICCINNI, R.; SOCCI, A.; REDAELLI, G. Localization and characteristics of swine thermophilic *Campylobacter* in carriers of experimentally conditioned animals. **Clin. Vet. Milan**, v. 109, p. 236-242, 1986.

SAVELKOUL, P. H. M.; AARTS, H. J. M.; DEHAAS, J.; DIJKSHOORN, L.; DUIM, B.; OTSEN, M.; RADEMAKER, J. L. W.; SCHOOLS, L.; LENSTRA, J. A. Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. **Journal Clinical Microbiology**, v. 37, n. 10, p. 3083-3091, 1999.

SCARCELLI, E.; COSTA, E. O.; GENOVEZ, M. E.; CARDOSO, M. V.; BACH, E. E.; TORRES, A. P. Comparison of electrophoretic protein profiles of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* isolated from different animal species. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 32, p. 286-292, 2001.

SCARCELLI, E.; GENOVEZ, M. E.; CARDOSO, M. V.; SOUZA, M. C. A. M.; GRASSO, L. M. P. S.; SOUZA, C. A. I.; TORRES, A. P. Avaliação do potencial de disseminação de *Campylobacter* spp por diferentes espécies animais. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 65, p. 55-61, 1998.

SCARCELLI, E.; GENOVEZ, M. E.; ROJAS, S.; BERSANO, J. G.; SCHOTTEN, M. H. S. S. Avaliação da presença de *Campylobacter* spp em suínos: sua relação com a ocorrência de distúrbios entéricos. **Veterinary Microbiology**, v. 22, p. 112-115, 1991.

SCARCELLI, E.; PIATTI, R. M.; HAKAKAVA, R.; MIYASHIRO, S.; FERNANDES, F. M. C.; CAMPOS, F. R.; FRANCISCO, W.; GENOVEZ, M. E.; RICHTZENHAIN, L. J. Molecular subtyping of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* strains isolated from different animal species in the state of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 378-382, 2005.

SEBALD, M.; VÉRON, M. Teneuren bases de LÁDN et classification de vibrions. **Annales de Institut Pasteur**, v. 105, p. 897-910, 1963.

SIEMER, L. B.; NILSEN, M. E.; ON, W. L. S. Identification and Molecular Epidemiology of *Campylobacter coli* Isolates from Human Gastroenteritis, Food, and Animal Sources by Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis and Penner Sorotyping. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 4, p. 1953-1958, 2005.

SKIRROW, M. B. *Campylobacter enteritis*: A "new" disease. **Brazilian Med. Journal**, v. 2, p. 9-11, 1977.

SKIRROW, M. B. Epidemiology of *Campylobacter enteritis*. **International Journal Food Microbiology**, v. 12, p. 9-16, 1991.

SKIRROW, M. B. Review: diseases due to *Campylobacter*, *Helicobacter* and related bacteria. **Journal Comparative Pathology**, v. 3, p. 113-149, 1994.

SMIBERT, R. M. Family *Spirillaceas*, genus *Campylobacter*. In: BUCHANAM, R. E. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 8. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1974. p. 111-117.

TAYLOR, D. J.; OLUBUNMI, P. A. A re-examination on the role of *Campylobacter fetus* subspecies *coli* in enteric disease of the pigs. **Veterinary Record**, v. 109, p. 112-115, 1981.

THAKUR, S.; GEBREYES, W. A. Prevalence, antimicrobial resistance and genotypic diversity of *Campylobacter coli* isolated from antimicrobial free swine production systems. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM, 6., 2005, California. **Anais...** 2005, p. 186-189.

THE NATIONAL ADVISORY COMMITTEE ON MICROBIOLOGICAL CRITERIA FOR FOODS. *Campylobacter jejuni/coli*. **Journal Food Protection**, v. 57, p. 1101-1121, 1994.

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

VANEECHOUTTE, M. DNA fingerprinting techniques for microorganisms. A proposal for classification e nomenclature. **Molecular Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 115-142, 1996.

VÉRON, M.; CHATELAINE, R. Taxonomie numérique des vibrions et de certaines bactéries comparables. **Annales de Institut Pasteur** (Paris), v. 111, p. 671-709, 1966.

VÉRON, M.; CHATELAINE, R. Taxonomic study of the genus *Campylobacter* SEBALD and VÉRON and designation of the neotype strain for the type species, *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and Véron. **International Journal Syst. Bacteriology**, v. 23, p. 122-134, 1973.

VITOVEC, C. J.; KOUDELA, B.; STERBA, J.; TOMANCOVA, I.; MATYAS, Z.; VLADIK, P. The gnotobiotic piglet as a model for the pathogenesis of *Campylobacter jejuni* infection. **Zentralblatt Bakteriologie**, v. 271, p. 91-103, 1989.

WALKER, R. I.; CADWELL, M. B.; LEE, E. C.; GUERRY, P.; TRUST, T. J.; RUIZ-PALACIOS, G. M. Pathophysiology of *Campylobacter* enteritis. **Microbiology Rev.**, v. 50, p. 81-94, 1986.

WLAZI, R.; WILLINGER, H. Zur pathologisch anatomischen und bakteriologischen Diagnostik der Scheridynseterie. **Wiener Tierärztliche Monatsschrift**, v. 44, p. 596-601, 1957.

WASSENAAR, T. M. Toxin production by *Campylobacter* spp. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, p. 466-476, 1997.

WOO P. C.; LEUNG, K. W.; TSOI, H. W.; WONG, S. S.; TENG, J. L.; YUEN, K. Y. Thermo-tolerant *Campylobacter fetus* bacteraemia identified by 16S ribosomal RNA gene sequencing: an emerging pathogen in immunocompromised patients. **Journal of Medical Microbiology**, v. 51, p. 740-746, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. **Food safety and foodborne illness**. 2002. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/print.html>>. Acesso em: 30 jan. 2006.

ZORMAN, T.; MOZINA, S. S. Classic and molecular identification of thermotolerant campylobacters from poultry meat. **Food Technology and Biotechnology**, Zabreb, v. 40, n. 3, p. 177-184, 2002.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)