



**Detecção dos genes da Toxina Citoletal Distensiva (CDT) em
estirpes de *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* isoladas de
frangos de corte e hortaliças**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

INSTITUTO BIOLÓGICO

PÓS-GRADUAÇÃO

**Deteccão dos genes da Toxina Citoletal Distensiva (CDT)
em estirpes de *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni*
isoladas de frangos de corte e hortaliças**

ALINE FEOLA DE CARVALHO

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Sanidade Animal, Segurança Alimentar e o Ambiente.

Orientador (a): Eliana Scarcelli Pinheiro

São Paulo

2009

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Núcleo de Informação e Documentação - Biblioteca
Instituto Biológico
Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo

Carvalho, Aline Feola de

Detecção dos genes da toxina citoletal distensiva (CDT) em estirpes de *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* isoladas de frangos de corte e hortaliças / Aline Feola de Carvalho. – São Paulo, 2009.

Dissertação (Mestrado) Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Sanidade Animal, Segurança Alimentar e o Ambiente.

Linha de pesquisa: Qualidade de produtos e processos na produção animal.

Orientadora: Eliana Scarcelli Pinheiro

Versão do título para o inglês: Detection of cytolethal distending toxin (CDT) genes in strains of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* isolated from vegetables and broiler carcasses.

1. *Campylobacter jejuni* 2. *Campylobacter coli* 3. Toxina citoletal distensiva 4. Frangos 5. Hortaliças 6. Multiplex-PCR I. Pinheiro, Eliana Scarcelli II. Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação III. Título

IB/Bibl /2009/010



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO
Pós-Graduação
Av. Cons. Rodrigues Alves 1252
CEP 04014-002 - São Paulo – SP
pg@biologico.sp.gov.br



FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do candidato: Aline Feola de Carvalho

Título: Detecção dos genes da Toxina Citoletal Distensiva (CDT) em estirpes de *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* isoladas de frangos de corte e hortaliças.

Orientador(a): Eliana Scarcelli Pinheiro

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Sanidade Animal, Segurança Alimentar e o Ambiente

Aprovada em:

Banca Examinadora

Assinatura:

Prof. (a) Dr.(a):

Instituição:

Assinatura:

Prof. (a) Dr.(a):

Instituição:

Assinatura:

Prof. (a) Dr.(a):

Instituição:

*Aos meus pais, pela força,
apoio e compreensão sempre.*

AGRADECIMENTOS

À prezada orientadora Prof. Dra. Eliana Scarcelli Pinheiro, do Instituto Biológico de São Paulo, pela precisa orientação e ensinamentos, além de uma grande amizade que quero ter para sempre.

À Dra. Margareth Élide Genovez, Dra. Rosa Maria Piatti e à bióloga Daniela Martins da Silva, do Laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal do Instituto Biológico de São Paulo, pelo companheirismo e colaboração no desenvolvimento do projeto.

À Dra. Maristela Vasconcellos Cardoso, Dra Lilia M. P. S. Paulin, Ms. Vanessa Castro, Maria Antera Ferreira e Maria Franco Martins, companheiras de trabalho e amigas do Laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal do Instituto Biológico de São Paulo.

À Ms. Simone Miyashiro, Ms. Alessandra Figueiredo de Castro Nassar e Ms. Fabíola Ribeiro Campos, companheiras de trabalho do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal do Instituto Biológico de São Paulo, pelos ensinamentos e grande amizade.

Aos colegas de pós-graduação, pela amizade e pelos momentos divertidos que passamos juntos, dentro e fora da sala de aula.

Ao Prof. Dr. Sérgio S. Azevedo, da Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba, pela colaboração nas análises estatísticas.

À Srta. Fernanda G. Carpanelli, secretária da pós-graduação do Instituto Biológico de São Paulo, pela atenção e eficiência.

À Fundação de Apoio à Pesquisa Agrícola (FUNDAG), pela bolsa de mestrado concedida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento do projeto (processo 07/52441/-0) e pela bolsa de treinamento técnico nível III (processo 08/09838-9).

CARVALHO, A. F. DETECÇÃO DOS GENES DA TOXINA CITOLETAL DISTENSIVA (CDT) EM ESTIRPES DE *CAMPYLOBACTER JEJUNI* SUBSP. *JEJUNI* ISOLADAS DE FRANGOS DE CORTE E HORTALIÇAS. São Paulo. 2009. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

RESUMO

A campilobacteriose é uma zoonose de distribuição mundial, sendo o *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* considerados microrganismos ubiqüitários, encontrando-se dispersos no ambiente ou assumindo papel de agentes patogênicos ou comensais do trato gastrointestinal de animais. A infecção por estas espécies é a causa mais comum de diarreia em crianças de países em desenvolvimento e de entes em regiões industrializadas. Um dos principais fatores de virulência relacionados à patogênese do *C. jejuni* em infecções humanas e animais, é a toxina citoletal distensiva (CDT), que interfere na divisão e diferenciação das células das criptas intestinais, levando à diarreia. Sua atividade é codificada pelo complexo de genes *cdt*, que consiste de três genes adjacentes denominados *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*. Os objetivos do presente estudo foram isolar e identificar estirpes de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter* spp., a partir de 80 amostras de frangos de corte e 80 de hortaliças (40 espinafres e 40 alfaces), adquiridos em hipermercados e feiras livres do Município de São Paulo; detectar pela técnica da Multiplex-PCR, a presença do complexo de genes *cdt* nas amostras isoladas de *Campylobacter jejuni*; verificar a inter-relação entre estirpes de *Campylobacter* spp. isoladas das amostras de origem animal e vegetal, e avaliar se o local de compra afeta a presença ou ausência do microrganismo. Foram isoladas e identificadas por métodos fenotípicos e genotípicos, 16 estirpes de *Campylobacter* spp., provenientes de 10/80 (12,5%) amostras de frangos de corte resfriados e de 3/80 (3,75%) hortaliças (alfaces). Destas, 13 estirpes foram identificadas como *C. jejuni*, 11 originárias de frangos, e duas de alface; e três estirpes foram identificadas como *C. coli*, duas de frangos e uma de alface. Quanto aos maços de espinafres, nenhum foi positivo para *Campylobacter* spp. nos pontos de comercialização pesquisados. A presença do complexo de genes *cdt* foi detectada em cinco (38,46%) estirpes, sendo quatro

provenientes de frangos e uma de alface. Não foi observada diferença estatisticamente significativa com relação ao número de amostras positivas para *Campylobacter* spp. isoladas de frangos e hortaliças, e entre hipermercados e feiras livres. No presente estudo, obteve-se o isolamento inédito de três amostras de origem vegetal (alface) positivas para *Campylobacter* spp. originárias de feiras livres; e a primeira detecção de cinco estirpes portadoras do complexo de genes *cdt* no estado de São Paulo. Os resultados obtidos são dignos de atenção, pois mostram que estirpes de *Campylobacter jejuni* virulentas e de *Campylobacter coli* continuam viáveis nas amostras de frango resfriado e de hortaliças (alface), não só na linha de abate e no momento da colheita, mas até o ponto final da cadeia de distribuição, ou seja, nos dois principais centros de venda a varejo, que dão acesso direto à mesa do consumidor.

Palavras-chave: *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, toxina citoletal distensiva, frangos, hortaliças, Multiplex-PCR.

CARVALHO, A. F. DETECTION OF CYTOLETHAL DISTENDING TOXIN (CDT) GENES IN STRAINS OF *CAMPYLOBACTER JEJUNI* SUBSP. *JEJUNI* ISOLATED FROM VEGETABLES AND BROILER CARCASSES. São Paulo. 2009. Dissertation (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

ABSTRACT

Campylobacteriosis is a worldwide distributed zoonosis. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* are considered to be ubiquitous microorganisms, and are either spread in the environment or have a role as pathogenic or commensal agents in the gastrointestinal tract of animals. These species are the most common causes of diarrhea in children in developing countries, and of enteritis in industrialized countries. One of the main virulence factors related to *C. jejuni* pathogenesis in humans and animals is cytolethal distending toxin (CDT), which causes diarrhea by interfering with the division and differentiation of cells in intestinal crypts. Its activity is encoded by the *cdt* gene cluster, made up of three adjacent genes called *cdtA*, *cdtB* and *cdtC*. The objectives of the present study were to isolate and identify *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter* spp. strains in 80 broiler carcasses and 80 vegetable samples (40 samples of spinach and 40 samples of lettuce), purchased in supermarkets and street markets in the city of São Paulo; to detect, using Multiplex-PCR, the presence of the *cdt* gene cluster in *Campylobacter jejuni* isolates; to assess the inter-relationship between *Campylobacter* spp. strains isolated from animal and vegetable samples; and to assess if the place of purchase affects the presence or absence of the microorganism. Sixteen *Campylobacter* spp. strains were isolated from 10/80 (12.5%) refrigerated broiler carcasses and from 3/80 (3.75%) samples of vegetables (lettuce), and identified by phenotypic and genotypic methods. Thirteen of these strains isolated were identified as *C. jejuni*; 11 from broiler carcasses and two from lettuce samples. Three strains were identified as *C. coli*, two from broiler carcasses and one from lettuce samples. As for spinach, none of the samples was positive for *Campylobacter* spp. The presence of the *cdt* gene cluster was detected in five (38.46%) strains, four from broiler carcasses and one from lettuce samples. No statistically significant differences were observed in relation to the

number of samples positive for *Campylobacter* spp. isolated from broiler carcasses and vegetables, or in samples purchased in supermarkets and street markets. *Campylobacter* spp. was isolated for the first time from three samples of vegetables (lettuce) purchased in street markets. It was also the first time that the *cdt* gene cluster was detected in five strains in the state of São Paulo. Results obtained are important, because they show that virulent *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains remain viable in refrigerated broiler carcasses and vegetable samples (lettuce), not only in the slaughterhouse or at the moment of harvest, but in the final link of the distribution chain, with direct access to the table of the consumer.

Keywords: *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, cytolethal distending toxin, broiler carcasses, vegetables, Multiplex-PCR.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Sequência nucleotídica dos *primers cdt*, descrito por Martinez *et al.* (2006).....15
- Tabela 2 - Frequência de isolamentos de *Campylobacter* spp. em relação ao ponto de venda e à origem das amostras. São Paulo - SP, 2008.....18
- Tabela 3 - Método de isolamento empregado e identificação bioquímica (fenotípica) das estirpes de *Campylobacter* spp. isoladas. São Paulo - SP, 2008.....19
- Tabela 4 - Identificação genotípica das estirpes de *Campylobacter* spp., através da pesquisa do gene *hip*, aspartoquinase e do complexo de genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* nas estirpes isoladas. São Paulo - SP, 2008.....25
- .

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Frequência de isolamento de coliformes fecais e totais em 80 amostras de frangos de corte e 80 de hortaliças.....20
- Figura 2 - Frequência de isolamento de bactérias ambientais em 80 amostras de frangos de corte e 80 de hortaliças.....21
- Figura 3 - Resultados obtidos pela amplificação por PCR para detecção do gene da enzima hipuricase (*hip*) do *Campylobacter jejuni* das 16 estirpes de *Campylobacter* spp. M: Marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder – Invitrogen); Linhas F21 a A16: estirpes de *Campylobacter* spp.; + Controle positivo (*C. jejuni* ATCC 33291); - Controle negativo.....22
- Figura 4 - Resultados obtidos pela amplificação por PCR para detecção do gene da enzima aspartoquinase do *Campylobacter coli* das 16 estirpes de *Campylobacter* spp. M: Marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder – Invitrogen); Linhas F21 a A16: estirpes de *Campylobacter* spp.; + Controle positivo (*C. coli* CDC A3315); - Controle negativo.....23
- Figura 5 - Resultados obtidos pela amplificação por Multiplex-PCR para detecção dos genes da toxina CDT (*cdtA*, *cdtB* e *cdtC*) do *Campylobacter jejuni* das 16 estirpes de *Campylobacter* spp. M: Marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder – Invitrogen); Linhas F21 a A16: estirpes de *Campylobacter* spp.; + Controle positivo (*C. jejuni* ATCC 33291); - Controle negativo.....24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - Percentagem

µg - Micrograma (10^{-6} grama)

µL - Microlitro (10^{-6} litro)

µm - Micrômetro (10^{-6} metro)

ABS - Brucella Ágar acrescido de 10% de sangue desfibrinado de carneiro

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

DNTP - Deoxinucleosídeo - trifosfato

EDTA - Ácido etilenodiaminotetra acético sal dissódico

g - Grama

mg - Miligrama (10^{-3} grama)

mL - Mililitro (10^{-3} litro)

mM - Milimolar (10^{-3} molar)

°C - Graus centígrados

pb - Pares de bases

PCR - Polymerase Chain Reaction

pH - Potencial hidrogeniônico

pmol - Picomol (10^{-12} mol)

rpm – Rotação por minuto

TSI - Tríplice açúcar ferro

U - Unidade

x g - Múltiplos da gravidade terrestre (9,8m/s²)

Visto terem seu uso consagrado na literatura técnica, algumas abreviaturas seguem as iniciais de sua grafia no idioma inglês.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1. Amostras de origem animal.....	11
3.2. Amostras de origem vegetal.....	11
3.3. Procedimentos bacteriológicos para isolamento e identificação de <i>Campylobacter</i> spp. a partir de amostras de origem animal e vegetal	12
3.3.1. Processamento das amostras de origem animal.....	12
3.3.2. Processamento das amostras de origem vegetal.....	13
3.4. Extração do DNA das estirpes de <i>Campylobacter</i> spp.....	13
3.5. Detecção do gene <i>hip</i> das estirpes isoladas de <i>Campylobacter</i> spp. pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)	13
3.6. Detecção do gene da aspartoquinase das estirpes isoladas de <i>Campylobacter</i> spp. pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).....	14
3.7. Detecção simultânea dos genes <i>cdtA</i> , <i>cdtB</i> e <i>cdtC</i> das estirpes isoladas de <i>Campylobacter</i> spp. pela técnica da Multiplex-PCR.....	15
3.8. Contaminação por coliformes.....	16
3.9. Análise estatística	16
4. RESULTADOS	17
5. DISCUSSÃO	26
6. CONCLUSÕES	34
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

1. INTRODUÇÃO

A campilobacteriose é uma zoonose de distribuição mundial, onde seu principal representante, a espécie *Campylobacter jejuni*, é considerado um microrganismo extremamente ubiqüitário, encontrando-se tanto disperso no ambiente, como também assumindo o papel de agente patogênico ou comensal do trato gastrointestinal de animais domésticos e selvagens (ALTEKRUSE, 1998; SCARCELLI et al., 2005b). Atribui-se como via de transmissão para o ser humano a ingestão de carnes de aves cruas ou mal cozidas, leite não pasteurizado, consumo de água e alimentos de origem animal e vegetal contaminados e o contato direto com animais portadores (KUMAR et al., 2001; SCARCELLI et al., 2005a).

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 com colônias frequentemente não pigmentadas. Células em culturas com mais de 48 horas tendem a assumir formas esféricas ou cocóides. São móveis por meio de flagelo em uma ou ambas as extremidades com 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).

Na atualidade, o gênero *Campylobacter* engloba dezessete espécies, cinco subespécies e três biotipos, sendo que o *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni*, chamado genericamente de *Campylobacter jejuni*, mais o *Campylobacter coli* e *Campylobacter lari*, são representantes do grupo de bactérias denominadas termofílicas, devido à temperatura ótima de incubação oscilar entre 42° e 43°C, e constituem-se nas espécies mais frequentemente isoladas de enterites humanas e animais (WOO et al., 2002, FOSTER et al., 2004).

As enterites por *Campylobacter* estão bem caracterizadas como doenças zoonóticas de origem alimentar, onde vários estudos têm demonstrado a significância dos reservatórios animais na epidemiologia do *Campylobacter jejuni*, e os alimentos de origem animal considerados a principal fonte de infecção (ALTEKRUSE et al., 1999). A contaminação de carcaças de frangos em abatedouros é considerada o principal fator de risco para infecções humanas (ROZYNEK, et al., 2005).

A produção de carne de frango tem se expandido cerca de 5,6% ao ano desde meados dos anos 80. Grande parte desse dinamismo pode ser explicada pelos avanços tecnológicos no setor, nas áreas de genética, nutrição e sanidade, tendo sido impulsionado

pelo crescimento da demanda associada à mudança no padrão de consumo, ou seja, ao processo de substituição de carne vermelha pela branca. O principal produtor mundial são os EUA, que detêm uma organização da cadeia estruturada a partir da relação entre o produtor e indústria de abate pela negociação e produção em grande escala, seguido do Brasil, que se encontra em segundo lugar. Os principais países importadores de carne de frango brasileira têm sido os do Oriente Médio e do Extremo Oriente, seguido do Japão e União Européia (CARVALHO; FIÚZA; LOPES, 2008).

Em função das exigências cada vez maiores do mercado internacional da carne de frango, o monitoramento e o controle da contaminação das carcaças por *Campylobacter jejuni* são preocupação mundial (SCARCELLI et al., 2005a).

Não obstante, as demais fontes de transmissão de *Campylobacter jejuni* também devem ser enfatizadas, como as ambientais, incluindo vegetais, insetos e água não clorada contaminada por fezes de animais, onde poucos estudos têm considerado a possibilidade de disseminação do microrganismo, particularmente pelos alimentos de origem não animal (KUMAR et al., 2001; CLARCK et al., 2003).

Nas propriedades localizadas no "cinturão verde" dos grandes centros urbanos do Brasil, são cultivadas várias hortaliças, a maioria de ciclo curto, sendo a alface a que apresenta maior importância econômica, uma vez que compreende a hortaliça folhosa de maior produção e consumo, de destacada importância nutricional, encontrando-se presente regularmente no cardápio da população brasileira. A produção de alface no estado de São Paulo ocupa aproximadamente uma área de 7.859 hectares, produzindo 137 mil toneladas por ano, gerando mais de 6.000 empregos. Os principais municípios fornecedores são Piedade (18%), Mogi das Cruzes (14%) e Suzano (11%) (CEASA, 2006).

Campylobacter jejuni é o principal causador de enterite aguda humana em muitos países desenvolvidos e em desenvolvimento. Possui a habilidade de aderir e colonizar células, como também invadir enterócitos e sintetizar uma ou mais toxinas (ROZYNEK, et al., 2005), entre elas, a toxina citoletal distensiva (CDT), codificada por três genes adjacentes, *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*, sendo que a expressão das três subunidades são requeridas para uma plena atividade da toxina (JEON; ITOH; RYU, 2005). Atuais evidências indicam que o gene *cdtB* codifica a atividade e toxicidade dos componentes da toxina, enquanto que os genes *cdtA* e *cdtC* estão envolvidos na aderência e interiorização na célula hospedeira (ABUOUN et al., 2005).

A toxina citoletal distensiva foi primeiramente descrita em 1988 por Johnson e Lior (JOHNSON; LIOR, 1988; WASSENAAR, 1997), e é um dos principais fatores de virulência do *Campylobacter jejuni*, induzindo secreção inflamatória nas células epiteliais do intestino, contribuindo para o desenvolvimento da diarreia (JEON; ITOH; RYU, 2005; ASAKURA et al., 2007).

Para tanto, os objetivos do presente estudo foram:

- Isolar e identificar estirpes de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter* spp., a partir de frangos de corte e hortaliças colhidas em diferentes pontos de venda.
- Detectar pela técnica da Multiplex-PCR, a presença do complexo de genes *cdt*, responsáveis pela expressão do fator de virulência da produção da toxina citoletal distensiva (CDT), nas estirpes isoladas de *Campylobacter jejuni*.
- Verificar se há variação na ocorrência dos genes *cdt* nas estirpes de *Campylobacter jejuni* isoladas das diferentes origens alimentares.
- Verificar qual fonte alimentar é mais frequente na disseminação do *Campylobacter* spp., e se há influência do ponto de venda nesta veiculação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Mesmo em países desenvolvidos como os Estados Unidos, onde o alimento é considerado um dos mais seguros do mundo, estima-se que anualmente 76 milhões de pessoas sejam acometidas por algum tipo de doença de origem alimentar, levando a 325.000 hospitalizações e 5.200 mortes. Em 14 milhões de pacientes confirmou-se a participação de agentes patogênicos através de diagnósticos laboratoriais, responsabilizando-os por 60.000 hospitalizações e 1.800 mortes. Anualmente, as perdas decorrentes das enfermidades de origem alimentar são estimadas entre U\$5 a U\$6 bilhões contabilizando-se despesas médicas e perda da produtividade (MEAD, et al., 1999).

Campylobacter jejuni destaca-se nos países desenvolvidos como o principal agente etiológico de diarreia humana, especialmente em crianças (CARVALHO et al., 2001). Nos Estados Unidos, estima-se anualmente mais de dois milhões e quinhentos mil casos de enterite humana por *Campylobacter jejuni*, índice que já superou os casos de salmonelose e, em muito, os de shigelose (FITZGERALD et al., 2001). Em 1996, 46% dos casos confirmados laboratorialmente de gastroenterite bacteriana e notificados aos órgãos oficiais de controle americanos, foram causados por espécies do gênero *Campylobacter*, principalmente *C. jejuni*, seguidos na prevalência por salmonelose (28%), shigelose (17%) e *Escherichia coli* O157:H7 (5%) (ALTEKRUSE et al., 1999).

Na Inglaterra e no País de Gales, o número de casos humanos confirmados de *Campylobacter jejuni* pelos serviços de saúde pública tem aumentado nos últimos anos passando de 34.000 em 1990 para 54.000 em 2000, ultrapassando em 3,6 vezes os casos de infecção por *Salmonella* spp. (DESAI et al., 2001). Na Dinamarca, o número de casos registrados triplicou no período de 1992 a 1999, atingindo o índice de 78/100.000 habitantes afetados pela enfermidade, onde 95% dos casos foram devidos ao *Campylobacter jejuni* (NIELSEN et al., 2000). No Japão, no período compreendido entre os anos de 1996 a 2000, *Campylobacter jejuni* foi verificado em 40,5% das ocorrências das enterites muco-hemorrágicas (NISHIMURA et al., 1996; OBANA et al., 2002), sendo que em 2007, *C. jejuni* foi responsável por 95% dos casos de intoxicação alimentar naquele país (ASAKURA et al., 2007). No sul do Iran, foi confirmada a presença de *C. jejuni* em 11/114 (9,6%) amostras fecais de pacientes com diarreia, sendo uma significativa causa de gastroenterite naquela região (HASSANZADEH; MOTAMEDIFAR, 2007).

No Brasil, diversos autores têm relatado a presença de *Campylobacter* spp. em casos de diarreia aguda ou crônica e até em indivíduos assintomáticos. Em São Paulo, nos quadros diarréicos, a incidência tem alcançado índice próximo a 25,9%, sendo o segundo enteropatógeno bacteriano isolado de crianças menores de quatro anos de idade, no

período de janeiro de 1998 a abril de 2001 (SCARCELLI et al., 2005a). Palma et al. (1997) também observaram que o agente mais frequentemente isolado entre os casos de diarreia infantil no Hospital “Umberto I”, em São Paulo, foi *Escherichia coli* enteropatogênica clássica com ocorrência de 20/40 (50%), seguido pelo *Campylobacter* spp. 3/40 (7,5%). Tosin e Machado (1995) relataram a presença de portadores de *Campylobacter* spp. em 11/177 (6,2%) dos manipuladores de alimentos da região Sul do Brasil, principalmente nos indivíduos do sexo masculino. Calzada et al. (1994) pesquisaram durante sete anos, na cidade de São Paulo, Brasil, 7652 amostras de fezes, obtendo o isolamento de 285 (3,7%) estirpes de *Campylobacter* spp., sendo 83,86% da espécie *C. jejuni*, provenientes especialmente de crianças com idade inferior a quatro anos, e 14,38% de adultos acima de 20 anos.

Nos últimos anos, também tem sido demonstrada associação entre a infecção por *Campylobacter jejuni* e duas doenças neurológicas: a Síndrome de Guillain-Barré (GBS) e a Síndrome de Muller-Fisher (MFS) uma rara variante da GBS (DUIM et al., 2000; ENDTZ et al., 2000). Dor e incapacitação podem durar por meses ou até mesmo tornarem-se crônicas. Infere-se que esta patologia seja uma resposta auto-imune estimulada pela infecção (PETERSON, 1994).

A GBS caracteriza-se principalmente por um quadro de desmielinização inflamatória aguda do sistema nervoso periférico (FORSYTHE, 2002). Em estudos sorológicos, tem sido observado que 40% dos pacientes com GBS apresentaram infecção recente por *Campylobacter jejuni*. Aproximadamente 20% dos pacientes com GBS sofrem sequelas motoras e 5% vem a óbito, apesar dos avanços nos cuidados dos distúrbios respiratórios (KUROKI et al., 1993).

Dourado et al. (2003) pesquisaram a GBS em pacientes do Rio Grande do Norte, Brasil, no período de junho de 1994 a novembro de 1999, e detectaram em 8/21 (32%) dos pacientes o anticorpo anti-*Campylobacter jejuni*. Rocha et al. (2004) avaliaram 95 casos de pacientes com GBS internados no Hospital Santa Marcelina em São Paulo, Brasil e observaram que em 12% dos casos houve relato de gastroenterite prévia antes do aparecimento dos sintomas da GBS. Desde a erradicação da poliomielite em grande parte do mundo, a GBS tornou-se a causa mais comum de paralisia flácida aguda (FORSYTHE, 2002).

Atualmente, têm sido descritas muitas formas de transmissão de *Campylobacter* spp. para humanos, principalmente de origem alimentar. Os fatores de risco mais significantes incluem o consumo e/ou a manipulação de frango e outras carnes cruas ou mal cozidas, e a ingestão de leite cru ou água não tratada. A contaminação cruzada de alimentos prontos para o consumo durante a preparação, bem como o contato direto com animais, também são riscos identificados (HUSSAIN et al., 2007).

Em Connecticut, Estados Unidos, durante um acampamento de verão, houve um surto de gastroenterite, no qual identificaram *Campylobacter jejuni* em 16/41 (39%) pessoas. A causa do surto foi devido ao cozinheiro, que enquanto doente, preparava a salada para os campistas com as mãos contaminadas pela bactéria (BLASER et al., 1982).

Nos Estados Unidos, o isolamento de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* de carcaças de frango é aproximadamente seis vezes maior que de suínos e bovinos, variando entre 30 a 100% de positividade (STERN et al., 1985). Em Lexington, Kentucky-USA, Eyigor et al. (1999) pesquisaram *Campylobacter* spp. em 91 carcaças de frango e encontraram 105 estirpes, sendo 70 (67%) estirpes de *C. jejuni* e 35 (33%) de *C. coli*. Whyte et al. (2003) isolaram 49,9% de *Campylobacter* spp. em 444 frangos de três diferentes cidades da Irlanda. Rozynek et al. (2005) pesquisaram *Campylobacter* spp. na Polônia e encontraram 53/92 (57,6%) estirpes de *C. jejuni* e 39/92 (42,4%) de *C. coli* isoladas de carcaças de frango. Mena et al. (2008) identificaram 99 (60,3%) estirpes de *Campylobacter* spp. em 164 amostras de frangos obtidas a partir de estabelecimentos varejistas de Portugal.

No Brasil, também foram observados altos percentuais de isolamentos de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* a partir de carcaças de frangos. Em estudo realizado em frangos de abatedouros, Castro et al. (1997) destacaram o processo de evisceração como ponto crítico da linha de abate para a contaminação de carcaças, tendo isolado *Campylobacter* spp. em 36/140 (25,8%) amostras de fezes, 5/14 (35,7%) amostras de água de evisceração e 1/14 (7,1%) águas de resfriamento pelo exame bacteriológico, resultando na contaminação de 15/140 (10,7%) amostras de fígado e 47/140 (33,6%) carcaças analisadas.

Diversos autores no Brasil e em outros países, observaram diferentes percentuais de isolamentos de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* a partir de fezes de frangos, que variam entre 22% (CORTEZ et al., 2006); 86,8% (JARAMILLO et al., 1983) e 90% (BLASER et al., 1980).

Com relação à análise de carcaças e miúdos de frangos resfriados prontos para o consumo, Sakuma et al. (1992) relataram a frequência de 27/200 (13,5%) *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* em São Paulo-SP; Machado et al. (1994) 15/30 (50%) em Santa Catarina; e Cortez et al. (2006) isolaram 14/288 (4,9%) estirpes de *Campylobacter jejuni* de diferentes abatedouros do estado de São Paulo.

Dias et al. (1990), pesquisaram a presença de *Campylobacter jejuni* em carcaças de frangos prontas para o consumo e em fezes de magarefes de abatedouros de Belo Horizonte, Brasil, tendo sido isolado *C. jejuni* em 19/50 (38%) carcaças de frangos e em 2/15 (13,3%) amostras de fezes dos magarefes. O perfil eletroforético em gel de poliacrilamida, as características bioquímicas e o padrão de susceptibilidade aos antimicrobianos apresentados pelos dois tipos de amostras, são muito semelhantes, o que

sugere que os frangos podem ser a fonte de *Campylobacter jejuni* para os magarefes, e que ambos podem estar envolvidos na transmissão do microrganismo.

Durante o resfriamento e secagem da carcaça de frangos, não ocorre uma drástica diminuição do número de células viáveis de *Campylobacter* spp., como ocorre nos suínos. Isto pode ser explicado pelo fato do processo de resfriamento da carcaça ser rápido, e pela diferença de textura da pele do frango, que apresenta poros que impedem a secagem total, protegendo contra dessecação (LANDER, 1985).

Talvez a forma mais importante para o alimento cárneo tornar-se via de transmissão da campilobacteriose intestinal, seja através da transferência passiva do agente para outros alimentos durante o descongelamento e o processamento em locais comuns (SKIRROW, 1991). Neste aspecto, a carcaça de frango assume capital importância, pois a água de degelo em contato com alimentos ingeridos "in natura" poderia explicar a origem dos frequentes surtos (SCARCELLI et al., 1998). Na Bélgica, a carne de frango é responsável por 40% dos casos de campilobacteriose em humanos, sendo um sério problema de saúde pública (GELLYNCK et al., 2008).

Outro dado relevante que poderia explicar a grande frequência dos surtos de campilobacteriose é o fato da dose infectante do *Campylobacter* ser baixa. A ingestão de apenas 500 microrganismos, facilmente presentes em uma gota de água de degelo de frango cru, pode resultar em uma enterite no homem (CDC, 1998).

Medidas de controle adotadas pelos abatedouros como adição e concentração de cloro ou outros antimicrobianos nos tanques de resfriamento, exemplificam condutas promissoras no estabelecimento de valores ideais para o controle da presença de *Campylobacter* spp. em abatedouros avícolas (SCARCELLI et al., 2005a).

Os vegetais frescos também podem ser fontes de transmissão de diversos patógenos capazes de causar doenças em humanos, principalmente quando o vegetal é ingerido cru (ABADIAS et al., 2008). Essa contaminação por *Campylobacter* spp. pode ocorrer antes ou depois da venda do produto (EVANS; RIBEIRO; SALMON, 2003).

Park e Sanders (1992) pesquisaram *Campylobacter* spp. em 533 amostras de vegetais frescos vendidos em propriedades rurais do Canadá, sendo isolados em 18 (3,3%) das amostras de espinafres; 17 (3,1%) de alfaces; 15 (2,7%) de rabanetes; 14 (2,5%) de cebolinha; 13 (2,4%) de salsinha e 9 (1,6%) de batatas. Kumar et al. (2001) analisaram 56 amostras de diferentes tipos de vegetais (repolho, couve-flor, espinafre, fenogrego, rabanete, cenoura e coentro) colhidos em mercados locais da cidade de Bareilly, Índia, e isolaram *Campylobacter jejuni* em duas amostras (3,57%), uma de espinafre e uma de fenogrego.

No Paquistão, Hussain et al. (2007) pesquisaram durante o período de janeiro de 2002 a dezembro de 2004, a prevalência de *Campylobacter* spp. em diferentes alimentos

colhidos de pontos de comércio varejista. Dentre esses alimentos, 9/22 (40,9%) das amostras de vegetais e saladas de frutas foram positivas para *Campylobacter* spp., além de 236/492 (48%) das amostras de frango; 24/465 (5,1%) das de carne de carneiro; 49/451 (10,9%) das de carne bovina; 13/127 (10,2%) de leite cru; 17/53 (32%) de sanduíches e 3/26 (11,5%) de queijos.

Considerando que o alimento apresenta-se naturalmente contaminado por diversos tipos de microrganismos, a grande preocupação é impedir que estes sobrevivam e se multipliquem, e que outros sejam acrescentados aos alimentos, como consequência de contaminação ambiental, fecal ou por manipulação inadequada (MESQUITA et al, 2006).

Há relatos frequentes de contaminação cruzada dos alimentos em cozinhas domésticas e comerciais, como o ocorrido em 1996, num restaurante em Oklahoma, onde houve um surto de enterite por *Campylobacter jejuni* devido à ingestão de lanches que continham alface contaminada por esta bactéria oriunda de frangos crus. Isso enfatiza a necessidade de manter certos alimentos e utensílios de cozinha separados durante a manipulação e preparo da refeição (CDC, 1998).

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. *C. jejuni* é capaz de hidrolisar o hipurato de sódio, enquanto que *C. coli*, assim como todas as outras espécies do gênero *Campylobacter*, não são capazes de hidrolisar o mesmo substrato, pois não possuem o gene da enzima hipuricase (*hip*) (LINTON et al., 1997).

Linton *et al.* (1997) descreveram um conjunto de oligonucleotídeos iniciadores específicos para detecção de *C. jejuni*, baseados na identificação da sequência do gene *hip*; e um conjunto de oligonucleotídeos iniciadores para detecção de *C. coli*, baseados na identificação da sequência do gene codificante da enzima aspartoquinase, ambas pela técnica da PCR a partir de amostras fecais, e também, para a diferenciação entre essas espécies, quando a prova bioquímica da hidrólise do hipurato apresenta resultados inconclusivos ou falso-negativos (RAUTELIN; JUSUFOVIC; HANNINEN, 1999; KOLACKOVA; KARPISKOVA, 2005).

À semelhança do que ocorre com os demais enteropatógenos, o desencadeamento de enterite por *Campylobacter jejuni*, tanto no homem como nos animais, está na dependência dos fatores relacionados às características de patogenicidade da estirpe envolvida (PEREZ-PEREZ; BLASER, 1991). Os intestinos delgado e grosso são os órgãos colonizados pelo *Campylobacter 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 o *Campylobacter jejuni* pode desencadear

diarréia aquosa ou disenteria muco-hemorrágica são baseados em quatro principais propriedades de virulência: motilidade, aderência, invasão e produção de toxina.

As diarréias aquosas e profusas, acompanhadas de desidratação, são associadas à elaboração de uma enterotoxina termolábil semelhante à toxina da cólera e a toxina termolábil (LT) de *Escherichia coli*. Por sua vez, as disenterias são relacionadas à produção de citotoxina similar à toxina de Shiga (WASSENAAR, 1997). Atualmente 11 fatores de virulência têm sido relacionados à patogênese do *Campylobacter jejuni* em infecções humanas e animais (DATTA; NIWA; ITOH, 2003), dentre elas a toxina citoletal distensiva (CDT), que afeta as camadas das células epiteliais, causando progressiva distensão e morte em várias linhagens celulares (CHO, Vero, HeLa e HEp-2) pelo acúmulo intracelular dos níveis de cAMP (MARTINEZ et al., 2006).

A atividade da toxina CDT é codificada pelos genes *cdt*, que no caso do *Campylobacter jejuni*, consistem em três genes adjacentes denominados *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* (MARTINEZ et al., 2006). A proteína produzida pelo gene *cdtB* (CdtB) potencializa o bloqueio do ciclo celular; e as proteínas dos genes *cdtA* e o *cdtC* funcionam como subunidades diméricas, que transportam a proteína do *cdtB* e a interiorizam na célula hospedeira. Uma vez dentro da célula, a proteína CdtB entra no núcleo e exibe uma atividade semelhante à DNase-I, resultando em cortes no DNA dupla fita. As células eucarióticas respondem aos cortes no DNA (SMITH; BAYLES, 2006), bloqueando a fase G2/M da divisão celular, induzindo uma distensão citoplasmática que leva à morte da célula (JEON; ITOH; RYU; 2005).

O resultado da atividade da toxina citoletal distensiva pode diferir ligeiramente, dependendo do tipo de célula eucariótica afetada. A toxina CDT contribui para a patogênese através da inibição da imunidade humoral e celular, via apoptose de células de resposta imune, e pode gerar necrose do epitélio celular e fibroblastos envolvidos na reparação de lesões produzidas por patógenos, resultando em lenta cicatrização e indução dos sintomas da doença (SMITH; BAYLES, 2006). Portanto, interfere na divisão e diferenciação das células das criptas intestinais, contribuindo para o desenvolvimento da diarréia (WASSENAAR, 1997; PARK, 2002).

A presença dos três genes *cdt* é requerida para uma plena atividade da toxina (ASAKURA et al., 2007). Mutações nos genes *cdtA*, *cdtB* ou *cdtC* que possam causar perda da função em alguma das três subunidades, impedem a célula bacteriana de induzir uma citotoxicidade. Sendo assim, a toxina CDT pode funcionar como um fator de virulência em patógenos que produzem essa toxina, desde que os genes estejam ativos (SMITH; BAYLES, 2006).

Eyigor et al. (1999) detectaram os genes *cdt* em 69/70 (99%) das estirpes isoladas de *Campylobacter jejuni* a partir de carcaças de frango de quatro diferentes supermercados

dos Estados Unidos. Na Dinamarca, Bang et al. (2001) detectaram o gene *cdtB* em 111/114 (97,3%) das estirpes de *Campylobacter* spp. isoladas de fezes de frangos; e Bang et al. (2004) isolaram 117 estirpes de *Campylobacter jejuni* a partir de carcaças de perus, e destas 101 (86,3%) foram positivas para o gene *cdtA*, 102 (87,2%) para o gene *cdtB* e 110 (94%) para o gene *cdtC*.

Martinez et al. (2006) pesquisaram a ocorrência dos genes *cdt* em estirpes de *Campylobacter jejuni* isolados de humanos e animais, e encontraram os três genes (*cdtA*, *cdtB* e *cdtC*) em 98/100 (98%) estirpes isoladas de diferentes origens geográficas.

No Brasil, são escassos os estudos sobre a ecologia, transmissibilidade e patogenicidade do *Campylobacter jejuni* isolados de alimentos de origem animal, e principalmente de origem vegetal. Portanto, os resultados obtidos fornecerão dados inéditos sobre a ocorrência de estirpes de *Campylobacter jejuni* portadoras dos genes da toxina CDT, provenientes de alimentos de origem animal (frangos de corte), e principalmente de origem vegetal (hortaliças).

3. MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de alimentos de origem animal e vegetal foram colhidas em diferentes pontos comerciais (feiras livres e hipermercados) do município de São Paulo, SP, e processadas no Laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal do Instituto Biológico.

3.1. Amostras de origem animal

Foram analisadas 80 amostras de frangos de corte (*Galus galus*) resfriados, representados por 80 sobrecoxas. Na ocasião de cada colheita, as amostras de sobrecoxas foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis descartáveis e transportadas ao laboratório em caixa isotérmica, com gelo reciclável, a temperatura de até 10°C.

As amostras de origem animal foram descritas nas feiras livres como originárias de abatedouros do interior do estado de São Paulo e, no caso dos hipermercados, eram comercializadas com sua marca institucional, também procedentes do estado de São Paulo.

3.2. Amostras de origem vegetal

Foram analisadas 80 amostras de hortaliças (40 maços de espinafres e 40 pés de alfaces). Os pés de alfaces lisas (*Lactuca sativa*) e os maços de espinafres (*Spinacea oleracea*) foram acondicionados em sacos plásticos estéreis descartáveis e transportados ao laboratório em caixa isotérmica, com gelo reciclável, a temperatura de até 10°C.

As amostras de origem vegetal, tanto dos hipermercados como das feiras livres, foram descritas como originárias da região denominada “cinturão verde de São Paulo” que abrange 73 municípios em torno da cidade de São Paulo.

As feiras livres localizavam-se, uma na região Sul (Feira livre A) e outra na região Leste (Feira livre B), o mesmo ocorrendo com os hipermercados (Hipermercado A e Hipermercado B).

Foram realizadas, no total, oito colheitas, distribuindo-se duas colheitas por ponto de venda, com amostragem de 20 espécimes por colheita, sendo 10 de origem animal (frangos) e 10 de origem vegetal (cinco pés de alfaces e cinco maços de espinafres), durante os meses de abril a outubro de 2008.

3.3. Procedimentos bacteriológicos para isolamento e identificação de *Campylobacter* spp. a partir de amostras de origem animal e vegetal

As amostras de sobrecoxa de frango e hortaliças foram submetidas ao procedimento bacteriológico, para isolamento e identificação bioquímica de *Campylobacter* spp. para posterior seleção de estirpes de *Campylobacter jejuni*, segundo Bacteriological Analytical Manual (BAM/FDA - HUNT et al., 2001) e Castro et al. (1997).

3.3.1. Processamento das amostras de origem animal

Para cada 25g de sobrecoxa de frango (composto por músculo e pele) foram adicionados 100mL de caldo BHI (Caldo Infusão Cérebro Coração – Difco) dentro de bolsas plásticas estéreis (Nasco), e submetidas à homogeneização por até quatro minutos em homogeneizador mecânico (Stomacher 80-Lab System).

Visando a eliminação de grandes partículas em suspensão, que pudessem interferir no futuro processo de filtração (MODOLO, 2000), o homogenato obtido pós-homogeneização foi submetido a duas centrifugações sucessivas (CASTRO et al., 1997), sendo que a segunda centrifugação objetivou a concentração do agente:

- 1º) Cinquenta mL do homogenato foram centrifugados a 3.000 x g por 15 minutos;
- 2º) Três mL do sobrenadante foram centrifugados a 14.000 x g por 15 minutos.

Após a segunda centrifugação, dois mL do sobrenadante mais o “pellet”, foram filtrados em membrana de éster de celulose (Millipore) com poro de 0,65 µm, utilizando-se suporte plástico (*swinex* - Millipore) e seringas estéreis, sendo que 100µL do filtrado foram semeados em meio de Ágar Brucella (Difco) acrescido de 10% de sangue desfibrinado de carneiro (ABS), e 100 µL (sem filtração) foram semeados em meio seletivo (ABS-ATB), constituído por Ágar Brucella Sangue e suplementado com mistura antibiótica (DUFTY, 1967), 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 em estufa por 48-72 horas, a 37°C sob atmosfera de microaerofilia (5% de CO₂).

Após o período de incubação, as colônias suspeitas foram identificadas por métodos presuntivos: coloração de Gram, observação de mobilidade em microscópio de campo escuro e teste de oxidase; e, uma vez caracterizado o gênero *Campylobacter*, foram determinadas as espécies e as subespécies pelas provas bioquímicas: catalase, formação de H₂S em TSI (meio de Tríplice Açúcar Ferro - Difco), hidrólise do hipurato, tolerância às

temperaturas de 25°C e 42°C, susceptibilidade ao ácido nalidíxico (30 µg) e à cefalotina (30 µg) (SKIRROW; BENJAMIN, 1980; HOLT et al., 1994).

Como estirpe controle, foi empregada a cepa padrão de *Campylobacter jejuni* ATCC 33291.

3.3.2. Processamento das amostras de origem vegetal

Para cada 50g de folhas de hortaliças (50g de espinafre ou 50g de alface) foram adicionados 100mL de caldo BHI (Caldo Infusão Cérebro Coração – Difco) dentro de bolsas plásticas estéreis (Nasco) e submetidos à homogeneização por até quatro minutos em homogeneizador mecânico (Stomacher 80-Lab System).

As metodologias empregadas para isolamento e identificação bioquímica foram as mesmas descritas para as amostras de origem animal (3.3.1.).

As estirpes de *Campylobacter* spp. isoladas dos alimentos de origem animal e vegetal foram preservadas em triplicata para posterior utilização nas metodologias bacteriológicas e moleculares. Uma amostra foi semeada em meio de Tioglicolato (Difco) e mantida em temperatura ambiente, após multiplicação a 37°C; outra em meio de congelamento (caldo Brucella (Difco) + 15% de glicerol) e armazenada a -20°C; e uma terceira suspensão composta por 1000 µL de tampão TE (10 mM Tris:1 mM EDTA, pH 8), cuja densidade foi ajustada para a escala 8 de MacFarland (23×10^9 bact/mL) e armazenada a -20°C até o momento da extração do DNA.

3.4. Extração do DNA das estirpes de *Campylobacter* spp.

As suspensões das estirpes de *Campylobacter* spp. isoladas tiveram seu DNA extraído pelo kit comercial Illustra Bacterial Genomic PREP Mini Spin (GE Healthcare), que apresenta rendimento de 4-12 µg/g DNA para um volume final de eluição de 200 µL.

3.5. Detecção do gene *hip* das estirpes isoladas de *Campylobacter* spp. pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Visando confirmar pela PCR a triagem inicial realizada pela prova bioquímica espécie-específica da hidrólise do hipurato para *Campylobacter jejuni*, foi pesquisada a presença do gene *hip*, codificante para a enzima hipuricase.

O DNA extraído das estirpes isoladas foi submetido à amplificação pela PCR utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores da região conservada do gene *hip*, que corresponde a um fragmento de 735 pares de bases (pb). Os oligonucleotídeos iniciadores empregados na amplificação do DNA, segundo Linton et al. (1997) foram: **HIP400F** 5'-GAA GAG GGT TTG GGT GGT G-3' e **HIP1134R** 5'-AGC TAG CTT CGC ATA ATA ACT TG-3'.

Para o volume final de reação de 50 µL foi empregado tampão PCR 10 X (500mM de KCl, 15 mM de MgCl₂, 100 mM de TRIS-HCl, pH 9,0); 2,5 mM de MgCl₂; 200 mM de dNTPs (200 mM de cada nucleotídeo dCTP, dATP, dGTP, dTTP); 40 pmol de cada *primer* (HIP400F e HIP1134R); 2,5 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e 10 µL do DNA extraído. No termociclador PT 200 (MJ Research), o ciclo de amplificação foi precedido de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguidos de 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, hibridização a 66°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto, e extensão final a 72°C por 10 minutos. Como controle positivo foi utilizada a estirpe padrão de *Campylobacter jejuni* ATCC 33291

A análise do produto amplificado do gene *hip* foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 2,0 %. O gel foi corado por brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e posteriormente fotografado sob luz ultravioleta (300-320 nm) pelo sistema de foto-documentação, Câmera Kodak Digital DC/120 Zoom, e analisado com o software 1D Image Analysis (Kodak Digital Science).

3.6. Detecção do gene da aspartoquinase das estirpes isoladas de *Campylobacter* spp. pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Visando confirmar pela PCR a triagem inicial realizada pelas provas bioquímicas para *Campylobacter coli*, foi pesquisada a presença do gene codificante da enzima aspartoquinase, presente nesta espécie.

O mesmo DNA extraído anteriormente para o teste da hipuricase foi submetido à amplificação através da PCR utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores da região do gene da aspartoquinase, que corresponde a um fragmento de 500 pb. Os oligonucleotídeos iniciadores empregados na amplificação do DNA, segundo Linton et al. (1997) foram: **CC18F** (5'-GGT ATG ATT TCT ACA AAG CGA G-3') e **CC519R** (5'-ATA AAA GAC TAT CGT CGC GTG-3').

Para o volume final de reação de 50 µL foi empregado tampão PCR 10 X (500mM de KCl, 15 mM de MgCl₂, 100 mM de TRIS-HCl, pH 9,0); 2,5 mM de MgCl₂; 200 mM de dNTPs (200 mM de cada nucleotídeo dCTP, dATP, dGTP, dTTP); 40 pmol de cada *primer* (CC18F

e CC519R); 2,5 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e 10 µL do DNA extraído. No termociclador PT 200 (MJ Research), o ciclo de amplificação foi precedido de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguidos de 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, hibridização a 60°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto, e extensão final a 72°C por 10 minutos. Como controle positivo foi utilizada a estirpe padrão de *Campylobacter coli* CDC A3315.

A análise do produto amplificado seguiu os mesmos procedimentos empregados para o gene *hip*.

3.7. Detecção simultânea dos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* das estirpes isoladas de *Campylobacter* spp. pela técnica da Multiplex-PCR

A partir do DNA das estirpes de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* confirmadas pela PCR, foi realizada a técnica de Multiplex-PCR com os *primers* (Tabela 1) descritos por Martinez et al. (2006), para detecção dos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* que amplificam fragmentos de 422 pb, 531 pb e 339 pb, respectivamente.

Para o volume final de reação de 50 µL foi empregado tampão PCR 10 X (500mM de KCl, 15 mM de MgCl₂, 100 mM de TRIS-HCl, pH 9,0); 3,0 mM de MgCl₂; 200 mM de dNTPs (200 mM de cada nucleotídeo dCTP, dATP, dGTP, dTTP); 20 pmol de cada *primer* (*cdtAF*, *cdtAR*, *cdtBF*, *cdtBR*, *cdtCF* e *cdtCR*); 2,0 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e 10 µL do DNA extraído. No termociclador PT 200 (MJ Research), o ciclo de amplificação foi precedido de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, hibridização a 57°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto, e extensão final a 72°C por 5 minutos.

A análise do produto amplificado seguiu os mesmos procedimentos empregados para o gene *hip*.

Tabela 1: Sequência nucleotídica dos *primers cdt*, descrito por Martinez et al. (2006).

“Primers”	Sequência 5´→ 3´
<i>cdtA</i> F	CTA TTA CTC CTA TTA CCC CAC C
<i>cdtA</i> R	AAT TTG AAC CGC TGT ATT GCT C
<i>cdtB</i> F	AGG AAC TTT ACC AAG AAC AGC C
<i>cdtB</i> R	GGT GGA GTA TAG GTT TGT TGT C
<i>cdtC</i> F	ACT CCT ACT GGA GAT TTG AAA G
<i>cdtC</i> R	CAC AGC TGA AGT TGT TGT TGG C

3.8. Contaminação por coliformes

Com o objetivo de estabelecer a possível origem do *Campylobacter* spp. nas amostras analisadas, foi realizada a pesquisa de coliformes fecais e totais para observação da presença de contaminação fecal nos alimentos.

Para tanto, 100µL do “pellet” resultante da segunda centrifugação (3.3.1.), tanto das amostras de origem animal, quanto das de origem vegetal, também foram semeados em meio de Ágar EMB-Levine (Difco) e as placas incubadas em estufa de aerobiose a 37°C por 24 horas, para verificação qualitativa de coliformes fecais e totais nas amostras analisadas (HOLT et al, 1994; FENG; WEAGANT; GRANT, 1998).

3.9. Análise estatística

Para verificar qual fonte alimentar é mais frequente na disseminação do *Campylobacter* spp.; se há influência do ponto de venda nesta veiculação; e se há variação na ocorrência dos genes *cdt* nos diferentes grupos de alimentos, foi realizada a análise estatística através do teste do qui-quadrado (χ^2) e teste exato de Fisher, considerando-se o nível de significância de 5% ($p < 0,05$), segundo Callegari-Jacques (2003). Para comparação das proporções de isolamento de *Campylobacter* spp. de acordo com as técnicas utilizadas (filtração e meio seletivo), foi empregado o teste binominal, segundo Siegel e Castellan Jr. (2006). Os cálculos estatísticos foram realizados pelo programa EpiInfo versão 6.04 (DEAN, 1994).

4. RESULTADOS

Do total de 80 amostras de sobrecoxas de frango avaliadas bacteriologicamente e identificadas pelos métodos fenotípicos, 10/80 (12,5%) mostraram-se contaminadas com *Campylobacter* spp.

Treze estirpes de *Campylobacter* spp. foram isoladas, sendo quatro estirpes de *Campylobacter jejuni* e nove de *Campylobacter coli*, verificando-se, portanto, que em três amostras de sobrecoxa foi possível isolar mais de uma espécie ou estirpe de *Campylobacter* spp. (Tabela 2). As estirpes provenientes da mesma amostra foram diferenciadas pelas características bioquímicas e/ou pelas características morfológicas das colônias isoladas (Tabela 3).

Do total de 80 amostras de hortaliças avaliadas bacteriologicamente, *Campylobacter* spp. foi isolado de 3/80 (3,75%) hortaliças, sendo as 3/40 (7,5%) estirpes originárias de alface lisa e positivas para *Campylobacter coli* (Tabela 2).

Quanto aos 40 maços de espinafes analisados, nenhum foi positivo para *Campylobacter* spp. (Tabela 2).

Tabela 2: Frequência de isolamentos de *Campylobacter* spp. em relação ao ponto de venda e à origem das amostras. São Paulo - SP, 2008.

Região do Município de São Paulo	Ponto de venda	Número de amostras examinadas	Número de amostras positivas para <i>Campylobacter</i> spp. (%)	Estirpes de <i>Campylobacter</i> spp. isoladas	Estirpes isoladas por tipo de amostra (origem)		
					F	A	E
Zona Sul	Hipermercado	40	1 (1F)	1	1	0	0
	A	(20 F + 20 H)	(2,5%)				
Zona Sul	Feira Livre	40	8 (5F, 3 A)	9*	6	3	0
	A	(20 F + 20 H)	(20%)				
Zona Leste	Hipermercado	40	4 (4F)	6*	6	0	0
	B	(20 F + 20 H)	(10%)				
Zona Leste	Feira Livre	40	0	0	0	0	0
	B	(20 F + 20 H)					
Total	-	160	13 (8,1%)	16 (10%)	13 (8,1%)	3 (1,9%)	0

Frango (F); Alface (A); Espinafre (E); Hortaliças (H)

*Mais de uma estirpe isolada na mesma amostra.

As reações bioquímicas observadas para *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* foram: oxidase e catalase positivas, multiplicação a temperatura de 42°C, mas negativa a 25°C, sensibilidade ao ácido nalidíxico (30 µg) e resistência à cefalotina (30 µg), reação de hidrólise do hipurato **positiva** e ausência de fermentação e produção de H₂S em meio TSI (Tabela 3).

As reações bioquímicas observadas para *Campylobacter coli* foram: oxidase e catalase positivas, multiplicação a temperatura de 42°C, mas negativa a 25°C, sensibilidade ao ácido nalidíxico (30 µg) e resistência à cefalotina (30 µg), reação de hidrólise do hipurato **negativa** e ausência de fermentação e produção de H₂S em meio TSI (Tabela 3).

Pela análise estatística através do teste do qui-quadrado - χ^2 , não foi observada diferença estatisticamente significativa ($\chi^2=3,01$; p=0,083) com relação ao número de amostras positivas para *Campylobacter* spp. isoladas de frangos (n=10) e isoladas de hortaliças (n=3).

Tabela 3: Método de isolamento empregado e identificação bioquímica (fenotípica) das estirpes de *Campylobacter* spp. isoladas. São Paulo - SP, 2008.

Denominação da Estirpe	Método de Isolamento	Espécie Identificada	Provas bioquímicas					
			Oxidase	Catalase	H ₂ S em TSI	Hidrólise do hipurato	Ácido Nalidíxico (30µg)	Cefalotina (30µg)
F5	Filtração	<i>C. coli</i>	+	+	-	-	S	R
F21	Filtração	<i>C. coli</i>	+	+	-	-	S	R
F22	Filtração	<i>C. coli</i>	+	+	-	-	S	R
F23	Filtração	<i>C. coli</i>	+	+	-	-	S	R
F24-1'	Filtração	<i>C. coli</i>	+	+	-	-	S	R
F24 -2'	Filtração	<i>C. coli</i>	+	+	-	-	S	R
F36	Filtração	<i>C. jejuni</i>	+	+	-	+	S	R
F55	Filtração	<i>C. coli</i>	+	+	-	-	S	R
F56-1'	Meio seletivo	<i>C. jejuni</i>	+	+	-	+	S	R
F 56-2'	Meio seletivo	<i>C. jejuni</i>	+	+	-	+	S	R
F 57-1'	Meio seletivo	<i>C. coli</i>	+	+	-	-	S	R
F 57-2'	Filtração	<i>C. jejuni</i>	+	+	-	+	S	R
F 58	Filtração	<i>C. coli</i>	+	+	-	-	S	R
A 12	Filtração	<i>C. coli</i>	+	+	-	-	S	R
A 15	Filtração	<i>C. coli</i>	+	+	-	-	S	R
A 16	Filtração	<i>C. coli</i>	+	+	-	-	S	R
ATCC 33291 (controle)	----	<i>C. jejuni</i>	+	+	-	+	S	R

Positivo (+); Negativo (-); Sensível (S); Resistente (R)

Meio seletivo: Ágar Brucella Sangue suplementado com mistura antibiótica.

Com relação aos coliformes fecais e totais, estes foram observados em todas as 160 amostras pesquisadas (Figura 1), representados nos frangos principalmente pelo gênero *Enterobacter* spp. 44/80 (55%) e pela espécie *Escherichia coli* 29/80 (36,25%). Nas hortaliças, predominaram os gêneros *Klebsiella* spp. 75/80 (93,75%), *Enterobacter* spp. 30/80 (37,5%), *Proteus* spp. 7/80 (8,75%) e a espécie *Escherichia coli* 31/80 (38,75%).

A presença de coliformes fecais e totais foi evidenciada em todas as amostras positivas para *Campylobacter* spp.

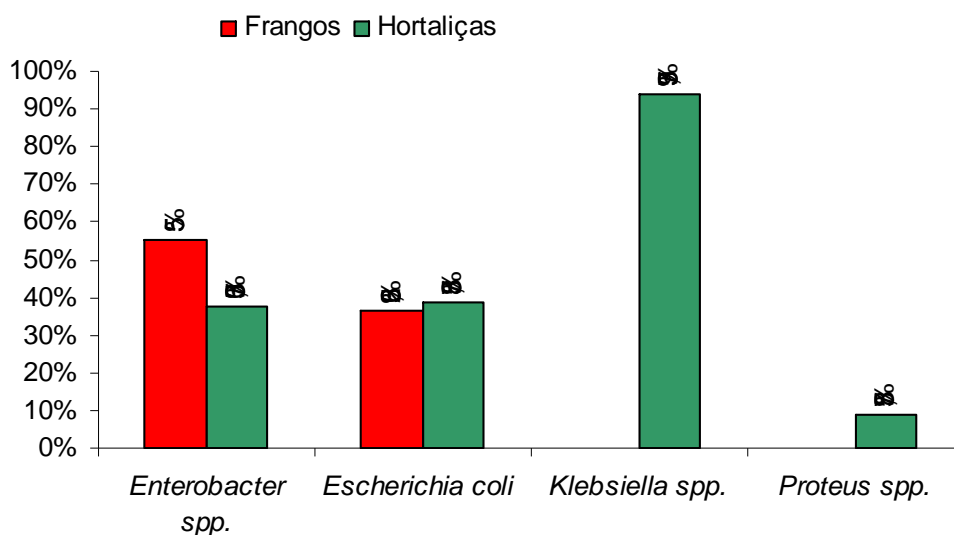


Figura 1: Frequência de isolamento de coliformes fecais e totais em 80 amostras de frangos de corte e 80 de hortaliças.

Outras espécies frequentemente observadas nas amostras de frangos de corte e hortaliças foram *Alcaligenes faecalis* 14/160 (8,75%), *Acinetobacter* spp. 7/160 (4,37%), *Bacillus* spp. 35/160 (21,87%) e *Staphylococcus* spp. 35/160 (21,87%), sendo os dois últimos gêneros identificados nas placas de ABS e ABS-ATB (Figura 2).

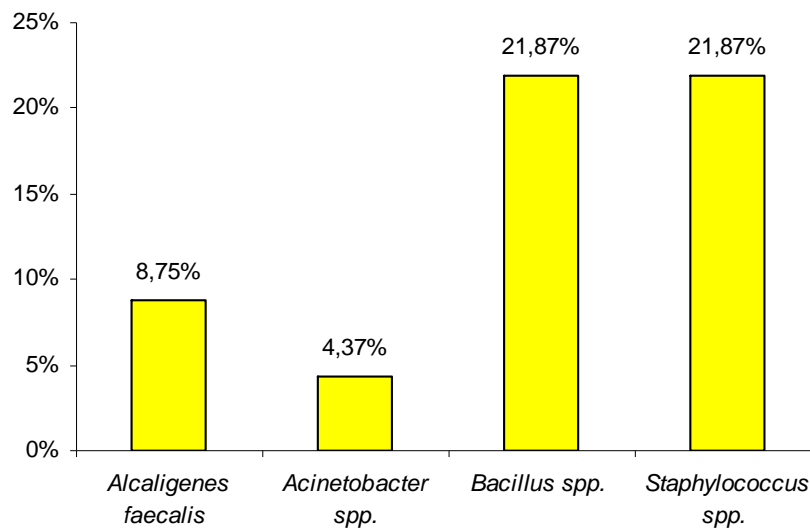


Figura 2: Frequência de isolamento de bactérias ambientais em 80 amostras de frangos de corte e 80 de hortaliças.

Com relação à técnica de isolamento empregada, do total de 16 estirpes de *Campylobacter* spp. isoladas, três (18,8%) estirpes foram identificadas a partir do meio seletivo, enquanto 13 (81,2%) foram obtidas pela técnica da filtração, havendo diferença estatística, avaliada pelo teste binomial, quanto ao número de estirpes isoladas ($p=0,021$), sendo que a técnica de filtração mostrou-se mais eficiente que o meio seletivo (Tabela 3).

Avaliando-se o ponto de venda, 5/40 (12,5%) amostras de frangos originárias de hipermercados e 5/40 (12,5%) amostras de frangos originárias de feiras livres, foram positivas para *Campylobacter* spp. Para as hortaliças, 3/20 (15%) pés de alfaces lisas provenientes de feiras livres, foram positivas para *Campylobacter* spp., e nenhum pé de alface lisa proveniente de hipermercados mostrou-se positivo. Quanto aos maços de espinafres, nenhum foi positivo para *Campylobacter* spp. nos pontos de comercialização pesquisados.

Com relação ao ponto de venda, empregando-se o teste do qui-quadrado - χ^2 , não foi observada diferença estatisticamente significativa entre hipermercados e feiras livres com relação ao número de estirpes de *Campylobacter* spp. isoladas a partir de amostras de frangos de corte ($\chi^2=0,11$; $p=0,735$). Também não houve diferença estatisticamente significativa pelo teste exato de Fisher, com relação ao número de estirpes isoladas a partir de amostras de alfaces lisas nos diferentes pontos de venda ($p=0,241$), mesmo sendo estas só isoladas de feiras livres.

Pelos dados fenotípicos obtidos verifica-se que *Campylobacter coli* (12/16 estirpes) foi mais frequente que *Campylobacter jejuni* (4/16 estirpes). Portanto, visando confirmar a

triagem inicial realizada pela prova bioquímica espécie-específica da hidrólise do hipurato, foi pesquisada a presença do gene *hip*, presente apenas na espécie *Campylobacter jejuni*, e do gene da aspartoquinase, para identificação da espécie *Campylobacter coli*, através da reação da polimerase em cadeia (PCR), das 16 estirpes isoladas de *Campylobacter* spp.

Pela genotipagem, verificou-se uma alteração de valores na ocorrência das espécies de *C. jejuni* e *C. coli*, revelando-se que 13/16 estirpes (81,25%) apresentaram o gene *hip* (Figura 3), classificando-as como *C. jejuni*, enquanto que 3/16 (18,75%) não apresentaram o gene codificante da enzima hipuricase, porém apresentaram o gene da aspartoquinase (Figura 4), identificando a espécie *C. coli* (Tabela 4).

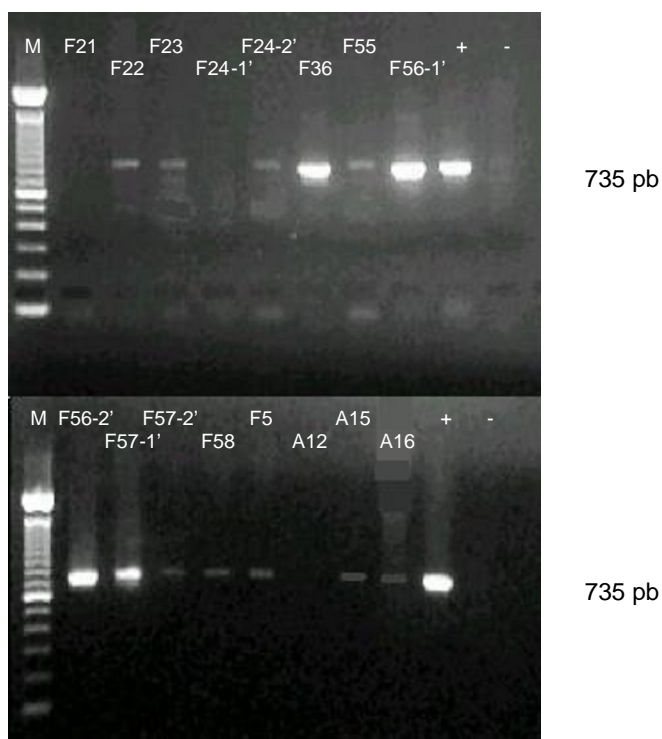


Figura 3: Resultados obtidos pela amplificação por PCR para detecção do gene da enzima hipuricase (*hip*) do *Campylobacter jejuni* das 16 estirpes de *Campylobacter* spp. M: Marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder – Invitrogen); Linhas F21 a A16: estirpes de *Campylobacter* spp.; + Controle positivo (*C. jejuni* ATCC 33291); - Controle negativo.



Figura 4: Resultados obtidos pela amplificação por PCR para detecção do gene da enzima aspartoquinase do *Campylobacter coli* das 16 estirpes de *Campylobacter* spp. M: Marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder – Invitrogen); Linhas F21 a A16: estirpes de *Campylobacter* spp.; + Controle positivo (*C. coli* CDC A3315); - Controle negativo.

No presente estudo, das 13 estirpes de *Campylobacter jejuni* confirmadas pela PCR, cinco (38,46%) apresentaram na Multiplex-PCR os três genes simultaneamente (*cdtA*, *cdtB* e *cdtC*) codificantes da toxina citotetal distensiva (Figura 5). Quatro eram provenientes de amostras de frangos, e uma de pé de alface lisa, sendo que nenhuma outra estirpe apresentou nenhum dos três genes (Tabela 4).

Para verificar a inter-relação entre estirpes de *Campylobacter jejuni* produtoras da toxina CDT em relação aos grupos de alimentos estudados, foi realizada a análise estatística através do teste exato de Fisher, onde não foi observada diferença estatisticamente significativa entre *cdt* em frangos e hortaliças ($p=0,620$).

Pela Multiplex-PCR também foi pesquisado o complexo de genes *cdt* nas três estirpes de *Campylobacter coli* isoladas, visando a pesquisa dos genes da toxina CDT nesta espécie, e também para reafirmação da especificidade do teste, visto que os *primers* utilizados são específicos para *Campylobacter jejuni*. Nenhuma das três estirpes (F21, F24-1' e A12) apresentaram os genes *cdt*, confirmando novamente a espécie *Campylobacter coli*.

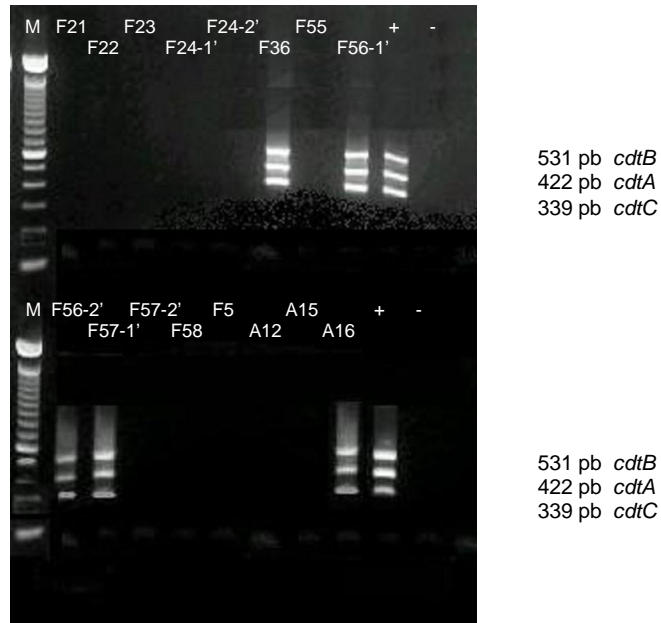


Figura 5: Resultados obtidos pela amplificação por Multiplex-PCR para detecção dos genes da toxina CDT (*cdtA*, *cdtB* e *cdtC*) do *Campylobacter jejuni* das 16 estirpes de *Campylobacter* spp. M: Marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder – Invitrogen); Linhas F21 a A16: estirpes de *Campylobacter* spp.; + Controle positivo (*C. jejuni* ATCC 33291); - Controle negativo.

Tabela 4: Identificação genotípica das estirpes de *Campylobacter* spp., através da pesquisa do gene *hip*, aspartoquinase e do complexo de genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* nas estirpes isoladas. São Paulo - SP, 2008.

Denominação da Estirpe	Presença do gene <i>hip</i> (735pb)	Presença do gene aspartoquinase (583pb)	Espécie Identificada	Presença do gene <i>cdtA</i> (422pb)	Presença do gene <i>cdtB</i> (531pb)	Presença do gene <i>cdtC</i> (339pb)
F5	+	-	<i>C. jejuni</i>	-	-	-
F21	-	+	<i>C. coli</i>	-	-	-
F22	+	-	<i>C. jejuni</i>	-	-	-
F23	+	-	<i>C. jejuni</i>	-	-	-
F24-1'	-	+	<i>C. coli</i>	-	-	-
F24-2'	+	-	<i>C. jejuni</i>	-	-	-
F36	+	-	<i>C. jejuni</i>	+	+	+
F55	+	-	<i>C. jejuni</i>	-	-	-
F56-1'	+	-	<i>C. jejuni</i>	+	+	+
F 56-2'	+	-	<i>C. jejuni</i>	+	+	+
F 57-1'	+	-	<i>C. jejuni</i>	+	+	+
F 57-2'	+	-	<i>C. jejuni</i>	-	-	-
F 58	+	-	<i>C. jejuni</i>	-	-	-
A 12	-	+	<i>C. coli</i>	-	-	-
A 15	+	-	<i>C. jejuni</i>	-	-	-
A 16	+	-	<i>C. jejuni</i>	+	+	+
ATCC 33291 (controle)	+	-	<i>C. jejuni</i>	+	+	+
CDC A3315 (controle)	-	+	<i>C. coli</i>	-	-	-

Positivo (+); Negativo (-)

5. DISCUSSÃO

Devido à preocupação da presença de *Campylobacter* spp. em alimentos, o conhecimento da via de transmissão e o controle da contaminação de frangos nas granjas se tornam necessários, assim como dos alimentos de origem não animal (KUMAR et al., 2001; FONSECA et al., 2006).

No presente estudo, foram isoladas 13 estirpes de *Campylobacter* spp. em 10/80 (12,5%) dos frangos resfriados analisados. Essa porcentagem foi superior, quando comparada aos resultados descritos por Scarcelli et al. (2005a) analisando frangos congelados, onde se observou 5/74 (6,75%) amostras positivas pela PCR para *C. jejuni* e nenhuma positiva pelo exame bacteriológico, indicando a susceptibilidade do microrganismo às condições adversas como o congelamento, aditivos, excessiva contaminação, alta tensão de oxigênio ou ressecamento (SCARCELLI et al., 2005a; FONSECA et al., 2007). Os autores também demonstraram as vantagens da PCR como técnica mais sensível e específica, pois não exige que a bactéria esteja viável, gerando índices maiores de detecção.

Segundo Franchin, Aidoo e Batista (2005), foram realizados estudos sobre a ocorrência de patógenos de origem alimentar em carcaças e produtos de frangos importados de países da União Européia, e vendidos em supermercados da Bélgica, onde foram encontrados *Campylobacter* spp. em 21,9% de 247 amostras da Bélgica, 30,2% de 427 amostras da França, 15,4% de 13 amostras da Itália e 54,5% de 44 amostras do Reino Unido.

Kang et al. (2006) isolaram *Campylobacter* spp. em 570/923 (61,8%) frangos colhidos em mercados tradicionais, varejos e depósitos da Coreia. No Vietnã, Ha e Pham (2006) pesquisaram *C. jejuni* em 177 amostras de diferentes alimentos, e identificaram esta espécie em 28,3% das amostras de frangos "in natura" provenientes de fábricas, escolas e hospitais da região. Hussain et al. (2007) pesquisaram a prevalência de *Campylobacter* spp. em diferentes alimentos de pontos de comércio varejista do Paquistão, sendo que 236/492 (48%) das amostras de frango foram positivas para *Campylobacter* spp. Prencipe et al. (2007) isolaram *Campylobacter* spp. em 178/392 (45,4%) carcaças de frango de supermercados e açougues da Itália, e mais de uma espécie de *Campylobacter* foi isolada em 23,1% das amostras positivas.

A contaminação da carne de frango pode ocorrer durante o abate, sendo mais comum no escaldamento e na evisceração, quando há a possibilidade da transmissão de microrganismos do intestino para a superfície das carcaças (CASTRO et al., 1997; CORTEZ et al., 2006; PRENCIPE, et al., 2007).

Mead et al. (1995) relataram que o aumento nos níveis de cloro nas águas de processamento das aves, aliada à melhoria das condições de higiene do abatedouro, promovem significativa diminuição na contaminação das carcaças. Porém, Peyrat et al. (2008) demonstraram que algumas estirpes de *Campylobacter* spp. podem sobreviver à limpeza e desinfecção nos matadouros de aves, podendo contaminar as carcaças durante o processamento.

Estudos no Brasil e em outros países, tem demonstrado que a incidência de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* em carcaças e vísceras de frangos analisadas imediatamente após a evisceração é alta, variando de 60% a 100% de positividade. Entretanto, a frequência diminui de 15% a 20% em amostras que foram armazenadas sob refrigeração ou congelamento por diferentes períodos de tempo (SAKUMA; FRANCO; FERNANDEZ; 1992).

No presente estudo, quanto às amostras originárias de vegetais, a frequência de *Campylobacter jejuni* em alface 2/40 (5,0%) foi maior do que os resultados descritos por Park e Sanders (1992), que observaram a ocorrência de 17/533 (3,1%). Com relação ao isolamento a partir de maços de espinafres, os mesmos autores identificaram estirpes de *Campylobacter jejuni* em 18/533 (3,3%) das amostras, enquanto que no presente estudo não foi isolada nenhuma estirpe proveniente desta hortaliça. Kumar et al. (2001) analisaram 56 amostras de diferentes tipos de vegetais colhidos em mercados da cidade de Bareilly, Índia, e isolaram duas (3,57%) estirpes de *Campylobacter jejuni* (uma de espinafre e uma de fenogrego).

Brandl et al. (2004) demonstraram que *Campylobacter jejuni* pode ser isolado de amostras de espinafre e rabanete, e que esta bactéria está presente nas raízes das plantas mantendo-se viável no solo e na rizosfera, podendo estar associado a casos esporádicos de campilobacteriose ligada à ingestão destes produtos. No Paquistão, Hussain et al. (2007) pesquisaram a prevalência de *Campylobacter* spp. em pontos de comércio varejista, sendo que 9/22 (40,9%) das amostras de vegetais e saladas de frutas foram positivas para *Campylobacter* spp. Abadias et al. (2008) pesquisaram a presença de *Campylobacter* spp. em amostras de vegetais de quatro supermercados da Catalonia, Espanha, incluindo 29 pés de alfaces e 10 maços de espinafres, porém não isolaram nenhuma estirpe proveniente destas amostras.

Segundo Kumar et al. (2001), o isolamento de *Campylobacter jejuni* em vegetais indica que essa contaminação pode provir de material fecal, em qualquer estágio, desde o ponto de produção até a venda. Butzler e Oosterman (1991) relatam que essa contaminação pode ser originária de fertilizantes naturais ou água contaminada utilizada na irrigação. De-Boer e Hahne (1990) demonstraam que também pode haver contaminação por *Campylobacter jejuni* em vegetais crus que tiveram contato com utensílios de cozinha

utilizados para cortar outros alimentos. Chai et al. (2007) inferem que pode haver contaminação-cruzada dos vegetais com outros alimentos, como frangos, no seu empacotamento, água contaminada utilizada em sua lavagem ou durante a manipulação pelos trabalhadores nos pontos de venda.

No presente estudo, com relação aos coliformes fecais e totais, estes foram observados em 160/160 (100%) das amostras pesquisadas, o que indica a provável fonte de contaminação do *Campylobacter* spp nas amostras de origem animal e vegetal.

Segundo Siqueira (1995), o índice de coliformes fecais é utilizado como indicador de contaminação fecal, ou seja, de condições higiênico-sanitárias, visto que a população deste grupo é constituída de uma alta proporção de *Escherichia coli*, que tem seu habitat exclusivo no trato intestinal do homem e animais. Além disso, indicam condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento, e altas contagens podem significar contaminação pós-processamento, limpezas, sanificações ou tratamentos térmicos ineficientes.

A RDC (Resolução da Diretoria Colegiada) nº 12, de 2 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, não estabelece padrões microbiológicos para coliformes totais. No entanto, sabe-se que dentre os microrganismos indicadores de padrões higiênico-sanitários, estão incluídos os coliformes totais como indicadores de falhas no aspecto higiênico no processamento (MESQUITA et al., 2006).

Castro et al. (1997) também observaram a presença de coliformes totais em amostras de coxa/sobrecoxa de frango e na água de evisceração, apontando a evisceração como ponto crítico na linha de abate para contaminação fecal das carcaças. Little et al. (1999) afirmam que é comum em vegetais crus encontrar um alto nível de enterobactérias, e que tais produtos muitas vezes têm elevados níveis destes microrganismos por fazerem parte da sua microbiota, ou ainda por serem provenientes do solo ou manuseio inadequado. Ha e Pham (2006) pesquisaram *Escherichia coli* em 177 amostras de diferentes alimentos, sendo que identificaram esta bactéria em 45% das amostras de frangos crus e em 18,5% dos vegetais pesquisados, ambos provenientes de fábricas, escolas e hospitais do Vietnã.

As três amostras de alfaces positivas para *Campylobacter* spp., a exemplo das demais amostras de alface e espinafre que estavam contaminadas por coliformes fecais, podem inferir um possível contato de fezes de animais ou mesmo de humanos positivas para *Campylobacter* spp. com estas hortaliças, por meio da água de irrigação ou do solo adubado (KUMAR et al., 2001).

No presente estudo, outras espécies frequentemente observadas nas amostras de frangos e hortaliças como *Alcaligenes faecalis*, *Acinetobacter* spp., *Bacillus* spp. e *Staphylococcus* spp., indicam que além da contaminação fecal, a contaminação ambiental também fazia parte das amostras de origem animal e vegetal analisadas.

Essas bactérias são amplamente difundidas na natureza e fazem parte da microbiota normal do homem e alguns animais. Os fatores que mais predis põem à contaminação por esses agentes são a inadequada manipulação dos produtos, resultando em contaminação cruzada, e na exposição dos produtos a temperaturas adequadas ao crescimento bacteriano (MESQUITA et al., 2006).

A presença de diferentes microrganismos na amostra, exerce uma pressão seletiva no crescimento do *Campylobacter* spp., tornando seu isolamento mais difícil. Para tanto, tornam-se necessárias técnicas seletivas de cultivo que eliminem os microrganismos indesejáveis para uma análise eficaz da amostra (MODOLO, 2000).

Quanto ao método de isolamento, a técnica de filtração mostrou-se estatisticamente mais eficiente que o meio seletivo, no sentido de minimizar a variedade de gêneros citados acima que acompanhavam as amostras de origem vegetal e animal, permitindo o isolamento das estirpes de *Campylobacter* spp. em três (18,8%) das amostras a partir do meio seletivo em comparação às 13 (81,2%) pela técnica da filtração.

Bolton et al. (1987) também observaram que a técnica de filtração foi mais eficiente para descontaminação das amostras, visto que muitos microrganismos se tornam resistentes aos antibióticos presentes no meio seletivo.

Modolo (2000) isolou *Campylobacter* spp. em fezes de diferentes animais através de meio seletivo e pela técnica da filtração, e concluiu que apesar de haver uma diferença significativa de isolamento entre as técnicas, o uso associado de ambos os procedimentos proporciona uma positividade mais elevada de isolamento.

Com relação ao ponto de venda, no presente estudo não foi observada diferença estatisticamente significativa com relação ao número de estirpes de *Campylobacter* spp. isoladas a partir de amostras de frangos de corte, entre hipermercados e feiras livres. Prencipe, et al. (2007) também observaram que não há diferença estatisticamente significativa nos níveis de contaminação por *Campylobacter* spp. em frangos provenientes de supermercados ou de açougues das regiões de Abruzzo e Molise, Itália.

Quanto às amostras de alfaces lisas, também não houve diferença estatisticamente significativa com relação ao número de estirpes isoladas de feiras livres e hipermercados. No entanto, estas estirpes só foram isoladas de feiras livres, onde se verificou uma manipulação mais intensa das hortaliças, inclusive com constantes aspersões de água que ficava armazenada em barris inadequados e, portanto, pouco higiênicos, mantidos atrás das barracas, com a intenção de imprimir aos vegetais um aspecto fresco.

Outro ponto a se considerar é que as hortaliças originárias das feiras livres aparentavam ser recém-colhidas, diferentemente dos vegetais comercializados nos hipermercados, o que poderia também manter a viabilidade do *Campylobacter* spp. nas amostras.

Chai et al. (2007) observaram que a prevalência de *Campylobacter* spp. em vegetais provenientes de supermercados da Malásia, foi o dobro da prevalência de *Campylobacter* spp. em amostras de mercado informal. Segundo os autores, estes dados sugerem que a contaminação cruzada se originou da carne de frango, já que estudos indicam que mais de 50% dos frangos de mercados e abatedouros da Malásia apresentam *Campylobacter* spp. Em decorrência desta contaminação cruzada, os autores inferem um aumento da probabilidade dessa espécie nas embalagens de supermercados, que podem advir de inadequadas práticas de manipulação durante a higienização dos vegetais ou seu empacotamento no ponto de venda.

Pelos dados fenotípicos obtidos no presente estudo, verifica-se que diferentemente da maioria dos relatos de ocorrência de *Campylobacter* spp. em aves (PRENCIPE et al., 2007; CARVALHO; CORTEZ, 2004; CASTRO et al., 1997) e mesmos em vegetais (PARK, 2002; PARK; SANDERS, 1992), *Campylobacter coli* (75%) foi mais frequente que *Campylobacter jejuni* (25%), o que reforçou o emprego da diferenciação genotípica entre as espécies através da pesquisa do gene *hip*, codificante para a enzima hipuricase, presente apenas na espécie *Campylobacter jejuni*, e do gene da aspartoquinase, utilizado na identificação da espécie *Campylobacter coli*, onde verificou-se uma alteração de valores na ocorrência das espécies de *C. jejuni* e *C. coli* observada anteriormente pela fenotipagem.

Outros autores também relataram a ocorrência de resultados falso-negativos para *Campylobacter jejuni* baseados apenas nos testes fenotípicos de identificação, onde os testes moleculares foram decisivos para a definitiva classificação da espécie dos campilobacters termofílicos hipurato negativos (RAUTELIN; JUSUFOVIC; HANNINEN, 1999; BANG et al., 2001; KOLACKOVA; KARPISKOVA, 2005; NAKARI; PUHAKKA; SIITONEN, 2008), o que reforça a utilização de ambas as técnicas na caracterização das espécies de *Campylobacter* spp.

Kolackova; Karpiskova (2005) compararam os métodos fenotípicos e genotípicos para identificação de campylobacters termofílicos de 911 isolados de humanos e de origem alimentar, e verificaram que em 28,5% das estirpes, a identificação não havia sido feita corretamente pelos métodos convencionais (hidrólise do hipurato). RAUTELIN; JUSUFOVIC; HANNINEN (1999) isolaram 18 estirpes de *Campylobacter* hipurato-negativo de amostras fecais de humanos com enterite, porém destas, cinco (27,7%) eram *C. jejuni*.

No presente estudo, 56,25% das estirpes isoladas apresentaram resultados discordantes quando classificadas através dos testes bioquímicos, sendo que das 12

estirpes de *C. coli* identificadas fenotipicamente, na realidade, apenas três foram confirmadas como bioquímica e geneticamente *C. coli*, enquanto que as outras 9 estirpes apresentaram o gene *hip*, sendo, portanto, classificadas como *C. jejuni*. Quanto às quatro estirpes identificadas pela hidrólise do hipurato como *C. jejuni*, estas foram confirmadas genotipicamente pela PCR como sendo realmente desta espécie.

O uso de testes bioquímicos para identificação da espécie de *Campylobacter* é limitado pela ocorrência de estirpes com reações atípicas. Pequenas alterações na quantidade do inóculo, excessivos subcultivos, deleções no gene *hip* ou até mesmo a presença deste gene, mas ausência de sua transcrição, podem interferir na correta identificação da espécie (LINTON et al., 1997; RAUTELIN; JUSUFOVIC; HANNINEN, 1999; KOLACKOVA; KARPISKOVA, 2005).

Portanto, com a genotipagem de todas as estirpes, pôde-se confirmar os resultados dos testes bioquímicos e definir a real distribuição das amostras por origem alimentar e por ponto de venda.

Recentemente, tem aumentado o número de estudos objetivando a detecção dos genes *cdt* em estirpes de *Campylobacter jejuni* de diferentes fontes, entretanto, a prevalência desses genes nesta espécie de *Campylobacter* isolada de reservatórios e potenciais fontes de infecção, ainda não está plenamente investigada (MARTINEZ et al., 2006), principalmente no Brasil.

No presente estudo, 5/13 (38,46%) estirpes de *Campylobacter jejuni* apresentaram os três genes (*cdtA*, *cdtB* e *cdtC*) codificantes da toxina citolética distensiva na Multiplex-PCR, sendo quatro estirpes provenientes de amostras de frangos (três de hipermercados e uma de feira livre), e uma de pé de alface lisa (feira livre).

No Japão, Datta, Niwa e Itoh (2003), identificaram os três genes *cdt* em 100% das 111 estirpes de *C. jejuni* isoladas de amostras clínicas humanas, carnes de frango, e fezes de frangos e bovinos. Bang et al. (2003) isolaram 20 estirpes de *Campylobacter jejuni* em amostras fecais de suínos e bovinos provenientes do Instituto de Veterinária da Dinamarca, sendo que o gene *cdtA* e *cdtB* foram detectados em 20 (100%) estirpes, e o gene *cdtC* em 19 (95%). Na Polônia, Rozynek et al. (2005) isolaram 53 estirpes de *C. jejuni* em carcaças de frangos de supermercados e abatedouros, sendo que 100% apresentaram os três genes *cdt*. Samosornsuk et al. (2007) isolaram na Tailândia 20 estirpes de *C. jejuni* provenientes de frangos, sendo que destas, 19 (95%) apresentavam o gene *cdtA*, 20 (100%) o gene *cdtB* e 19 (95%) o *cdtC*. Hanel et al. (2007) pesquisaram na Alemanha a toxina citolética distensiva em perus e encontraram os três genes *cdt* em 9/13 (53%) das estirpes de *C. jejuni* isoladas.

Martinez et al. (2006) aplicou a Multiplex-PCR para pesquisa dos genes *cdt* em 100 estirpes de *C. jejuni* isolados de diferentes fontes e países, sendo que os três genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* foram observados em 98 (98%) das estirpes isoladas. Na Polônia, Wardak e

Szych (2006) isolaram 102 estirpes de *C. jejuni* a partir de fezes diarréicas humanas, e identificaram uma prevalência do gene *cdtA* em 100 (98%) das estirpes, *cdtB* em 98 (96%) e *cdtC* em 94 (92%), determinando que a alta prevalência do complexo de genes *cdt* indica que estes genes são importantes fatores de virulência desta bactéria, concordando com Van Deun et al. (2007) que afirmaram que a produção da toxina CDT está associada com as estirpes causadoras de enterites em humanos. Talukder et al. (2008) também identificaram *C. jejuni* de pacientes com diarréia em Bangladesh, e identificaram os genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* em 39/40 (97,5%) das estirpes.

No presente estudo, os percentuais de estirpes de *C. jejuni* portadoras do complexo *cdt* foram inferiores aos relatados por outros autores em diferentes países, sendo a ocorrência de linhagens de estirpes de *C. jejuni* negativas na Multiplex-PCR (8/13), superior às amostras positivas (5/13). Segundo Martinez et al. (2006), essencialmente todas as estirpes de *Campylobacter jejuni* apresentam os genes *cdt*, e a maioria tem atividade da toxina. Porém, há exceções de raros isolamentos que sofrem mutação e não expressam a atividade do gene. Estes mesmos autores sequenciaram e caracterizaram os genes CDT negativos de seu estudo, e constataram a presença de pseudogenes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*, que apresentavam deleções em seu código sequencial. Com este resultado, os autores afirmaram que é possível essas deleções serem mais comuns do que o esperado.

Asakura et al. (2007) também observaram que alguns genes *cdt* não são identificados devido a mutações como deleção, inserção ou substituição de nucleotídeos, e sugerem que essas mutações podem afetar a atividade da toxina.

Bang et al. (2003) relatam que a produção da toxina é baixa ou negativa quando há mutações em regiões do gene *cdt*, porém, segundo Park (2002), mesmo algumas estirpes sendo CDT negativas mutantes, ainda mantém alguma atividade toxigênica.

Observando-se a Tabela 3 e a Figura 3, verifica-se que as estirpes de *Campylobacter jejuni* hidrólise do hipurato negativas, apresentaram uma banda de fraco sinal na PCR, enquanto que as estirpes hidrólise do hipurato positivas apresentaram bandas com intenso sinal, e somente estas foram positivas para a presença do complexo de genes *cdt*, com exceção da estirpe A16, isolada de alface lisa, que era hidrólise do hipurato negativa e apresentou banda de fraco sinal na PCR para o gene da hipuricase.

A partir destes resultados, pode-se inferir que as estirpes de *Campylobacter jejuni* identificadas no presente estudo possam realmente apresentar mutações em seus genes, visto que as amostras que apresentaram banda de fraco sinal na PCR para o gene *hip*, coincidiram com as negativas no teste da hidrólise do hipurato. Segundo Samosornsuk et al. (2007), deleções ou mutações no gene *hip* podem resultar em um produto não amplificado na PCR, ou ainda um produto menor que o esperado. Caso haja possibilidade

das estirpes apresentarem mutações em outros genes, justificaria o fato destas também serem negativas para o complexo de genes *cdt*.

No presente estudo, obteve-se o isolamento inédito de três amostras de origem vegetal (alface lisa) positivas para *Campylobacter* spp. (duas estirpes de *Campylobacter jejuni* e uma de *Campylobacter coli*) originárias de feiras livres localizadas no estado de São Paulo; e a detecção também inédita de cinco estirpes portadoras do complexo de genes *cdt* (quatro provenientes de frangos e uma de alface).

Os resultados do presente estudo são dignos de atenção, pois mostram que estirpes de *Campylobacter jejuni* virulentas e de *Campylobacter coli* continuam viáveis nas amostras de frango resfriado e de hortaliças (alface), não só na linha de abate e no momento da colheita, mas até o ponto final da cadeia de distribuição, ou seja, nos dois principais centros de venda a varejo, que dão acesso direto à mesa do consumidor.

Portanto, *Campylobacter* spp. pode estar presente tanto nos alimentos de origem animal como vegetal, e apresentar fatores de virulência, como a toxina CDT, sendo considerado um importante patógeno causador de infecção alimentar no homem. Para tanto, a contaminação de alimentos por estes microrganismos não deve ser ignorada, atentando às condições ideais de higiene e sanitárias durante o preparo dos mesmos, pois os alimentos contaminados representam um risco real para a saúde pública, principalmente quando os produtos são consumidos “in natura” ou quando há contaminação-cruzada durante a manipulação dos alimentos.

6. CONCLUSÕES

Foram isoladas e identificadas estirpes de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* a partir de amostras de frangos de corte provenientes de hipermercados e feiras livres do município de São Paulo – SP, assim como de pés de alface lisa de feiras livres do mesmo município. Porém não foram isoladas estirpes a partir de maços de espinafres.

Pela técnica de Multiplex-PCR, foi detectada a presença do complexo de genes *cdt* em estirpes de *Campylobacter jejuni*, tanto nas amostras de frangos, como nas de alface lisa, não havendo diferença significativa entre as origens alimentares.

Não foi observada diferença estatisticamente significativa com relação ao número de estirpes isoladas de *Campylobacter* spp. a partir de amostras de frangos e hortaliças, assim como não houve influência do ponto de venda (hipermercados e feiras livres) na veiculação do *Campylobacter* spp.

O uso exclusivo de testes fenotípicos para identificação das espécies de *Campylobacter* é limitado pela ocorrência de estirpes com reações atípicas, o que corrobora a utilização conjunta dos testes genotípicos confirmatórios para identificação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADIAS, M.; USALL, J.; ANGUERA, M.; SOLSONA, C.; VIÑAS, I. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.123, p.121–129, 2008.

ABUOUN, M.; MANNING, G.; CAWTHRAW, S. A.; RIDLEY, A.; AHMED, I. H.; WASSENAAR, T. M.; NEWELL, D. G. Cytolethal Distending Toxin (CDT)-Negative *Campylobacter jejuni* strains and anti-CDT neutralizing antibodies are induced during human infection but not during colonization in chickens. **Infection and Immunity**, Washington, v.73, n.5, p.3053-3062, 2005.

ALTEKRUSE, S. F. *Campylobacter jejuni* in foods. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.213, p.1734-1735, 1998.

ALTEKRUSE, S. F.; STERN, N. J.; FIELDS, P. I.; SWERDLOW, D. L. *Campylobacter jejuni* an emerging foodborne pathogen. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.5, p.28-35, 1999.

ASAKURA, M.; SAMOSORNSUK, W.; TAGUCHI, M.; KOBAYASHI, K.; MISAWA, N.; KUSUMOTO, M.; NISHIMURA, K.; MATSUHISA, A.; YAMASAKI, S. Comparative analysis of cytolethal distending toxin (*cdt*) genes among *Campylobacter jejuni*, *C. coli* and *C. fetus* strains. **Microbial Pathogenesis**, London, v.42, n.5/6, p.174-183, 2007.

BANG, D. D.; SCHEUTZ, F.; AHRENS, P.; PEDERSEN, K.; BLOM, J.; MADSEM, M. Prevalence of cytolethal distending toxin (*cdt*) genes and CDT production in *Campylobacter* spp. isolated from Danish broilers. **Journal of Medical Microbiology**, London, v.50, p.1087-1094, 2001.

BANG, D. D., NIELSEN, E. M., SCHEUTZ, F.; PEDERSEN, K.; HANDBERG, K.; MADSEN, M. PCR detection of seven virulence and toxin genes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from Danish pigs and cattle and cytolethal distending toxin production of the isolates. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, GB, v.94, p.1003-1014, 2003.

BANG, D. D.; BORCK, B.; NIELSEN, E. M.; SCHEUTZ, F.; PEDERSEN, K.; MADSEN, M. Detection of seven virulence and toxin genes of *Campylobacter jejuni* isolates from Danish turkeys by PCR and cytolethal distending toxin production of the isolates. **Journal of Food Protection**, Des Moines, US, v.67, n.10, p.2171-2177, 2004.

BLASER, M. J.; LAFORCE, F. M.; WILSON, N. A.; WANG, W. L. L. Reservatories for human campylobacteriosis. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.141, p.665-669, 1980.

BLASER, M. J.; CHECKO, P.; BOPP, C.; BRUCE, A.; HUGHES, J. M. *Campylobacter* enteritis associated with foodborne transmission. **American Journal of Epidemiology**, Chicago, v.116, n.6, p.886-894, 1982.

BLASER, M. J. *Campylobacter* species. In: MANDELL, L. G.; DOUGLAS, R. G.; BENNETT, J. E. (Ed.) *Principles and practice of infectious diseases*, New York: Churchill Livingstone, 1990. p.1649-1658.

- BOLTON, F. J.; HUTCHINSON, D. N.; PARKER, G. Isolations of *Campylobacter*. What are we missing? **Journal of Clinical Pathology**, London, v.40, n.6, p.702-703, 1987.
- BRANDL, M. T.; HAXO, A. F.; BATES, A. H.; MANDRELL, R. E. Comparison of survival of *Campylobacter jejuni* in the phyllosphere with that in the rhizosphere of spinach and radish plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.70, n.2, p.1182-1189, 2004.
- BUTZLER, J. P.; OOSTERMAN, J. *Campylobacter*: pathogenicity and significance in foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.12, n.1, p.1-8, 1991.
- CALLEGARI-JACQUES, S. M. *Bioestatística: Princípios e Aplicações*. São Paulo: Artmed, 2003. 256p.
- CALZADA, C. T.; NAKAHARA, L. K.; KANO, E.; IRINO, K. Biotype and Lior's serogroup of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated in São Paulo, Brazil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 25, p. 1-5, 1994.
- CARVALHO, A. C.; RUIZ-PALACIOS, G. M.; RAMOS-CERVANTES, P.; CERVANTES, L.; JING, X.; PICCKERING, L. K. Molecular characterization of invasive and noninvasive *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.39, n.4, p.1353-1359, 2001.
- CARVALHO, A.C.F.B.; CORTEZ, A.L.C. Contaminação de produtos avícolas industrializados e seus derivados por *Campylobacter jejuni* e *Salmonella* sp. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v.19, p.57-62, 2004.
- CARVALHO, F. M.; FIÚZA, M. A.; LOPES, M. A. Determinação de custos como ação de competitividade: estudo de um caso na avicultura de corte. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n.3, p.908-913, 2008.
- CASTRO, A. G. M.; GENOVEZ, M. E.; SCARCELLI, E.; TORRES, A. P.; CARDOSO, M. V.; PASCHOAL, A. P.; SOUZA, C. A. I.; CARRASCO, S. Monitoramento de *Campylobacter* spp ao longo da linha de abate de frangos de corte. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.64, p.21-26, 1997.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Outbreak of *Campylobacter* enteritis associated with cross-contamination of food – Oklahoma. **MMWR: Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v.27; n.47, p.129-131, 1998.
- CENTRAIS DE ABASTECIMENTO DE CAMPINAS S.A. – Ceasa/Campinas. 2006. Padronização/Alface. Disponível em: <http://www.ceasacampinas.com.br/Servico_padronizacao.php?pagina=alface>. Acesso em: 15 jan. 2009.
- CHAI, L. C.; ROBIN, T.; RAGAVAN, U. M.; GUNSALAM, J. W.; BAKAR, F. A.; GHAZALI, F. M.; RADU, S.; KUMAR, M. P. Thermophilic *Campylobacter* spp. in salad vegetables in Malaysia. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.117, p.106-111, 2007.
- CLARK, C. G.; PRICE, L.; AHMED, R.; WOODWARD, D. L.; MELITO, P. L.; RODGERS, F. G.; JAMIESON, F.; CIEBIN, B.; LI, A.; ELLIS, A. Characterization of waterborne outbreak-associated *Campylobacter jejuni*, Walkerton, Ontario. *Emerging Infectious Diseases* [serial online] 2003 Oct [date cited]. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol9no10/02-0584.htm>>. Acesso em: 1 mar. 2007.

CORTEZ, A. L. L.; CARVALHO, A. C. F. B.; SCARCELLI, E.; MIYASHIRO, S.; VIDAL MARTINS, A. M. C.; BÜRGER, K. P. Survey of chicken abattoir for the presence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.48, p.307-310, 2006.

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

DE-BOER, E.; HAHNE, M. Cross-contamination with *Campylobacter jejuni* and *Salmonella* spp. from raw chicken products during food preparation. **Journal of Food Protection**, Des Moines, US, v.53, p.1063-1068, 1990.

DEAN, A. G. EpiInfo version 6: a word-processing, database, and statistic program for public health on IBM-compatible microcomputers. Atlanta: Center for Diseases Control and Prevention, 1994. 601 p.

DESAI, M.; LOGAN, J. M. J.; FROST, J. A.; STANLEY, J. Genome sequence-based fluorescent length polymorphism of *Campylobacter jejuni*, its relationship to serotyping, and its implications for epidemiological analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.39, p.3823-3829, 2001.

DIAS, T. C.; QUEIROZ, D. M. M.; MENDES, E. N.; PERES, J. N. Chicken carcasses as a source of *Campylobacter jejuni* in Belo Horizonte, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.32, n.6, p.414-418, 1990.

DOURADO, M. E.; DUARTE, R. C.; FERREIRA, L. C.; QUEIROZ, J. W.; ILLA, I.; PEREZ-PEREZ, G.; GUERRANT, R. L.; JERÔNIMO, S. M. B. Anti-ganglioside antibodies and clinical outcome of patients with Guillain-Barré Syndrome in northeast Brazil. **Acta Neurologica Scandinavica**, Copenhagen, v.108, p.102-108, 2003.

DUFTY, J. H. Diagnosis of vibriosis in the bull. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v.43, p.433-437, 1967.

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**, Washington, v.66, p.3917-3923, 2000.

ENDTZ, H. P.; ANG, C. W.; VAN DEN BRAAK, N.; DUIM, B.; RIGTER, A.; PRICE, L. J.; WOODWARD, D. L.; RODGERS, F. G.; JOHNSON, W. M.; WAGENAAR, J. A.; JACOBS, B. C.; VERBRUGH, H. A.; VAN BELKUM, A. Molecular characterization of *Campylobacter jejuni* from patients with Guillain-Barre and Miller Fisher syndromes. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.38, n.6, p.2297-2301, 2000.

EVANS, M. R.; RIBEIRO, C. D.; SALMON, R. L. Hazards of Healthy Living: Bottled Water and Salad Vegetables as Risk Factors for *Campylobacter* Infection. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.9, n.10, p.1219-1225, 2003.

EYIGOR, A.; DAWASON, K. A.; LANGLOIS, B. E.; PICKETT, C. L. Detection of cytolethal distending toxin activity and *cdt* genes in *Campylobacter* spp. isolates from chicken carcasses. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, n.4, p.1501-1505, 1999.

- FENG, P.; WEAGANT, S. D.; GRANT, M. A. Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. In: FDA's *Bacteriological Analytical Manual Online*, 8. ed. Revision A, 1998, chap. 4. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4.html>>. Acesso em: 22 fev. 2007.
- 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 of Clinical Microbiology**, Washington, v.39, n.7, p.2386-2390, 2001.
- FONSECA, B. B.; SONCINI, R. A.; VIEIRA, F. L.; SIQUEIRA, M. S.; GUIMARÃES, A. R.; BELETTI, M. E.; ROSSI, D. A. *Campylobacter* SPP. in organ and meconium of day-old broiler chicks derived from naturally infected breeder hens. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v.8, n.4, p.265-268, 2006.
- FONSECA, B. B.; SONCINI, R. A.; FREZZA, A. L. C.; ROSSI, D. A. *Campylobacter* spp. em mecônio de pintainhos e em cloaca de reprodutoras de corte. **Bioscience Journal**, Uberlandia, v.23, n.3, p.128-132, 2007.
- FORSYTHE, S. J. *Microbiologia da Segurança Alimentar*. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424p.
- FOSTER, G.; HOLMES, B.; STEIGERWALT, A. G.; LAWSON, P. A; THORNE, P.; BYRER, D. E.; ROSS, H. M.; XERRY, J.; THOMPSON, P. M.; COLLINS, M. D. *Campylobacter insulaenigrae* sp. nov., isolated from marine mammals. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, GB, v.54, n.6, p.2369-2373, 2004.
- FRANCHIN P. R.; AIDOO, K. E.; BATISTA, C. R. V. Sources of poultry meat contamination with thermophilic *Campylobacter* before slaughter. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.36, p.157-162, 2005.
- GELLYNCK, X.; MESSENS, W.; HALET, D.; GRIJSPEERDT, K.; HARTNETT, E.; VIAENE, J. Economics of reducing *Campylobacter* at different levels within the Belgian poultry meat chain. **Journal of Food Protection**, Des Moines, US, v.71, n.3, p.479-485, 2008.
- HA, T. A; PHAM, T. Y. Study of *Salmonella*, *Campylobacter*, and *Escherichia coli* contamination in raw food available in factories, schools, and hospital canteens in Hanoi, Vietnam. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.1081, p.262-265, 2006.
- HANEL, I.; BORRMANN, E.; MULLER, J.; ATLER, T. Relationships between bacterial genotypes and *in vitro* virulence properties of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from turkeys. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, GB, v.102, p.433-441, 2007.
- HASSANZADEH, P.; MOTAMEDIFAR, M. Occurrence of *Campylobacter jejuni* in Shiraz, Southwest Iran. **Medical Principles and Practice**, Kuwait, v.16, n.1, p.59-62, 2007.
- 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. 789p.
- HUNT, J. M.; ABEYTA, C.; TRAN, T. *Campylobacter*. In: FDA's *Bacteriological Analytical Manual Online*, 8 ed. Revision A, 2001. chap. 7. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-7.html>>. Acesso em: 22 fev. 2007.

- HUSSAIN, I.; SHAHID MAHMOOD, M.; AKHTAR, M.; KHAN, A. Prevalence of *Campylobacter* species in meat, milk and other food commodities in Pakistan. **Food Microbiology**, London, v.24, n.3, p.219-222, 2007.
- JARAMILLO, H. F. **Espécies termofílicas de *Campylobacter*; aspectos bacteriológicos, epidemiológicos e patogênicos.** 1983. 144p. Tese (Doutorado) - Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1983.
- JEON, B.; ITOH, K.; RYU, S. Promoter analysis of Cytotoxic Distending Toxin genes (*cdtA*, *B* and *C*) and effect of a *luxS* mutation on CDT production in *Campylobacter jejuni*. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v.49, n.7, p.599-603, 2005.
- JOHNSON, W. M.; LIOR, H. A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Campylobacter* spp. **Microbial Pathogenesis**, London, v.4, p.115-126, 1988.
- KANG, Y. S.; CHO, Y. S.; YOON, S. K.; YU, M. A.; KIM, C. M.; LEE, J. O.; PYUN, Y.R. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from raw chicken meat and human stools in Korea. **Journal of Food Protection**, Des Moines, US, v.69, n.12, p.2915-2923, 2006.
- KOLACKOVA, I; KARPISKOVA, R. Species level identification of thermotolerant campylobacteres. **Veterinary Medicine**, Slezka, Praha, v.12, p.543-547, 2005.
- KUMAR, A.; AGARWAL, R. K.; BHILEGAONKAR, K. N.; SHOME, B. R.; BACHHIL, V. N. Occurrence of *Campylobacter jejuni* in vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.67, n.1/2, p.153-155, 2001.
- KUROKI, S.; SAÍDA, T.; NUKINA, M.; HARUTA, T.; YOSHIOKA, M.; KOBAYASHI, Y.; NAKANISHI, H. *Campylobacter jejuni* strains from patients with Guillain-Barre syndrome belong mostly to Penner serogroup 19 and contain beta-N-acetylglucosamine residues. **Annals of Neurology**, Boston, US, v.33, p.243-247, 1993.
- LANDER, K. P. *Campylobacter*: Proceedings of a conference held in Brussels. New Haw: Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1985. 145p.
- 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 of Clinical Microbiology**, Washington, v.35, p.2568-2572, 1997.
- LITTLE, C. L.; ROBERTS, D.; YOUNGS, E., De LOUVOIS, J. Microbiological quality of retail imported unprepared whole lettuce: a PHLS food working group study. Public Health Laboratory Service. **Journal of Food Protection**, Des Moines, US, v.62, p.325-328, 1999.
- MACHADO, R. A.; TOSIN, I.; LEITÃO, M. F. F. Occurrence of *Salmonella* sp. and *Campylobacter* sp. in chickens during industrial processing. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.25, p.239-244, 1994.
- MARTINEZ, I.; MATEO, E.; CHURRUCA, E.; GIRBAU, C.; ALONSO, R.; FERNANDEZ-ASTORGA, A. Detection of *cdtA*, *cdtB*, and *cdtC* genes in *Campylobacter jejuni* by multiplex PCR. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, DE, v.296, n.1, p.45-48, 2006.
- MEAD, C. G.; HUDSON, W. R.; HINTON, M. H. Effects of changes in processing to improve hygiene control on contamination of poultry carcasses with *Campylobacter*. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, GB, v.115, p.495-500, 1995.

- MEAD, P. S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MCCAIG, L. F.; BRESEE, J. S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Diseases Journal**, Atlanta, v.5, n.5, p.607-625, 1999.
- MENA, C.; RODRIGUES, D.; SILVA, J.; GIBBS, P.; TEIXEIRA, P. Occurrence, identification, and characterization of *Campylobacter* species isolated from portuguese poultry samples collected from retail establishments. **Poultry Science**, Champaign, v.87, n.1, p.187-190, 2008.
- MESQUITA, M. O.; DANIEL, A. P.; SACCOL, A. L. F.; MILANI, L. I. G.; FRIES, L. L. M. Qualidade microbiológica no processamento do frango assado em unidade de alimentação e nutrição. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.1, p.198-203, 2006.
- MODOLO, J. R. Comparação do meio Butzler, técnica de filtração e sua associação para o isolamento de *Campylobacter* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.33, n.2, p.1-3, 2000.
- NAKARI, U. M.; PUHAKKA, A.; SIITONEN, A. Correct identification and discrimination between *Campylobacter jejuni* and *C. coli* by a standardized hippurate test and species-specific polymerase chain reaction. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Wiesbaden, v.27, n.7, p.513-518, 2008.
- 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 of Clinical Microbiology**, Washington, v.38, n.10, p.3800-3810, 2000.
- NISHIMURA, M.; NUKINA, M.; YUAN, J. M.; SHEN, B. Q.; M. A. J. J.; OHTA, M.; SAIDA, T.; UCHIYAMA, T. PCR-based restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis and serotyping of *Campylobacter jejuni* isolates from diarrheic patients in China and Japan. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.142, p.133-138, 1996.
- OBANA, M.; SAGARA, H.; AOKI, T.; KIM, R.; TAKIZAWA, Y.; TSUNODA, T.; IRIMAJIRI, S.; YAMASHITA, K. The current status of infectious enteritis in Japan: reports of the "Research Group for Infectious Enteric Diseases, Japan" in the last 5 years (1996-2000). **Kansenshogaku Zasshi**, Japan, v.76, n.5, p.355-368, 2002.
- PALMA, D.; OLIVA, C. A.; TADDEI, J. A.; FAGUNDES-NETO, U. Acute diarrhea: stoolwater loss in hospitalized infants and its correlation with etiologic agents and lactose content in the diet. **Arquivos de Gastroenterologia**, São Paulo, v.34, p.186-195, 1997.
- PARK, C. E.; SANDERS, G. W. Occurrence of thermotolerant campylobacters in fresh vegetables sold at farmers' outdoor markets and supermarkets. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.38, n.4, p.313-316, 1992.
- PARK, S. F The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.74, n.3, p.177-188, 2002.
- PEREZ-PEREZ, G. I.; BLASER, M. J. *Campylobacter and Helicobacter*. In: BARON, S.; JENNINGS, P.M. *Medical Microbiology*. New York: Churchill Livingstone, 1991. p.337-349.
- PETERSON, M. C. Rheumatic manifestations of *Campylobacter jejuni* and *C. fetus* infections in adults. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, Stockholm, v.23, p.167-170, 1994.

PEYRAT, M. B.; SOUMET, C.; MARIS, P.; SANDERS, P. Recovery of *Campylobacter jejuni* from surfaces of poultry slaughterhouses after cleaning and disinfection procedures: Analysis of a potential source of carcass contamination. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.124, n.2, p.188-194, 2008.

PRENCIPE, V.; PARISCIANI, G.; CALISTRI, P.; CAPORALE, C. M.; IANNITTO, G.; MORELLI, D.; POMILIO, F.; PROCHOWSKI, D.; MIGLIORATI, G. Thermotolerant *Campylobacter* in poultry meat marketed in the Abruzzo and Molise regions of Italy: prevalence and contaminations levels. **Veterinaria Italiana**, Teramo, v.43, n.1, p.157-165, 2007.

RAUTELIN, H.; JUSUFOVIC, J.; HANNINEN, M. Identification of Hippurate-negative Thermophilic *Campylobacter*s. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v.35, p.9-12, 1999.

ROCHA, M. S. G.; BRUCKI, S. M. D.; CARVALHO, A. A. S.; LIMA, U. W. P. Epidemiologic features of Guillain-Barré syndrome in São Paulo, Brazil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, v.62, n.1, 2004.

ROZYNEK, E.; DZIERZANOWSKA-FRANGAT, K.; JOZWIAK, P.; POPOWSKI, J.; KORSAK, D.; DZIERZANOWSKA, D. Prevalence of potential virulence markers in Polish *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates obtained from hospitalized children and from chicken carcasses. **Journal of Medical Microbiology**, London, v.54, p.615-619, 2005.

SAKUMA, H.; FRANCO, D. G. M.; FERNADEZ, H. Occurrence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in retail raw chicken meat and giblets in São Paulo, Brazil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.23, p.13-16, 1992.

SAMOSORNUSUK, W.; ASAKURA, M.; YOSHIDA, E.; TAGUCHI, T.; NISHIMURA, K.; EAMPOKALAP, B.; PHONGSISAY, V.; CHAICUMPA, W.; YAMASAKI, S. Evaluation of a Cytotoxic Distending Toxin (*cdt*) gene-based species-specific Multiplex-PCR assay for the identification of *Campylobacter* strains isolated from poultry in Thailand. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v.51, n.9, p. 909-917, 2007.

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.; MIYASHIRO, S.; CAMPOS, F. R.; CASTRO, A. G. M.; TESSARI, E. N. C.; CARDOSO, A. L. S. P. Detecção de *Campylobacter jejuni* em carcaças e cortes de frangos pela Reação da Polimerase em Cadeia. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.19, n.129, p.71-76, 2005a.

SCARCELLI, E.; PIATTI, R. M.; HAKAKAVA, R.; MIYASHIRO, S.; CAMPOS FERNANDES, F. M.; 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**, São Paulo, v.36, n.4, p.378-382, 2005b.

SIEGEL, S.; CASTELLAN JUNIOR, N. J. *Estatística não-paramétrica para as ciências do comportamento*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 448p.

SIQUEIRA, R.S. *Manual de microbiologia de alimentos*. Brasília: Embrapa-SPI, 1995.159p.

SKIRROW, M. B., BENJAMIN, J. Differentiation of enteropathogenic *Campylobacter*. **Journal of Clinical Pathology**, London, v.33, p.1222, 1980.

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

SMITH, J. L.; BAYLES, D. O. The contribution of cytolethal distending toxin to bacterial pathogenesis. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v.32, n.4, p.227-248, 2006.

STERN, N. J.; HERNANDEZ, M. P.; BLANKENSHIP, L.; DEIBEL, K. E.; DOORES, S.; DOYLE, M. P.; PIERSON, M. D.; SOFOS, J. N.; SVEUM, W. H.; WESTHOFF, D. C. Prevalence and distribution of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in retail meats. **Journal of Food Protection**, Des Moines, US, v.48, p.595-599, 1985.

TALUKDER, K. A.; ASLAM, M.; ISLAM, Z.; AZMI, I. J.; DUTTA, D. K.; HOSSAIN, S.; NUR-E-KAMAL, A.; NAIR, G. B.; CRAVIOTO, A.; SACK, D. A.; ENDTZ, H. P. Prevalence of virulence genes and cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* isolates from diarrheal patients in Bangladesh. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.46, n.4, p.1485-1488, 2008.

TOSIN, I.; MACHADO, R. A. Occurrence of *Campylobacter* spp among food handlers in hospital kitchens in urban areas of the southern region of Brazil. **Revista da Saúde Pública**, São Paulo, v.29, p.472-477, 1995.

VAN DEUN, K.; HAESBROUCK, F.; HEYNDRIKX, M.; FAVOREEL, H.; DEWULF, J.; CEELLEN, L.; DUMEZ, L.; MESSENS, W.; LELEU, S.; VAN IMMERSEEL, F.; DUCATELLE, R.; PASMANS, F. Virulence properties of *Campylobacter jejuni* isolates of poultry and human origin. **Journal of Medical Microbiology**, London, v.56, p.1284-1289, 2007.

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

WARDAK, S.; SZYCH, J. Prevalence of pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* isolated from humans in Poland between 2003-2005. **Medycyna Doswiadczalna Mikrobiologia**, Polônia, v.58, n.3, p.217-222, 2006.

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

WHYTE, P.; MCGILL, K.; COWLEY, D.; MADDEN, R. H.; MORAN, L.; SCATES, P.; CARROLL, C.; O'LEARY, A.; FANNING, S.; COLLINS, J. D.; MCNAMARA, E.; MOORE, J.E.; CORMICAN, M. Occurrence of *Campylobacter* in retail foods in Ireland. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 95, p.111-118, 2003.

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**, London, v.51, p.740-746, 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](#)