

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**OCORRÊNCIA E SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE
Campylobacter spp. EM CÃES, GATOS, CRIANÇAS E SUA
IMPORTÂNCIA ZOONÓTICA**

**Cecília Gomes Rodrigues
Médica Veterinária**

**UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL
Setembro – 2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**OCORRÊNCIA E SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE
Campylobacter spp. EM CÃES, GATOS, CRIANÇAS E SUA
IMPORTÂNCIA ZOONÓTICA**

Discente: Cecília Gomes Rodrigues

Orientadora: Profa. Dra. Daise Aparecida Rossi

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – UFU, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias (Saúde Animal).

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL

Setembro – 2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

R696o Rodrigues, Cecília Gomes, 1980-
2011 Ocorrência e suscetibilidade antimicrobiana de *Campylobacter*
spp. em cães, gatos, crianças e sua importância zoonótica / Cecília
Gomes Rodrigues. -- 2011.
63 f. : il.

Orientadora: Daise Aparecida Rossi.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. *Campylobacter* - Teses. 3. Epidemiologia
veterinária - Teses. I. Rossi, Daise Aparecida. II. Universidade Federal de
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

CECÍLIA GOMES RODRIGUES – nascida em Tupaciguara, Minas Gerais, em 28 de Outubro de 1980. Possui graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Uberlândia (UFU) - período: 2001/2005. Residência em Clínica Médica dos Animais Domésticos (R1 e R2) pelo Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) - período: 2007/2008. Atualmente aluna bolsista (CAPES) do Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias na área de Saúde Animal com linha de pesquisa em Clínica Médica e Investigação Etiológica pela Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia.

“Esperança é um pedaço da gente que sabe que vai dar certo.”

Pedro Bloch

DEDICATÓRIA

Dedico a minha filha, que participou de todas as etapas deste curso, que me recebia com um sorriso enorme todos os dias quando eu chegava da aula, que me acompanhava nas idas intermináveis ao laboratório nos sábados. Adorava quando ela perguntava: mamãe a bactéria cresceu?

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por fazer parte da minha trajetória de vida, me guiando e fortalecendo sempre diante das dificuldades.

Aos meus pais, Nívia e Sebastião, pelo amor e dedicação depositados em mim. Muito Obrigada por ser meu porto seguro.

A minha filha Alice, minha grande jóia, que me ensina uma lição a cada dia, me enche de carinho e me mostra que ser mãe é a maior dádiva da vida.

Ao Alexey, por ser meu companheiro, amigo, confidente e amor da minha vida. Obrigada pela força e carinho. Tenho certeza que a gente vai vencer essa batalha.

A minha orientadora, “nossa mamy”, por ser um exemplo de profissionalismo. Muito Obrigada pelos ensinamentos, pela ajuda e paciência durante o percurso do meu trabalho.

A todos os amigos do Labio, em especial a Roberta, “a florzinha”, pela ajuda durante toda prática do meu projeto. Sempre que precisei você estava lá pronta para ver minhas lâminas e placas.

A Bia pela ajuda na análise epidemiológica.

As técnicas do Laboratório de Parasitologia do Hospital de Clínicas, Alessandra, Geralda, Márcia, Pollyanna, Regina, Rosânia, pelas coletas das amostras.

Aos meus grandes mestres, Prof. Fernando Ferreira e Prof. José Eugênio, que me fizeram apaixonar pela clínica médica dos animais.

A Dra. Maria Bernadete, médica pediátrica e Dra. Mariana, Residente de pediatria, pela ajuda na coleta de dados no Hospital de Clínicas.

Aos residentes do Hospital Veterinário, em especial ao Matheus, Luiz e Thaís e a Dra. Suzana pela ajuda na coleta de material.

Ao Prof. Heriberto Fernandez por aceitar o convite, tenho certeza que o seu conhecimento vai acrescentar muito ao meu trabalho.

A todos os animais e crianças que foram o objeto de estudo deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE ANEXOS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	2
3 REFERENCIAL TEÓRICO	3
3.1 Classificação e Características do gênero <i>Campylobacter</i>	3
3.2 Patogenia	4
3.3 Transmissão e Sinais Clínicos	7
3.4 Epidemiologia	7
3.5 Diagnósticos Laboratoriais	14
3.6 Tratamento e Medidas Profiláticas	16
4 MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 Isolamento e Identificação de <i>Campylobacter</i> spp.	20
4.2 Biotipificação de <i>Campylobacter</i> spp.	22
4.3 Identificação de <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> por PCR – multiplex	22
4.4 Determinações dos genes de virulência	23
4.5 Suscetibilidades aos antimicrobianos	24
4.6 Análises dos resultados	25
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1 Isolamento, Identificação e Biotificação de <i>Campylobacter</i> spp.	26
5.2 Suscetibilidades aos antimicrobianos	29
5.3 Genes de virulência	31
5.4 Fatores de Risco para infecção por <i>Campylobacter</i> spp.	33
5.4.1 Crianças até cinco anos	33
5.4.2 – Animais	37
6 CONCLUSÃO	41
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
8 ANEXOS	54

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
1 PCR – Multiplex das amostras isoladas (M) Marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder - Invitrogen®), (C-) controle negativo, (C1+) controle positivo para <i>Campylobacter jejuni</i> , (C2+) controle positivo para <i>Campylobacter coli</i> , – 1A caninos - (C1 – C15) amostra de <i>Campylobacter jejuni</i> , (C16, C18 – C20) amostra de <i>Campylobacter coli</i> , (C17) <i>Campylobacter gracilis</i> ; 1B – felinos –(G1 – G2) amostra positiva para <i>Campylobacter coli</i> ; 1C –humanos - (H2 – H5) amostra de <i>Campylobacter jejuni</i> , (H1, H8-H11) amostra de <i>Campylobacter coli</i> , (H6, H7) <i>Campylobacter gracilis</i> .	27
2 2A - C1 – C4, C7: <i>Campylobacter jejuni</i> portadores do gene <i>flaA</i> isoladas de cães; 2B – H2 – H5: estirpes de <i>Campylobacter jejuni</i> portadores do gene <i>flaA</i> isoladas de crianças. (M) Marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder -Invitrogen); (C+) Controle positivo (1728pb); (C-) Controle negativo.	31
3 3A - C1–C3: <i>Campylobacter jejuni</i> portadores do gene <i>pdlA</i> isoladas de cães; 3B –H2: <i>Campylobacter jejuni</i> portador do gene <i>pdlA</i> isolada de criança. (M) Marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder -Invitrogen), (C +) Controle positivo (385pb); (C -) Controle negativo.	32
4 4A - C1 – C6, C8: <i>Campylobacter jejuni</i> portadores do gene <i>cadF</i> isoladas de cães; 4B – H2 – H5: <i>Campylobacter jejuni</i> portadores do gene <i>cadF</i> isoladas de crianças. (M) Marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder -Invitrogen); (C+) Controle positivo (400pb); (C-) Controle negativo.	32
5 5A - C1, C2 e C8: <i>Campylobacter jejuni</i> portadores do gene <i>ciaB</i> isoladas de cães; 5B – H2 – H4: <i>Campylobacter jejuni</i> portadores do gene <i>ciaB</i> isoladas de crianças. (M) Marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder -Invitrogen); (C+) Controle positivo (527pb); (C-) Controle negativo.	32

LISTA DE TABELAS

	Pág.
1 <i>Primers utilizados na identificação de <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>.</i>	22
2 <i>Primers para identificação dos genes de virulência <i>flaA</i>, <i>cadF</i> e <i>pldA</i> de <i>Campylobacter jejuni</i></i>	23
3 <i>Identificação das espécies de <i>Campylobacter</i> spp. isoladas de fezes de cães e gatos atendidos no HVet e crianças de até 5 anos atendidas no HC, de julho de 2010 a março de 2011.</i>	27
4 <i>Biotipificação de <i>Campylobacter jejuni</i> e <i>Campylobacter coli</i> isolados de fezes de cães e gatos atendidos no HVet e crianças de até 5 anos atendidas no HC, de julho de 2010 a março de 2011.</i>	28
5 <i>Resistência aos antimicrobianos de espécies de <i>Campylobacter</i> spp. isoladas de fezes de animais <i>pets</i> atendidos no HVet de julho de 2010 a março de 2011.</i>	29
6 <i>Resistência aos antimicrobianos de espécies de <i>Campylobacter</i> spp. isoladas de fezes de crianças de até 5 anos atendidas no HC-UFU de julho de 2010 a março de 2011.</i>	30
7 <i>Ocorrência de genes de virulência em <i>Campylobacter jejuni</i> isolados de fezes de animais <i>pets</i> atendidos no HVet e de crianças até 5 anos atendidas no HC, de julho de 2010 a março de 2011.</i>	33
8 <i>Associação entre a presença de diarréia e positividade para <i>Campylobacter</i> spp. nas fezes de crianças de até 5 anos atendidas no HC-UFU de julho de 2010 a março de 2011.</i>	34
9 <i>Associação entre o contato com <i>pets</i> e positividade para <i>Campylobacter</i> spp. nas fezes de crianças de até 5 anos atendidas no HC-UFU de julho de 2010 a março de 2011.</i>	35
10 <i>Associação entre o uso de antibioticoterapia e a positividade para <i>Campylobacter</i> spp. nas fezes de crianças de até 5 anos atendidas no HC-UFU de julho de 2010 a março de 2011.</i>	36
11 <i>Associação entre sintomas clínicos de diarréia e positividade para <i>Campylobacter</i> spp. nas fezes de animais <i>pets</i> atendidos no HVet de julho de 2010 a março de 2011.</i>	37
12 <i>Associação entre o uso de antimicrobianos e positividade para <i>Campylobacter</i> em fezes de animais <i>pets</i> atendidos no HVet de julho de 2010 a março de 2011.</i>	38
13 <i>Relação entre a resistência aos antimicrobianos e a presença de genes de virulência em <i>Campylobacter jejuni</i> isolados de fezes de animais <i>pets</i> atendidos no HVet e de crianças até 5 anos atendidas no HC, de julho de 2010 a março de 2011.</i>	38
14 <i>Associação entre a presença de genes de virulência em <i>C. jejuni</i> e a ocorrência de diarréia em crianças de até cinco anos atendidas no HC e <i>pets</i> atendidos no HVet, de julho de 2010 a março de 2011.</i>	40

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
I Termo de consentimento livre e esclarecido solicitado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais.	54
II Termo de consentimento livre e esclarecido solicitado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos.	56
III Inquérito epidemiológico dos animais atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia.	58
IV Questionário Clínico das crianças conviventes com os animais <i>pets</i> atendidos no H-Vet da UFU.	61
V Inquérito epidemiológico das crianças atendidas nos Setores de Pronto Socorro e Pronto Atendimento do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.	63

OCORRÊNCIA E SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE *Campylobacter* spp. EM CÃES, GATOS, CRIANÇAS E SUA IMPORTÂNCIA ZOONÓTICA

RESUMO – As espécies de *Campylobacter* são os agentes etiológicos mais incriminados nos casos de gastroenterite humana. A principal forma de infecção dos humanos é o consumo de alimentos de origem animal e água contaminada, porém, estudos são necessários para o melhor entendimento da epidemiologia e dos fatores risco para a infecção de humanos e animais por estes microrganismos. Foram coletadas e analisadas para a presença de *Campylobacter* spp., amostras de fezes de 160 crianças de até cinco anos e 120 amostras de pets (103 cães e 17 gatos) atendidos no Hospital de Clínicas e Hospital Veterinário, respectivamente, da Universidade Federal de Uberlândia. A positividade foi de 6,87% entre as amostras humanas e 18,3% entre as amostras de animais, com 100% de concordância entre os resultados obtidos pelo método fenotípico e genotípico. Das 33 amostras de fezes positivas para *Campylobacter* spp., 57,6% foram identificadas como *C. jejuni* (15 de caninos e quatro de crianças), 33,4% como *C. coli* (quatro de caninos, duas de felinos e cinco de crianças) e 9% como *Campylobacter gracilis* (um cão e duas crianças). O biótipo mais prevalente foi o *C. jejuni* biótipo I, com 13 isolados, seguido pela *C. coli* biótipo I com 11 isolados. Houve resistência de mais de 50% das cepas isoladas de cães ao ceftiofur, sulfazotrim, norfloxacina e tetraciclina. Dentre as cepas isoladas de humanos destacaram-se as resistências à amoxicilina, cefazolina, ceftiofur, eritromicina e norfloxacina. Não houve diferenças ao perfil de resistência entre as espécies *C. coli* e *C. jejuni* ($p>0,05$). Técnica de PCR demonstrou que entre as 19 cepas de *C. jejuni* isoladas, 12 apresentavam dois a quatro dos genes de virulência *flaA*, *pdIA*, *cadF* ou *ciaB*. Entre as cepas isoladas de caninos, uma apresentou os quatro genes simultaneamente, duas possuíam três genes e duas um gene, as demais possuíam dois genes. Dentre as cepas isoladas de fezes humanas todas apresentaram os genes *flaA* e *cadF* e somente uma amostra tinha o gene *pdIA* e duas o gene *ciaB*. Todas as cepas que apresentaram os genes de virulência foram isoladas de fezes de animais ou crianças com diarréia. Foi observado nas amostras isoladas de cães e gatos um alto índice de resistência ao sulfazotrim, com valores de 66,7% e 100% respectivamente. Nas amostras isoladas das crianças os valores de resistência mais preocupantes foram encontrados para a eritromicina e

norfloxacina. Estes dados demonstram a necessidade de monitoramento quanto o uso desses antimicrobianos já que eles são a droga de eleição para tratamento das gastrenterites em animais e da campilobacteriose em humanos, respectivamente. A associação de fatores de risco e infecção por *Campylobacter* spp. em crianças demonstrou: aumento da probabilidade de 3,57 vezes de ter diarréia, 0,49 vezes mais chances quando em contato com pets e 1,4 vezes mais provável quando em antibioticoterapia, porém, todos sem significância estatística ($p>0,05$). Quando as mesmas associações foram realizadas para caninos, as probabilidades aumentaram 7,38 vezes para a presença de diarréia e 57,41 mais chances quando em uso de antibióticos ($p<0,05$). A presença dos quatro genes de virulência nas cepas isoladas de cães aumentou em 11,36 vezes a probabilidade de o animal ter diarréia ($p<0,05$). Apesar de não ter havido neste estudo uma associação positiva entre o convívio com pets e a infecção de crianças por *Campylobacter* spp. novas investigações mais abrangentes devem ser realizadas, assim como, deve-se estabelecer a relação epidemiológica por métodos moleculares entre cepas isoladas de infecções humanas e animais.

Palavras-chave: *pets*, infecção, *Campylobacter*, epidemiologia, genes de virulência, fatores de risco.

***Campylobacter* spp. OCORRENCE AND ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY IN DOGS, CATS, CHILDREN AND THEIR ZOONOTIC IMPORTANCE**

ABSTRACT – The *Campylobacter* species are the etiologic agents incriminated in most cases of human gastroenteritis. The main way of human infection is the consumption of animal risen food and contaminated water, but studies are required to better understand the epidemiology and risk factors for the infection of humans and animals by these organisms. They have been collected and analyzed for the presence of *Campylobacter* spp., faeces samples from 160 children under five years old and 120 samples from pets (103 dogs and 17 cats) met at the Clinical Hospital and Veterinary Hospital, respectively, at Federal University of Uberlândia. The positivity was 6.87% among the human samples and 18.3% among the animal samples, with 100% of agreement between the results obtained through phenotypic and genotypic methods. From the 33 positive faeces samples for *Campylobacter* spp., 57.6% were identified as *C. jejuni* (fifteen from dogs and four from children), 33.4% as *C. coli* (four from dogs, two from cats and five from children) and 9% as *Campylobacter gracilis* (one from dog and two from children). The most prevalent biotype was *C. jejuni* biotype I, with 13 isolated samples, followed by *C. coli* biotype I with 11 isolated ones. There was resistance from more than 50% of the strains isolated from dogs to ceftiofur, sulfazotrim, norfloxacin and tetracycline. Among the strains isolated from humans samples could be headlined the resistance to amoxicillin, cefazolin, ceftiofur, erythromycin, and norfloxacin. There were no differences in resistance profile between the species *C. coli* and *C. jejuni* ($p > 0.05$). The PCR technique showed that among 19 isolated strains of *C. jejuni*, 12 had between two and four of the virulence genes: *flaA*, *pdlA*, *cadF* or *ciaB*. Among the isolated strains from canine, one of them has shown the four genes simultaneously, two strains had three genes and two of them had one gene, all the others had two genes. Among the isolated strains from human faeces, all of them had the *flaA* and *cadF* genes, only one sample contained the *pdlA* gene and two of the strains had the *ciaB* gene. All the strains that showed the virulence genes have been isolated from faeces of animals or children with diarrhea. It was observed a high rate of resistance to sulfazotrim in isolated sample from dogs and cats, with values of 66.7% and 100%

respectively. Among the children isolated samples the most troubling resistance values were found to erythromycin and norfloxacin. This data demonstrates the need to follow the use of antimicrobials as they are the drug of choice for gastroenteritis treatment in animals and campylobacteriosis in humans, respectively. The association of risk factors and infection of *Campylobacter* spp. in children demonstrated: an increase of 3.57 times probability to have diarrhea, 0.49 times more, when in contact with pets and 1.4 times more, during an antibiotic therapy, but in all of them there was no statistical significance ($p > 0.05$). When the same associations were created for dogs, the odds increased 7.38 times for the presence of diarrhea and 57.41 more chances when on antibiotic use ($p < 0.05$). The presence of the four virulence genes in dogs isolated strains increased by 18.33 times the probability of the animal get diarrhea ($p < 0.05$). Although, in this study, there has been no positive association between contact with pets and children infected by *Campylobacter* spp., further investigation should be made such as it must be established the epidemiological relationship by molecular methods for isolated strains from human and animal infections.

KEYWORDS: *pets*, *infection*, *Campylobacter*, *epidemiology*, *virulence genes*, *risk factors*

1 – INTRODUÇÃO

Nos seres humanos, *Campylobacter* é a mais freqüente causa bacteriana de enterite alimentar (EFSA, 2009; EFSA, 2010). A espécie *Campylobacter jejuni* é o agente etiológico mais incriminado, com contribuições menores para *C. coli* e *C. lari* (ALLOS, 2001; TAUXE et al., 1987). O papel da *Campylobacter* como um patógeno entérico em cães é muito menos evidente. Nestes animais, a bactéria é freqüentemente isolada tanto de animais com sintomas de enterite quanto de animais assintomáticos (BAKER et al, 1999; HALD, MADSEN, 1997; MOSER et al., 2001; SANDSTEDT et al., 1981).

O alimento é reconhecido como o veículo mais frequentemente envolvido na transmissão de *Campylobacter* para os seres humanos em países desenvolvidos (MURPHY et al., 2006; EFSA, 2009). Porém, além da ingestão de alimentos e água contaminados, o contato direto com animais portadores pode ser uma possível fonte de infecção por *Campylobacter jejuni* (DAMBORG et al., 2004; HOUF, 2008).

Pets como cães e gatos estão cada vez mais presentes na convivência familiar, particularmente em residências com crianças. Em muitos casos, o contato dos animais com crianças e adultos é bastante íntimo, e no caso dos *pets* estarem infectados com bactérias zoonóticas, essas podem ser transmitidas aos humanos por contato direto ou por fômites.

A importância de *Campylobacter* spp. na saúde pública e a possibilidade do contato com animais domésticos ser um possível fator de risco para a infecção de humanos com este agente justificam este estudo. Há falta de informações consistentes sobre os aspectos epidemiológicos referentes à distribuição das espécies e biótipos deste gênero que infectam *pets* e a real importância destes animais como fonte de infecção aos seres humanos no Brasil. O entendimento dos diferentes aspectos relacionados à epidemiologia da *Campylobacter* spp. em cães e gatos permitirá a sugestão de medidas visando prevenir a infecção de proprietários, outros conviventes e profissionais na área de medicina veterinária, e ainda, nortear os tratamentos e cuidados que devem ser dispensados aos animais.

2 – OBJETIVOS

Identificar em cães e gatos atendidos no Hospital Veterinário e em crianças de até cinco anos atendidas no Hospital de Clínicas:

- a presença de *Campylobacter* spp. nas fezes;
- as espécies e biótipos prevalentes;
- estabelecer possíveis associações entre o isolamento de *Campylobacter* spp. em fezes e distúrbios gastrointestinais;
- determinar fatores de risco relacionados à infecção por *Campylobacter* spp.;
- verificar nas cepas isoladas a presença dos genes de virulência relacionados com aderência e produção de toxinas;
- determinar a suscetibilidade aos antimicrobianos nas espécies isoladas, com ênfase nas drogas indicadas no tratamento da infecção;
- associar a presença de genes de virulência com a resistência aos antibióticos das cepas isoladas e a presença e gravidade de distúrbios gastrointestinais.

3 – REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 – Classificação e Características do gênero *Campylobacter*

A família *Campylobacteraceae* está constituída pelos gêneros *Campylobacter*, *Arcobacter* e *Sulfurospirillum*. Os dois primeiros gêneros contêm espécies patogênicas para o homem e animais, enquanto o gênero *Sulfurospirillum* está formado por espécies de vida livre isoladas de ambientes aquáticos (FERNANDEZ, 2008).

As espécies do gênero *Campylobacter* são de natureza zoonótica, cuja morfologia microscópica conserva as características morfológicas gerais dos membros da família (FERNANDEZ, 2008). Podem ser isoladas dos tratos intestinal e genital de animais domésticos e têm ampla distribuição geográfica. As principais doenças associadas à infecção são intestinais, apresentando-se como diarréia, ou genitais, que causam infertilidade ou aborto (QUINN et al., 2005).

Campylobacter spp. são bactérias na forma de bastonetes, negativas à reação de Gram, encurvadas ou espiraladas, não-esporuladas, com tamanho variável entre 0,5µm a 0,8µm por 0,2µm a 0,5µm. Apresentam flagelos polares, arranjo típico em forma de “S” ou asa de gaivota quando duas células formam pequenas cadeias e motilidade característica (movimento saca-rolhas ou vaivém). Preferem condições microaerófilas, requerendo concentrações de 3% a 10% de oxigênio e concentração de dióxido de carbono de 3% a 5% para crescimento (FORSYTHE, 2002; HOLT, 1994). São oxidase positiva e urease negativa. Células em culturas velhas podem assumir formas arredondadas ou cocóides conhecidas como VNC - viáveis e não cultiváveis (WHO, 2000).

A sensibilidade a pH inferior a 5,1, à desidratação, luz solar direta e a maioria dos desinfetantes são características do gênero *Campylobacter*. Possuem plasmídeos R, que frequentemente medeiam resistência a tetraciclinas. A atividade de água ideal é de 0,997. O congelamento é capaz de reduzir fortemente o número destes microrganismos, porém, após a redução brusca que ocorre no início do congelamento, as células sobreviventes podem permanecer viáveis durante muitas semanas (FRANCO et al., 2004). Essa prática, porém, não elimina o microrganismo (KEENER et al., 2004; LEE et al., 1998).

O metabolismo energético de *Campylobacter* spp. é oxidativo, porém, não utiliza carboidratos como fonte de energia, sendo esta derivada da oxidação de aminoácidos ou ácidos intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico. São inativados na maioria das provas bioquímicas convencionais e crescem em um intervalo de temperatura pouco comum para bactérias (37°C-42°C), sendo considerados termotolerantes. Entretanto, não são termoresistentes, sendo facilmente destruídos pela pasteurização (GERMANO; GERMANO 2001). Não sobrevivem a tratamentos térmicos nas seguintes condições: D50°C = 0,88 minutos a 1,63 minutos e D55°C = 0,7 minutos a 1 minuto, nem ao aquecimento a 60°C por 10 minutos (FORSYTHE, 2002).

3.2 – Patogenia

C. jejuni é um microrganismo enteropatogênico que eventualmente invade a circulação, causando infecção em diferentes órgãos. Porém, isto ocorre nos primeiros estágios da doença já que, como é sensível ao poder bactericida do soro humano, rapidamente é eliminado da circulação. A infecção intestinal localiza-se nos intestinos delgado e grosso, onde a bactéria adere e prolifera. Os fatores de virulência podem ser componentes estruturais ou toxinas. O passo inicial para que possa ocorrer à infecção é a adesão (TRABULSI, 1981).

Campylobacter não possui fímbrias, porém, tem-se demonstrado que elementos estruturais como o flagelo, algumas proteínas de membrana externa e o LPS (lipopolissacarídeo) atuam como adesinas que permitem a adesão da bactéria à célula epitelial e ao muco intestinal. A forma curvada e espiralada, com movimento típico em “saca-rolha” em conjunto com a atração quimiotática que exerce o muco intestinal sobre a bactéria, facilita o contato desta com o epitélio do intestino. A adesão pode ser inibida, experimentalmente, por anticorpos específicos antiflagelos e, naturalmente, pelo colostro (FERNANDEZ, 2008).

Em alguns pacientes humanos, a campilobacteriose ocorre como uma diarréia exsudativa não deixando dúvida de que *C. jejuni* invade a mucosa intestinal, determinando também, ulceração e diarréia mucossanguinolenta com presença de leucócitos nas fezes (THOMPSOM et al., 1992).

A capacidade do *C. jejuni* para invadir a célula intestinal hospedeira é um mecanismo patogênico que envolve tanto fatores bacterianos como fatores da célula

hospedeira. A inflamação e a bacteremia produzidas por estas bactérias sugerem que a invasão celular seja um importante fator de patogenicidade (PARK, 2002).

Embora os mecanismos pelos quais *C. jejuni* invade as células epiteliais sejam precisos, estes ainda não estão completamente definidos. Acredita-se que processos dependentes de microfilamentos de actina e outros que envolvem a formação de microtúbulos sejam responsáveis pela internalização. Também, certas proteínas sintetizadas pelo *C. jejuni*, depois de entrarem em contato com células eucarióticas poderiam facilitar a internalização da bactéria (FERNANDEZ, 2008).

Os genes *flaA*, *ciaB*, *cadF* e *pldA* são de referência no estudo dos mecanismos de patogenicidade de *C. jejuni* (HÄNEL et al., 2004; ZHENG et al., 2006). Esses genes codificam proteínas envolvidas na adesão e na capacidade invasiva de *C. jejuni* e podem, portanto, ser considerados como possíveis fatores de virulência desta espécie. O gene *flaA*, que codifica flagelina, é necessário para a adesão e invasão de *C. jejuni* nas células epiteliais (WASSENAAR et al., 1991). O gene *ciaB* codifica uma proteína envolvida na invasão celular (RIVERA-AMILL et al., 2001), enquanto *cadF* codifica uma proteína que interage com a fibronectina da matriz extracelular do hospedeiro, participando da colonização da superfície celular (MONTEVILLE et al., 2003). O gene *pldA* está relacionado à invasão celular e codifica uma proteína envolvida na síntese de fosfolipase da membrana externa (ZIPRIN et al., 2001).

A infecção por *Campylobacter* é acompanhada, na maioria das vezes, de aumento de títulos séricos de IgA, IgM e IgG. As primeiras a aparecer, aproximadamente ao sexto dia, são a IgA e a IgM. A IgG aparece em torno do décimo segundo dia. Estes anticorpos atingem os títulos mais altos por volta da terceira semana. A primeira a desaparecer, em torno da quarta ou quinta semana, é a IgA; em seguida, a IgM, a qual é detectável por três meses aproximadamente e, finalmente, a IgG que pode ser encontrada no soro depois de três a seis meses de ocorrida à infecção. Por esta razão, a detecção de IgA específica em uma única amostra de soro é útil para estabelecer infecção recente. Porém, para pesquisas sorológicas mais apuradas, as duas primeiras imunoglobulinas específicas devem ser estudadas em pelo menos duas amostras de soro, uma na fase aguda e outra entre duas a três semanas depois. Isto é importante para poder associar a participação de *Campylobacter* em casos de Guillain – Barré (FERNANDEZ, 2008).

Há evidências de que os anticorpos anti *Campylobacter* podem determinar um período de excreção mais curto, bem como impedir o aparecimento de manifestações clínicas em muitos portadores da bactéria. Em países em desenvolvimento, onde o contato com a bactéria é precoce e as oportunidades de infecção e reinfecção são maiores, encontram-se altos títulos de IgA que persistem mais do que as IgGs. Esta resposta é induzida pelo flagelo ou outros抗ígenos de superfície, que parecem ser importantes no estabelecimento de *C. jejuni* no intestino de portadores assintomáticas de *Campylobacter* (FERNANDEZ, 2008).

Não há consenso de opiniões a respeito ao modo de infecção por *Campylobacter*. Porém, Franco et al. (2004) afirmam que o mecanismo pelo qual o microrganismo causa a doença é multifatorial, sendo a adesão à mucosa intestinal indispensável.

A patogenicidade de *C. jejuni* envolve condições do hospedeiro e determinados fatores de virulência específicos. O estado de saúde e a idade da pessoa acometida pelo microrganismo, bem como a imunidade humoral específica para *C. jejuni* obtida de infecções anteriores influenciam na resposta clínica do paciente. Estima-se que a quantidade de células de *Campylobacter jejuni* necessárias para causar infecção seja pequena, na ordem de 400-500 células, variando entre indivíduos. Tal fato sugere um elevado potencial de infecção dado que apenas um pequeno número destas células presentes na água ou alimentos pode provocar um potencial risco para a saúde pública. O período de incubação é estimado em um a sete dias, podendo se prolongar até dez dias (ALMEIDA FILHO et al., 2007).

Segundo Ynterian (2002), em torno de 500 células de *Campylobacter jejuni* é suficiente para causar doenças em humanos com seqüelas, como a Síndrome de Guillain-Barré, uma paralisia de várias semanas que exige internação e pode causar a morte.

Aspectos suspeitos de patogenicidade de *Campylobacter* incluem a motilidade por meio de flagelos, os quais são requeridos para ataque e colonização da mucosa intestinal. Uma vez ocorrida a colonização, outros possíveis fatores de virulência são o seqüestro de ferro, necessário à produção de enterotoxina (SMITH, 1995), invasão celular, produção de toxina, inflamação e secreção ativa, por meio de ativação da adenosina monofosfato (AMP cíclico), com consequente destruição epitelial e extravasamento de fluido para a luz intestinal (ALTEKRUSE et al., 1999).

3.3 – Transmissão e Sinais Clínicos

Em humanos a campilobacteriose é uma zoonose geralmente veiculada por alimentos, caracterizada por uma gastrenterite aguda, febre, dores abdominais e diarréias aquosas ou mucosanguinolentas, que pode ocorrer de forma branda ou severa, apresentando ainda um quadro inflamatório na mucosa entérica, vômitos e presença de leucócitos no exame fecal (YNTERIAN, 2002). Outros sintomas incluemcefaléia, mal estar e dores musculares (GERMANO; GERMANO, 2001). A doença normalmente se estende por duas semanas, sendo auto-limitante, porém, após a recuperação pode haver recidiva. Em longo prazo pode haver sérias complicações pós infecção, entre as quais se destacam: meningite, protocolite, septicemia, apendicite, colecistite e pancreatite (MOORE et al., 2005). Outra consequência importante é o desenvolvimento de edema de cólon, o qual pode provocar o impedimento do trânsito intestinal (GERMANO; GERMANO, 2001).

C. jejuni é um dos microrganismos responsável pela indução de um tipo de artrite, chamada artrite reativa, que se desenvolve depois de dias ou semanas de uma infecção originária de um sítio não articular, normalmente o trato entérico ou urinário. A gastroenterite provocada por alguns sorotipos de *Campylobacter* spp. é responsável por raros casos de polineurite aguda marcada por paralisia, muita dor e fadiga muscular, conhecida como Síndrome de Guillain-Barré, que pode levar o indivíduo a morte (SMITH, 1995).

A transmissão da campilobacteriose pode ocorrer através da ingestão de água ou alimento contaminado. O patógeno pode sobreviver fora do hospedeiro por duas a cinco semanas no leite ou na água, ou por até um mês, em fezes infectadas (BLASER; RELLER, 1981; BLASER et al., 1980). A transmissão também ocorre por contato direto com animais infectados ou doentes e há relato de ocorrência em que a transmissão aconteceu por contato sexual (GERMANO; GERMANO, 2001).

3.4 – Epidemiologia

Campylobacter ganhou importância epidemiológica devido à crescente incidência mundial (EFSA, 2009; EFSA, 2010; YNTERIAN, 2002). O microrganismo é encontrado no trato intestinal de homens e de grande variedade de animais domésticos e silvestres (AQUINO et al., 1996; FORSYTHE, 2002) como pássaros,

roedores e insetos, que podem albergar o microrganismo em seus exoesqueletos (ALTEKRUSE et al., 1999). Pode ser isolado também de órgãos reprodutivos. A susceptibilidade à enterite por *Campylobacter* spp. compreende pessoas sensíveis, crianças menores de quatro anos, jovens de 15 a 24 anos, idosos e imunocomprometidos, apesar de todas as pessoas poderem contrair a campilobacteriose (GERMANO; GERMANO, 2001).

As fezes de aproximadamente 10% dos cães assintomáticos e 5% dos gatos assintomáticos contêm *C. jejuni*. Estas porcentagens podem ser mais altas nos animais adquiridos de canis (HIRSH; ZEE, 2003).

Steinhausserova, Fojtikova, Klimes (2000) estudaram a incidência de *C. upsaliensis* entre cães e gatos com diarréia aguda ou crônica. Foram examinados 225 cães e gatos e 51 estirpes foram identificadas como *Campylobacter* spp. Destas, 16 (7%) eram *C. upsaliensis*. Quando amostras retais foram coletadas de um grupo controle de 126 cães e gatos sem sintomas clínicos, 19 *Campylobacter* spp. e quatro *C. upsaliensis* foram identificados. Todas as estirpes de *C. upsaliensis* foram isoladas em cães e identificadas por suas características bioquímicas e por PCR (reação em cadeia da polimerase).

O *C. upsaliensis* causa diarréia e bacteremia em pessoas saudáveis ou imunocomprometidas. A presença de plasmídeos idênticos nas amostras de *C. upsaliensis* isolados de cães e do homem sugere que essas infecções são zoonoses (MODOLLO; GIUFFRIDA, 2004).

Testes de suscetibilidade aos antimicrobianos realizados em um estudo na Noruega para infecção por *Campylobacter* em cães e gatos mostraram que uma das 22 amostras *C. jejuni* e 18 das 20 amostras de *C. upsaliensis* investigadas eram resistentes a estreptomicina e uma das amostras de *C. upsaliensis* foi classificada como resistente ao ácido nalidíxico. Nenhum dos isolados testados foi resistente a ciprofloxacina. Isto provavelmente reflete uma restrição na utilização de quinolonas em gatos e cães na Noruega (SANDBERG et al., 2002). O programa de monitoramento norueguês para a resistência microbiana relata um aumento na resistência às quinolonas apenas em *Campylobacter* isoladas de humanos (MELBY, 2001).

Nos Estados Unidos um estudo conduzido para avaliar a resistência à quinolona em uma amostra de *Campylobacter* isolada de pacientes com campilobacteriose no município de Los Angeles, Califórnia, em 1998, mostrou que

não foram observadas diferenças nos padrões de resistência para a ciprofloxacina. O estudo demonstrou também que a segunda espécie mais freqüentemente isolada era *C. upsaliensis*, 4% (6/155 isolados).

Este estudo discute que a capacidade dos laboratórios em recuperar esta espécie pode ser dependente das condições de cultura e dos meios utilizados. Laboratórios que utilizaram um período de incubação de 48-72 horas conseguiram isolar *C. upsaliensis* mais facilmente e que os laboratórios que utilizaram incubação de 24-36 horas, que não conseguiram isolar esta espécie.

Além disso, alguns laboratórios utilizavam a cefalotina nos meios de cultivo, o qual o *C. upsaliensis* se mostra suscetível. Dos seis pacientes em quem o *C. upsaliensis* foi isolado (todos os isolados apresentaram diferentes padrões revelados por eletroforese de gel em campo pulsado), cinco possuíam animais de estimação em casa. Três cães que viviam nos agregados familiares de dois destes seis pacientes tiveram o *C. upsaliensis* isolados em suas amostras de fezes, porém não foi observado clonalidade na caracterização molecular (LABARCA et al., 2002).

Sandberg et al. (2006) avaliaram o aumento na incidência de campilobacteriose em humanos durante os anos de 1995 a 2001 e a significância de diferentes fatores de risco para aquisição da infecção em diversos condados da Noruega. Concluíram que o aumento na incidência de infecções em seres humanos por *Campylobacter* foi estatisticamente significativo a partir de 1998 devido ao aumento no consumo de produtos de origem aviária e ao maior contato com animais domésticos. Já a água tratada foi um fator protetor contra infecções por *Campylobacter* em seres humanos, pois neste ano o serviço de saneamento básico foi intensificado.

Um estudo transversal foi realizado na Suíça para determinar a prevalência, fatores de risco e diversidade genética de *Campylobacter* em cães e gatos saudáveis. O fator de risco identificado para a infecção por *C. jejuni* foi a ingestão de produtos de origem animal contaminados, considerado diferente do fator de risco para infecção por *C. upsaliensis* / *C. helveticus*, que era o contato com outros animais de estimação.

Os animais jovens (≤ 3 anos) tiveram significativamente maiores chances de ter *C. upsaliensis* / *C. helveticus* do que animais mais velhos enquanto que para infecção por *C. jejuni*, a idade não foi um fator de risco. A genotipagem revelou heterogeneidade entre as cepas de *C. jejuni* e foi suficiente para diferenciar

claramente *C. helveticus* de *C. upsaliensis*. Foi demonstrado que os gatos transportam mais frequentemente *C. helveticus* enquanto que cães transportam principalmente *C. upsaliensis* (WIELAND et al., 2005).

A prevalência de espécies termófilas de *Campylobacter* em cães e gatos em dois abrigos de animais na Irlanda foi calculada. As amostras para análise foram coletadas por *swabs* retais, em animais de faixa etária variada, com ou sem sinal de gastrenterite. O percentual de isolamento foi maior em cães e gatos com menos de seis meses de idade e significantemente maior em cães quando comparado aos gatos (ACKE et al., 2006).

Fernandez e Martin (1991) estudaram no Sul do Chile a distribuição natural de espécies termotolerantes de *Campylobacter* em cães de rua e de estimação. Foi coletado material fecal através de *swab* anal e nenhum dos animais amostrados apresentava sintomatologia de distúrbios gastrointestinais. Todos os biótipos descritos por Lior para *C. jejuni* e *C. coli* foram encontrados entre as amostras isoladas de cães de rua, com freqüências de 38,9%, 29,6% e 60,9%, respectivamente, para *C. jejuni* biótipo I, *C. jejuni* biótipo II e *C. coli* biótipo I. Entre os cães de estimação a distribuição dos biótipos foi de *C. jejuni* biótipo I e II (55,6% e 44,4% respectivamente) e *C. coli* biótipo II (100%).

A prevalência e os fatores de risco para infecção por *C. jejuni* em animais de uma região com necessidades básicas precárias na cidade de Buenos Aires foram pesquisadas. Para o estudo foi realizado um censo para identificar todas as residências que tinham animais de companhia (cães, gatos e aves) e coletadas amostras de fezes para o isolamento e identificação do microrganismo.

A prevalência de infecção foi de 17% nos cães, 16% nos gatos e 19% nas aves. Em cães, as maiores prevalências foram encontradas no verão e em animais de um ano de idade e em gatos, no outono e com idades entre três e cinco anos. Cepas foram identificadas como *C. jejuni* biótipo II em 70% dos isolados. Na população descrita, cães, gatos e aves mantidos em domicílios foram possíveis fontes de infecções por *C. jejuni* para humanos (LÓPEZ et al., 2002).

López e colaboradores (2003) descreveram novamente o problema de campilobacteriose em uma comunidade de baixa renda localizada no sul de Buenos Aires. Para isso realizaram uma classificação das residências de acordo com o número total de habitantes, de crianças e animais existentes e também com a quantidade de carne consumida. As amostras foram colhidas de todos os diferentes

tipos de residências classificadas com o objetivo de isolar e identificar as espécies e biótipos de *Campylobacter* spp.

As prevalências encontradas foram 16,96% em cães, 20% em gatos e 40% nas aves. Os patógenos isolados nos animais domésticos foram: *C. jejuni* tipo II em 94,44% dos casos e *C. upsaliensis* em 5,55% dos casos. Na carne de aves, 92,85% das amostras foram positivas para *C. jejuni* (23,07% para o tipo I e 76,92% para o tipo II). A incidência de diarréia em crianças causada por *C. jejuni* foi 0,4/1000 crianças / mês (tipo I em todos os casos). Com isso os autores concluíram uma alta prevalência de *C. jejuni* do tipo II detectada tanto nos animais de estimação e como na carne de aves. A fonte de infecção em crianças pode ter sido a carne de aves visto que foram identificadas somente as espécies do biótipo I tanto nas crianças como nas aves.

Estudos demonstraram que cerca de 6% dos episódios de campilobacteriose humana é adquirida por meio do contato com *pets* (TENKATE; STAFFORD, 2001). Estes animais podem também representar fontes potenciais de disseminação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos devido aos seus contatos estreitos com seres humanos. Prova direta é a transmissão de resistência do *C. jejuni* à fluoroquinolona entre bactérias isoladas de seres humanos e animais que vivem no mesmo ambiente familiar (GUARDABASSI et al., 2004).

Campylobacter isolados a partir de uma menina de dois anos de idade e seu cachorro foram resistentes ao ácido nalidíxico e ciprofloxacina. Não foi possível estabelecer que esta resistência às quinolonas possuísse a mesma causa que a determinada à resistência de bactéria isolada de um paciente dinamarquês, que foi associada com viagens (EMBORG; HEUER; DANMAP, 2003), indicando que outro fator foi o predisponente.

Tanto a menina como o cão nunca tinham sido tratados com quinolonas, indicando que a cepa não foi selecionada por exposição à droga, mas que a resistência foi adquirida a partir de uma fonte externa. Foi citado como alternativa da aquisição da resistência à quinolona, a exposição ambiental que poderia ser a causa da presença da mesma cepa no hospedeiro animal e humano (cão e menina), ou mesmo que o cão tenha sido alimentado com uma dieta comercial. Outra especulação foi o consumo de um mesmo alimento, já que o cão ocasionalmente ingeria alimentação humana (DAMBORG et al., 2004).

Nos países desenvolvidos, *C. jejuni* não é normalmente encontrado como participante da microbiota intestinal dos humanos, ao contrário dos países em desenvolvimento, como o Brasil, onde tem sido observada a presença deste microrganismo em indivíduos sem sintomatologia clínica. Isso demonstra a existência de portadores assintomáticos. Machado (1995) e Franco et al. (2004) atribuíram este fato ao saneamento básico precário nos países em desenvolvimento.

A transmissão de *Campylobacter* spp. do animal de estimação para o homem foi reconhecida como importante via para a disseminação da infecção. Os casos humanos, em sua maioria, estão associados a cães e gatos diarréicos recentemente adquiridos. Nestes casos, os veterinários devem aconselhar ao dono do animal infectado a prática de medidas higiênicas apropriadas para evitar a disseminação do agente. Entre elas: efetuar uma minuciosa lavagem das mãos após manipular os animais, promover o descarte correto das fezes, limpeza no local onde estes animais depositam suas fezes, e ainda, separar os animais infectados de bebês e crianças pequenas até que as culturas após o tratamento confirmem que a infecção foi eliminada (ETTINGER, 1992).

As consequências econômicas da contaminação por *Campylobacter* são expressivas e agravadas devido ao desencadeamento da Síndrome de Guillain-Barré, doença que causa paralisia neuromuscular, e que está sendo associada a pacientes com campilobacteriose. A morte por infecção sem complicações é rara e ocorre em crianças, idosos e pessoas imunologicamente debilitadas (ALTEKRUSE, 1999). Já Martins (2004) aponta que, nos Estados Unidos, estudos mostram que a infecção gastrointestinal com *C. jejuni* causa uma elevada morbidez e a mortalidade por ano passa de duas mil.

Wolf e colaboradores (2001) relataram um caso de sepse neonatal por *C. jejuni* em uma criança de três semanas que adquiriu a infecção por transmissão de um cão doméstico recentemente adquirido. O genotipagem das estirpes de *Campylobacter* obtidas do cão e da criança resultou em resultados altamente homogêneos, representando o primeiro caso geneticamente comprovado de transmissão (cão-homem) por *C. jejuni*.

Pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) são mais suscetíveis às enterites por *Campylobacter* e possuem menor tempo de sobrevida que pacientes com SIDA sem este tipo de enterite. Um estudo conduzido na cidade de Los Angeles (Estados Unidos) mostrou que a média de incidência de

campilobacteriose em pessoas com SIDA foi de 519 em cada 100.000 indivíduos (SMITH, 1995).

Hackett e Lappin (2003) avaliaram a prevalência de patógenos entéricos em cães no Colorado central e verificaram que entre os agentes com potencial zoonótico detectados em fezes se encontrava o *C. jejuni*. Resultados positivos ocorreram em cães com ou sem sinais de doença gastrointestinal. Os autores recomendam que os cães, especialmente aqueles em casas de pessoas imunodeprimidas, devem ser avaliados para agentes entéricos zoonóticos.

Na Irlanda do Norte, dentro das infecções registradas por *Campylobacter* spp. no país, 95% são atribuídas a *C. jejuni* e os outros 5% ao *C. coli*, demonstrando a importância da espécie *C. jejuni* (MARTINS, 2004). Na Nova Zelândia, o número de casos de campilobacteriose reportados tem aumentado significativamente, sendo que o país é considerado como de alta incidência da infecção (EVANS, 2003).

Na Austrália, o número de casos de campilobacteriose reportados em 1996 foi de 12.158 casos, 11,2% superior aos identificados no ano anterior (LEE et al., 1998).

Baker, Barton e Lancer (1999) verificaram que a enterite por *Campylobacter* era a doença infecciosa mais freqüentemente notificada em 1996 em humanos e que algumas espécies foram associadas com infecções extra-intestinais tal como artrite séptica e síndrome de Guillain-Barré. Neste estudo, os autores tentaram fornecer informações sobre as espécies de *Campylobacter* nos cães e gatos no sul da Austrália e associar estes animais como possíveis reservatórios. A coleta foi feita em animais que tinham acesso a rua em locais onde se encontravam carcaças de aves e encanamento aberto. Concluíram que a relação entre os fatores de risco e animais como reservatórios os tornam como possíveis fontes de infecções para humanos.

Na Suíça, uma base de dados nacional com 1028 cepas de *Campylobacter* isoladas de aves, suínos, gatos, cães, seres humanos, animais de zoológico e água foi criada. Neste banco são armazenadas informações básicas e moleculares (impressão digital genética) de cada uma das cepas depositadas. Espécies dominantes podem ser identificadas nas diferentes fontes com predominância de *C. jejuni* em: aves (73%), seres humanos (79%), bovinos (95%), jardim zoológico e animais (40%) e água (100%); *C. coli* em suínos (72%), e *C. upsaliensis / helveticus* em gatos e cães (55%). Análises de genotipagem demonstraram que a população é heterogênea entre as diferentes fontes e que não havia um clone dominante no país.

Pode-se afirmar então que a genotipagem e análise epidemiológica são ferramentas úteis para rastrear futuras infecções por *Campylobacter* (KELLER, 2007).

A legislação brasileira ainda não contempla o controle em alimentos do patógeno *C. jejuni* como agente infeccioso. Há apenas citação deste microrganismo na Portaria nº 451, de 19 de setembro de 1997, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 1997) como microrganismo patogênico.

Almeida Filho et al. (2007) investigaram a microbiota intestinal de crianças de até cinco anos de idade na cidade do Rio de Janeiro e verificaram 9,9% de positividade para *Campylobacter* spp. Os autores discutem que nos casos de gastrenterite por *C. jejuni* devem ser levados em consideração, além da doença, o aspecto econômico, pois os custos com pacientes infectados por esta bactéria são elevados.

Smith (1995) relata que os custos de enfermidades com envolvimento de *C. jejuni* é de 3,9 milhões de dólares ao ano nos Estados Unidos. O autor ressaltou que nestes custos não foram computados os casos em que não havia a suspeita clínica do microrganismo levando à condução de tratamentos equivocados. O impacto econômico nestas situações seria sensivelmente mais alto.

Fernandez et al. (2005) sorotipificaram 50 espécimes de *C. jejuni* subsp. *jejuni* isoladas de carcaças de frango e 50 espécimes isolados de fezes de crianças e encontram 17 sorotipos diferentes e seis idênticos. A alta porcentagem de sorotipos sem nenhuma similaridade sugere que no Sul do Chile, não somente a carne de ave é veículo de *C. jejuni* subsp. *jejuni* para humanos, mas outras fontes ou reservatórios não identificados estão envolvidos.

3.5 – Diagnósticos Laboratoriais

3.5.1 – Isolamento e Identificação

O diagnóstico de *Campylobacter* spp. pode ser realizado pelo isolamento e identificação do microrganismo pelas técnicas tradicionais de cultivo em placas. Uma das técnicas que pode ser utilizada é a semeadura das fezes em agar sangue suplementado com misturas de antimicrobianos que suprimem o crescimento de outros microrganismos da microbiota intestinal. Diferentes misturas antimicrobianas podem ser utilizadas, entre as mais comuns as que contêm polimixina B,

vancomicina, cefalotina e trimetoprim. Anfotericina B pode ser incluída com o objetivo de suprimir o crescimento de fungos. Vários outros meios de cultivo seletivos podem também ser utilizados para o cultivo. As placas semeadas são incubadas em atmosfera pobre em oxigênio (microaerofilia estrita, 5% a 6% O₂) a 42°C a 43°C. O emprego de meios seletivos, incubados em temperatura e atmosfera desfavoráveis ao crescimento de bactérias da microbiota fecal facilita o isolamento de *Campylobacter*. O emprego de meios de enriquecimento favorece o isolamento da bactéria, quando esta se encontra em pequena quantidade nas fezes (FERNANDEZ, 2008).

A filtração direta de uma suspensão das fezes, através de um filtro de 0,45 µm de diâmetro dos poros, colocado sobre a superfície de ágar sangue sem antibióticos e incubada em microaerofilia estrita a 37°C, permite o isolamento do *C. jejuni* subsp. *jejuni*, bem como das outras espécies do gênero envolvidas em infecções humanas (FERNANDEZ, 2008).

A identificação do *C. jejuni* e das outras espécies do gênero tem por base sua morfologia, características culturais e propriedades bioquímicas. Foi demonstrado recentemente que a espécie pode ser identificada por meio de aglutinação em lâmina utilizando-se partículas de látex sensibilizadas com anticorpos contra os tipos sorológicos mais freqüentes. A utilização de sondas genéticas e da técnica do PCR (*polymerase chain reaction*) também tem sido proposta com esta finalidade (FERNANDEZ, 2008).

A utilização de múltiplos métodos de isolamento, bem como o tempo decorrido entre colheita e processamento é importante para a detecção de infecções por *Campylobacter* spp. (KOENE et al., 2004). *C. jejuni* é mais frequentemente isolado de animais jovens abrigados em canis, cães vadios, e em cães e gatos com infecção entérica concomitante com parasitas, bactérias ou vírus (FLEMING, 1980; SANDSTEDT; WIERUP, 1981).

Um diagnóstico presuntivo de campilobacteriose pode ser feito pela identificação de bastonetes delgados, espiralados, Gram negativos e em forma de "W" em um esfregaço fecal corado. A presença de leucócitos fecais pode também ser notada. Em esfregaço fresco com solução salina, pode-se tentar identificar *Campylobacter* spp. com o uso de microscopia de contraste de fase ou de fundo escuro. O gênero se apresentará como bactérias altamente móveis e rápidas, em forma de "S" ou espiral, entretanto, não devem ser confundidas com espiroquetas e

outras bactérias móveis que fazem parte da microbiota normal. O diagnóstico definitivo requer isolamento de *Campylobacter* de fezes frescas com meio seletivo e a identificação bioquímica pode ser realizada. *Campylobacter* são microaerófilicos e difíceis de isolar, assim, as amostras fecais devem ser obtidas diretamente do reto e cultivadas ou guardadas em meio de transporte logo após a coleta (TAMS, 2005).

O imunodiagnóstico não é utilizado para doença intestinal produzida por *Campylobacter* e ensaios imunoenzimáticos são utilizados com finalidade epidemiológica. Porém sabe-se que anticorpos circulantes são produzidos após infecção. Não há preparados imunizantes disponíveis para prevenir a gastrite (HIRSH; ZEE, 2003).

Atualmente são utilizados dois esquemas de classificação sorológica para subdividir *C. jejuni* em sorogrupos. Um deles baseia-se na composição dos抗ígenos somáticos termoestáveis (antígeno O) e outro, na composição dos抗ígenos flagelares (H) termolábeis. O último esquema é o mais aceito e permite reconhecer mais de 100 sorogrupos nas espécies termotolerantes. Deles, mais de 60 correspondem a *C. jejuni* e em torno de 90% das amostras isoladas do homem e de animais pertencem aos 25 primeiros sorogrupos desta espécie. Este esquema também é aplicado na classificação sorológica de *C. coli* e *C. lari*. A classificação sorológica destas espécies é de interesse epidemiológico (FERNANDEZ, 2008).

3.6 – Tratamento e Medidas Profiláticas

Embora não tenham sido efetuados ensaios de eficácia clínica em animais há relatos que a eritromicina, que é a droga de escolha para tratamento humano, na dose de 11,1mg/kg a 15,5 mg/kg, por via oral, três vezes ao dia, por sete dias ou a tilosina são capazes de eliminar a infecção por *Campylobacter* em cães e gatos (HOLT, 1981; FLEMING, 1980).

A anorexia e o vômito são efeitos colaterais freqüentes observados após a administração de eritromicina. Outros antibióticos orais efetivos incluem neomicina, enrofloxacina, cloranfenicol, furazolidona e doxiciclina. Embora fatalidades nos cães e gatos sejam eventualmente descritas, o prognóstico é considerado bom e os antibióticos são rapidamente efetivos para interromper a eliminação fecal dos microrganismos (TAMS, 2005). *Campylobacter* isolados também podem ser testados

quanto à resistência aos antibióticos usando o método de diluição em ágar (ROSSI, 2008).

Como a campilobacteriose é geralmente autolimitante, os animais de estimação só necessitam de tratamento se os sintomas clínicos vierem a persistir, e se estes pacientes se tornarem desidratados. Nestes animais, fica recomendada a fluidoterapia e/ou antibioticoterapia. A via oral de administração pode ser usada, visto que de modo geral não ocorre vômito nos episódios de campilobacteriose. As fezes devem ser cultivadas desde uma a quatro semanas pós-terapia para a confirmação da eficácia do tratamento. Deve-se observar que a duração da excreção nos animais de companhia não tratados pode variar entre um e quatro meses (GREENE, 1984).

No norte de Taiwan foi realizado um estudo para investigar a prevalência de *Campylobacter* e de sua susceptibilidade aos antibióticos. Foram coletadas amostras por suabes retais de cães domésticos e vadios. Destes, 2,7% dos cães domésticos e 23,8% dos cães vadios foram positivos para *Campylobacter* spp.. *C. jejuni* foi à espécie mais prevalente (86,8%), seguida por *C. upsaliensis* (9,3%) e *C. coli* (3,9%). Os percentuais de isolamento de *Campylobacter* spp. foram significativamente mais elevados nos cães vadios do que os cães do agregado familiar. A suscetibilidade de *C. jejuni* a oito antimicrobianos foi estudada. Foram observadas resistências a: azitromicina (93,9%), clindamicina (87,9%), eritromicina (81,8%), tetraciclina (78,8%), cloranfenicol (69,7%), ácido nalidíxico (51,5%), gentamicina (33,3%) e ciprofloxacina (18,2%) (TSAL et al., 2007).

Aquino et al. (2002) determinaram a suscetibilidade de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* a nove agentes antimicrobianos utilizando o método de difusão em disco e investigaram a presença de DNA plasmidial por meio da eletroforese em gel de agarose. Os autores verificaram resistência à sulfonamida, norfloxacina, eritromicina, ciprofloxacina, ampicilina, e tetraciclina. Todos os isolados foram sensíveis a gentamicina e cloranfenicol. Os plasmídeos detectados tinham tamanhos variando de 3,4-50 KB.

Lee et al. (2004) testaram a susceptibilidade aos antimicrobianos em *C. jejuni* isolados de alimentos e animais de companhia. Os autores verificaram que nenhum dos isolados era resistente à eritromicina e gentamicina, enquanto que para a ciprofloxacina e tetraciclina houve resistência. Estes resultados confirmaram a eritromicina, como a droga indicada para o tratamento padrão em episódios de

campilobacteriose. Damborg (2004) realizou estudo similar e obteve resultados semelhantes.

Rastall (2004) ao pesquisar fontes alternativas de tratamento para a campilobacteriose verificaram que a utilização de um probiótico (*Lactobacillus acidophilus*) juntamente com um prebiótico (lactosucrose e fructo-oligosacáridos) demonstravam efeitos positivos sobre o equilíbrio da microbiota intestinal, melhora na resposta imune e recuperação da infecção. Este equilíbrio da microbiota acontecia por exclusão competitiva com os patógenos após o uso de probióticos (RINKINEN, 2003).

4 – MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados para este estudo amostras de fezes de animais *pets* e fezes humanas de pacientes pediátricos de até cinco anos. As amostras foram provenientes de pacientes atendidos no Setor de Clínica Médica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário (HVet) e dos setores de Pronto Socorro e Pronto Atendimento do Hospital das Clínicas (HC), ambos da Universidade Federal de Uberlândia. As coletas foram realizadas durante o período de julho de 2010 a março de 2011.

A coleta das fezes foi realizada após a concordância do proprietário no caso dos *pets* e do responsável pela criança no caso de humanos, de acordo com o previsto pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais e Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (anexos I e II).

O estudo abrangeu cães e gatos de diferentes idades, apresentando ou não sinais de distúrbios gastrointestinais. As amostras fecais foram obtidas no momento do atendimento no HVet-UFU. Neste momento era também realizado um inquérito epidemiológico (anexo III) contemplando diferentes fatores que poderiam representar risco de infecção destes animais, assim como, era verificada se havia presença na residência de crianças com idade até cinco anos e outros animais. Caso houvesse crianças conviventes nesta fase etária, questionamentos adicionais eram realizados (anexo IV). Nestes casos, era solicitado ao responsável uma amostra de fezes destas crianças e permissão para coletar por meio de *swab* anal amostra de outros animais presentes na residência.

A coleta das fezes dos animais foi realizada diretamente do reto dos animais com o auxílio de *swabs* estéreis pelo médico veterinário que o atendia. Após a coleta eram depositados em 5mL de caldo Bolton (Oxoid®) suplementado com mistura antibiótica (Selective Supplement Oxoid ®) e imediatamente transportado ao Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada da Faculdade de Medicina Veterinária (LABIO-UFU) para análise.

Participaram do estudo crianças com até cinco anos de idade, apresentando ou não sinais de diarréia, atendidas nos setores de Pronto Socorro e Pronto Atendimento do HC. As amostras fecais eram obtidas no Laboratório de Análises Clínicas do HC (LAC) em potes estéreis, não havendo participação dos integrantes

deste estudo na coleta. Os potes com as fezes eram transportados ao LABIO e imediatamente analisadas.

Durante o atendimento das crianças era realizado um inquérito epidemiológico abordando seu histórico clínico, alimentação, moradia, convívio com animais e outros possíveis fatores de risco para a infecção (anexo V).

4.1 – Isolamento e Identificação de *Campylobacter* spp.

O protocolo de análise utilizado foi o cultivo tradicional em placas com pré-enriquecimento, de acordo com recomendações de Fernandez (1983).

No LABIO as fezes foram pesadas e adicionadas em caldo Bolton (Oxoid®) suplementado com seu suplemento antibiótico (Oxoid®). A diluição foi realizada em volume de caldo suficiente para atingir a concentração de 1:10.

Para o pré-enriquecimento, as amostras provenientes de animais e humanos foram homogeneizadas com auxílio de vortex e suplementadas com 5% de sangue eqüino hemolisado. A incubação foi realizada em atmosfera de microaerofilia (Probac do Brasil®) em jarras para anaerobiose a 37°C por 24 horas.

Após o pré-enriquecimento, o material foi semeado no meio seletivo *Campylobacter Blood-Free Selective Agar Base modified* (mCCDA) (Oxoid®) adicionado do seu suplemento antibiótico (Oxoid ®) e 5% de sangue equino hemolisado. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas em jarras para anaerobiose em condições de microaerofilia (Probac do Brasil®). Finalizado esse período, as placas foram abertas e as colônias com morfologia suspeita de pertencerem ao gênero *Campylobacter* foram confirmadas pela coloração de Gram modificada (substituição da safranina pela carboxifuccina), observando-se a morfologia típica de bastonetes curvos e espiralados ou em “asa de gaivota”.

Colônias típicas de *Campylobacter* spp. foram cultivadas novamente em mCCDA para obtenção de culturas puras. Estas foram estocadas em meio estoque adicionado de 13% do crioprotetor glicerol e mantidas sob congelamento para a futura caracterização.

A identificação fenotípica para diferenciação das espécies foi realizada conforme recomendações de Silva et al. (2007) utilizando os testes de oxidase, produção de catalase, hidrólise do hipurato, redução do nitrato, produção de H₂S,

crescimento de 25°C e 42°C. Todos os testes foram realizados em duplicata e utilizado como controle positivo a cepa de *C. jejuni* ATCC 33291.

A prova de oxidase foi realizada espalhando uma pequena quantidade da cultura sobre uma fita reagente (Laborclean®). O resultado positivo era observado quando havia o desenvolvimento de uma cor azul intensa, em aproximadamente dez segundos.

A capacidade dos isolados produzirem a enzima catalase foi realizada adicionando-se em uma lâmina de microscópio uma alçada da cultura e uma gota de peróxido de hidrogênio 3%. A positividade era observada pela ocorrência de borbulhamento.

Para verificar o crescimento nas temperaturas de 25°C e 42°C, uma alçada das cepas em cultura pura foi estriada em placas de m-CCDA (Oxoid®), e após, incubadas nas duas temperaturas por 48 horas em atmosfera microaerófila e aeróbica, respectivamente. As espécies de *Campylobacter* termotolerantes alvo desse ensaio não crescem a 25°C em microaerofilia ou a 42°C em atmosfera aeróbica.

A hidrólise do hipurato foi determinada pela transferência de uma alçada pesada da cepa pura a ser testada para um tubo com 0,4 mL de solução de hipurato de sódio (nuclear®), com o cuidado de não carregar ágar junto com o inóculo. A homogeneização foi realizada em vórtex e a mistura foi incubada a 37°C por 4 horas em atmosfera aeróbica. Após, cuidadosamente, adicionou ao tubo 0,2 mL de solução de ninidrina (nuclear®), sobre a superfície da solução de hipurato e realizou-se nova incubação a 37°C por 10 minutos. Foi considerado teste positivo quando foi observado o desenvolvimento de uma cor violeta escura.

O teste da redução do nitrato de potássio (KNO₃) consistiu na inoculação de uma alçada da cultura em um tubo contendo caldo infusão de cérebro e coração - BHI (Oxoid®) e incubação a 37°C por 72 horas com as tampas dos tubos desrosqueadas em atmosfera de microaerofilia. Após adicionou-se ao tubo cinco gotas de solução de ácido sulfanílico (Synth®) e solução de dimetil – α – naftilamina (Synth®) no tubo. Observou-se a formação de cor vermelha em 2 minutos para o teste positivo. Na ausência de cor adicionou um pitada de pó de zinco e observou a ausência de cor vermelha entre 5 – 10 minutos para o teste positivo.

Para verificar a capacidade de produção de gás sulfídrico (H₂S) pelos isolados transferiu-se uma alçada da cultura para tubos de ensaio com o meio tríplice açúcar e ferro – TSI (BD®). Após incubação a 37°C por 72 horas em atmosfera

microaerófila com as tampas desrosqueadas foi observado o desenvolvimento de coloração negra ao redor do inoculo. Foram considerados positivos, os tubos que desenvolveram a coloração negra.

4.2 – Biotipificação de *Campylobacter* spp.

A identificação de espécie e subespécie termotolerante foi feita pelo teste de DNase, que consiste na detecção de degradação do ácido desoxirribonucléico (DNA), contido no meio de cultura (ágar DNase), por bactérias que possuem uma enzima extracelular, a desoxirribonuclease, responsável pela reação (LIOR, 1984; SILVA et al., 2007). Estes resultados somados aos obtidos nos testes da hidrólise do hipurato e produção de H₂S (LIOR, 1984) foram utilizados para a identificação da subespécie e biotipificação das cepas.

4.3 – Identificação de *Campylobacter jejuni* e *C. coli* por PCR - multiplex

Em paralelo à identificação fenotípica, as colônias típicas foram submetidas à identificação molecular, com o uso da técnica do multiplex PCR.

O DNA das colônias foi extraído por termoextração e a amplificação realizada utilizou os conjuntos de *primers* descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – *Primers* utilizados na identificação de *C. jejuni* e *C. coli*.

Gene	Primers	Sequência 5' → 3'	Peso molecular (pb)	Referência
<i>flaA</i>	pg 3	GAACTTGAACCGATTG	460 (<i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>)	Harmon et al. (1997)
	pg 50	ATGGGATTTCGTATTAAC		
I	C1	CAAATAAAGTTAGAGGTAGAATGT	160 (<i>C. jejuni</i>)	Harmon et al. (1997)
	C4	GGATAAGCACTAGCTAGCTGAT		

I: indeterminado.

Foi preparado um volume final de reação de 50µL composto por 20ng da solução de DNA bacteriano e pelos seguintes reagentes: 10mM de Tris-HCL, 50mM de KCL, 5,5 mM de MgCl₂, 200 µM de DNTPs (cada nucleotídio), 20 picomoles

de cada primer C1 e C4, 40 picomoles de cada primer pg 3 e pg 50, 1,25 U *taq* DNA polimerase.

No termociclador, o ciclo de amplificação foi programado conforme protocolo descrito por Vilardo et al. (2006) com 1 ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, seguidos de 25 ciclos de amplificação constituídos de três etapas: desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 47°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto, completando com mais um ciclo de extensão final a 72°C por 7 minutos. Como controle positivo foi utilizado as cepas padrão de *Campylobacter jejuni* ATCC 33291 e *Campylobacter coli* ATCC 43478.

Os produtos amplificados (5µL) foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, utilizando o tampão de corrida TBE 0,5x, corados com solução de SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen®), adicionado de marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen®) e depois visualizados em luz UV em transluminador (L PIX EX Loccus Biotecnologia).

4.4 – Determinação dos genes de virulência

Os pares de iniciadores descritos na tabela 2 foram utilizados na análise dos fatores de virulência relacionados à aderência e à invasão celular.

Tabela 2 – *Primers* para identificação dos genes de virulência *flaA*, *cadF* e *pldA* de *Campylobacter jejuni*.

Genes	Primers	Sequência 5' → 3'	Referência
<i>flaA</i>	flaA-F	ATGGGATTCGTATTAACAC	Hänel et al. (2004)
	flaA-R	CTGTAGTAATCTTAAACATTG	
<i>cadF</i>	cadFI-F2B	TTGAAGGTAATTTAGATATG	Zheng et al. (2006)
	cadFI-R1B	CTAATACCTAAAGTTGAAAC	
<i>ciaB</i>	ciaBI-652	TGCGAGATTTTCGAGAATG	Zheng et al. (2006)
	ciaBI-1159	TGCCCGCCTTAGAACTTACA	
<i>pldA</i>	pldA-361	AAGAGTGAGGCGAAATTCCA	Zheng et al. (2006)
	pldA-726	GCAAGATGGCAGGATTATCA	

O DNA extraído para a realização da PCR-multiplex foi utilizado para a análise dos fatores de virulência. O volume final para a reação de amplificação

(50µL) foi composto por 20ng da solução de DNA bacteriano e pelos reagentes: 10mM de Tris-HCL; 50mM de KCl; 200 µM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (DNTP); 2,6 mM de MgCl₂; 10 picomoles para os primer *flaA* e *pldA*, 40 picomoles para o gene *cadF* e 1,25U de Taq DNA polimerase. A determinação de cada gene foi realizada individualmente.

O controle positivo de *C. jejuni* (ATCC 33291) foi usado em todas as reações de amplificação, bem como um controle negativo, composto por água bidestilada estéril, adicionada à mistura de reação, em substituição ao DNA alvo.

A amplificação foi realizada em termociclador (*Eppendorf*®), obedecendo aos seguintes ciclos: 1 ciclo inicial a 95°C por 10 minutos; 35 ciclos de amplificação, constituídos de 3 etapas: desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 45°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos; completando com mais 1 ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos. A separação e a visualização dos produtos amplificados foram realizadas utilizando a mesma técnica descrita para a PCR-multiplex.

4.5 – Suscetibilidade aos antimicrobianos

O teste de suscetibilidade aos antimicrobianos foi executado conforme protocolo descrito no NCCLS (2000), com modificações para permitir o crescimento de *Campylobacter*. Colônias de *Campylobacter* spp. foram suspendidas em solução de NaCl 0,85% estéril até atingir a turvação corresponde a 0,5 na escala de MacFarland. Alíquota de 100 µL de inóculo foi semeado com auxílio de alça de Drigalsky na superfície de placas de ágar Mueller-Hilton (Oxoid®) suplementado com sangue de ovino desfibrinado. Após a absorção do inóculo foram adicionados os discos de antimicrobianos: ácido nalidíxico (30µg), amoxacilina (10µg), cefalotina (30µg), ceftiofur (30µg), enrofloxacina (5µg), eritromicina (15µg), gentamicina (10µg), lincomicina (9/100µg), neomicina (30µg), norfloxacina (10µg), sulfazotrim (25µg) e tetraciclina (30µg). A incubação foi realizada em atmosfera de microaerofilia (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂) a 37°C por 48 horas, e após, a leitura da foi rea lizada pela medição dos halos de inibição do crescimento bacteriano. Para controle do teste foi utilizada a amostras padrão de *C. jejuni* ATCC 33291.

4.6 – Análise dos resultados

Os resultados foram tabulados e submetidos à estatística descritiva. Para determinar a associação da positividade em crianças com o contato com animais de companhia foi utilizado teste do quiquadrado e após a razão de ODDS. O mesmo cálculo foi realizado para verificar a associação entre uso concomitante de antibiótico e a infecção por *Campylobacter* spp. assim como a associação entre a presença dos genes de virulência nas cepas de *C. jejuni* e a diarréia em crianças e cães. Para estas avaliações epidemiológicas foi utilizado programa estatístico Graphpad Prism 5.

Para verificar a existência ou não de diferenças estatisticamente significantes, entre as freqüências de animais e de crianças, que se apresentaram sensíveis ou resistentes, quando analisadas a respeito da presença de *Campylobacter* spp., considerando-se os diversos antimicrobianos utilizados foi aplicado o teste de Fisher (Siegel, 1975).

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Isolamento, Identificação e Biotificação de *Campylobacter* spp.

Foram analisadas 120 amostras de fezes de animais *pets* atendidos no ambulatório do Hospital Veterinário (HVet) da Faculdade de Medicina Veterinária, sendo 103 provenientes de cães e 17 de felinos. Destas 22/120 (18,3%) foram positivas para *Campylobacter* spp. (20 amostras de caninos e duas amostras de felinos). López e colaboradores (2003) determinaram em uma comunidade de baixa renda de Buenos Aires, prevalências de 16,96% e 20% em fezes de cães e gatos, respectivamente.

Das 160 amostras de fezes de crianças atendidas nos setores de Pronto Socorro e Pronto Atendimento do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia 6,87% (11/160) foram positivas para *Campylobacter* spp. Essa porcentagem foi ligeiramente inferior aos descritos por Cocker et al. (2002), que investigaram a microbiota intestinal em crianças de até cinco anos de idade com e sem diarréia na cidade do Rio de Janeiro e encontraram 9,9% (15/153) das fezes positivas para *Campylobacter* spp.

Das amostras humanas positivas somente duas crianças tinham contato com animais (uma amostra diarréica e outra amostra não diarréica) e dos animais atendidos no Hospital Veterinário (HVet) somente cinco pais consentiram em permitir a participação de seus filhos no projeto. Tanto as amostras coletadas dos *pets* que tinham contato com as crianças positivas quanto às amostras das crianças que tinham contato com os animais positivos foram negativas.

As 33 cepas de *Campylobacter* spp. isoladas de fezes de crianças e animais foram identificadas para determinação da espécie. Os resultados obtidos por métodos fenotípicos estão na tabela 3. Somente para as espécies de *C. coli* e *C. jejuni* foi realizada a confirmação por técnica genotípica. A identificação genotípica por PCR multiplex e a identificação fenotípica para *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* demonstraram homologia de 100% (figuras 1a, 1b e 1c).

A identificação demonstrou que 57,6% (19/33) cepas foram identificadas como *Campylobacter jejuni*, 33,3% (11/33) como *Campylobacter coli* e 9,1% (3/33) como *Campylobacter gracilis*.

Tabela 3 – Identificação das espécies de *Campylobacter* spp. isoladas de fezes de cães e gatos atendidos no HVet e crianças de até 5 anos atendidas no HC, de julho de 2010 a março de 2011.

Amostras	ESPÉCIE IDENTIFICADA					
	<i>Campylobacter</i> <i>jejuni</i>		<i>Campylobacter</i> <i>coli</i>		<i>Campylobacter</i> <i>gracilis</i>	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)
Canino	15	79	4	36,4	1	33,4
Felino	0	0	2	18,1	0	0
Crianças	4	21	5	45,5	2	66,6
TOTAL	19	100	11	100	3	100

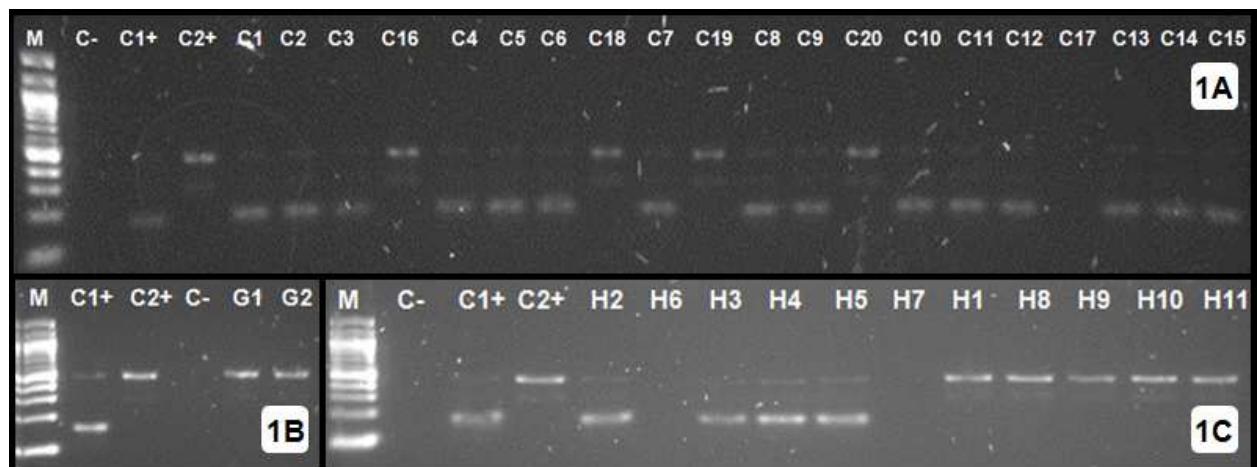


Figura 1 – PCR – Multiplex das amostras isoladas (M) Marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder -Invitrogen®), (C-) controle negativo, (C1+) controle positivo para *Campylobacter jejuni*, (C2+) controle positivo para *Campylobacter coli*, **1A** caninos - (C1 – C15) amostra de *Campylobacter jejuni*, (C16, C18 – C20) amostra de *Campylobacter coli*, (C17) *Campylobacter gracilis; **1B** felinos - (G1–G2) amostra positiva para *Campylobacter coli*; **1C** humanos - (H2 – H5) amostra de *Campylobacter jejuni*, (H1, H8-H11) amostra de *Campylobacter coli*, (H6, H7) *Campylobacter gracilis*.*

Dentre as 20 cepas isoladas dos caninos, 15 foram identificadas como *C. jejuni*, quatro como *C. coli* e uma como *Campylobacter gracilis*. Tsai et al. (2007) determinaram a prevalência de espécies de *Campylobacter* em cães domésticos e vadios em Taiwan e verificaram que *C. jejuni* também foi a espécie mais identificada. Apesar de isolamentos da espécie *C. upsaliensis* provenientes de cães ser citada por Steinhauserova, Fojtikova, Klimes (2000) e Tsai et al. (2007), esta espécie não foi identificada neste estudo.

A biotificação dos isolados identificados com *C. jejuni* e *C. coli* pode ser observada na tabela 4.

Tabela 4 – Biotipificação de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* isolados de fezes de cães e gatos atendidos no HVet e crianças de até 5 anos atendidas no HC, de julho de 2010 a março de 2011.

	<i>C. Jejuni</i>				<i>C. Coli</i>	
	I	II	III	IV	I	II
Cão	9	6	-	-	4	-
Gato	-	-	-	-	2	-
Criança	4	-	-	-	5	-
Total	13	6	-	-	11	-

A biotificação demonstrou treze espécies como *C. jejuni* biótipo I, seis *C. jejuni* biótipo II e onze como *C. coli* biótipo I.

Fernandez e colaboradores (1991) estudaram a disseminação de *Campylobacter* spp. entre cães vadios e de estimação em Valdivia e verificaram que as amostras de *C. jejuni* isoladas dos cães de estimação foram classificadas como dos biótipos I e II. Estes resultados concordam com os observados neste estudo. Já na biotificação das amostras de *C. coli*, neste estudo, identificou-se somente o biótipo I, discordando dos estudos de Fernandez et al. que observaram este biótipo restrito a cães de rua e uma maior incidência do biótipo II. López e colaboradores (2003) identificaram em animais de estimação de Buenos Aires somente *C. jejuni* tipo II.

Os biótipos de *C. jejuni* I e II e *C. coli* biótipo II são os mais frequentemente isolados de casos de diarréia humana nas cidades chilenas de Valdivia e Santiago (FIGUEROA et al., 1990). Neste estudo, os isolados provenientes de humanos foram identificados como *C. jejuni* biótipo I e *C. coli* biótipo I.

López e colaboradores (2003) isolaram em Buenos Aires *C. jejuni* de fezes diarréicas de crianças e também observaram que o biótipo tipo I foi o identificado em todos os casos.

5.2 – Suscetibilidade aos antimicrobianos

As resistências aos antimicrobianos de isolados de fezes de animais *pets* e crianças de até cinco anos, por espécie identificada está nas tabelas 5 e 6.

Tabela 5 – Resistência aos antimicrobianos de espécies de *Campylobacter* spp. isoladas de fezes de animais *pets* atendidos no HVet de julho de 2010 a março de 2011.

Antimicrobiano	<i>Campylobacter jejuni</i>		<i>Campylobacter coli</i>		<i>Campylobacter gracilis</i>	
	N	%	N	%	N	%
Ácido Nalidíxico	5	33,3	2	33	0	0
Amoxicilina	4	26,7	3	50	1	100
Cefazolina	6	40,0	4	67	0	0
Ceftiofur	8	53,3	3	50	0	0
Enrofloxacina	6	40,0	3	50	1	100
Eritromicina	7	46,7	4	67	0	0
Gentamicina	5	33,3	3	50	0	0
Lincomicina	9	60,0	4	67	0	0
Neomicina	6	40,0	1	17	1	100
Norfloxacina	7	46,7	4	67	1	100
Sulfazotrim	10	66,7	6	100	0	0
Tetraciclina	9	60,0	3	50	0	0

N – número de amostras resistentes.

Dentre as amostras coletadas de animais, as espécies de *C. coli* e *C. gracilis* demonstraram altos percentuais de resistência à amoxicilina, com valores de 50% e 100%, respectivamente. Para os outros β – lactâmicos analisados foi observada mais de 50% de resistência para a cefazolina nas amostras de *C. coli* e para o ceftiofur nas amostras de *C. jejuni* e *C. coli*. Esses dados corroboram com os encontrados por Modolo et al. (2003) que isolaram cepas altamente resistentes a β - lactâmicos. Isto é devido à alta resistência dessas bactérias às cefalosporinas e β - lactâmicos em geral (ABRAHANS et al., 1990; TAJADA et al., 1996).

Entre as quinolonas testadas, mais de 50% das cepas de *C. coli* e 100% das cepas identificadas como *C. gracilis* demonstraram resistência para a enrofloxacina e norfloxacina. Kuana e colaboradores (2008) estudaram o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de *Campylobacter* spp. em animais e também verificaram altos índices de resistência às quinolonas em especial a enrofloxacina.

Rossi et al. (2008) estudaram diferentes espécies de *Campylobacter* isoladas de cães e gatos em encontraram uma possível associação entre o isolamento destes microrganismos em animais com doença clínica e a resistência da cepa aos antimicrobianos. O estudo revelou que uma alta porcentagem dos isolados identificados como *C. jejuni* eram resistentes ao ácido nalidíxico e ciprofloxacina, com valores mais elevados do que os descritos por Sandberg et al. (2006), na Noruega. Os autores concluíram que esta resistência refletia a extensa utilização de fluoroquinolonas em cães e gatos na Itália.

Tabela 6 – Resistência aos antimicrobianos de espécies de *Campylobacter* spp. isoladas de fezes de crianças de até cinco anos atendidas no HC-UFG de julho de 2010 a março de 2011.

Antimicrobiano	<i>Campylobacter jejuni</i>		<i>Campylobacter coli</i>		<i>Campylobacter gracilis</i>	
	N	%	N	%	N	%
Ácido Nalidíxico	1	25%	2	40%	1	50%
Amoxicilina	3	75%	3	60%	2	100%
Cefazolina	3	75%	3	60%	2	100%
Ceftiofur	3	75%	2	40%	1	50%
Enrofloxacina	0	0%	2	40%	0	0%
Eritromicina	3	75%	3	60%	1	50%
Gentamicina	0	0%	1	20%	1	50%
Lincomicina	0	0%	3	60%	0	0%
Neomicina	0	0%	0	0%	0	0%
Norfloxacina	2	50%	2	40%	2	100%
Sulfazotrim	1	25%	2	40%	0	0%
Tetraciclina	2	50%	1	20%	1	50%

N – número de amostras resistentes.

Neste estudo também foi observada resistência de mais de 50% das cepas de *C. coli* para a eritromicina e para a tetraciclina nas cepas de *C. jejuni* e *C. coli*. Este fato é considerado preocupante já que estes antibióticos são considerados as drogas de eleição para o tratamento da infecção (KUANA et al., 2008). Além disso, o gênero *Campylobacter* possui plasmídeos R, que frequentemente medeiam resistência a tetraciclinas (FRANCO et al., 2004).

O conjunto de resultados deste estudo mostra que independente das diferenças identificadas entre as estirpes para alguns antimicrobianos, os isolados apresentaram altos índices de resistência. A resistência foi observada

principalmente para as drogas mais usadas em tratamentos clínicos de gastrenterites em animais, como o sulfazotrim (66,7% das amostras de *C. jejuni* e 100% das amostras de *C. coli*). A resistência é preocupante e demonstra que é necessária a conscientização do uso desse antimicrobiano na clínica como forma de reduzir a pressão de seleção a que estes microrganismos são submetidos.

Entre as amostras isoladas de crianças e identificadas como *C. jejuni*, 75% foi resistente para os antimicrobianos amoxicilina, cefazolina, ceftiofur e eritromicina. Para as cepas identificadas como *C. coli*, foi observada maior resistência para a amoxicilina, cefazolina, eritromicina e lincomicina (60%). Já as cepas de *C. gracilis* foram 100% resistentes à amoxicilina, cefazolina e norfloxacina.

Conforme observado nas cepas isoladas dos animais, os antimicrobianos como β – lactâmicos, macrolídeos e quinolônios também foram os que as cepas isoladas das crianças mais demonstraram resistência.

Estudos epidemiológicos têm demonstrado o impacto clínico da resistência aos antibióticos em infecções de humanos por *Campylobacter*. Pacientes infectados com *Campylobacter jejuni* quinolona-resistentes e tratados com fluoroquinolonas, em Minnesota, em 1997, tiveram uma duração média de diarréia de 10 dias, em comparação com pacientes infectados com cepas sensíveis que tiveram duração de sete dias (SMITH et al., 1999).

A resistência determinada para cada uma das espécies identificadas demonstrou que não foram encontradas diferenças ($p>0,05$), estatisticamente significantes, entre as freqüências quando analisados pelo teste de Fisher.

5.3 – Genes de virulência

A determinação nos isolados identificados como *Campylobacter jejuni* da presença dos genes de virulência *flaA*, *ciaB*, *cadF* e *pldA* por meio de análises moleculares pode ser visualizada nas figuras 2, 3, 4 e 5.

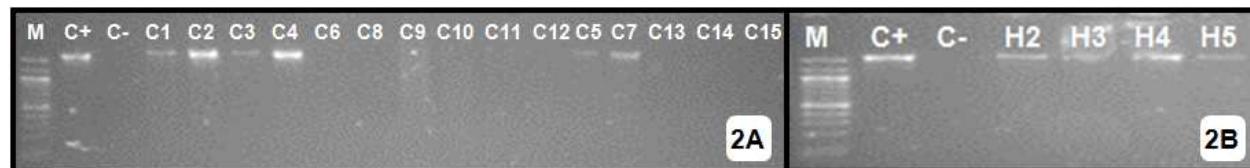


Figura 2 – 2A - C1 – C4, C7: *Campylobacter jejuni* portadores do gene *flaA* isoladas de cães; 2B – H2 – H5: estirpes de *Campylobacter jejuni* portadores do gene *flaA* isoladas de crianças. (M)

Marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder -Invitrogen); (C+) Controle positivo (1728pb); (C-) Controle negativo.

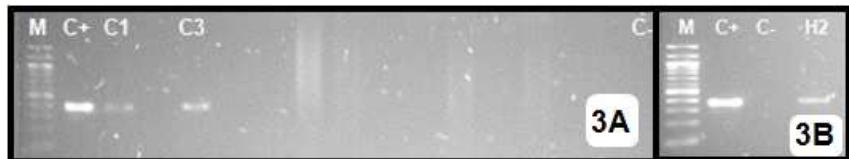


Figura 3 – 3A - C1–C3: *Campylobacter jejuni* portadores do gene *pdlA* isoladas de cães; **3B** – H2: *Campylobacter jejuni* portador do gene *pdlA* isolada de criança. (M) Marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder -Invitrogen), (C +) Controle positivo (385pb); (C -) Controle negativo.



Figura 4 – 4A - C1 – C6, C8: *Campylobacter jejuni* portadores do gene *cadF* isoladas de cães; **4B** – H2 – H5: *Campylobacter jejuni* portadores do gene *cadF* isoladas de crianças. (M) Marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder -Invitrogen); (C +) Controle positivo (400pb); (C -) Controle negativo.

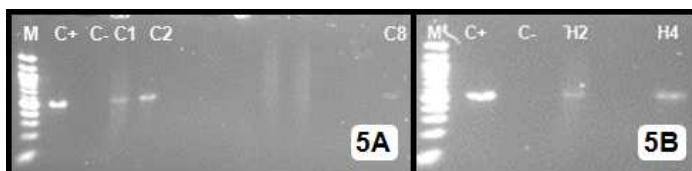


Figura 5 – 5A - C1, C2 e C8: *Campylobacter jejuni* portadores do gene *ciaB* isoladas de cães; **5B** – H2 – H4: *Campylobacter jejuni* portadores do gene *ciaB* isoladas de crianças; (M) Marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder -Invitrogen); (C +) Controle positivo (527pb); (C -) Controle negativo.

Esses genes codificam proteínas envolvidas na adesão e na capacidade invasiva de *Campylobacter jejuni*. O gene *flaA* é necessário para a adesão e invasão de *Campylobacter jejuni* nas células epiteliais (WASSENAAR et al., 1991) e o gene *ciaB* codifica uma proteína envolvida na invasão celular (RIVERA-AMILL et al., 2001). O gene *cadF* é responsável pela codificação de uma proteína que interage com a fibronectina da matriz extracelular do hospedeiro, participando na colonização celular (MONTEVILLE et al., 2003). O gene *pdlA* está relacionado à invasão celular e codifica uma proteína envolvida na síntese de fosfolipase da membrana externa (ZIPRIN et al., 2001).

A presença dos genes de virulência nos isolados identificados como *Campylobacter jejuni* pode ser visualizada na tabela 7.

Tabela 7 – Ocorrência de genes de virulência em *Campylobacter jejuni* isolados de fezes de animais pets atendidos no Hvet e de crianças até 5 anos atendidas no HC, de julho de 2010 a março de 2011.

Isolados	Genes de Virulência			
	<i>flaA</i>	<i>pdlA</i>	<i>cadF</i>	<i>ciaB</i>
C1	+	+	+	+
C2	+	-	+	+
C3	+	+	+	-
C4	+	-	+	-
C5	+	-	+	-
C6	-	-	+	-
C7	+	-	-	-
C8	-	-	+	+
H2	+	+	+	+
H3	+	-	+	-
H4	+	-	+	+
H5	+	-	+	-

C1-C8: isolados de cães, H2-H5: isolados de crianças; (+) presença do gene de virulência; (-) ausência do gene de virulência.

Entre os isolados de cães, uma das amostras apresentou os quatro genes simultaneamente (C1), duas amostras possuíam três genes (C2: *flaA*, *cadF* e *ciaB*; C3: *flaA*, *pdlA* e *cadF*). Dois isolados (C4 e C5) possuíam os genes *flaA* e *cadF* e o isolado C8, os genes *cadF* e *ciaB*. Dois isolados possuíam somente um gene de virulência (C6: *cadF* e C7: *flaA*). Dentre as cepas isoladas de fezes humanas todas apresentaram os genes *flaA* e *cadF* e somente uma amostra tinha o gene *pdlA* (H2) e duas o gene *ciaB* (H2 e H4).

Tanto as amostras de animais quanto as amostras humanas que apresentaram os genes de virulência eram todas amostras diarréicas. Isto confirma as afirmações de Hänel et al. (2004) e Zheng et al. (2006) que comentam que os genes *flaA*, *ciaB*, *cadF* e *pdlA* são importantes e podem ser usados como referência no estudo dos mecanismos de patogenicidade de *C. jejuni*.

5.4 – Fatores de Risco para infecção por *Campylobacter* spp.

5.4.1 – Crianças até cinco anos

A associação entre a positividade para *Campylobacter* spp. e a presença de diarréia nas crianças está descrita na tabela 8.

Tabela 8 – Associação entre a presença de diarréia e positividade para *Campylobacter* spp. nas fezes de crianças de até cinco anos atendidas no HC-UFU de julho de 2010 a março de 2011.

<i>Campylobacter</i> spp.	Diarréia	Assintomática	Total
Positivo	9	2	11
Negativo	83	66	149
Total	92	68	160

p>0,05; OR=3,57

Dentre as 92 amostras de fezes diarréicas, nove (9,8%) foram positivas para *Campylobacter* spp. Duas dessas crianças apresentavam episódio de diarréia aguda com características de fezes líquida com presença de sangue e muco, vômito, febre e curso da doença em torno de cinco dias e faziam uso de antibioticoterapia (amoxicilina e sulfametoxazol, respectivamente). As demais crianças apresentavam sintomas menos severos e não faziam uso de antibióticos.

No Brasil, tem sido relatada a presença de *Campylobacter* spp. em casos de diarréia aguda, sendo que em São Paulo, de acordo com Scarcelli et al. (2005), o índice está próximo aos 26%, sendo afetadas principalmente crianças (Franco et al., 2004). Palma et al. (1997) também observaram que o segundo agente mais freqüentemente isolado entre os casos de diarréia infantil no Hospital “Umberto I”, em São Paulo foi *Campylobacter* spp. 3/40 (7,5%).

Entre as 68 amostras não diarréicas, somente duas (2,9%) foram positivas. O motivo do exame de fezes nestes pacientes foi devido à queixa de prurido anal.

Apesar de o cálculo do índice de associação OR mostrar que crianças positivas para *Campylobacter* spp. nas fezes apresentarem 3,57 vezes mais probabilidade de ter diarréia que as negativas, essa associação não foi estatisticamente significante (tabela 8).

Os resultados desse trabalho mostram que há presença de crianças assintomáticas e isso concorda com Mendes et al. (1987) que cita que pessoas de países em desenvolvimento, quando infectadas, nem sempre apresentam sintomatologia clínica.

Há evidências de que os anticorpos anti *Campylobacter* podem determinar um período de excreção mais curto, bem como impedir o aparecimento de manifestações clínicas em muitos portadores da bactéria. Em países em desenvolvimento, onde o contato com a bactéria é precoce e as oportunidades de

infecção e reinfecção são maiores, encontram-se altos títulos de IgA que persistem mais do que as IgGs. Esta resposta é induzida pelo flagelo ou outros抗ígenos de superfície, que parecem ser importantes no estabelecimento de *C. jejuni* no intestino de portadores assintomáticas (FERNANDEZ, 2008).

Quando se investigou se o convívio com animais *pets* era fator de risco para a presença de *Campylobacter* spp. nas fezes das crianças, os resultados demonstraram que estas duas situações não estavam associadas (tabela 9).

Tabela 9 – Associação entre o contato com *pets* e positividade para *Campylobacter* spp. nas fezes de crianças de até cinco anos atendidas no HC-UFG de julho de 2010 a março de 2011.

<i>Campylobacter</i> spp.			
Hábito	Positivo	Negativo	Total
Contato com <i>pet</i>	2	46	48
Não contato	9	103	112
Total	11	149	160

p>0,05; OR=0,49

A probabilidade de crianças serem positivas para *Campylobacter* spp. nas fezes devido ao contato com *pets* foi 0,49 vezes maior do que as negativas, porém esta diferença não foi significativa (p>0,05). Esses resultados indicam que nos casos estudados outros fatores estão associados à presença da bactéria nas crianças.

Esses dados discordam com Houf (2008) que realizou um estudo sobre o contato com cães e gatos domésticos como fator de risco para infecção humana por *Campylobacter* entre julho de 2006 a setembro de 2007, utilizando fezes e swabs orais, para verificar a presença do patógeno. Os isolados obtidos por cultivo em meio seletivo foram identificados quanto à espécie por meio da técnica de PCR. Foi demonstrado que os cães excretaram o patógeno nas fezes e na boca. O autor considerou que junto com o consumo de alimentos e água contaminados, entrar em contato com cães foi também considerado outra fonte potencial de infecção.

O fato de o contato com *pets* não ser fator de risco para a infecção de humanos por *Campylobacter* também discordam dos resultados obtidos por Tenkate e Stafford (2001). Estes autores relatam que infecções por *Campylobacter* era uma das principais causas de doenças de declaração obrigatória na Austrália, com um pico em crianças de 0-35 meses. Um estudo caso-controle foi conduzido para

investigar fatores de risco para infecção por *Campylobacter* em crianças nessa faixa etária. Entre os fatores de risco associados de forma independente para a aquisição da doença estava a presença de filhotes de *pets* no domicílio da criança. Eles observaram OR= 16,58, o que sugere que crianças com idade inferior a três anos estão em risco de infecção por *Campylobacter* se residindo em uma casa que tem filhotes de *pets*.

Foi difícil avaliar os hábitos alimentares das crianças com fezes positivas para *Campylobacter* spp. que participaram do estudo, no entanto, todas eram da mesma região da cidade e durante a visita foi possível perceber que eram de famílias de baixa renda e com baixo grau de instrução. Assim, apesar de Holf (2008) afirmar que o tipo de alimentação é um importante fator de risco para infecção por *Campylobacter*, este item não foi avaliado neste estudo.

Crianças que usavam antibióticos apresentaram 1,4 vezes mais chance de se infectarem com *Campylobacter* spp. em relação àquelas crianças que não usavam antibiótico, porém, sem diferenças significantes ($p>0,05$). Assim, o uso de antibiótico não é um efeito protetor para infecção por *Campylobacter* spp. (tabela 10). Esta constatação também foi observada durante a análise de resistência *in vitro* aos antimicrobianos das cepas de *Campylobacter* isoladas das fezes das crianças que apresentavam episódio de diarréia aguda. Cepas isoladas das fezes de duas crianças que estavam sob tratamento com as drogas amoxicilina e sulfazotrim, respectivamente, apresentaram resistência a estes dois antimicrobianos.

Tabela 10 – Associação entre o uso de antibioticoterapia e a positividade para *Campylobacter* spp. nas fezes de crianças de até 5 anos atendidas no HC-UFU de julho de 2010 a março de 2011.

<i>Campylobacter</i> spp.	Em uso de antibióticos	Sem uso antibióticos	Total
Positivo	2	9	11
Negativo	20	129	149
Total	22	138	160

p>0,05; OR=1,4

Nenhum dos responsáveis pelas crianças com fezes positivas para *Campylobacter* spp. relatou durante a entrevista queixas como paralisia, dor ou

fadiga muscular, descartando dessa forma, naquele momento, suspeita da síndrome de Guillain – Barré.

5.4.2 – Animais

Entre os animais *pets* atendidos no ambulatório do Hospital Veterinário (HVet) da Faculdade de Medicina Veterinária a associação entre a positividade para *Campylobacter* spp. e sintomatologia clínica de diarréia foi significativa e demonstrou que animais infectados com *Campylobacter* possuem 7,38 vezes mais probabilidade de apresentarem diarréia (tabela 11).

A associação entre a positividade para *Campylobacter* spp. nas fezes e presença de diarréia também foi observada por Burnens et al. (1992), que analisaram as taxas intestinais desta bactéria em animais com gastrite e assintomáticos. Verificou-se naquele estudo que os animais diarréicos positivos apresentavam o dobro de isolamentos quando comparadas aos animais assintomáticos. A diferença entre os isolamentos em animais com e sem diarréia foi significativa, indicando a associação entre diarréia e infecção.

Tabela 11 – Associação entre sintomas clínicos de diarréia e positividade para *Campylobacter* spp. nas fezes de animais *pets* atendidos no HVet de julho de 2010 a março de 2011.

<i>Campylobacter</i> spp.	Tipo de fezes		Total
	Diarréica	Não diarréica	
Positivo	17	5	22
Negativo	31	67	98
Total	48	72	120

p<0,05; OR=7,38

Neste estudo, com exceção de um canino de 11 anos que apresentava diarréia crônica de coloração enegrecida, dor abdominal cranial, febre, vômito e anorexia, todos os outros animais apresentavam episódio de diarréia líquida com sangue e muco, doença com características de curso agudo, com duração em torno de quatro dias, presença de vômito e febre, calendário vacinal atualizado, não apresentavam parasitas macroscópicos e estavam vermifugados.

Há associação entre a positividade para *Campylobacter* e o uso concomitante de antibióticos. Animais tratados têm 57,41 vezes mais probabilidade de serem positivos nas fezes que aqueles não tratados (tabela 12). É possível que o uso de antimicrobianos reduza a microbiota natural do intestino, e assim, favoreça a colonização e multiplicação de *Campylobacter* após a infecção dos animais. A alta resistência aos antimicrobianos observada para os isolados em teste *in vitro* (tabela 5) confirma a possibilidade desta teoria.

Tabela 12 – Associação entre o uso de antimicrobianos e positividade para *Campylobacter* spp. em fezes de animais pets atendidos no HVet de julho de 2010 a março de 2011.

<i>Campylobacter</i> spp.	Animais		
	Em uso de Antibióticos	Sem uso de antibióticos	Total
Positivo	22	0	22
Negativo	43	55	98
Total	65	55	120

p<0,05; OR=57,41

A presença de genes de virulência nas cepas isoladas de fezes de crianças e animais foi relacionada à resistência aos antimicrobianos testados (tabela 13).

Tabela 13 – Relação entre a resistência aos antimicrobianos e a presença de genes de virulência em *Campylobacter jejuni* isolados de fezes de animais pets atendidos no HVet e de crianças até 5 anos atendidas no HC, de julho de 2010 a março de 2011.

Isolados	Genes de Virulência				Resistência aos Antimicrobianos
	<i>flaA</i>	<i>pdlA</i>	<i>cadF</i>	<i>ciaB</i>	
C1	+	+	+	+	CFO, NAL, NOR
C2	+	-	+	+	AMO, CTF, CFO, NOR, SUT
C3	+	+	+	-	ERI, LIN, TET
C4	+	-	+	-	TET
C5	+	-	+	-	ERI, LIN, TET
C6	-	-	+	-	NAL, CTF, CFO, NOR, SUT, ENR
C7	+	-	-	-	NAL, CTF, CFO, SUT, TET
C8	-	-	+	+	NAL, LIN, SUT, CTF, ENR, GEN, TET
H2	+	+	+	+	NAL, AMO, CFO, CTF, NOR
H3	+	-	+	-	AMO, CTF, ERI, NOR, TET
H4	+	-	+	+	AMO, CTF, CFO, ERI, SUT
H5	+	-	+	-	ERI, LIN, TET

C1-C8: isolados de cães, H2-H5: isolados de crianças; (+) presença do gene de virulência; (-) ausência do gene de virulência; AMO:amoxicilina, CFO:cefalotina, CTF:ceftiofur, ERI: eritromicina, ENR:enrofloxacina, GEN:gentamicina, LIN: lincomicina, NAL: ácido nalidíxico, NOR: norfloxacina, SUT: sulfazotrim, TET: tetraciclina.

Embora não houvesse resistência para a enrofloxacina na cepa isolada de um cão (C1) houve resistência para outros antibióticos pertencentes ao mesmo grupo desse antimicrobiano (quinolona). As drogas a que este isolado foi resistente foram o ácido nalidíxico (quinolona de primeira geração) e norfloxacina (quinolona de segunda geração, assim como a enrofloxacina). A cepa isolada deste animal apresentava todos os quatro genes de virulência estudados.

No cão diarréico em que foi isolada a cepa C2 foi utilizado sulfazotrim na primeira internação sem melhora clínica, sendo após quatro dias, em nova internação, administrado amoxicilina. Não houve resposta clínica a nenhuma das duas drogas e o animal foi a óbito. A cepa isolada deste animal apresentou três dos quatro genes de virulência estudados e demonstrou in vitro e in vivo resistência para estes dois antimicrobianos.

Nas cepas isoladas de humanos, todas que apresentaram os genes de virulência eram de amostras diarréicas. Em uma criança infectada com a cepa H3 (dois genes de virulência), estava sendo administrado amoxicilina e em outra em uso de sulfazotrim foi isolada a cepa H4 (três genes de virulência). Ambas as cepas mostraram resistência para estes antimicrobianos.

Foram isoladas de crianças duas cepas resistentes a eritromicina (H3 e H4), duas resistentes a norfloxacina (H2 e H3) e duas à tetraciclina (H3 e H5). Estas cepas possuíam de dois a quatro genes de virulência. Atualmente, macrolídeos e fluoroquinolonas são os antimicrobianos de escolha quando a intervenção terapêutica é justificada (ENGBERG et al., 2001; MOORE et al., 2005) e as tetraciclinas têm sido sugeridas como uma escolha alternativa no tratamento de campilobacteriose clínica (AERESTRUP; ENGBERG, 2001).

A tabela 14 mostra a associação entre os isolados que apresentavam todos os quatro genes de virulência estudados e a presença de diarréia no paciente. Houve alta associação entre presença dos quatro genes de virulência para *Campylobacter jejuni* e os sintomas clínicos de diarréia em crianças e animais. Assim pacientes infectados com *C. jejuni* que apresentam os genes de virulência

(*flaA*, *cadF*, *ciaB* e *pdlA*) apresentam 11,36 mais probabilidade de apresentar diarréia que aqueles com ausência dos genes de virulência ($p<0,05$).

Tabela 14 – Associação entre a presença de genes de virulência em *Campylobacter jejuni* e a ocorrência de diarréia em crianças de até cinco anos atendidas no HC e pets atendidos no HVet, de julho de 2010 a março de 2011.

Genes de virulência	Tipo de fezes		Total
	Diarréica	Não diarréica	
Presença dos genes	12	0	12
Ausência dos genes	5	2	7
Total	17	2	19

p<0,05; OR=11,36

6 – CONCLUSÕES

Bactérias do gênero *Campylobacter* spp. foram isoladas 6,87% e 18,3% das fezes de crianças e animais, respectivamente. Houve uma associação entre a presença de *C. jejuni* e diarréia em animais. Além da *C. jejuni*, em animais assintomáticos foram identificadas as espécies *C. coli* e *C. gracilis*. Em fezes de crianças com diarréia foram identificadas *C. jejuni* e *C. coli* e nas fezes não diarréicas foram identificadas *C. gracilis*.

Os biótipos encontrados entre as amostras diarréicas foram o *C. jejuni* biótipo I e II. Já entre as amostras assintomáticas foi verificado somente o biótipo I. As espécies de *C. coli* biótipo I foi encontrado tanto em amostras diarréicas como em amostras assintomáticas.

O convívio com pets não aumentou o risco de crianças serem infectadas com *Campylobacter* e não foi possível estabelecer entre os pontos estudados um fator de risco para a infecção em crianças.

Cepas que possuíam os genes de virulência foram positivamente associados à presença de diarréia. Essas cepas também mostraram maior resistência aos antimicrobianos testados, principalmente para as quinolonas e sulfonamidas. Esta resistência foi observada principalmente nas cepas isoladas dos animais, o que reflete o uso indiscriminado destes antibióticos na clínica veterinária. Nas cepas isoladas de amostras humanas a preocupação se encontra na resistência para a eritromicina, antibiótico de escolha para o tratamento da campilobacteriose. O uso da antibioticoterapia em cães aumentou a probabilidade de risco para a infecção por *Campylobacter* em 57,41 vezes.

Apesar de não ter havido neste estudo uma associação positiva entre o convívio com pets e a infecção de crianças por *Campylobacter* spp. novas investigações mais abrangentes devem ser realizadas, assim como, deve-se estabelecer a relação epidemiológica por métodos moleculares entre cepas isoladas de infecções humanas e animais.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHANS, C.A.; AGBODAZE, D.; NAKANO, T.; AFARI, E.A.; LONGMATEY, H.E.K. Prevalence and antibiogram of *Campylobacter jejuni* in domestic animals in rural Ghana. **Archives Environmental Heath**, v. 45, n. 1, p.59-62, 1990.
- ACKE, E.; WHYTE, P.; JONES, B. R.; McGILL, K.; COLLINS, J. D.; FANNING, S. Prevalence of thermophilic *Campylobacter* species in cats and dogs in two animal shelters in Ireland. **Veterinary Record**, London, v. 158, n. 2, p. 51-54, 2006.
- AERESTRUP, F. M.; ENGBERG, J. Antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter*. **Veterinary Research**, Les Ulis, v. 32, p. 311-321, 2001.
- ALLOS, B. M. *Campylobacter jejuni* infections: update on emerging issues and trends. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, p.1201–1206, 2001.
- ALMEIDA FILHO, E. S.; MEDEIROS, R. J.; FERREIRA, M. S.; DE OLIVEIRA, L. A. T. *Campylobacter* spp. e sua importância em saúde pública. **Higiene Alimentar**, Brasil, v. 21, n. 148, p. 55-59, 2007.
- ALTEKRUSE, S. F.; STERN, N. J.; FIELDS, P. I.; SWERDLOW, D. L. *Campylobacter jejuni* – Na emerging foodborne pathogen. **Emerging Infectious Disease**, Atlanta, v. 5, n. 1, p. 28-34, 1999.
- ALTWEGG, M.; BAMERS, A.; ZOLLINGER-ITEN, J.; PENNER, J. L. Problems in identification of *Campylobacter jejuni* associated with acquisition of resistance to nalidixic acid. **Journal of Clinical Microbiology**, Great Britain, v. 25, p. 1807-1808, 1987.
- AQUINO, M. E. C.; CARVALHO, J. C. P.; TIBANA, A.; FRANCO, R. M. *Campylobacter jejuni/coli*: Methodology of isolation and possible interfering factors in primary culture. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 59, n . 4, p. 429-432, 1996.

AQUINO, M. H.; FILGUEIRAS, A. L.; FERREIRA, M. C.; OLIVEIRA, S. S.; BASTOS, M. C.; TIBANA, A. Antimicrobial resistance and plasmid profiles of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from human and animal sources. **Letters in Applied Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 149-153, 2002.

BAKER, J.; BARTON, M. D.; LANSER, J. *Campylobacter* species in cats and dog in South Australia. *Australia Vet J*, Australia, v. 77, n. 10, p. 662-6, 1999.

BLASER, M. J.; LAFORCE, F. M.; WILSON, N. A.; WANG, W. L. L. Reservoirs for human campylobacteriosis. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 141, n. 5, p. 665, 1980.

BLASER, M. J.; RELLER, L. B. *Campylobacter enteritis*. **Journal of Medicine**, New England, v. 305, n. 24, p. 1444-1452, 1981.

BRASIL. Portaria nº 368 de 4 de setembro de 1997. Regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de elaboração para estabelecimentos elaboradores/ industrializadores de alimentos. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasil. **Diário Oficial da União**. Brasília, 8 de setembro de 1997, seção 1, página 19697. Disponível em <www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 18 jan. 2005.

BURNENS, A.P.; WICK, B.A.; NICOLET, J. Comparison of *Campylobacter* carriage rates in diarrheic and healthy pet animals. **Journal of Veterinary Medical**, v.39, p.175-180, 1992.

COKER, A.O.; ISOKPEHI, R.D.; THOMAS, B.N.; AMISU, K.O., OBIT, C.L. Human campylobacteriosis in developing countries, **Emergency Infection Diseases**, v. 8, n. 3, p. 237/243, 2002.

DAMBORG, P.; OLSEN, K. E. P.; NIELSEN, E. M.; GUARDABASSI, L. Occurrence of *Campylobacter jejuni* in pets living with human patients infected with *C. jejuni*. **Journal of Clinical Microbiology**, Great Britain, v. 42, n. 3, p. 1363-1364, Mar 2004.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. **The Community Summary Report on trends and sources of zoonoses and Zoonotic agents in the European Union in 2007**, The EFSA Journal, 2009, 223. Disponível em: www.efsa.europa.eu. Acesso em: 05 de Jun. de 2009.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. **The Community Summary Report on trends and sources of zoonoses and Zoonotic agents in the European Union in 2007**, The EFSA Journal, 2009, 223. Disponível em : www.efsa.europa.eu. Acesso em: 05 de Jun. de 2010.

EMBORG, H. D.; HEUER, O. E. DANMAP 2002: **use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark**. Danish Veterinary Institute, Copenhagen: 2003.

ENGBERG, J.; NACHAMKIN, I.; FUSSING, V.; MCKHANN, G. M.; GRIFFIN, J. W.; PIFFARETTI, J. C.; NIELSEN, E. M.; GERNER-SMIDT, P. Absence of clonality of *Campylobacter jejuni* in serotypes other than HS:19 associated with Guillain-Barré syndrome and gastroenteritis. **Journal of Infection Diseases**, v. 184, n. 2, p. 215-220, 2001.

ETTINGER, S. J. Infecções bacterianas do trato intestinal. In: _____. **Tratado de medicina interna veterinária: moléstias do cão e do gato**. Tradução de Sônia de Aguiar Gomes do Nascimento e Fernando Gomes do Nascimento. 3. ed. São Paulo: Manole, 1992, p.280.

EVANS, M.; WEGENER, H. C. **Antimicrobial growth promoters ans *Salmonella* spp, *Campylobacter* spp in poultry and swine**. Dinamarca: Danish Veterinary Institute, 2003. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol9no4/02-0325.htm>>. Acesso em: 5 maio. 2005.

FERNANDEZ, H. **Thermophilic species of *Campylobacter*: bacteriological, epidemiological and pathogenical aspects**. Tese de Doutorado. Escola de Medicina de São Paulo, São Paulo, 1983.

FERNANDEZ, H.; MARTIN, R. *Campylobacter* intestinal carriage among stray and pet dogs. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v. 25, n. 6, p. 473-475, 1991.

FERNANDEZ, H. *Campylobacter y Arcobacter*. In: Congresso Chileno de Microbiologia, **Biological Research**, Santiago, v. 38, n. 2, 27 oct 2005.

FERNANDEZ, H. Família *Campylobacteraceae*. In: TRABULSI, L. R. **Microbiologia**, São Paulo: Atheneu, 2008, cap. 47, p. 357-362.

FIGUEROA, C. ; TRONCOSO, M.; GALENO, H.; SOTO, V.; TOLEDO, M.S. Biotypes, serogroups and antibiotic susceptibility of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Chile. **Journal Infection**, v. 20, n. 2, p. 123-127, 1990.

FLEMING, M. P. Incidence of *Campylobacter* infection in dogs. **Veterinary Record**, London, v. 9, n. 107, p. 202, 1980.

FORSYTHE, S. J. Microrganismos espiralados: classificação descritiva. In: _____. **Microbiologia da segurança alimentar**. Tradução de Maria Carolina Minardi Guimarães e Cristina Teonhardt. 1 ed. Rio Grande do Sul: Artmed, 2002, p.159-163.

FRANCO, B. D. G.; LANGRAF, M. In: _____. **Microbiologia dos alimentos**. Tradução de Alfredo Alves de Farias. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. In: _____. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 2. ed. São Paulo: varela, 2001, p. 204-208.

GREENE, C. E. Enteric bacterial infectious campylobacteriosis. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases of the dogs and cats**, Geórgia, v. 2, p. 624, 1984.

GUARDABASSI, L.; SCHWARZ, S.; LLOYD, D. H. Pet animals as reservoirs of antimicrobial resistant bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 321-332, 2004.

HACKETT, T.; LAPPIN, M. R. Prevalence of enteric pathogens in dogs of north-central Colorado. **Journal of American Animal Hospital Association**, v. 39, n. 1, p. 52-60, 2003.

HALD, B., MADSEN, M. Healthy puppies and kittens as carriers of *Campylobacter* spp., with special reference to *Campylobacter upsaliensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Great Britain, v. 35, p. 3351–3352, 1997.

HARMON, K. M.; RAMSOM, G. M.; WESLEY, I. V. Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by polymerase chain reaction. **Molecular and Cellular Probes**, v. 11, p. 195-200, 1997.

HÄNEL, I.; MULLER, J.; MULLER, W.; SCHULZE, E. Correlation between invasion of Caco-2 eukaryotic cells and colonization ability in the chick gut in *Campylobacter jejuni*. **Veterinary Microbiology**, v. 101, p. 75–82, 2004.

HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. Organismos espiralados I: *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Lawsonia*. In: _____. **Microbiologia veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003, p. 83-86.

HOLT, P. E. The role of dogs and cats in the epidemiology of human *Campylobacter* enterocolitis. **Journal of Small Animal Practice**. v. 22, p.681, 1981.

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

HOUF, K.; DE SMET, S.; BARÉ, J.; DAMINET, S. Dogs as carries of the emerging pathogen *Arcobacter*. **Veterinary Microbiology**, United States, v. 130, n. 1-2, p. 208-213, Jul 2008.

KEENER, K. M.; BASHOR, M. P.; CURTIS, P. A.; SHELDON, B. W.; KATHARIOU, S. Comprehensive review of *Campylobacter* and poultry processing. **Institute of Food Technologists**, Estados Unidos, v. 3, p. 105-116, 2004.

KELLER, J.; WIELAND, B.; WITTWER, M.; STEPHAN, R.; PERRETEN, V. Distribution and genetic variability among *Campylobacter* spp. isolates from different animal species and humans in Switzerland. **Zoonoses Public Health**, Switzerland, v. 54, n. 1, p. 2-7, 2007.

KOENE, M. G.; HOUWERS, D. J.; DIJKSTRA, J. R. Simultaneous presence of multiple *Campylobacter* species in dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, Great Britain, v. 42, n. 2, p. 819-821, 2004.

KUANA, S. L.; SANTOS, L. R.; RODRIGUES, L. B.; BORSOI, A.; MORAES, H. L. S.; SALLE, C. T. P.; NASCIMENTO, V. P. Antimicrobial resistance in *Campylobacter* spp isolated from broiler flocks. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 738-740, 2008.

LABARCA, J. A.; STURGEON, K. J.; BORENSTEIN, L.; SALEM, N.; HARVEY, S. M.; LEHNKERING, E.; REPORTER, R.; MASCOLA, L. *Campylobacter upsaliensis*: Another pathogen for consideration in the United States. **Clinical Infection Diseases**, v. 34, n. 11, p. 59-60, 2002.

LEE, A.; SMITH, S. C.; COLOE, P. J. Survival and growth of *Campylobacter jejuni* after artificial inoculation onto chicken skin as a function of temperature and packaging conditions. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 61, n. 12, p. 1609-1614, 1998.

LEE, M. K.; BILLINGTON, S. J.; JOENS, L. A. Potencial virulence and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* isolates from food and companion animals. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 1, n. 4, p. 223-230, 2004.

LOPEZ, C. M.; GIACOBONI, G.; AGOSTINI, A.; CORNERO, F. J.; TELLECHEA, D. M.; TRINIDAD, J. J. Thermotolerant *Campylobacter* in domestic animals in a defined population in Buenos Aires, Argentina. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 55, n. 3, p. 193-200, 2002.

LOPEZ, C.; AGOSTINI, A.; GIACOBONI, G.; CORNERO, F.; TELLECHEA, D.; TRINIDAD, J. J. Campylobacteriosis in a low income community in Buenos Aires, Argentina. **Rev Sci Tech**, v. 22, n. 3, p. 1013-1020, 2003.

LIOR, H. New extended biotyping scheme for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter laridis*. **Clinical Microbiology**. V. 20, p. 630-640, 1984.

MACHADO, R. A. et al. Ocorrência de *Campylobacter* spp entre manipuladores de alimentos em cozinhas hospitalares de localidade urbana da região sul do Brasil. **Revista Saúde Pública**. São Paulo, v. 29, n. 6, p. 472-477, 1995.

MARTINS, A. D. et al. Principais patógenos à carne suína. **Revista Nacional da Carne**. n. 332, Out. de 2004.

MELBY, K. *Campylobacter* og antibiotika resistens, norske forhold. In: Proceedings of the *Campylobacter* hva vet vi hva gjor vi. **The Norwegian Zoonosis Center**. <http://www.vetinst.no/zoonose.htm>.

MENDES, E.N.; QUEIROZ, D.M.M.; CISALPINO, E.O.; PERES, J.N.; PENNA, F.J.; FIGUEIREDO FILHO, P.P. Ocorrência de *Campylobacter jejuni* em crianças com e sem diarréia em Belo Horizonte. **Revista Microbiologia**, v. 18, p. 25-30, 1987.

MODOLO, J. R.; GIUFFRIDA, R.; LOPES, C.A.M. Antimicrobial susceptibility of 51 *Campylobacter* strains isolated from diarrheic and diarrhea-free dogs. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.70, n.3, p.283-286, jul./set., 2003

MODOLO, J. R.; GIUFFRIDA, R. *Campylobacter upsaliensis* isolated from young dogs with and without diarrhea. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 1, p. 72-73, 2004.

MONTEVILLE, M. R.; YOON, J. E.; KONKEL, M. E. Maximal adherence and invasion of INT 407 cells by *Campylobacter jejuni* requires the CadF outer membrane protein and microfilament reorganization. **Microbiology**, v. 149, p. 153–165, 2003.

MOORE, J.E.; CORCORAN, J. E.; DOOLEY, J. S. G.; FANNING, S.; LUCEY, B.; MATSUDA, M.; McDOWELL, D. A.; MEGRAUD, F.; MILLAR, B. C.; O'MAHONY, R.; O'RIORDAN, L.; O'ROURKE, M.; RAO, J. R.; ROONEY, P. J.; SAILS, A.; WHYTE, P. *Campylobacter*. **Veterinary Research**, Les Ulis, v. 36, n. 3, p. 351-382, 2005.

MOSER, I., B. RIEKSNEUWOHNER, P. LENTZSCH, P. SCHWERK, WIELER, L. H. Genomic heterogeneity and O-antigenic diversity of *Campylobacter upsaliensis* and *Campylobacter helveticus* strains isolated from dogs and cats in Germany. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 2548–2557, 2001.

MURPHY, C., CARROLL, C., JORDAN, K. N. Environmental survival mechanisms of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, p. 623-632, 2006.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY PERFORMANCE STANDARDS. **Perfomance Standardas for antimicrobial disk susceptibility tests**. Approved Standard M2-A5 NCCLS, Villanova, 2000.

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, S. F. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens- **International journal of food microbiology**, v. 74, n. 3, p. 177-188, 2002.

QUINN, P. J. Gênero *Campylobacter*. In: _____. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Tradução de Lúcia Helena Niederauer Weiss e Rita Denise Niederauer Weiss. Porto Alegre: Artmed, 2005, p. 172-178.

RACHID.T .L.; ALTERTHUM .F. **Microbiologia**, São Paulo: ATHENEU, 2005

RASTALL, R. A. Bacteria in the gut: friends and foes and how to alter the balance. **Journal of Nutrition**, v. 134, n. 8, p. 2022-2026, 2004.

RINKINEN, M.; JALAVA, K.; WESTERMARCK, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A. C. Interaction between probiotic lactic acid bacteria and canine enteric pathogens: a risk factor for intestinal *Enterococcus faecium* colonization? **Veterinary Microbiology**, v. 20, n. 1-2, p. 111-119, 2003.

RIVERA-AMILL, V.; KIM, B. J.; SESHU, J.; KONKEL, M. E. Secretion of the virulence-associated *Campylobacter* invasion antigens from *Campylobacter jejuni* requires a stimulatory signal. **Journal of Infectious Diseases**, v. 183, p. 1607-1616, 2001.

ROSSI, M.; HÄNNINEN, M. L.; REVEZ, J.; HANNULA, M.; ZANONI, R. G. Occurrence and species level diagnostics of *Campylobacter* spp., enteric *Helicobacter* spp. And *Anaerobiospirillum* spp. In healthy and diarrheic dogs and cats. **Veterinary Microbiology**, v. 129, n. 3-4, p. 304-314, Jun 2008.

SANDBERG, M.; BERGSJO, B.; HOFSHAGEN, M.; SKJERVE, E.; KRUSE, H. Risk factors for *Campylobacter* infection in Norwegian cats and dogs. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 55, p. 241-253, 2002.

SANDBERG, M.; NYGARD, K.; MELDAL, H.; VALLE, P. S.; KRUSE, H.; SKJERVE, E. Incidence trend and risk factors for *Campylobacter* infections in humans in Norway. **BMC Public Health**, v. 7, n. 6, p. 179, 2006.

SANDSTEDT, K.; WIERUP, M. Concomitant occurrence of *Campylobacter* and parvovirus in dogs with gastroenteritis. **Veterinary Research Communications**, n. 4, p. 271, 1981.

SCARCELLI, E.; MIYASHIRO, S.; CAMPOS, F. R.; DE 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. **Revista Higiene Alimentar**, Brasil, v. 19, n. 129, p. 71-75, 2005.

SIEGEL, S. **Estatística não paramétrica para as ciências do comportamento.** São Paulo: McGraw-Hill, p. 350, 1975.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. *Campylobacter*. In: _____. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, p. 201-211, 2007.

SMITH, J. L. Arthritis, Guillain- Barré syndrome, and other sequelae of *Campylobacter jejuni* enteritis. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 58, n. 10, p. 1153-1160, 1995.

SMITH, K. E.; BESSER, J. M.; HEDBERG, C. W.; LEANO, F. T.; BENDER, J. B.; Wicklund, J. H.; JOHNSON, B. P.; MOORE, K. A.; OSTERHOLM, M. T. Quinolone-resistant *Campylobacter jejuni* infections in Minnesota, 1992e 1998, **New England Journal of Medicine**. 340. p. 1525-1532, 1999.

STEINHAUSEROVA, I.; FOJTIKOVA, K.; KLIMES, J. The incidence and PCR detection of *Campylobacter upsaliensis* in dogs and cats. **Letters in Applied Microbiology**, v. 31, p. 209-212, 2000.

TAJADA, P.; GOMEZ-GARCES, J.L.; ALÓS, J.I.; B ALAS, D.; COGOLLOS, R. Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* to 12 beta-lactam agents and combinations with beta-lactamase inhibitors. **Anti. Agen. Chem.**, v.40, p.1924-1925, 1996.

TAMS, T. R. Doenças do intestino grosso. In: _____. Tradução de Ângela Bacic et al. **Gastroenterologia de pequenos animais**, 2 ed. São Paulo: Roca, 2005, p. 255-256.

TAUXE, R. V., PEGUES, D. A., HARGRETT-BEAN, N. *Campylobacter* infections: the emerging national pattern. **American Journal of Public Health**, n. 77, p. 1219-1221, 1987.

TENKATE, T. D.; STAFFORD, R. J.. Risk factors for *Campylobacter* infection in infants and young children: a matched case control study. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 127, n. 3, p. 399-404, 2001.

THOMPSOM, J. H.; KOBAYASHI, G. S.; DREW, W. L. **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A. 1992.

TSAI, H. J.; HUANG, H. C.; LIN, C. M.; LIEN, Y. Y.; CHOU, C. H. *Salmonellae* and *Campylobacters* in household and stray dogs in northern Taiwan. **Veterinary Research Communications**, v. 31, n. 8, p. 931-939, 2007.

VARNAM, A.H.; EVANS, M.G. **Foodborne pathogens - An Illustrated Text**. London : Wolfe, 1996, n. 69; p. 176-7.

VILARDO, M.C.B.; THOMÉ, J.D.S; ESTEVES, W.T.C; FILGUEIRA, A.L.L.; OLIVEIRA, S.S. Aplication of biochemical and polymerase chain reaction assays for identification of *Campylobacter* isolates from non-human primates. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, p.400-501, 2006.

WASSENAAR, T. M.; BLEUMINK-PLUYM, N. M.; VAN DER ZEIJST, B. A. Inactivation of *Campylobacter-jejuni* flagellin genes by homologous recombination demonstrates that FlaA but not FlaB is required for invasion. **EMBO Journal**, v. 10, p. 2055–2061, 1991.

WIELAND, B.; REGULA, G.; DANUSER, J.; WITTNER, M.; BURNERS, A. P.; WASSENAAR, T. M.; STARK, K. D. C. *Campylobacter* spp. in dogs and cats in Switzerland: risk factor analysis and molecular characterization with AFLP. **Journal Veterinary Medical B Infection and Diseases Veterinary Public Health**, v. 52, n. 4, p. 183-189, May 2005.

WOLF, T. F.; DUIM, B.; GEELEN S. P.; RIGTER, A.; THOMSON-CARTER, F.; FLEER, A.; WAGENAAR, J. A. Neonatal sepsis by *Campylobacter jejuni*: genetically proven transmission from a household puppy. **Clinical Infection Diseases**, v. 32, n. 5, p. 97-99, 2001.

WHO - **World Health organization.** *Campylobacter.* 2000. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/en/print.html>>. Acesso em: 21 mar. 2005.

YNTERIAN, C. G. **Campylobacter.** 2002. Disponível em: <http://www.interlabdist.com.br/ind_htm/internews_ind_4.htm> Acesso em: 29 mar. 2005.

ZHENG, J.; MENG, J. H.; ZHAO, S. H.; SINGH, R.; SONG, W. X. Adherence to and invasion of human intestinal epithelial cells by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from retail meat products. **Journal of Food Protection**, v. 69, p. 768–774, 2006.

ZIPRIN, R. L.; YOUNG, C. R.; BYRD, J. A.; STANKER, L. H.; HUME, M. E.; GRAY, S. A.; KIM, B. J.; KONKEL, M. E. Role of *Campylobacter jejuni* potential virulence genes in cecal colonization. **Avian Diseases**, v. 45, p. 549–557, 2001.

8 – ANEXOS

ANEXO I – Termo de consentimento livre e esclarecido solicitado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais

Você está sendo convidado para participar da pesquisa sobre “Ocorrência e suscetibilidade antimicrobiana de *Campylobacter* spp. em cães, gatos, crianças e sua importância zoonótica”, sob a responsabilidade dos seguintes pesquisadores: Daise Aparecida Rossi; Cecília Gomes Rodrigues; Fernando Antônio Ferreira; Maria Bernadete Jeha Araújo.

Nesta pesquisa nós estamos buscando entender o papel epidemiológico das espécies de *Campylobacter* spp. Na sua participação você permitirá coletar amostras fecais do(s) animal(is) sob sua responsabilidade, com o uso de suabes estéreis.

Em nenhum momento você será identificado. Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada.

Você não terá nenhum gasto ou ganho financeiro por participar da pesquisa.

Os benefícios serão identificar uma possível zoonose dentro do seu ambiente domiciliar, podendo dessa forma utilizar medidas profiláticas adequadas.

Você é livre para parar de participar a qualquer momento sem nenhum prejuízo para o senhor (a).

Uma cópia deste Termo de consentimento ficará com o senhor(a).

Qualquer dúvida a respeito da pesquisa o senhor poderá entrar em contato com os pesquisadores: Daise Aparecida Rossi e/ou Cecília Gomes Rodrigues, Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia – MG, rua Ceará s/n Bloco 2D, sala 43, fone: (034) 3218-2482. CEP/UFU: Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco J, Campus Santa Mônica – Uberlândia –MG, CEP: 38408-100; fone: 34-32394531

Uberlândia, de de 20

Assinatura do pesquisador

Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido

Participante da pesquisa

ANEXO II – Termo de consentimento livre e esclarecido solicitado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

Você está sendo convidado para participar da pesquisa sobre “Ocorrência e suscetibilidade antimicrobiana de *Campylobacter* spp. em cães, gatos, crianças e sua importância zoonótica”, sob a responsabilidade dos seguintes pesquisadores: Daise Aparecida Rossi; Cecília Gomes Rodrigues; Fernando Antônio Ferreira; Maria Bernadete Jeha Araújo.

Nesta pesquisa nós estamos buscando entender o papel epidemiológico das espécies de *Campylobacter* spp. Na sua participação você permitirá coletar amostras fecais da(s) criança(s) sob sua responsabilidade, com o uso de potes estéreis descartáveis.

Em nenhum momento você será identificado. Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada.

Você não terá nenhum gasto ou ganho financeiro por participar da pesquisa.

Os benefícios serão identificar uma possível zoonose dentro do seu ambiente domiciliar, podendo dessa forma utilizar medidas profiláticas adequadas.

Você é livre para parar de participar a qualquer momento sem nenhum prejuízo para o senhor (a).

Uma cópia deste Termo de consentimento ficará com o senhor(a).

Qualquer dúvida a respeito da pesquisa o senhor poderá entrar em contato com os pesquisadores: Daise Aparecida Rossi e/ou Cecília Gomes Rodrigues, Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia – MG, rua Ceará s/n Bloco 2D, sala 43, fone: (034) 3218-2482.

CEP/UFU: Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco J, Campus Santa Mônica – Uberlândia –MG, CEP: 38408-100; fone: 34-32394531

Uberlândia, de 20

Assinatura do pesquisador

Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido

Participante da pesquisa

ANEXO III – Inquérito epidemiológico dos animais atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia.

a- Identificação do animal

Espécie () canina () felina

Idade

Sexo () fêmea () macho

b- Anamnesia clínica

Animais sem gastroenterite ()

Animais com gastroenterite ()

Características das fezes:

líquida () pastosa () mucopurulenta () sanguinolenta ()

Curso da doença (quanto tempo os sinais se manifestaram)

Visualização, tipo e quantidade observada de ectoparasitas

Presença de material não digerido ()

Febre()

vômito()

dores abdominais()

fraqueza muscular()

dores articulares()

Calendário de vacinação para cães (parvovírus, antirábica, giárdia, gripe canina, leptospirose, octupla ou déctupla) e para gatos (quádrupla e antirábica), especificando doses e período em que foi administrado essas doses

Exames parasitológicos

() positivo tipo de endoparasitas

() negativo

Uso de vermífugos ou antibióticos (freqüência de administração, período do tratamento, droga utilizada)

Presença de outros animais (galinhas, aves silvestres, suíno, bovinos) e qual o tipo de contato entre esses animais.

Presença de crianças no domicílio.

Localização da moradia (zona rural, urbana ou distrito próximo as áreas urbanas).

Moradia apresenta saneamento básico (água e esgoto tratados).

Alimentação destinada a esses animais (industrializada ou caseira).

Tipo de consumo dos alimentos (carne ou ovos cru ou mal cozidos, leite não pasteurizado) e procedência destes alimentos, verificar a possibilidade de contaminação cruzada na cozinha com produtos que não são cozidos antes de ser consumidos.

Limpeza da moradia e forma de descarte das fezes dos animais.

Higienização correta das mãos antes de manipular alimentos e limpeza adequada dos utensílios domésticos.

Presença de aterros sanitários, lotes com restos alimentares ou animais mortos próximo as moradias.

Contato direto com material fecal de animais infectados.

ANEXO IV – Questionário Clínico das crianças conviventes com os animais pets atendidos no H-Vet da UFU.

Código da criança: _____

Visita à residência (endereço): _____

a - Identificação da criança (para todas com menos de 5 anos)

Idade: _____

Sexo: _____

b-Episódio de diarréia (aguda, prolongada, crônica), período em que os sintomas aparecerão e freqüência da diarréia.

c-característica das fezes:

() líquida () semi-líquida () semi-pastosa () pastosa

() sangue () muco () pus

() presença de alimentos não digeridos

() presença de parasitas macroscópicos

() vômitos () febre

d-Tipo de contato com o(s) animal(is) (íntimo, regular ou eventual)

e-Alimentação da criança (tipo, freqüência, procedência)

f-Consumo de água (tratamento, origem)

g-Uso de medicamentos (nome da droga, freqüência e período de administração)

h-presença de outras pessoas no domicílio com diarréia (características das fezes e episódios)

i- Outras observações

ANEXO V – Inquérito epidemiológico das crianças atendidas nos Setores de Pronto Socorro e Pronto Atendimento do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

1-Histórico Clínico do Paciente (período em que foi atendido ou hospitalizado: evolução do quadro clínico, prescrição utilizada e resposta do paciente a determinadas drogas, exames solicitados).

2-Idade e sexo.

3-Episódios de diarréia anterior (curso da doença).

4-Quadro de vermifugação (medicamento utilizado, validade do produto, tempo e intervalo de administração, dose utilizada).

5-Apresenta sintomatologia clínica como paralisia ou fadiga muscular e dor.

6-Período em que os sinais se manifestaram.

7-Contato com animais confinados sem/com acesso a rua, tipo de contato, procedência dos animais.

8-Alimentação (origem do produto, tempo e local de estocagem, tipo de consumo).

9-Moradia (saneamento básico, localização próxima a depósito de lixo ou de restos de animais).