

DÉBORA DIRANI SENA DE GOBBI

Isolamento e caracterização de amostras de *Arcobacter* spp em sistemas intensivos de produção de suínos e abatedouros

São Paulo
2010

DÉBORA DIRANI SENA DE GOBBI

Isolamento e caracterização de amostras de *Arcobacter* spp em sistemas intensivos de produção de suínos e abatedouros

São Paulo

2010

DÉBORA DIRANI SENA DE GOBBI

Isolamento e caracterização de amostras de *Arcobacter* spp em sistemas intensivos de produção de suínos e abatedouros.

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

Departamento:

Medicina Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Profa. Dra. Andrea Micke Moreno

São Paulo

2010

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2228
FMVZ

Gobbi, Débora Dirani Sena de
Isolamento e caracterização de amostras de *Arcobacter* spp em sistemas intensivos de produção de suínos e abatedouros / Débora Dirani Sena de Gobbi. -- 2010.
62 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Andrea Micke Moreno.

1. Suínos. 2. Arcobacter. 3. Abatedouro. 4. PCR. 5. PFGE. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

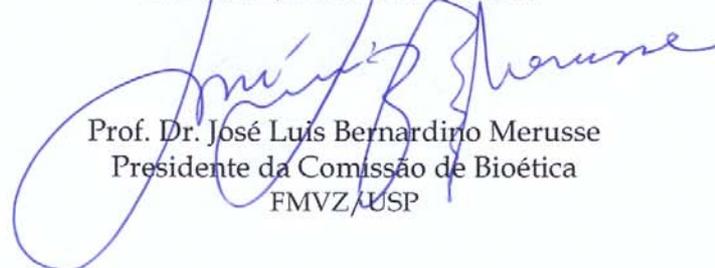
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Isolamento e caracterização de *Listeria monocytogenes* e *Yersinia enterocolitica* em abatedouros e cortes de carne suína no Estado de São Paulo e sua comparação genotípica com isolados de casos clínicos em humanos”, protocolado sob o nº1103/2007, utilizando 360 (trezentos e sessenta) suínos (peças de matadouro), sob a responsabilidade da Profa. Dra. Andréa Micke Moreno, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 23/05/07.

(We certify that the Research “Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* from slaughterhouses and pork from São Paulo State and their genotypic comparison with clinical human isolates”, protocol number 1103/2007, utilizing 360 (tree hundred and sixty) swines (parts of slaughterhouses), under the responsibility Profa. Dra. Andréa Micke Moreno, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 05/23/2007).

São Paulo, 24 de maio de 2007



Prof. Dr. José Luís Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: GOBBI, Débora Dirani Sena de

Título: Isolamento e caracterização de amostras de *Arcobacter* spp em sistemas intensivos de produção de suínos e abatedouros

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

*Aos meus amados pais, Márcia e João, e a
minha querida irmã Anna, pelo amor e apoio
incondicionais.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo constante apoio, incentivos e carinho a mim dispensados durante toda a minha trajetória pessoal e estudantil.

À Prof. Dra. Andrea Micke Moreno, por todo conhecimento, paciência e orientação desde os anos iniciais de minha graduação e mestrado. Por todas as oportunidades oferecidas e pelo aprendizado pessoal e profissional.

Á amiga Renata Paixão, pela ajuda constante em meu projeto, desde a coleta aos ensinamentos sobre PFGE, e pela inestimável amizade de todas as horas.

Ao amigo Sergio Novita, pelo apoio nas coletas e pela constante amizade, apoio e incentivo.

Á amiga Danielle, pelo apoio nas coletas, amizade e carinho.

Às amigas Thaís, Cleise, Roberta e Tânia pelos anos de convívio, amizade e apoio durante a realização desse projeto.

Á amiga Marina, pela ajuda na formatação da dissertação, pela amizade e convívio.

Á amiga Paula, pela ajuda com o material utilizado no projeto.

Às Profs. Dra. Simone Bailan e Dra. Evelise Telles pelo espaço cedido, sem o qual o projeto não poderia ter sido iniciado.

Á amiga Sandra, pela amizade, incentivos constantes e pela recepção calorosa em seu ambiente de trabalho.

Ao amigo Orlando Bispo, pela convivência e apoio durante a permanência no Laboratório de Higiene Alimentar.

Á FAPESP, pela bolsa que possibilitou o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Sérgio J. Oliveira, pelas amostras cedidas.

Aos funcionários e veterinários responsáveis pelos abatedouros nos quais as coletas foram realizadas, pela ajuda nos procedimentos e boa vontade em nos receber.

A todos os professores, pós-graduandos e funcionários do Departamento de Medicina Preventiva e Saúde Animal, pelos ensinamentos transmitidos, apoio e convívio.

“Além da mente humana e como um impulso livre, cria-se a Ciência. Esta se renova, assim como as gerações, frente a uma atividade que constitui o melhor jogo do Homo ludens: a ciência é, no mais estrito e melhor dos sentidos, uma gloriosa diversão”

(Jacques Barzun)

RESUMO

GOBBI, D. D. S. **Isolamento e caracterização de amostras de *Arcobacter* spp. em sistemas intensivos de produção de suínos e abatedouros.** [Isolation and characterization of *Arcobacter* spp. strains from intensive swine productions and slaughterhouses]. 2010. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

As espécies do gênero *Arcobacter* eram classificadas até a década de 1990 como pertencentes ao gênero *Campylobacter*. Atualmente três das cinco espécies deste gênero são consideradas potencialmente zoonóticas, podendo ser transmitidas por alimentos de origem animal. O presente estudo teve como objetivo isolar e caracterizar geneticamente amostras de *Arcobacter* spp., isoladas a partir de 120 amostras de carcaças, 120 amostras de fezes e 24 de amostras de músculo suíno coletadas em dois abatedouros localizados no Estado de São Paulo. Os isolados obtidos foram submetidos ao PCR-Multiplex para a determinação das espécies do gênero e analisados através da eletroforese em campo pulsado. O agente foi isolado de 71,6% das carcaças, 4,16% das amostras de fezes e 8,3% das amostras de músculo. As espécies mais prevalentes foram *A. butzleri* e *A. cryaerophilus*. A análise dos dados obtidos no PFGE (*Sma*I) revelou 51 perfis distintos, com um índice discriminatório de 0,98 e grande diversidade genotípica entre as amostras. O sítio de isolamento mais frequente para o agente foram as carcaças e o PFGE mostrou-se um bom instrumento para a caracterização e discriminação de cepas deste gênero

Palavras-chave: Suínos. *Arcobacter*. Abatedouro. PCR. PFGE.

ABSTRACT

GOBBI, D. D. S. **Isolation and characterization of *Arcobacter* spp. strains from intensive swine productions and slaughterhouses.** [Isolamento e caracterização de amostras de *Arcobacter* spp. em sistemas intensivos de produção de suínos e abatedouros]. 2010. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The species of *Arcobacter* spp. genus have been classified until 1990 as species belonging to the genus *Campylobacter*. Nowadays, three of five species of this genus are considered as potentially zoonotic, and can be transmitted from food of animal origin. The present study goal was to isolate and characterize genetically strains of *Arcobacter* spp. isolated from 120 carcasses, 120 faeces and 24 swine muscle sampled in two swine slaughterhouses located in São Paulo State. Isolates were submitted to multiplex-PCR to identify species of the genus and analyzed by pulsed field gel electrophoresis. The agent was isolated from 71,6% of carcasses, 4,16% of faeces and 8,3% of muscles samples. *A. butzleri* and *A. cryaerophilus* were the most prevalent species. The analysis of data obtained in PFGE showed 51 distinct profiles, the discriminatory index of 0,98 and it demonstrated large genotypic diversity among the strains. The main isolation site were the carcasses and the PFGE was a good tool to characterize and discriminate *Arcobacter* spp. strains.

Key words: Swine. *Arcobacter*. Slaughterhouses. PCR. PFGE.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1	ETIOLOGIA.....	12
2.2	PATOGENICIDADE.....	14
2.3	EPIDEMIOLOGIA.....	15
2.4	PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL.....	16
2.5	ÁGUA COMO FONTE DE CONTAMINAÇÃO.....	17
2.6	INFECÇÃO EM HUMANOS.....	18
2.7	DOENÇA NOS SUÍNOS.....	20
2.8	MÉTODOS DE ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO.....	21
2.8.1	Métodos Convencionais.....	21
2.8.2	Métodos Moleculares.....	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1	AMOSTRAS.....	25
3.2	COLHEITA DAS AMOSTRAS.....	25
3.3	ISOLAMENTO.....	26
3.4	EXTRAÇÃO DO DNA.....	26
3.5	AMPLIFICAÇÃO DO DNA.....	27
3.6	DETECÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO.....	27
3.7	ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO (PFGE).....	27
3.8	DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DISCRIMINATÓRIO (ID).....	28
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS.....	28
4	RESULTADOS	29
5	DISCUSSÃO	45
6	CONCLUSÕES	54
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Arcobacter* possui, atualmente, sete espécies e pertence à família *Campylobacteriaceae*. As espécies *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii* estão relacionadas com infecções em seres humanos e animais de produção.

Por muitos anos estes agentes foram considerados como pertencentes ao gênero *Campylobacter*. Assim como ocorre com as campilobactérias, o sucesso para o isolamento deste microrganismo é influenciado pelas exigências diferenciadas de seu crescimento *in vitro*, já que possui crescimento fastidioso e é inerte às provas bioquímicas.

É considerado um agente potencialmente zoonótico, transmitido por alimentos e pela água. Os produtos de origem animal, em especial aqueles oriundos de aves e suínos, estão envolvidos com a veiculação do agente.

A epidemiologia do microrganismo é pouco elucidada, algumas questões referentes à cadeia de transmissão dos alimentos para o ser humano necessitam ser mais bem compreendidas.

O presente estudo teve por objetivo avaliar a presença do agente em carcaças, fezes e cortes de carne suína, colhidas em abatedouros e estabelecimentos de comercialização de carne resfriada.

Foram determinadas as espécies mais freqüentes e os isolados foram genotipados através da eletroforese de campo pulsado. O trabalho forneceu importantes informações sobre o papel do suíno como fonte de infecção do *Arcobacter spp.* para os seres humanos.

2 RESUMO DE LITERATURA

São descritos a seguir os pontos mais relevantes sobre *Arcobacter* spp.

2.1 ETIOLOGIA

Arcobacter spp é uma bactéria pertencente à família *Campylobacteraceae*, que também abrange as bactérias do gênero *Campylobacter* e *Helicobacter*. Esses três gêneros formam um grupo filogenético distinto conhecido como superfamília VI RNA ou divisão épsilon da classe das Proteobactérias. (LEHNER et al, 2005), tal agrupamento se caracteriza por sua morfologia em espiral, com flagelos polares que lhe conferem motilidade rápida (NEWELL, 1997).

O gênero *Arcobacter* foi descrito em 1991, por Vandamme e integra bactérias que no passado eram classificadas como pertencentes ao gênero *Campylobacter*, e por suas características de crescimento *in vitro* eram conhecidas como *Campylobacter* aerotolerantes. (PHILLIPS, 2001). Vandamme reclassificou 77 diferentes espécies de *Campylobacter* em cinco grupos distintos de *Arcobacter*. (JOHNSON; MURANO, 1999). O isolamento do agente foi descrito pela primeira vez em 1977, a partir de fetos abortados de bovinos (VILLARRUEL-LOPEZ et al., 2003).

São microrganismos Gram negativos, com aproximadamente 0.2- 0.9 µm de largura por 0.5-3 µm de comprimento, que crescem tanto em atmosfera microaeróbica como aeróbica, não esporulados e curvos. Sua temperatura de crescimento varia de 15 a 37°C, sendo que podem crescer a 30°C após isolamento primário em atmosfera microaeróbica. (SNELLING et al., 2006). Podem sobreviver à temperatura de 4°C, comumente encontrada em abatedouros e estabelecimentos processadores de alimentos, e morrem em poucos segundos a 55°C (ATANASSOVA et al., 2008).

Por serem extremamente parecidos com as bactérias do gênero *Campylobacter* spp, algumas características são utilizadas para diferenciá-los dos

microrganismos deste gênero: não são capazes de crescer a 42°C, possuem crescimento ótimo a 30°C em aerobiose e apresentam o conteúdo de G+C que varia de 27 a 30 mol % (PHILLIPS, 2001).

Assim como ocorre com as espécies de *Campylobacter*, a rotina de identificação e diferenciação não é muito fácil, pois esses microrganismos são relativamente inertes às provas bioquímicas e possuem crescimento fastidioso. (ATABAY, 2002; ATABAY et al., 2006).

Atualmente o gênero é composto por sete espécies: *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. nitrofigilis*, *A. skirrowii* e, mais recentemente, *A. cibarius*. *A. halophilus* e *A. sulfidicus*. (COLLADO et al., 2008). As espécies *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii* estão relacionadas com doenças em seres humanos e em animais de produção, e são as mais estudadas do gênero. *A. cibarius* já foi isolada de carcaças de frangos. (HO et al., 2007). *A. nitrofigilis* é um organismo que fixa nitrogênio e é encontrado em associação a uma planta pantanosa chamada *Spartina alterniflora*. (SNELLING et al., 2006; PEJCHALOVÁ et al., 2008).

Graças à grande diversidade de hospedeiros das espécies deste gênero, este é incomum e muito provavelmente, bastante heterogêneo. (HO et al., 2008a).

A espécie *A. butzleri* é capaz de crescer em meio contendo 1% de glicina e 1,5% de NaCl numa faixa de pH entre 5 e 8,5 e possui fraca reação a catalase e resistência ao cloreto de cádmio. Já *A. cryaerophilus* possui forte atividade da catalase e é sensível ao cloreto de cádmio. Tais características são utilizadas para diferenciar as duas espécies quando em meio de cultivo (HARMON et al., 1997; LEHNER et al., 2005).

Além disso, as colônias de *A. butzleri* podem ser diferenciadas das outras duas espécies por serem maiores e crescerem mais rapidamente (ATABAY et al., 1998). O tamanho da colônia pode variar de 1 a 3 mm, com coloração de amarela a bege. (HARRAB et al, 1998). Algumas colônias podem ou não ser Alfa - hemolíticas.

A espécie *A. cryaerophilus* tem sido classificada em dois grupos distintos: 1A e 1B através da restrição do DNA com a enzima Pvu II (OLIVEIRA et al., 1999a).

2.2 PATOGENICIDADE

Apenas as espécies *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii* são consideradas patogênicas para o homem e animais (NEWELL,1997). Até o momento, os mecanismos de patogenicidade e os possíveis fatores de virulência do *Arcobacter* spp são pouco conhecidos (FERNÁNDEZ et al., 1995).

Sabe-se que algumas cepas podem ou não ser alfa-hemolíticas, porém não se conhece a relação desta característica na virulência do microrganismo (ATABAY et al., 2002).

Fernandez et al. (1995) determinaram a existência toxinas ou capacidade de invasão de dois isolados de *A. cryaerophilus* a partir de um feto bovino abortado e fezes de suíno. A presença de toxinas foi avaliada através do teste em alça ligada de rato, que resultou na distensão das alças com acúmulo de fluído e no aumento da concentração de eletrólitos dentro do lúmen intestinal. No mesmo estudo a capacidade de invasão tecidual pelo agente foi avaliada em culturas celulares HEP-2, nas quais foi observada a invasão das células pelos microrganismos dos dois isolados.

Wesley et al. (1996) infectaram experimentalmente leitões de apenas um dia de vida, obtidos por cesariana e privados do recebimento do colostro, com cepas de *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii*. O tempo de eliminação fecal do agente foi avaliado, os leitões que receberam as cepas de *A. butzleri* eliminaram o agente por tempo até 10 dias, o que indica a colonização intestinal e multiplicação do agente no organismo. O tempo de eliminação das outras espécies foi bem reduzido, o que pode sugerir um menor grau de patogenicidade das mesmas.

Villarruel-López et al. (2003) testaram amostras de *Arcobacter* spp. isoladas de diversos tipos de carne e as testou em cultivo de células Vero. Noventa e cinco por cento das cepas produziram efeito citotóxico na linhagem testada, sendo que 38% das amostras induziram um efeito tipo alongamento celular, indicativo de produção de enterotoxina. Outro efeito observado em algumas cepas foi a formação de vacúolos, possivelmente relacionados com a produção de uma toxina de vacuolização.

Ho et al. (2007) pesquisaram a habilidade de adesão, invasão e indução da expressão da interleucina-8 em linhagens de células epiteliais intestinais humanas e suínas. Todas as cepas estudadas se aderiram e induziram a produção de IL-8. *A. cibarius* apresentou a maior habilidade de adesão, e apenas *A. cryaerophilus* invadiu as células.

2.3 EPIDEMIOLOGIA

Arcobacter spp foi relatado em diversos países: Nova Zelândia (BRIGHTWELL et al., 2007); Dinamarca (ATABAY et al., 2002); Bélgica (HOUF et al., 2003); Turquia (ON et al., 2003); Alemanha (HARRAB et al., 1998; ATANASSOVA et al., 2008); Brasil (OLIVEIRA et al., 1999b); Reino Unido (SNELLING et al., 2006); Itália (VANDAMME et al., 1993); África do Sul (DIERGAARDT et al., 2004); Austrália (RIVAS et al., 2004); Suíça (LEHNER et al., 2005); Espanha (COLLADO et al., 2008); República Checa (PEJCHALOVÁ et al., 2008); Irlanda (HAMILL et al., 2008) e Estados Unidos (WESLEY, 2007).

O agente é associado à doença em seres humanos e em animais, já isolado de diversos tipos de tecidos, como fetos bovinos e suínos resultantes de abortos (OLIVEIRA et al., 1997; ON et al., 2003); fezes de animais de diversas espécies (VAN DRIESSCHE et al., 2003; ATABAY et al., 2006); carcaças de aves e suínos (ATABAY et al., 1998; HARRAB et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2003; KABEYA et al., 2004) e também de produtos de origem animal (ZANETTI et al., 1996; OHLENDORF et al., 2002; HOUF et al., 2003) e a partir das fezes e da cultura do sangue de indivíduos que sofreram de gastroenterite e bacteremia (VANDAMME et al., 1992; ENGBERG et al., 2000; LAU et al., 2002).

2.4 PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL

A via mais importante de transmissão de *Arcobacter* spp. para seres humanos é a ingestão de alimentos de origem animal e água contaminados (HAMILL et al., 2008). Em relação aos reservatórios do agente, os animais de produção são importantes carreadores, principalmente aves e suínos. O agente foi isolado do intestino de animais saudáveis de diferentes espécies como bovinos, suínos, ovinos e eqüinos (LEHNER et al., 2005).

Lipman et al. (2008) estudaram a presença de *Arcobacter* spp em galinhas poedeiras e a possível transmissão para os ovos. Os resultados demonstraram a presença do agente no trato intestinal (com uma prevalência variável de 20 a 85%), mas não nos ovos. Assim como ocorre com o *Campylobacter*, não existe consenso sobre a possibilidade de transmissão vertical do agente para o ovo.

Arcobacter spp. é encontrado em carnes de aves e suínos, e em carnes de origem bovina e ovina, em menor frequência (WESLEY, 2007). Além disso, o agente foi isolado de leite cru de vacas com mastite e de primatas não-humanos com diarreia (VAN DRIESSCHE et al., 2003).

Dentre as espécies conhecidas, *A. butzleri* é a mais comumente isolada de produtos de origem animal, assim como carcaças de aves e suínos (PHILLIPS, 1999).

Pouco foi esclarecido a respeito da epidemiologia do *Arcobacter* spp. em abatedouros. Kabeya et al. (2004) e Ho et al. (2008) defendem a hipótese de que as carcaças de frangos são contaminadas após o abate, em etapas como a escalda. Houf et al. (2000) acreditam que o procedimento de abate pode não ter papel importante nos níveis de contaminação de carcaças de frango, uma vez que a bactéria não foi isolada do equipamento de abate antes do início das atividades.

Sabe-se que *A. butzleri* é capaz de colonizar as superfícies de equipamentos feitos de aço, cobre e polietileno, o que reforça a questão da formação dos biofilmes em abatedouros, tornando a contaminação do local persistente (KJELDGAARD et al., 2009).

Em relação à prevalência em carcaças de suínos no Brasil, Oliveira et al. (2003), obtiveram 21 isolados de *Arcobacter* spp. a partir de 74 carcaças avaliadas (29,3%) em abatedouro do Sul do país.

Collins et al. (1996) analisando amostras de carne de diferentes abatedouros descrevem uma prevalência que variou de 5 a 90%, enquanto DE Boer et al. (1996) isolaram o agente em apenas 0,5% das amostras de carne minimamente processadas. No Japão, Kabeya et al. (2004) analisaram 100 amostras de carne suína e a frequência de isolamento foi de 7%. Ohlendorf et al. (2002), nos Estados Unidos, encontraram uma frequência que variou de 0 a 64% de acordo com os diferentes abatedouros, observando ainda frequência de contaminação cinco vezes maior em peças de carne com baixos teores de gordura quando comparada a peças de carne com alto teor de gordura. Na Austrália, Rivas et al. (2004), obtiveram uma frequência de 29% de isolados em amostras de carne suína. Na Itália, Zanetti et al. (1996) obtiveram uma prevalência de 3,7% em cortes de lombo suíno, e não isolaram o agente de salsichas suínas.

A análise de fezes de suínos obtidas em abatedouros na Bélgica resultou em uma prevalência de 44% (36/82) de *Arcobacter* spp, das quais 29 foram *A. butzleri* e sete foram *A. cryaerophilus* (VAN DRIESSCHE et al., 2003). Em 1996, Harmon e Wesley obtiveram uma prevalência de 40% de positivos em amostras de fezes de animais saudáveis nos Estados Unidos. Tal constatação pode indicar que seja possível que a carne proveniente do abate desses animais possa sofrer contaminação cruzada. Diferentemente das aves, o suíno possui uma temperatura interna (39°C) favorável ao *Arcobacter* spp. enquanto que no caso das aves a temperatura interna (42 °C) é muito alta para a multiplicação deste gênero bacteriano (OHLENDORF; MURANO, 2002).

Em outras espécies a frequência de isolamento a partir das fezes foi de 39% em bovinos, 16% em ovinos e 15% em eqüinos, segundo estudo conduzido na Bélgica por Van Driessche et al. (2003).

2.5 ÁGUA COMO FONTE DE CONTAMINAÇÃO

Outra fonte importante de contaminação pelo agente é a água. Os microrganismos contaminam o meio aquático, assim como a água utilizada em abatedouros, casas, estações de tratamento a partir das fezes dos animais portadores. *A. butzleri* e *A. cryaerophilus* já foram isoladas de estações de tratamento de água na África do Sul por Diergaardt et al., (2004).

Collado et al. (2008) investigaram a presença de *Arcobacter* spp. em 205 amostras de água proveniente de rios, lagos, mar e efluentes de esgoto. Do total, 55,1% foram positivas para o isolamento do agente e houve uma associação significativa com bactérias indicadoras de poluição fecal (coliformes fecais como *Escherichia coli*, enterococos). Tal associação entre a presença de *Arcobacter* spp. e coliformes fecais sugere que a água do mar não seja habitat natural do agente, e sim, que ele apareça quando há poluição por dejetos, diferentemente do que defendem outros autores .

A veiculação da bactéria pela água do mar também implica em contaminação de crustáceos e mariscos, utilizados na alimentação humana, sendo que segundo Romero et al. (2002), *Arcobacter* spp. é regularmente encontrado em ostras.

2.6 INFECÇÃO EM HUMANOS

Campylobacter spp. e microrganismos *Campylobacter-like* foram identificados como patógenos de importância veterinária há mais de 80 anos, porém devido ao desenvolvimento de técnicas de cultivo seletivo nos anos 70, sua associação com doenças entéricas em seres humanos foi estabelecida (NEWELL, 1997).

Campylobacter jejuni é uma das maiores causas de enterite bacteriana em humanos. Em países desenvolvidos, como os EUA, 1% da população é afetada anualmente por infecção por *Campylobacter* spp. e os custos das infecções podem girar em torno de 6,2 bilhões de dólares.

Graças a sua similaridade filogenética, a patogênese, distribuição e vias de transmissão descritas para *C. jejuni* podem ser estendidas para o gênero *Arcobacter*. No entanto, suas semelhanças morfológicas e bioquímicas podem levar a uma detecção incorreta destes agentes. (SNELLING et al., 2005; ATABAY et al., 2006; WESLEY et al., 2007).

Além disso, o isolamento e identificação de *Arcobacter* spp. não são normalmente realizados na rotina de laboratórios de diagnóstico humano, por isso também, pouco se sabe sobre o seu papel em saúde pública. É provável que sua importância como agente zoonótico e sua prevalência em infecções de seres humanos sejam subestimadas graças à utilização de métodos de tipificação inapropriados, já que não há métodos padronizados para o seu isolamento (ATABAY et al., 2006).

A. butzleri e *A. cryaerophilus* são as espécies mais frequentemente relacionadas com gastroenterites em humanos (VANDAMME et al., 1992). Entre estas duas espécies, *A. butzleri* foi a mais frequente nas fezes de pacientes da Bélgica e da França (HO et al., 2006) e de pacientes com queixas gastrointestinais na África do Sul (SAMIE et al., 2006).

A primeira evidência de uma relação epidemiológica entre *Arcobacter* spp. e doença nos seres humanos foi sugerida a partir de um surto de cólica abdominal em crianças na Itália. O surto ocorreu em 1983, em um berçário e escola primária, o qual afetou 10 crianças entre 2 a 8 anos, três das quais foram hospitalizadas devido aos sintomas muito agudos. As amostras de fezes coletadas das crianças foram positivas para o *A. butzleri* (ATABAY et al., 2002).

Segundo Mansfield, *A. butzleri* não é habitante normal do intestino de seres humanos, sendo que o autor observou apenas 2% das amostras fecais de indivíduos saudáveis contaminadas pelo agente (MANSFIELD¹, 2000 apud OLIVEIRA et al., 2003, p. 889).

Estudos de biotipificação e sorotipagem demonstraram que os mesmos biótipos são simultaneamente distribuídos entre seres humanos e animais (HOUF et al., 2000).

Os sintomas de gastroenterites causada por *Arcobacter* spp. são similares àqueles causados por outros agentes enteropatogênicos: diarreia aquosa, cólica

abdominal, náusea, febre, vômitos e calafrios. Pouco se sabe sobre seu período de incubação e duração dos sintomas (VANDAMME et al., 1993).

Além dos relatos de gastroenterites em crianças e adultos relacionados com *Arcobacter* spp., outras doenças foram associadas à presença do patógeno, cuja infecção pode se tornar fatal em pacientes imunocomprometidos. Lau et al. (2002) relataram bacteremia em uma mulher de 69 anos com quadro agudo de apendicite e Phillips (2001) relata ocorrência de bacteremia em neonato, um caso de bacteremia em paciente com cirrose hepática, e também quadro de uremia associada à bacteremia.

A associação entre *Arcobacter* spp. e *Helicobacter pylori* está sendo relacionada à ocorrência em seres humanos de gastrite, úlceras e até câncer gástrico, o que vem despertando o interesse dos pesquisadores pelo agente em termos de saúde pública (SUAREZ et al., 1997).

2.7 DOENÇA NOS SUÍNOS

Há vários relatos do isolamento deste microrganismo a partir de fezes de animais de produção. No caso de suínos, o agente é relacionado à ocorrência de problemas reprodutivos, mais freqüentemente isolado de fetos suínos abortados e de marrãs inférteis com descarga vaginal recorrente (NEWELL, 1997; OLIVEIRA et al., 1999).

No entanto, a sua patogenicidade em suínos tem sido discutida já que o agente pode ser isolado do trato gastrintestinal de animais saudáveis (NEWELL, 1997; OLIVEIRA et al., 1999). O agente foi isolado de marrãs e cachaços clinicamente assintomáticos com diferentes níveis de prevalência e colonização, e houve eliminação intermitente de até três espécies simultaneamente (VAN DRIESSCHE et al., 2003).

A. cryaerophilus é a espécie mais prevalente nos casos de problemas reprodutivos nos animais, ao contrário de *A. butzleri*, que é a mais associada aos casos de enterite em seres humanos e mais freqüentemente encontrada em carcaças de aves e suínos. No Brasil, Oliveira et al. (1997) analisaram seis cepas

isoladas de fetos suínos abortados, 10 cepas isoladas do útero e oviduto de marrãs e uma cepa de placenta de fêmeas que apresentavam problemas reprodutivos. Do total, 71% das cepas foram classificadas como *A. cryaerophilus* 1B, 24% como *A. cryaerophilus* 1A e 6% como *A. butzleri*.

Oliveira et al. (1999), analisaram, ainda, 74 amostras de fluido prepucial e nove amostras de sêmen, coletadas em granjas que reportavam problemas reprodutivos. A espécie mais prevalente foi *A. cryaerophilus* (11,1%), seguida por *A. butzleri* (1,48%).

Em 1996, Wesley et al. infectaram experimentalmente leitões de um dia de vida obtidos por cesariana e privados de colostro com as cepas isoladas de casos clínicos de *Arcobacter* spp. Os leitões infectados com *A. butzleri* morreram após 24 horas da inoculação, à necropsia a mucosa do íleo e ceco estava avermelhada, observaram-se pequenas úlceras gástricas na mucosa glandular e o agente foi isolado dos tecidos renal, cerebral, intestinal e pulmonar. *A. cryaerophilus* foi isolado a partir de suabes retais, mas não foi cultivado de tecidos. Os animais infectados por *A. skirrowii* morreram após quatro dias da inoculação, mas não foi possível o cultivo a partir de tecidos. Este estudo indica que leitões neonatos podem ser infectados com *Arcobacter* spp, o que pode explicar o fato de animais saudáveis serem portadores do microrganismo.

O agente também foi isolado do estômago de suínos que apresentavam úlceras gástricas, uma doença economicamente significativa em todas as linhagens de suínos. Suarez et al. (1997), detectaram em 51% dos estômagos analisados, sendo que *A. butzleri* foi a espécie mais prevalente (77%). A partir do exame microscópico dos estômagos, foi possível observar lesões com paraqueratose leve a erosões e ulcerações, e nos casos crônicos, formação de tecido de granulação, hipertrofia da mucosa e presença de tecido necrótico.

2.8 MÉTODOS DE ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO

Os métodos de isolamento e identificação são descritos a seguir:

2.8.1 Métodos Convencionais

A utilização de métodos sensíveis de isolamento propicia a detecção de grande número desse microrganismo. Tais métodos utilizam diferentes agentes seletivos associados com baixas concentrações de antibióticos, diferentes atmosferas de incubação (ATABAY et al., 1997) e etapas de enriquecimento (LEHNER et al., 2005).

O primeiro protocolo desenvolvido para o isolamento e cultivo de *Arcobacter* spp. utilizava um meio semi-sólido de isolamento de *Leptospira* spp. denominado Ellinghausen-Mc Cullough - Johnson-Harris Polisorbato- 80 (EMPH-P80) que necessita de suplementação com 100 µL/mL de 5 fluoracil (OHLENDORF et al., 2002). Este protocolo foi muito utilizado na década de 1990 por diversos autores (HARMON et al., 1997; OLIVEIRA et al., 1997; SUAREZ et al., 1997).

A partir daí, muitos meios de enriquecimento e de identificação foram elaborados: há no mercado caldos de enriquecimento comerciais que são suplementados com cefoperazone, anfotericina e teicoplanina (CAT) e com cefoperazone modificado, carvão e deoxicolato (mCCD), que permitem o bom crescimento das espécies de *Arcobacter* spp., já que não possuem sistemas de captura de oxigênio, como no caso dos meios que levam sangue e neutralizam o efeito do oxigênio atmosférico (PHILLIPS, 2001).

De Bôer et al. (1996) desenvolveram um meio de enriquecimento para isolar *Arcobacter* spp. sob condições aeróbicas, que se baseia em enriquecer a amostra em um caldo seletivo e em seguida, plaqueá-la em ágar seletivo, examinando em seguida as características das zonas de motilidade.

O meio de isolamento mais recente e mais efetivo foi desenvolvido por Johnson e Murano, em 1999, e é um método realizado totalmente em aerobiose, mais seletivo e rápido e não requer a identificação de zonas de motilidade como o anteriormente descrito. Este meio contém carvão que é uma agente detoxificante, benéfico para o crescimento de espécies aerotolerantes; cefoperazone, sais biliares e 5-fluoracil que agem como agentes seletivos e a peptona especial que propicia suporte para o crescimento mais efetivo da bactéria.

Como resultado do refinamento dos métodos de identificação e isolamento desse agente, a frequência de detecção do agente aumentou nos últimos anos (WESLEY, 2007).

Em relação aos métodos de caracterização fenotípica, citam-se: testes bioquímicos, perfis de proteínas de membrana e perfis de ácidos graxos. Quanto aos testes bioquímicos, os resultados são limitados, graças à baixa atividade metabólica geralmente observada dentro desta classe, associada à grande variabilidade de cepas e à reação atípica de algumas delas (HARMON et al., 1997).

Os testes que têm sido realizados são a hidrólise de indoxil-acetato e o teste da catalase, que possibilita a diferenciação entre *A. butzleri* e *A. cryaerophilus*, já que a primeira apresenta uma reação mais fraca que a segunda (WESLEY, 2007).

Quanto à sorotipagem, Lior e Wood em 1991, desenvolveram um método para sorotipar *A. butzleri*, o qual utiliza antígenos vivos e anti-soros adsorvidos, em teste de aglutinação em lâmina. Até o momento foram discriminados 14 sorogrupos. (OLIVEIRA et al., 1999).

2.8.2 Métodos Moleculares

Diversas técnicas moleculares baseadas na Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) foram utilizadas ao longo das duas últimas décadas para a identificação rápida e específica de *Arcobacter* spp. (SUAREZ et al., 1997; OLIVEIRA et al., 2003; KABEYA et al., 2004). Em 1997, Harmon et al., desenvolveram a PCR multiplex para diferenciar *A. butzleri* das outras espécies de *Arcobacter* spp. Mais tarde, Houf et al. (2000) elaboraram outra reação multiplex para identificação simultânea de *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii*. Em 2007, Brightwell et al. criaram PCR multiplex e PCR em tempo real para identificar cepas de *A. butzleri* e *A. cryaerophilus*.

Mais recentemente, Pentamalli et al. (2009) desenvolveram uma PCR multiplex para a detecção e diferenciação de *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* e *A. cibarius*.

Embora a PCR seja altamente discriminatória para identificar as diferentes espécies do gênero, uma limitação inerente frequentemente encontrada é a inabilidade de diferenciar genotipicamente as cepas dentro da mesma espécie (HUME et al., 2001).

A caracterização genotípica dos isolados pode ser realizada através de técnicas que envolvem a amplificação de DNA, ou métodos que envolvem a restrição do DNA bacteriano com enzimas de restrição como a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), considerada o método padrão de ouro para a maioria dos patógenos bacterianos. Alguns autores já utilizaram a PFGE em isolados provenientes de fezes de suínos para diferenciar cepas de *Arcobacter* spp. (HUME et al., 2001; RIVAS et al., 2004; HO et al., 2005).

Entre as técnicas baseadas na PCR, se pode citar a amplificação randômica de DNA polimórfico -RAPD (ATABAY et al., 2002; HOUF et al., 2003), polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados- AFLP, (ON et al., 2003) e, polimorfismo de fragmentos de restrição - RFLP (OLIVEIRA et al., 1999).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais e métodos utilizados estão descritos a seguir:

3.1 AMOSTRAS

Foi analisado um total de 120 amostras de suabes de carcaça, 120 amostras de fezes de dois abatedouros de suínos localizados no Estado de São Paulo, e 24 amostras de carne suína refrigerada proveniente de estabelecimentos comerciais de venda. Estas amostras foram coletadas mensalmente, por um período de seis meses, sempre nos mesmos estabelecimentos.

Foram utilizadas como padrão para a PCR e para controle do meio empregado cepas de *A.butzleri* ATCC 49616, *A.cryaerophilus* ATCC 43158 e *A.skirrowii* ATCC 51132.

3.2 COLHEITA DAS AMOSTRAS

As amostras foram colhidas durante a linha de abate, com suabes estéreis acondicionados em bolsas plásticas sendo mantidos sob refrigeração até o momento do processamento.

Os cortes de carne foram acondicionados em bolsas estéreis e refrigerados até o momento do processamento.

As amostras de fezes foram colocadas em coletores plásticos estéreis e mantidas em refrigeração até o processamento.

3.3 ISOLAMENTO

Os suabes de carcaça, 25 gr de fragmentos de músculo (carne) e 2,5 gramas de fezes foram adicionados a 225 mL, 225 mL e 22,5 mL de caldo de enriquecimento seletivo *Arcobacter spp.*(Oxoid) respectivamente. Após 48 horas a 30° C, uma alíquota de 10 uL foi filtrada através de membrana estéril de celulose de 0,45µm, depositada diretamente sobre a superfície do ágar seletivo descrito por Johnson e Murano (1999). A seguir, as placas foram incubadas em aerobiose a 30 °C por 48 horas. Colônias pequenas, típicas, não hemolíticas foram identificadas e testadas pelo método de Gram, inoculadas em BHI semi-sólido (0,15 % de agar) e os tubos foram incubados à mesma temperatura por 48 horas. Os cultivos foram examinados em microscópio de campo escuro, objetiva 40X para a observação de bactérias curvas e espiraladas, extremamente móveis. Foram então realizados testes de oxidase, catalase e verificado o crescimento em agar MacConkey

De acordo com o número de colônias suspeitas, foram selecionadas até 3 colônias para caracterização através da PCR. As cepas confirmadas como *Arcobacter spp* foram estocadas a -86° C.

3.4 EXTRAÇÃO DO DNA

O DNA bacteriano foi purificado pela extração de DNA baseada nas propriedades de lise e inativação de nucleases do isotiocianato de guanidina junto às propriedades das partículas de terra diatomácea em ligar-se ao DNA ou RNA. Este método para purificação de ácidos nucléicos foi descrito por Boom et al. (1990).

3.5 AMPLIFICAÇÃO DO DNA (PCR)

A PCR foi realizada utilizando-se 5 μ L do DNA bacteriano, 1.5 mM de $MgCl_2$, 10 pmoles dos *primers* para gênero *Arcobacter* e 10 pmoles para o primer para espécie *A. butzleri*, 1.0 U de *Taq* DNA polimerase, 1 X tampão de PCR e água até o volume final de 50 μ L. A reação foi submetida à desnaturação à 94° C por 4 minutos seguido por 35 ciclos de 1 minuto à 94° C, 1 minuto à 55° C e 1 minuto à 72° C. As amostras negativas para *A. butzleri* foram caracterizadas quanto a espécie através de *primers* específicos (HOUF et al., 2000).

3.6 DETECÇÃO DO PRODUTO DE AMPLIFICAÇÃO (AMPLICON).

A detecção dos produtos de amplificação (10 μ L produto e 2 μ L de tampão de corrida 6X) foi realizada através da eletroforese em gel de agarose 1,5%, utilizando-se tampão TAE (0,04 M tris-acetato [pH 8,5], 0,002 M de EDTA).

Os fragmentos amplificados foram visualizadas no sistema de fotodocumentação ImageMaster[®] (Amershan Biosciences) por meio do uso do corante BlueGreen. [®] (LGC Biotecnologia). Os fragmentos foram identificados com base na utilização de marcador de pares de base 100 pb DNA Ladder (LGC Biotecnologia).

3.7 ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO (PFGE)

As amostras foram submetidas ao perfil de macrorestrição através de ensaios de PFGE utilizando o sistema de eletroforese CHEF DR III Chiller System (Bio-Rad). Em resumo, uma alíquota do cultivo bacteriano padronizada na diluição 1×10^9 , foi

incorporada em agarose de baixo ponto de fusão e, após homogeneização, transferidas para moldes plásticos. Os *plugs* de agarose resultantes contendo a amostra foram então submetidos a um processo de lise *in situ* e, posteriormente, estocados em tampão Tris-EDTA até o momento da eletroforese. Uma fração do *plug* foi submetida à digestão com a enzima de restrição (*SacII*, *EagI* e *SmaI*) e posteriormente adicionada ao gel de agarose 1%. A eletroforese foi conduzida num período de 20h a 6V/cm, ângulo fixo de 120°, com pulso inicial de 0,1 s e final de 90s., em tampão TBE 0,5X mantido a 14°C.

3.8 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DISCRIMINATÓRIO (ID)

Os resultados obtidos através da caracterização genotípica foram analisados segundo o método numérico descrito por Hunter e Gaston (1988).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS

Para análise estatística dos fragmentos obtidos através da PFGE foi utilizado o programa NTSYS ("Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System"). A similaridade das amostras foi estimada através do coeficiente de Dice. Com a matriz de similaridade gerada por este coeficiente foi possível determinar os grupos pelo método de UPGMA ("Unweighthed Pair-Group Method Using Arithmetic Average"), que foi representado pela forma de dendrograma.

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos referentes as 264 amostras das seis coletas realizadas, sendo que todas elas foram submetidas ao exame bacteriológico e caracterização genotípica pela PCR, encontram-se compilados nas tabelas 1 a 6 apresentadas a seguir:

Tabela 1- Freqüência de amostras de carcaças positivas para gênero *Arcobacter* cepas positivas para *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e outras espécies no abatedouro 1, São Paulo- 2008-2009

Abatedouro 1- Carcaças						
Mês	Amostras	Positivos	Nº Cepas	Espécies		
	Nº	Nº	Nº	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	Outras
Fevereiro	10	4	4	4	0	0
Março	10	5	13	0	13	0
Abril	10	9	27	21	6	0
Maió	10	8	24	2	22	0
Junho	10	9	27	14	12	1
Julho	10	10	30	26	3	1
Total	60	45	125	67	56	2

Tabela 2- Freqüência de amostras de fezes positivas para gênero *Arcobacter* cepas positivas para *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e outras espécies, no abatedouro 1, São Paulo- 2008-2009

Abatedouro 1- Fezes						
Mês	Amostras	Positivos	N° Cepas	Espécies		
	N°	N°	N°	A. <i>butzleri</i>	A. <i>cryaerophilus</i>	Outras
Fevereiro	10	1	1	0	1	0
Março	10	0	0	0	0	0
Abril	10	0	0	0	0	0
Maiο	10	1	3	3	0	0
Junho	10	0	0	0	0	0
Julho	10	1	3	0	3	0
Total	60	3	7	3	4	0

Tabela 3- Freqüência de amostras de músculo positivas para gênero *Arcobacter* cepas positivas para *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e outras espécies, no abatedouro 1, São Paulo- 2008-2009

Abatedouro 1- Cortes de músculo						
Mês	Amostras	Positivos	N° Cepas	Espécies		
	N°	N°	N°	A. <i>butzleri</i>	A. <i>cryaerophilus</i>	Outras
Fevereiro	2	0	0	0	0	0
Março	2	0	0	0	0	0
Abril	2	1	1	0	1	0
Maiο	2	0	0	0	0	0
Junho	2	0	0	0	0	0
Julho	2	0	0	0	0	0
Total	12	1	1	0	1	0

De todas as sessenta amostras de carcaças de suínos coletadas no abatedouro 1 , 75,5% (45/60) foram positivas para o isolamento de bactérias do gênero *Arcobacter*, dessas 45 carcaças positivas, foram selecionadas 125 cepas, das quais 53,6% (67/125) foram positivas na PCR para a espécie *A. butzleri*, 44,8% (56/125) para *A. cryaerophilus* e 1,6% (2/125) para outras espécies do gênero.

Houve o isolamento de mais de uma espécie de *Arcobacter spp.* na mesma carcaça. Do total de 45 carcaças positivas, 77,7% (35/45) foram positivas para apenas uma espécie, 17,7% (8/45) foram isoladas duas espécies na mesma carcaça, e em 4,44% (2/45) foram encontradas mais de duas espécies. As duas espécies encontradas juntas nas oito carcaças mencionadas acima foram *A. butzleri* e *A. cryaerophilus*. Apenas duas carcaças apresentaram *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e outras espécies simultaneamente.

De um total de 60 amostras de fezes, apenas 5% (3/60) foram positivas para o isolamento de *Arcobacter spp.* Destas amostras foram selecionadas sete cepas, das quais três foram positivas para *A. butzleri* e quatro para *A. cryaerophilus*.

Quanto às amostras de músculo, foram analisados 12 fragmentos e em apenas um foi isolado *A. cryaerophilus* identificado pela PCR.

Tabela 4- Frequência de amostras de carcaças positivas para gênero *Arcobacter* e cepas positivas para *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e outras espécies, no abatedouro 2, São Paulo- 2008-2009

Abatedouro 2- Carcaças						
Mês	Amostras	Positivos	Nº Cepas	Espécies		
	Nº	Nº	Nº	<i>A.</i> <i>butzleri</i>	<i>A.</i> <i>cryaerophilus</i>	Outras
Fevereiro	10	10	10	8	2	0
Março	10	3	8	3	5	0
Abril	10	4	12	3	8	1
Maiο	10	8	24	22	2	0
Junho	10	9	27	13	14	0
Julho	10	7	17	10	3	4
Total	60	41	98	59	34	5

Tabela 5- Frequência de amostras de fezes positivas para gênero *Arcobacter* e cepas positivas para *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e outras espécies, no abatedouro 2, São Paulo- 2008-2009

Abatedouro 2- Fezes						
Mês	Amostras	Positivos	Nº Cepas	Espécies		
	Nº	Nº	Nº	<i>A.</i> <i>butzleri</i>	<i>A.</i> <i>cryaerophilus</i>	Outras
Fevereiro	10	0	0	0	0	0
Março	10	0	0	0	0	0
Abril	10	1	3	0	3	0
Maiο	10	0	0	0	0	0
Junho	10	1	3	0	3	0
Julho	10	0	0	0	0	0
Total	60	2	6	0	6	0

Tabela 6- Frequência de amostras de músculo positivas para gênero *Arcobacter* e cepas positivas para *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e outras espécies, no abatedouro 2, São Paulo- 2008-2009

Abatedouro 2- Cortes de músculo						
Mês	Amostras	Positivos	Nº Cepas	Espécies		
	Nº	Nº	Nº	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	Outras
Fevereiro	2	0	0	0	0	0
Março	2	0	0	0	0	0
Abril	2	1	2	2	0	0
Maiο	2	0	0	0	0	0
Junho	2	0	0	0	0	0
Julho	2	0	0	0	0	0
Total	12	1	2	2	0	0

Das carcaças analisadas no abatedouro 2, 68,3% (41/60) foram positivas para o isolamento de bactérias do gênero *Arcobacter*, foram isoladas 98 cepas, das quais 60,2% (59/98) foram caracterizadas como *A. butzleri* pela PCR, 34,7% (34/98) para *A. cryaerophilus* e 5,1% (5/98) para outras espécies.

No abatedouro 2 também ocorreu o isolamento de mais de uma espécie numa mesma carcaça. Das 41 amostras positivas, 78% (32/41) apresentaram apenas uma espécie e 22% (9/41) apresentaram duas espécies. A combinação de espécies encontradas nessas carcaças foi bem variável, sendo que cinco apresentaram *A. butzleri* e *A. cryaerophilus*, duas carcaças com *A. butzleri* em conjunto com outras espécies e duas amostras *A. cryaerophilus* e outras espécies.

Apenas duas amostras de fezes foram positivas para isolamento do agente representando 3,3% (2/60) do total; dessas amostras, foram isoladas seis cepas que foram identificadas como *A. cryaerophilus*.

Em relação às amostras de músculo, somente uma amostra coletada no mês de Abril foi positiva para o isolamento (1/12), dois isolados foram obtidos e caracterizados como *A. butzleri* pela PCR.

Os resultados gerais dos dois abatedouros encontram-se nas tabelas 7 e 8 e gráfico 1.

Tabela 7 - Número de amostras positivas para *Arcobacter* spp. nos diferentes sítios de coletas e nos dois abatedouros de acordo com o mês, São Paulo- 2008-2009

Mês	Carcaças	Fezes	Músculo
Fevereiro	14/120	1/120	0/12
Março	8/120	0/120	0/12
Abril	13/120	1/120	2/12
Maio	16/120	1/120	0/12
Junho	18/120	1/120	0/12
Julho	17/120	1/120	0/12
Total	86/120	5/120	2/12

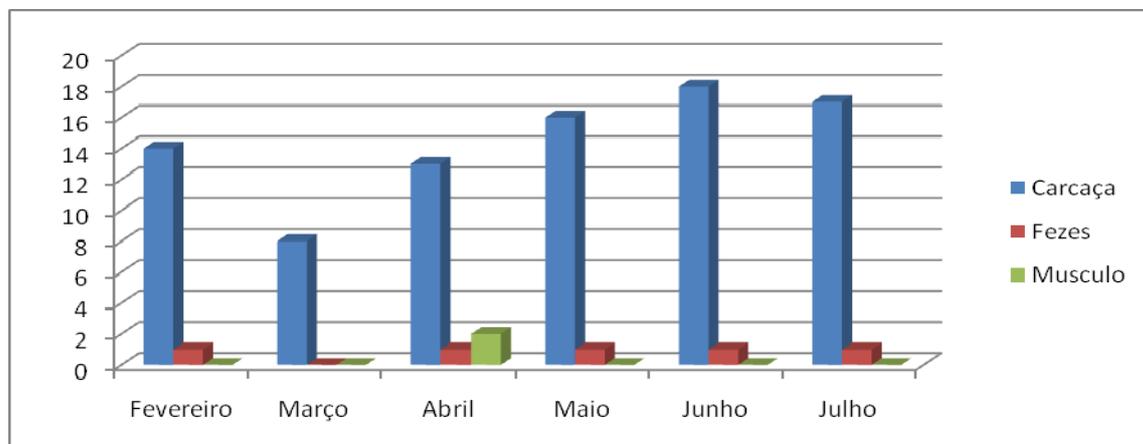


Gráfico 1 – Número de amostras positivas para *Arcobacter* spp. de acordo com a coleta e sítio de isolamento.

Tabela 8- Números de cepas selecionadas e espécies identificadas nos diferentes sítios de coletas e nos dois abatedouros de acordo com o mês, São Paulo- 2008-2009

Carcaças				
Mês	Isolados	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	Outras espécies
Fev.	14	12	2	0
Mar.	21	3	18	0
Abr.	39	24	14	1
Maio	48	24	24	0
Jun.	54	27	26	1
Jul.	47	36	6	5
Total	223	126	90	7

Fezes				
Mês	Isolados	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	Outras espécies
Fev.	1	0	1	0
Mar.	0	0	0	0
Abr.	3	0	3	0
Maio	3	3	0	0
Jun.	3	0	3	0
Jul.	3	0	3	0
Total	13	3	10	0

Músculo				
Mês	Isolados	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	Outras espécies
Fev.	0	0	0	0
Mar.	0	0	0	0
Abr.	3	2	1	0
Maio	0	0	0	0
Jun.	0	0	0	0
Jul.	0	0	0	0
Total	3	2	1	0

Tabela 9 – Freqüência de carcaças positivas apresentando uma, duas ou mais espécies de *Arcobacter* spp, São Paulo-2008-2009

Mês	Positivos	1 espécie	%	2 espécies	%	mais de 2	%
Fev.	14	14	100	0	0	0	0
Mar.	8	8	100	0	0	0	0
Abr.	13	10	77	3	23	0	0
Mai	16	14	87,5	2	12,5	0	0
Jun.	18	11	61,11	6	33,33	1	5,55
Jul.	17	10	58,82	6	35,29	1	5,88
Total	86	67	77,9	17	19,76	2	2,32

No total, reunindo as amostras dos dois abatedouros foram coletadas 264 amostras sendo 120 de carcaça, 120 de fezes e 24 pedaços de músculo suíno (Gráficos 1 e 2).

Das 120 carcaças, 71,6% (86/120) foram positivas para o isolamento de *Arcobacter* spp. A partir dessas carcaças, foram selecionadas 223 cepas, das quais 56,5% (126/223) foram caracterizadas pela PCR como *A. butzleri*, 40,3% (90/223) como *A. cryaerophilus* e 3,1% (7/223) caracterizadas como outras espécies do gênero.

O número de espécies isoladas em cada carcaça acompanhou a variação encontrada isoladamente em cada abatedouro. Das 86 carcaças positivas, 77,9% (67/86) foram positivas para apenas uma espécie do gênero, 19,76% (17/86) para duas espécies e 2,32% (2/86) para mais de duas espécies (Tabela 9).

Em relação às amostras de fezes, apenas 4,16% (5/120) das amostras foram positivas para o isolamento do agente. As cinco amostras positivas resultaram em 13 isolados que foram caracterizados pela PCR como *A. butzleri* em 23% (3/13) dos isolados e 77% (10/13) como *A. cryaerophilus*.

Somente 8,3% (2/24) amostras de músculo foram positivas para o isolamento de *Arcobacter* spp. e três isolados foram caracterizados pela PCR, sendo duas cepas como *A. butzleri* (66,6%) e uma como *A. cryaerophilus* (33,3%).

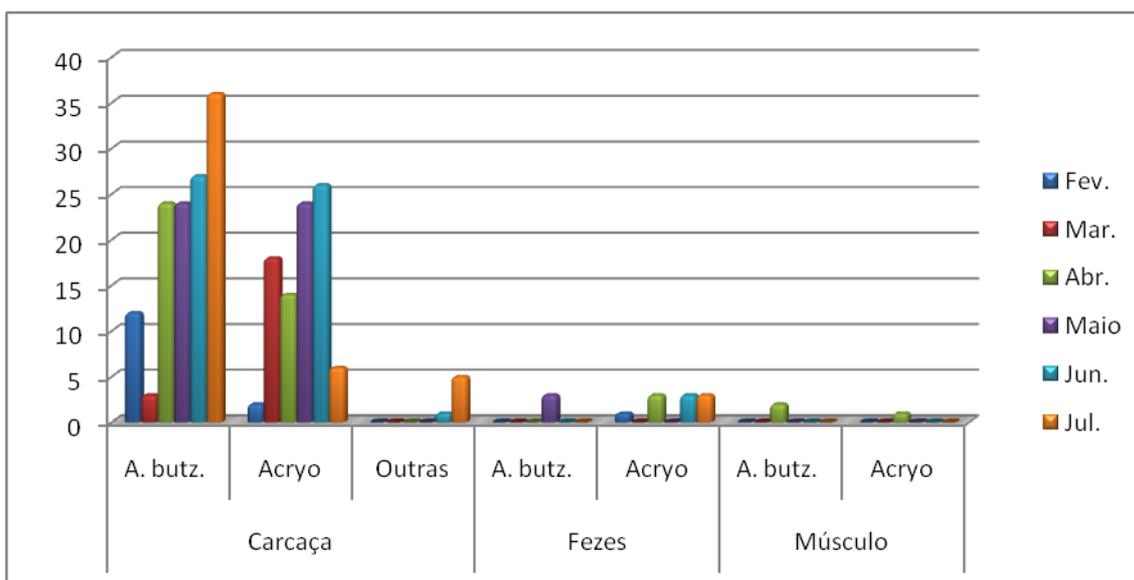


Gráfico 2 – Espécies de *Arcobacter* spp. de acordo com a coleta e sítio de isolamento.

Dos 223 isolados obtidos nas seis coletas realizadas nos dois abatedouros, foram selecionados algumas cepas representativas das coletas de Março, Abril, Maio, Junho e Julho para a caracterização através do PFGE. As amostras referentes à coleta de Fevereiro não estavam viáveis no momento da realização da PFGE, contudo, testes futuros podem ser realizados, uma vez que o DNA das amostras foi conservado.

As três enzimas de restrição (*Sma* I, *Eag* I e *Sac* II) foram testadas em um grupo inicial de 10 isolados (Figura 2) e a partir destes resultados optou-se pela utilização da que apresentou maior reprodutibilidade e clareza nas bandas, sendo neste caso a enzima *Sma* I. (Figura 3). Após determinar a enzima de restrição de eleição, 65 cepas foram submetidas à caracterização genotípica pela PFGE.

Através da PFGE observou-se 51 perfis distintos, considerando-se a presença ou ausência de uma ou mais bandas. Cada cultura gerou de três a nove fragmentos de tamanho variando entre 48 Kb e 1018 kb (Figura 3). O índice discriminatório calculado para a PFGE foi de 0,98.

Na tabela 11, pode-se observar a relação de 51 perfis discriminados no PFGE com o número de isolados em cada perfil, coleta realizada, abatedouro analisado, número do animal amostrado, sítio de isolamento e espécie.

A análise dos dados obtidos no PFGE, através do UPGMA resultou no dendograma apresentado na figura 1, no qual se pode observar a distribuição dos 51 perfis em dois grandes grupos I e II e quatro subgrupos denominados A, B, C, D.

O grupo I representado pelos subgrupos A, B e C representou 44 perfis e reuniu 53 amostras e o grupo II composto pelo subgrupo D revelou sete perfis contendo 12 amostras. O coeficiente de similaridade entre os isolados dos quatro subgrupos variou de 30 a 100%.

O número de perfis e amostras distribuídos nos diferentes subgrupos obtidos através do PFGE pode ser observado na tabela 10:

Tabela 10- Número de perfis e amostras de *Arcobacter* spp. de acordo com os subgrupos discriminados através do PFGE, São Paulo- 2008-2009

Subgrupos	N de Perfis (%)	N de Amostras (%)	<i>A. butzleri</i> (%)	<i>A.cryaerophilus</i> (%)
A	7 (13,7)	9 (13,8)	1 (11,1)	8 (88,8)
B	24 (47)	29 (44,6)	24 (82,75)	5 (17,3)
C	13 (25,4)	15 (23)	1 (6,66)	14 (93,3)
D	7 (13,7)	12 (18,4)	12 (100)	0

Tabela 11 - Distribuição das 65 amostras de *Arcobacter* spp. de acordo com a coleta, abatedouro, animal, sítio e espécie segundo o perfil no PFGE, São Paulo – 2008-2009

(continua)

Perfil	Nº				Sítio	Espécie
	isolados	Coleta	Abatedouro	Animal		
.1	1	3	1	2	carcaça	<i>A.cryaerophilus</i>
.2	1	3	1	6	carcaça	<i>A.cryaerophilus</i>
.3	1	3	1	9	carcaça	<i>A.cryaerophilus</i>
.4	1	3	2	3	carcaça	<i>A.butzleri</i>
.5	2	3	1	6	carcaça	<i>A.cryaerophilus</i>
.6	2	6,7	2	10,6	carcaça	<i>A.cryaerophilus</i>
.7	1	4	1	7	carcaça	<i>A.cryaerophilus</i>
.8	1	4	1	3	carcaça	<i>A.cryaerophilus</i>
.9	1	4	1	4	carcaça	<i>A.butzleri</i>
.10	1	4	2	2	carcaça	<i>A.cryaerophilus</i>
.11	1	7	1	5	carcaça	<i>A.butzleri</i>
.12	1	4	2	1	músculo	<i>A.butzleri</i>
.13	1	7	1	2	carcaça	<i>A.butzleri</i>
.14	1	7	1	5	carcaça	<i>A.butzleri</i>
.15	2	5	1	8	carcaça	<i>A.cryaerophilus</i>
.16	3	6	1	1,2,4	carcaça	<i>A.butzleri</i>
.17	2	5,7	2	2,3	carcaça	<i>A.butzleri</i>
.18	1	5	2	4	carcaça	<i>A.butzleri</i>
.19	1	6	2	8	carcaça	<i>A.butzleri</i>
.20	1	6	2	8	carcaça	<i>A.butzleri</i>
.21	1	7	1	8	carcaça	<i>A.butzleri</i>
.22	1	7	1	7	carcaça	<i>A.butzleri</i>
.23	1	7	2	5	carcaça	<i>A.butzleri</i>
.24	1	7	2	4	carcaça	<i>A.butzleri</i>
.25	1	5	2	1	carcaça	<i>A.butzleri</i>
.26	1	5	1	10	fezes	<i>A.cryaerophilus</i>
.27	1	5	2	6	carcaça	<i>A.butzleri</i>
.28	2	5	2	8,9	carcaça	<i>A.butzleri</i>

Perfil	N°				Sítio	Espécie
	isolados	Coleta	Abatedouro	Animal		
.30	1	4	2	1	músculo	<i>A.butzleri</i>
.31	1	7	1	4	carcaça	<i>A.butzleri</i>
.32	2	3	2	5,9	carcaça	<i>A.cryaerophilus</i>
.33	1	5	2	10	carcaça	<i>A.cryaerophilus</i>
.34	1	5	1	10	carcaça	<i>A.cryaerophilus</i>
.35	1	5	1	4	carcaça	<i>A.cryaerophilus</i>
.36	1	5	1	4	carcaça	<i>A.cryaerophilus</i>
.37	1	6	1	3	carcaça	<i>A.cryaerophilus</i>
.38	1	6	1	7	carcaça	<i>A.cryaerophilus</i>
.39	1	6	1	7	carcaça	<i>A.cryaerophilus</i>
.40	1	6	1	10	carcaça	<i>A.cryaerophilus</i>
.41	1	6	1	5	carcaça	<i>A.butzleri</i>
.42	1	5	1	6	carcaça	<i>A.cryaerophilus</i>
.43	1	6	2	10	fezes	<i>A.cryaerophilus</i>
.44	2	7	1	1	fezes	<i>A.cryaerophilus</i>
.45	5	4	1	1,2,5,7	carcaça	<i>A.butzleri</i>
.46	2	4	1	6	carcaça	<i>A.butzleri</i>
.47	1	4	1	4	carcaça	<i>A.butzleri</i>
.48	1	4	1	2	carcaça	<i>A.butzleri</i>
.49	1	4	1	9	carcaça	<i>A.butzleri</i>
.50	1	6	2	9	carcaça	<i>A.butzleri</i>
.51	1	4	1	10	carcaça	<i>A.butzleri</i>

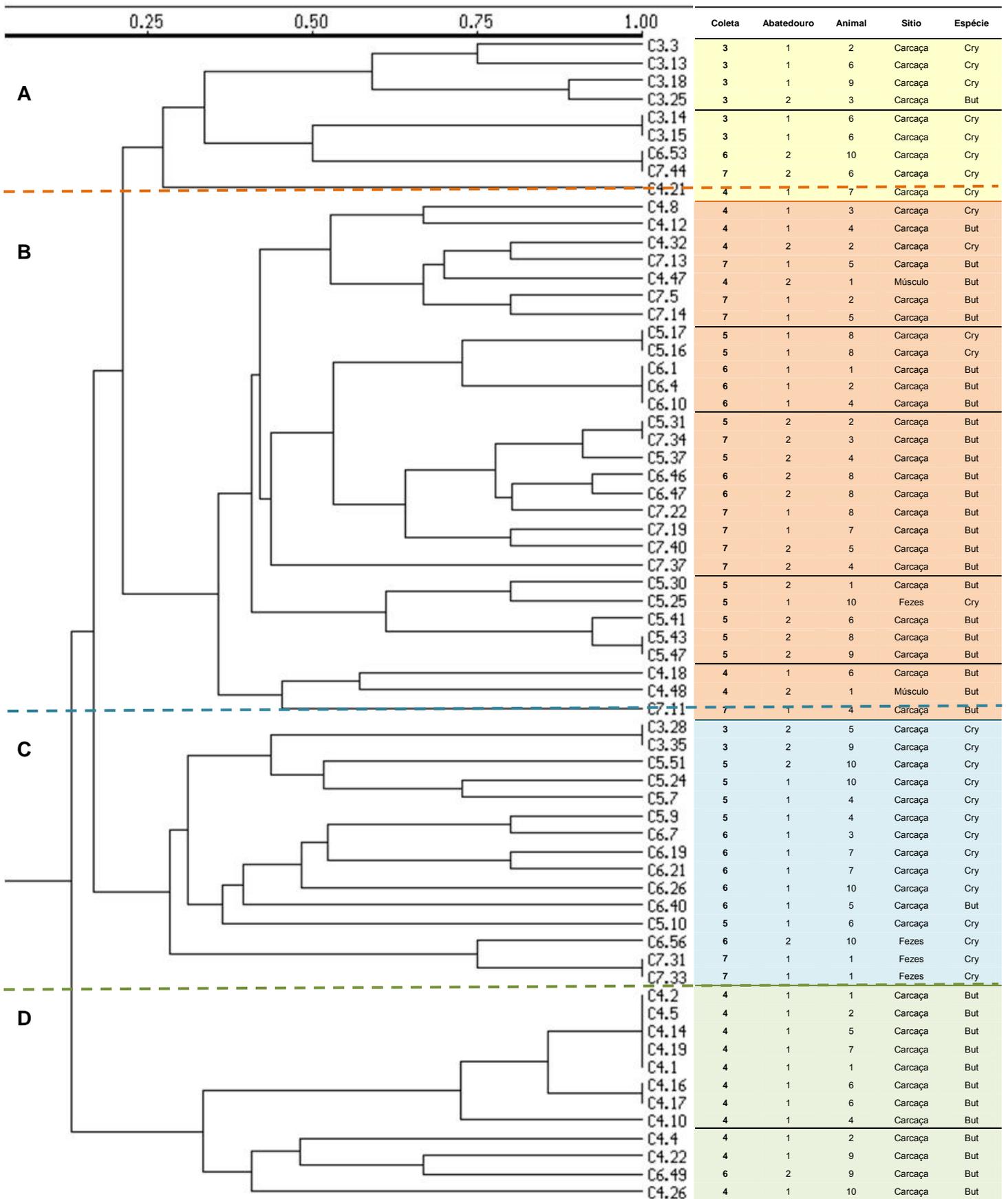


Figura 1 - Dendrograma obtido pela análise dos géis de PFGE de *Arcobacter* spp. utilizando a enzima de restrição *Sma*I, baseado no coeficiente de similaridade de Dice

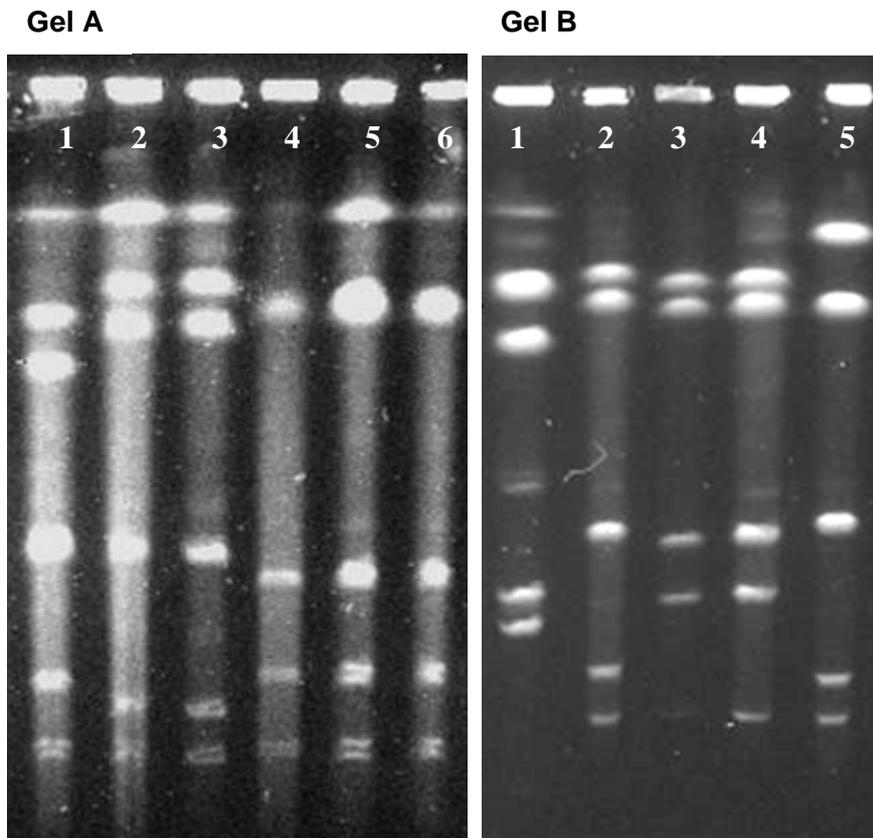


Figura 2- Eletroforese em campo pulsado – Amostras analisadas após a restrição com a enzima *Sma* I- Gel A- Colunas 1 a 6 e Gel B- Colunas 1 a 5- cepas de *Arcobacter* spp.

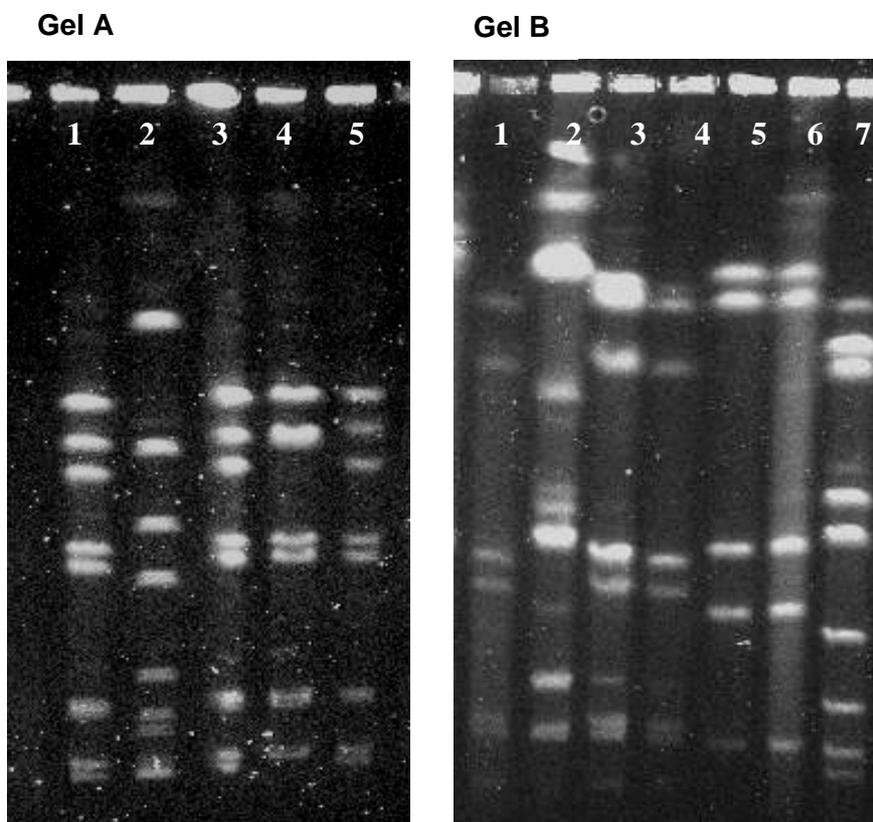


Figura 3- Eletroforese em campo pulsado –Gel A- Colunas 1 a 5- cepas de *Arcobacter* spp. analisadas após a restrição com a enzima *Eag* I e Gel B - Colunas 1 a 7- cepas de *Arcobacter* spp. analisadas após a restrição com a enzima *Sac* II

No subgrupo A foram obtidos sete perfis contendo nove isolados, os quais apresentaram uma similaridade acima de 25%. Considerando o sítio de isolamento, todas as cepas foram provenientes de carcaça e apenas uma foi classificada como *A. butzleri*. Nesse subgrupo, verificou-se que o animal seis, da coleta de Março (3) do abatedouro um apresentou dois isolados com perfis idênticos e um terceiro isolado com perfil distinto. Dos isolados, 66,6% (6/9) foram da terceira coleta, efetuada em Março, seguida por um isolado das coletas de Abril (4), um de Junho(6) e um de Julho(7).

O subgrupo B apresentou 24 perfis com 29 amostras, as quais revelaram uma similaridade superior a 35%. Em relação ao sítio de isolamento, 89,6% (26/29) dos isolados foram provenientes de carcaça, em menor número (dois isolados) foram provenientes de músculo e um a partir de fezes. Os dois isolados de músculo apresentaram perfis distintos, porém foram provenientes da mesma peça de carne amostrada. *A. butzleri* correspondeu a 82,7% (24/29) das cepas e *A. cryaerophilus* a 17,3% (5/29) dos isolados. Nesse subgrupo, houve uma distribuição mais homogênea entre as coletas de Abril, Maio, Junho e Julho, sendo que as coletas de Maio e Julho representaram 31% (9/29) dos isolados cada uma. Em relação aos perfis, encontramos perfis idênticos em isolados de um mesmo animal e perfis distintos do mesmo animal. Dos 24 perfis, quatro albergaram mais de um isolado e, em todos os casos, os animais eram oriundos do mesmo abatedouro. Apenas em um desses quatro perfis os animais eram provenientes de coletas distintas, nos outros casos, os isolados eram de animais diferentes, mas da mesma coleta e mesmo abatedouro.

O subgrupo C formado por 13 perfis apresentou 15 amostras, com uma similaridade superior a 25%. Os sítios de isolamento foram carcaça e fezes, com o predomínio de carcaças 80% (12/15) sobre 20% (3/15) das fezes. Apenas uma amostra isolada de carcaça foi caracterizada como *A. butzleri*, o restante das amostras foram classificadas como *A. cryaerophilus*. Estas amostras foram provenientes das coletas de Março, Maio, Junho e Julho, sendo que amostras de Maio e Junho apareceram com maior frequência, 33% e 40%, respectivamente. Dos 13 perfis, dois albergaram mais de um isolado: em um deles, os animais eram distintos, porém da mesma coleta e do mesmo abatedouro, no outro caso, os dois isolados eram da mesma amostra de fezes.

O subgrupo D foi o mais homogêneo, composto por sete perfis, com 12 amostras. Os sítios de isolamento de todas as amostras foram carcaças, a espécie foi *A. butzleri* e a coleta predominante foi a do mês de Abril. Apenas uma amostra foi oriunda da coleta de Junho. Um dos perfis agrupou cinco isolados, todos eles provenientes do mesmo abatedouro e coleta, a partir de quatro animais, sendo que dois isolados foram de um mesmo animal. O outro perfil que conteve mais de um isolado é respectivo a um mesmo animal.

5 DISCUSSÃO

As bactérias do gênero *Arcobacter* integraram inicialmente o gênero *Campylobacter* por suas características de crescimento aerotolerante. Na década de 1990, passaram a ser designadas como um gênero a parte dentro da família *Campylobacteraceae*.

Assim como os membros do gênero *Campylobacter*, o *Arcobacter* possui potencial zoonótico, atuando como agente causador de enteropatias em humanos por meio da ingestão de produtos de origem animal contaminados.

Como não há até o momento um método padrão para o isolamento e cultivo desse microrganismo, e somado a este fato, os laboratórios de diagnóstico não o procuram, é provável que sua prevalência em casos de infecção em humanos seja subestimada.

Alguns aspectos ligados à epidemiologia do *Arcobacter spp.* ainda são pouco esclarecidos. A fonte de contaminação dos produtos de origem animal não foi elucidada, alguns autores acreditam que a água utilizada nos abatedouros seja a responsável pela contaminação das carcaças, no entanto, outros autores não apóiam essa hipótese. (HOUF et al., 2000; KABEYA et al., 2004; HO et al., 2008)

O agente pode ser isolado dos tratos gastrointestinal e reprodutivo de suínos clinicamente saudáveis, porém também é associado a doenças reprodutivas nessa espécie. (NEWELL, 1997; OLIVEIRA et al., 1999; VAN DRIESSCHE et al., 2003).

No presente trabalho foram analisadas amostras de carcaças, fezes e músculos suínos provenientes de dois abatedouros do Estado de São Paulo, as coletas foram realizadas mensalmente no período de Fevereiro a Julho de 2008.

Nos abatedouros 1 e 2, os resultados obtidos para a prevalência em carcaças foi, respectivamente, 75% e 68,3%. Nos dois abatedouros, a espécie mais encontrada foi *A. butzleri*, com a frequência de 53,6% e 60,2%. Não houve diferença significativa entre a frequência do agente nos dois abatedouros; a pequena diferença entre eles pode ser relacionada ao *status* sanitário dos animais abatidos ou a fatores ligados aos processos de higienização de equipamentos, água utilizada no abate, entre outros.

A prevalência geral nas carcaças foi de 71,6%, sendo que *A. butzleri* foi a espécie mais isolada, 56,5% das cepas, seguido pela espécie *A. cryaerophilus* com 40,3% das cepas e outras espécies com 3,1% dos isolados.

A freqüência de isolamento observada é superior a descrita por Oliveira et al. (2003), que analisaram 224 carcaças após a evisceração, sendo 30,8% (69/224) destas positivas para *Arcobacter* spp., e todos isolados caracterizados como *A. butzleri* pela PCR. Estes pesquisadores foram os primeiros a relatar a prevalência desse agente em carcaças suínas no Brasil, e o abatedouro estudado localiza-se no Estado do Rio Grande do Sul.

Tanto no estudo conduzido por Oliveira et al. (2003), como no presente, a coleta de amostra das carcaças foi realizada imediatamente após a evisceração, com o objetivo de estimar a freqüência de *Arcobacter* spp. antes que ocorresse maior contaminação por manuseio posterior no próprio frigorífico. No entanto, no estudo conduzido por Oliveira et al. (2003), o meio de cultura utilizado foi o EMJH (Ellinghausen, MacCullough, Johnson & Harris), enquanto que no presente o meio utilizado foi o de Johnson-Murano (JM). Como ainda não há um método padrão para o isolamento e cultivo de *Arcobacter* spp., deve se levar em conta que diferenças nas prevalências encontradas em trabalhos similares podem ser, em parte, decorrentes do uso de diferentes meios de cultivo.

Ohlendorf et al. (2002), nos Estados Unidos, compararam a taxa de isolamento de *Arcobacter* spp. usando os meios de cultivo EMJH e o JM e concluíram que o método de cultivo que utilizou o JM foi mais eficiente, pois detectou um maior número de amostras positivas. Porém, é necessário ressaltar, que as amostras analisadas foram peças de carnes já manipuladas e cortadas.

Além da metodologia empregada para o isolamento, as diferenças observadas entre os dois estudos nacionais podem ter sido consequência de vários fatores como a variação na localização geográfica dos abatedouros, condições climáticas, idade dos animais avaliados e uma possível contaminação cruzada entre as carcaças na linha de abate, ou até mesmo durante o transporte dos animais.

Em relação à espécie mais isolada nas carcaças, os resultados aqui descritos estão de acordo com os encontrados na literatura. Segundo Phillips (1999), dentre as espécies do gênero, *A. butzleri* é a mais encontrada em produtos de origem animal, bem como carcaças de aves e suínos.

Atabay et al., (1998) em estudo realizado na Dinamarca, analisaram 25 carcaças de aves, e todas foram positivas para *A. butzleri*, 10 dessas carcaças também foram positivas para *A. cryaerophilus* e duas para *A. skirrowii*. Os mesmos autores, em 2006, analisaram 30 carcaças de aves e novamente todas elas foram positivas para *A. butzleri*, seis delas também foram positivas para *A. cryaerophilus*.

A segunda espécie mais isolada das carcaças foi *A. cryaerophilus*, o que também é similar aos resultados descritos na literatura. No entanto, as informações disponíveis sobre *A. cryaerophilus* são referentes às carcaças de aves.

A baixíssima frequência de isolamento das outras espécies como *A. skirrowii* aqui descrita também é comum a outros trabalhos citados anteriormente. Atanassova et al., (2008) acreditam que a baixa taxa de isolamento dessa espécie seja decorrente da pouca sensibilidade aos métodos de cultivo, e por isso, sua prevalência possa ser subestimada.

Kabeya et al., (2004) citam a susceptibilidade de *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii* a cefoperazone, antibiótico utilizado no meio JM, o que poderia justificar um menor isolamento dessas espécies. Ainda assim, o autor acredita que existam duas possibilidades para justificar a baixa prevalência de *A. skirrowii*: ou sua prevalência real é efetivamente muito baixa, ou seu isolamento é dificultado na presença de outros microrganismos. Deve se considerar ainda o baixo isolamento desta espécie nos estudos que utilizam outros protocolos de isolamento.

Tal discussão sobre o maior crescimento de uma espécie sobre a outra também pode ser um fator para justificar as maiores taxas de isolamento de *A. butzleri*. Sabe-se que essa espécie possui crescimento menos fastidioso do que *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii* (KABEYA et al., 2004) e que o uso de meio de enriquecimento favorece o seu crescimento sobre as outras duas espécies. (HOUF et al., 2003). Os animais podem ser colonizados simultaneamente por até três espécies de *Arcobacter* spp.; no entanto, umas delas pode desaparecer durante o enriquecimento ou durante a inoculação de colônias a partir de caldos seletivos. (PEJCHALOVÁ et al., 2008).

Das 86 carcaças positivas, 13 foram positivas para *A. butzleri* e *A. cryaerophilus* simultaneamente. Tal fato também ocorreu em estudos já anteriormente citados.

A prevalência de isolamento de *Arcobacter* spp. nas fezes nos abatedouros 1 e 2 foi de 5% e 3,3%, respectivamente. No total, a frequência foi de 4,16%. A espécie mais isolada foi *A. cryaerophilus* seguida de *A. butzleri*.

Estes resultados se assemelham aos de Golla et al., (2002), que, utilizando o meio JM encontraram uma prevalência de 4,5% de *Arcobacter* spp. em 200 suabes retais de bovinos, nos Estados Unidos. No entanto, no mesmo trabalho, a prevalência para as mesmas amostras diminuiu ao utilizar outra metodologia de cultivo, os autores obtiveram 2,5% de amostras positivas utilizando o método descrito por Collins (1996).

De Bôer et al. (1996), analisando amostras de fezes de suínos em abatedouro obtiveram uma prevalência de 10%, já Van Driessche et al. (2003), na Bélgica, encontraram uma prevalência de 44% (36/82) em amostras de fezes suínas, utilizando um protocolo de isolamento baseado em um caldo de enriquecimento seletivo específico para *Arcobacter* spp. (CM 965-Oxoid, Basingstoke, R.U.). Mais uma vez, as diferentes prevalências encontradas pelos diversos autores remetem à discussão anterior sobre a interferência do tipo de meio de cultura utilizado em cada grupo de estudo.

Em relação ao isolamento a partir das fezes cabe dizer ainda que o intestino é colonizado por grande número de bactérias e fungos, o que pode dificultar o crescimento de *Arcobacter* mesmo em meios suplementados com antibióticos. O procedimento adotado na pré-inoculação pode alterar os resultados, como a falta de homogeneidade das amostras antes do enriquecimento.

O local de coleta parece influenciar os resultados, no caso de *Campylobacter*, por exemplo, o ceco e a cloaca, nas aves, são os locais primários de colonização. Ainda não foi estabelecido qual o local preferencial de colonização do *Arcobacter*, mas o íleo, nas aves, seria preferido ao ceco, já que é um sítio que abriga microrganismos aerotolerante (HO et al., 2006).

A idade dos animais pode ser significativa para o isolamento do agente nas fezes. Hume et al., (2001), nos Estados Unidos, analisaram as fezes de marrãs, suas leitegadas, leitões em crescimento e terminação, e constataram que a incidência de *Arcobacter* spp. na granja estudada aumentou de acordo com a idade dos animais. Dos 200 leitões amostrados, apenas quatro foram positivos para o microrganismo, enquanto 23 de 79 marrãs foram positivas. Tal situação sugere que

a progressiva incidência de eliminação de *Arcobacter* ocorra a partir da prolongada exposição e reinfecções subseqüentes.

Outra questão a ser considerada é a possível eliminação intermitente da bactéria, que estaria associada a fatores estressantes durante o processo de criação *per si* e conseqüentes mudanças na resposta imune do trato intestinal (HUME et al., 2001).

No presente estudo, a espécie mais isolada foi *A. cryaerophilus*, enquanto Hume (2001) e Van Driessche (2003) descrevem como a espécie mais prevalente *A. butzleri*. O número de amostras de fezes positivas para o gênero nesse estudo foi baixo e pode não representar fidedignamente a real distribuição das espécies nas fezes. Serão necessárias maiores pesquisas do gênero para se determinar a distribuição deste agente nas fezes de suínos no Brasil.

As freqüências de isolamento nos dois abatedouros e no total de amostras de músculo foram iguais: 8,3%, e os isolados foram caracterizados como *A. butzleri* (2/3) e *A. cryaerophilus* (1/3). Os resultados aqui obtidos são semelhantes aos de Kabeya et al. (2004), que analisaram 100 amostras de carne suína e encontraram uma prevalência de 7% para *Arcobacter* spp, sendo as espécies *A. butzleri* (4%) e *A. cryaerophilus* (3%), em pesquisa conduzida no Japão.

Ohlendorf e Murano (2002), também utilizando meio JM em amostras de carne, obtiveram uma prevalência de 32% (64/200) para *Arcobacter* spp, no entanto, quando analisaram as mesmas amostras pelo método descrito por Collins et al. (1996) e o descrito por De Bôer et al. (1996), as prevalências diminuíram para 3,5% e 4%, respectivamente.

Villarruel-Lopez et al. (2003), utilizaram a meio JM, e analisou 45 amostras de cortes de carne suína processada, encontrando o agente em 51,1% das amostras, sendo que dos 39 isolados selecionados, 33 foram caracterizados como *A. butzleri*, 4 como *A. cryaerophilus* e 2 como *A. skirrowii*.

Rivas et al. (2004), na Austrália, utilizaram o meio comercial *Arcobacter broth* (Oxoid; Basingstoke, R.U.; CM 965) e o suplemento CAT (Oxoid; SR174E) em amostras de carne de aves e suínos, observaram uma freqüência de isolamento de 29% (6/21) nas amostras de suíno, sendo os isolados caracterizados como *A. butzleri*.

Nos casos de carne suína, a discussão sobre a disparidade das prevalências obtidas por outros autores é ainda mais interessante, pois o mesmo tipo de meio foi utilizado em dois trabalhos, além do presente projeto, mas as frequências foram bem diferentes.

Alguns fatores podem contribuir para que haja um acréscimo no número de isolados em carnes. Villarruel-Lopez et al. (2003) descrevem em seu estudo que o local onde coletaram as amostras mantinha a carne fora do refrigerador durante o período de compras, o que propiciou um aumento no número de microrganismos por peça de carne e também colaborou para a contaminação cruzada entre as peças de carne expostas. Há de se considerar ainda que a manipulação da carne fresca, desde o abatedouro até o açougue pode aumentar a contaminação da mesma.

Considerando-se a carne suína processada, Zanetti et al. (1996) analisaram 41 salsichas suínas provenientes de estabelecimentos na Itália e não houve isolamento.

Em todas as pesquisas citadas anteriormente, não há relato de contaminação das carnes por mais de uma espécie de *Arcobacter* spp. Não é possível afirmar que tal fato não ocorra primeiro pelo pequeno número de amostras analisadas no presente estudo, e em segundo lugar, porque não há dados suficientes nos outros relatos sobre o número de isolados selecionados e caracterizados em cada peça amostrada.

Além da caracterização das diferentes espécies várias técnicas moleculares têm sido utilizadas na subtipagem de amostras de *Arcobacter* spp. A escolha do método a ser utilizado na caracterização de agentes bacterianos depende de vários fatores relacionados à espécie estudada e a proximidade genética das amostras utilizadas, assim como fatores relacionados a características intrínsecas ao método tais como poder discriminatório e reprodutibilidade. É necessário levar em consideração ainda os custos do teste, a estrutura do laboratório em que a análise será realizada, assim como a capacitação das pessoas que executarão a prova (BEAN; OLIVE, 1999).

Para a diferenciação de amostras, o presente estudo optou pela metodologia considerada padrão ouro (*gold standard*) na epidemiologia molecular (GOERING, 1993). A PFGE é uma técnica confiável na análise do DNA genômico bacteriano e

foi utilizada para cepas de *Arcobacter* spp. por outros autores com resultados satisfatórios. (HUME et al., 2001; RIVAS et al., 2004; HO et al., 2006;).

Hume et al. (2001) analisaram cepas provenientes de fezes de marrãs, leitões e fezes coletadas em abatedouros e Ho et al. (2006) analisaram suabes retais de marrãs examinadas em criações de suínos. Rivas et al. (2004) estudaram amostras isoladas de carne suína de açougues e supermercados.

No presente estudo a PFGE empregando a enzima *Sma*I foi aplicada na caracterização de amostras de *Arcobacter* spp. de carcaças, fezes e músculo suínos com o objetivo de avaliar a diversidade genética entre amostras provenientes do estado de São Paulo de acordo com o abatedouro, mês de coleta e espécie.

Os isolados selecionados para a PFGE apresentaram uma grande variabilidade de perfis genotípicos, o que está em plena concordância com os resultados encontrados pelos autores citados acima.

Em um trabalho conduzido nos Estados Unidos, Hume et al. (2001), analisando granjas com movimentação de animais entre si, não encontraram cepas de *A. butzleri* provenientes de fezes de marrãs com perfis idênticos em uma das granjas estudadas, bem como obtiveram perfis diferentes de isolados de *A. cryaerophilus* de fezes numa mesma granja. Os autores também encontraram perfis diferentes em isolados obtidos de um mesmo animal.

Ho et al. (2006) também citam a heterogeneidade de perfis de *A. cryaerophilus* de isolados de leitões neonatos da mesma ninhada em relação ao isolados da marrã, e entre os isolados de *A. butzleri* obtidos das marrãs e dos leitões da mesma granja. Esta grande diversidade sugere que existem múltiplos genótipos parentais para isolados de *A. butzleri* e *A. cryaerophilus*.

As bactérias do gênero *Campylobacter* possuem habilidade para transformar DNA genômico endógeno a partir da incorporação de DNA exógeno e rearranjo genômico. (ON et al., 1998). Wassenaar et al. (1998) afirmam que bactérias com genomas pequenos como *Campylobacter* e *Helicobacter* utilizam o rearranjo genômico como meio de aumentar a sobrevivência ao ambiente.

Dessa forma, é provável que ocorra o mesmo para as bactérias do gênero *Arcobacter*, ou seja, que haja alto nível de recombinação genômica entre a progênie de um número limitado de genótipos parentais.

As 65 amostras foram agrupadas em 51 perfis, divididas em dois grandes grupamentos, os quais foram subdivididos em quatro subgrupos.

O grupamento I foi composto por três subgrupos, A, B e C.

O subgrupo A possui o menor número de perfis (7) e de amostras (9). *A. cryaerophilus* é a espécie mais prevalente nesse subgrupo, 8 das 9 amostras. Houve também a prevalência de isolados da coleta de Março em relação as outras coletas, e todas as amostras eram de carcaças. Nesse subgrupo, um mesmo perfil correspondeu a amostras de diferentes coletas, mas de um mesmo abatedouro, o que pode sugerir que o abatedouro possa ser responsável pela contaminação das carcaças, já que no abatedouro 1, os animais são de origens diversas.

Rivas et al. (2004) estudaram carnes de diversas espécies animais obtidas de açougues e estabelecimentos comerciais na Austrália, e encontraram perfis idênticos em duas amostras de carne suína provenientes do mesmo estabelecimento, porém compradas em dias diferentes. Os dois isolados são geneticamente relacionados, o que sugere ou uma possível contaminação ao abate, ou uma contaminação durante o manuseio no estabelecimento em questão.

O subgrupo B foi o maior dos subgrupos composto por 24 perfis, quase metade de todos os perfis, e por 29 amostras. Aqui, a espécie mais prevalente foi *A. butzleri*, com mais de 80% dos isolados. Apenas a coleta de Março ficou de fora desse conjunto; os sítios de isolamento foram carcaças, fezes e músculo, com predomínio de carcaças.

O subgrupo C é formado por 13 perfis e 15 amostras, mais de 90% dos isolados foram *A. cryaerophilus* com predomínio de amostras do abatedouro 1. Dois isolados de carcaça com o mesmo perfil são de animais diferentes, na mesma coleta e mesmo abatedouro.

O subgrupo D é o mais homogêneo de todos, com sete perfis e 12 amostras, todas caracterizadas como *A. butzleri*, provenientes de carcaças e apenas uma amostra da coleta de Junho, o restante da coleta de Abril, do abatedouro 1.

Analisando-se os perfis isoladamente observa-se que o sítio de isolamento prevalente nos quatro subgrupos foi carcaça, no subgrupo A e D eles são únicos, e nos subgrupos restantes, eles aparecem em conjunto com fezes e músculo. Isso ocorreu porque dentre os sítios, as carcaças que obtiveram maior número de isolados positivos.

Em relação às espécies, houve uma distribuição quase uniforme das espécies dentro dos subgrupos, no mínimo 80% dos isolados de um determinado grupo correspondiam a uma espécie apenas.

Não encontramos isolados de diferentes abatedouros com perfil idêntico, nem isolados idênticos em diferentes sítios de isolamento, e ainda, perfis idênticos em isolados de espécies distintas.

Não houve entre as amostras de carcaças e as de músculos perfis idênticos, no entanto, um dos isolados de músculo possui 70% de similaridade com um isolado de carcaça.

Estudos ainda devem ser realizados a fim de identificar as possíveis fontes de contaminação dos produtos de origem animal por *Arcobacter* spp. Para tanto, é necessário em primeiro lugar estabelecer uma metodologia padrão de isolamento e cultivo das diferentes espécies, para que os dados dos trabalhos de diferentes autores possam ser mais facilmente comparados.

Há muitas perguntas não respondidas sobre a cadeia epidemiológica desse agente e seu potencial zoonótico para o homem. O presente estudo identificou o sítio de isolamento mais freqüente para a bactéria, utilizando a metodologia de Johnson e Murano, e obteve resultados satisfatórios para a caracterização genotípica dos isolados através do PFGE.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, podemos concluir que:

- ✓ As carcaças foram o sítio de isolamento mais freqüente do agente.
- ✓ *A. butzleri* foi a espécie mais freqüente nas carcaças suínas.
- ✓ O isolamento de mais de uma espécie de *Arcobacter* spp. é possível em carcaças suínas.
- ✓ *Arcobacter* spp. apresentou alta diversidade genética através da PFGE.
- ✓ O PFGE apresentou resultados satisfatórios em relação ao índice discriminatório e em relação à utilização da enzima de restrição *Sma* I para análise de amostras de *Arcobacter* spp.
- ✓ O PFGE pode ser utilizado para a caracterização e discriminação de amostras de *Arcobacter* spp.

REFERÊNCIAS

- ATABAY, H. I.; BANG, D. D.; AYDIN, F.; ERDOGAN, H. M.; MADSEN, M. Discrimination of *Arcobacter butzleri* isolates by polimerase chain reaction-mediated DNA fingerprinting. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, p.141-145, 2002.
- ATABAY, H. I.; CORRY, J. E. L.; ON, S. L. W. Diversity and prevalence of *Arcobacter* spp. in broiler chickens. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p. 1007-1016, 1998.
- ATABAY, H. I.; UNVER, A.; SAHIN, M.; OTLU, S.; ELMALI, M.; YAMAN, H. Isolation of various *Arcobacter* species from domestic geese (*Anser anser*). **Veterinary Microbiology**, v. 128, p. 400-405, 2008.
- ATABAY, H. I.; WAINO, M.; MADSEN, M. Detection and diversity of various *Arcobacter* species in Danish poultry. **International Journal of Food Microbiology**, v. 109, p.139-145, 2006.
- ATANASSOVA, V.; KESSEN, V.; REICH, F.; KLEIN, G. Incidence of *Arcobacter* spp. In poultry: quantitative and qualitative analysis and PCR differentiation. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 12, p. 2533- 2536, 2008.
- BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p.459-453. 1990.
- BRIGHTWELL, G.; MOWAT, E.; CLEMENS, R.; BOEREMA, J.; PULFORD, D. J.; ON, S. L. Development of a multiplex and real time PCR assay for the specific detection of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 68, p. 318-325, 2007.

COLLADO, L.; INZA, I.; GUARRO, J.; FIGUERAS, M. J. Presence of *Arcobacter* spp. In environmental waters correlates with high levels of fecal pollution. **Environmental Microbiology**, v.10, n.6, p. 1365-1640, 2008.

COLLINS, C. I.; WESLEY, I. V.; MURANO, E. A. Detection of *Arcobacter* spp. in ground pork by modified plating methods. **Journal of Food Protection**, v. 59, p. 448-452. 1996.

DE BOER, E.; TILBURG, J. J.; WOODWAED, D. L.; LIOR, H.; JOHNSON, W. M. A selective medium for the isolation of *Arcobacter* from meats. **Letters in Applied Microbiology**, v. 23, p. 64-66. 1996.

DIERGAARDT, S. M.; VENTER, S. N.; SPREETH, J. T.; BROZEL, V. S. The occurrence of campylobacters in water sources in South Africa. **Water Research**, v.38, p. 2589-2595, 2004.

ENGBERG, J.; ON, S.; HARRINGTON, C.; GERNER-SMIDT, P. Prevalence of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter*, and *Sutterella* spp. in Human fecal samples as estimates by a reevaluation of isolation methods for *Campylobacters*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 286-291, 2000.

FERNÁNDEZ, H.; ELLER, G.; PAILLACAR, J.; GAJARDO, T.; RIQUELME, A. Toxigenic and invasive capacities: possible pathogenic mechanisms in *Arcobacter cryaerophilus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 90, p. 633-634, 1995.

FIGUERAS, M. J.; COLLADO, L.; GUARRO, J. A new 16S rDNA-RFLP method for the discrimination of the accepted species of *Arcobacter*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 62, p. 11-15, 2008.

GOERING, R. V. Molecular epidemiology of nosocomial infection: analysis of cromossomal restriction fragment patterns by pulsed-field gel electrophoresis. **Infection Control Hospital Epidemiology**, v. 14, n. 10, p. 595-600, 1993.

GOLLA, S. C.; MURANO, E.; JOHNSON, L. G.; TIPTON, N. C.; CUREINGTON, E. A.; SAVELL, J. W. Determination of the occurrence of *Arcobacter butzleri* in beef and dairy cattle from Texas by various isolation methods. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 12, p. 1849-1853, 2002.

HAMILL, S.; NEILL, S. D.; MADDEN, R. H. A comparison of media for the isolation of *Arcobacter* spp. From retail packs of beef. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 4, p. 850-854, 2008.

HARMON, K.; WESLEY, I. Multiplex PCR for the identification of *Arcobacter* and differentiation of *Arcobacter butzleri* from others arcobacters. **Veterinary Microbiology**, v. 58, p. 215-227, 1997.

HARRAB, B.; SCHWARTZ, S.; WENZEL, S. Identification and Characterization of *Arcobacter* isolates from broilers by Biochemical tests, antimicrobial resistance patterns and plasmid analysis. **Journal of Veterinary Medicine B** v. 45, p. 87-94, 1998.

HO, T. K. H.; LIPMAN, L. J. A.; GAASTRA, W. The introduction of *Arcobacter* spp. in poultry slaughterhouses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, p. 223-229, 2008a.

HO, T. K. H.; LIPMAN, L. J. A.; HENDRIKS, G. C. J. M. H.; TOOTEN, P. C. J.; ULTEE, T.; GAASTRA, W. Interaction of *Arcobacter* spp. with human and porcine intestinal epithelial cells. **FEMS Immunology Medicine Microbiology**, v.50, p. 51-58, 2007.

HO, T. K. H.; LIPMAN, L. J. A.; VAN DER GRAAF-VAN BLOOIS, L.; VAN BERGEN, M.; GAASTRA, W. Potential routes of acquisition of *Arcobacter* species by piglets. **Veterinary Microbiology**, v. 114, p. 123-133, 2006.

HO, T. K. H.; LIPMAN, L. J. A.; WÖSTEN, M. M. S. M.; VAN ASTEN, A. J. A. M.; GAASTRA, W. *Arcobacter* spp. possess two very short flagellins of which FlaA is essential for motility. **FEMS Immunology Medicine Microbiology**, v. 53, p. 85-95, 2008b.

HOUF, K.; DEVRIESE, L. A.; DE ZUTTER, L.; VAN HOOFF, J.; VANDAMME, P. Susceptibility of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, and *Arcobacter skirrowii* to antimicrobial agents used in selective media. **Journal of Clinical Microbiology**. V.39, n.4, p. 1654-1656, 2001.

HOUF, K.; TUTENEL, A.; DE ZUTTER, L.; VAN HOOFF, J.; VANDAMME, P. Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection and identification of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus* and *Arcobacter skirrowii*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 193, p. 89-94, 2000.

HOUF, K.; ZUTTER, L.; VERBEKE, B.; VAN HOOFF, JAN; VANDAMME, P. Molecular characterization of *Arcobacter* isolates collected in a poultry slaughterhouse. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 3, p. 364-369, 2003.

HUME, E. M.; HARVEY, R. B., STANKER, L. H.; DROLESKEY, R. E.; POOLE, T. L.; ZHANG, H. Genotypic variation among *Arcobacter* isolates from a farrow-to-finish swine facility. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 5, p. 645-651, 2001.

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

JOHNSON, L. G.; MURANO, E. A. Development of a new medium for the isolation of *Arcobacter* spp. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 5, p. 456-462, 1999.

KABEYA, H.; MARUYAMA, S.; MORITA, Y.; OHSUGA, T.; OZAWA, S.; KOBAYASHI, Y.; ABE, M.; KATSUBE, Y.; MIKAMI, T. prevalence of *Arcobacter* species in retail meats and antimicrobial susceptibility of the isolates in Japan. **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, p. 303-308, 2004.

LAU, S. K. P.; WOO, P. C. Y.; TENG, J. L. L., LEUNG, K. W., YUEN, K. Y. Identification by 16S ribosomal RNA gene sequencing of *Arcobacter butzleri* bacteremia in a patient with acute gangrenous appendicitis. **Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology**, v.55, p. 182-185, 2002.

LEHNER, A.; TASARA, T.; STEPLAN, R. Relevant aspects of *Arcobacter spp.* as potential foodborne pathogen. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, p.127-135, 2005.

LIPMAN, L.; HO, H.; GAASTRA, W. The presence of *Arcobacter* species in breeding hens and eggs from these hens. **Poultry Science**, v. 87, p. 2404-2407, 2008.

MANKE, T. R.; WESLEY, I .V.; DICKSON, J. S.; HARMON, K. M. Prevalence and genetic variability of **Arcobacter** species in mechanically separated turkey. **Journal of Food Protection**. v. 61, n.12, p. 1623-1628, 1998.

NEWELL, D.G. *Campylobacters, Helicobacters* and Related organisms- Disease associations in pigs. **The Pig Journal**, v. 39, p. 102, 1997.

OHLENDORF, D. S.; MURANO, E. A. Prevalence of *Arcobacter spp.* in raw ground pork from several geographical regions according to various isolation methods. **Journal of Food Protection**, v. 65, p. 1700-1705, 2002.

OLIVE, M. D; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37,n. 6, p.1661-1669, 1999.

OLIVEIRA, S. J.; BAETZ, A. L.; WESLEY, I. V.; HARMON, K. M. Classification of *Arcobacter* species isolated from aborted pig fetuses and sows with reproductive problems in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 57, p. 347-354, 1997.

OLIVEIRA, S. J.; BARCELLOS, D.; BOROWSKI, S. Diversidade antigênica entre amostras de *Arcobacter spp* isoladas de suínos no Rio Grande do Sul e presença de anticorpos aglutinantes em amostras de soro de porcas com problemas reprodutivos. **Ciência Rural, Sta Maria**, v. 29, n. 4, p.705-710, 1999a.

OLIVEIRA, S. J.; IKUTA, N.; LUNGE, V. R.; FONSECA, A.; MORAES, H. L.; KUCHENBECKER, B. S.; PASSOS, D. T. Isolamento de *Arcobacter butzleri* de músculos de suínos de terminação e de matrizes descartadas abatidos em um matadouro no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural, Sta Maria**, v. 33, n.5, p. 889-892, 2003.

OLIVEIRA, S. J.; WESLEY, I. V.; BAETZ, A. L.; HARMON, K. M.; KADER, I. T. A.; UZEDA, M. *Arcobacter cryaerophilus* and *Arcobacter butzleri* isolated from preputial fluid of boars and fattening pigs in Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, p. 462-464, 1999b.

ON, S. L. W.; HARRINGTON, C. S.; ATABAY, H. I. Differentiation of *Arcobacter* species by numerical analysis of AFLP profiles and description of a novel *Arcobacter* from pig abortions and turkey faeces. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 1096-1105, 2003.

PEJCHALOVÁ, M.; DOSTALÍKOVÁ, E.; SLÁMOVÁ, M.; BROZKOVÁ, I.; VYTRASOVÁ, J. Prevalence and diversity of *Arcobacter* spp. in the Czech Republic. **Journal of Food Protection**, v. 71, n.4, p. 719-727, 2008.

PENTIMALLI, D.; PEGELS, N.; GARCIA, T.; MARTÍN, R.; GONZÁLEZ, I. Specific PCR detection of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, *Arcobacter skirrowii*, and *Arcobacter cibarius* in chicken meat. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 7, p. 1491-1495, 2009.

PHILLIPS, C.A. *Arcobacter* spp in food: isolation, identification and control. **Trends in Food Science and Technology**, v. 12, p. 263-275, 2001.

PHILLIPS, C.A. The effect of citric acid, lactic acid, sodium citrate and sodium lactate, alone and in combination with nisin, on the growth of *Arcobacter butzleri*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, p. 424-428, 1999.

RIVAS, L.; FEGAN, N.; VANDERLINDE, P. Isolation and characterization of *Arcobacter butzleri* from meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, p. 31-41, 2004.

ROMERO, J.; GARCIA-VARELA, M.; LACLETTE, J. P.; ESPEJO, R. T. Bacterial 16S rRNA gene analysis revealed that bacteria related to *Arcobacter* spp. constitute an abundant and common component of the oystermicrobiota (*Tiostrea chilensis*). **Microbial Ecology**, v. 44, p. 365-371, 2002.

- SAMIE, A.; OBI, C. L.; BARRET, L. J.; POWELL, S. M; GUERRANT, R. L. Prevalence of *Campylobacter* species; *Helicobacter pylori* and *Arcobacter* species in stool samples from Venda region, Limpopo, South Africa: Studies using molecular diagnostic methods. **Journal of Infection**, v. 54, p. 558-566, 2007
- SON, I.; ENGLER, M. D.; BERRANG, M. A.; FEDORKA-CREY, P. J.; HARRISON, M. A. Genetic diversity of *Arcobacter* and *Campylobacter* on broiler carcasses during processing. **Journal of Food Protection**, v.69, n.5, p. 1028-1033, 2006.
- SNELLING, W. J.; MATSUDA, M.; MOORE, J. E.; DOOLEY, J. S. G. Under the microscope: *Arcobacter* **Letters in Applied Microbiology**, v. 42, p. 7-14, 2006.
- SUAREZ, D. I.; WESLEY, I.; LARSON, D. J. Detection of *Arcobacter* species in gastric samples from swines. **Veterinary Microbiology**, v.57, p. 325-336, 1997.
- VAN DRIESSCHE, E.; HOUF, K. Discrepancy between the occurrence of *Arcobacter* in chickens and broiler carcass contamination. **Poultry Science**, v.86, p. 744-751, 2007.
- VAN DRIESSCHE, E.; HOUF, K.; HOOF, J.; DE ZUTTER, L.; VANDAMME, P. Isolation of *Arcobacter* species from animal feces. **FEMS Microbiology Letters**, v. 29, p. 243-248, 2003.
- VAN DRIESSCHE, E.; HOUF, K.; VANGROENWEGHE, F.; NOLLET, N.; DE ZUTTER, L.; VANSAMME, P.; VAN HOOF, J. Occurrence and strain diversity of *Arcobacter* species isolated from healthy Belgian pigs. **Research in Microbiology**, v. 155, p.662-666, 2004.
- VANDAMME, P.; GIESENDORF, B. A. J.; VAN BELKUM, A.; PIERARD, D.; LAUWERS, S., KERTERS, K.; BUTZLER, J. P.; GOOSENS, H.; QUINT, W. G. V. Discrimination of Epidemic and Sporadic Isolates of *Arcobacter butzleri* by Polymerase Chain Reaction- Mediated DNA Fingerprinting. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, n. 12, p. 3317-3319, 1993.
- VANDAMME, P.; PUGINA, P.; BENZI, G.; VAN ETTERIJCK, R.; VLAES, L.; KERTERS, K.; BUTZLER, J.; LIOR, H.; LAUWERS, S. Outbreak of recurrent abdominal cramps associated with *Arcobacter butzleri* in an Italian school. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 9, p. 2335-2337, 1992.

VILLARRUEL-LÓPEZ, A.; MÁRQUEZ-GONZÁLEZ, M.; GARAY-MARTINEZ, E.; ZEPEDA, H.; CASTILLO, A.; MOTA, L.; MURANO, E.; TORRES-VITELA, R. Isolation of *Arcobacter* spp. from retail meats and cytotoxic effects of isolates against Vero Cells. **Journal of Food Protection**, v. 66, p. 1374-1378, 2003.

WESLEY, I.V.; *Arcobacter*. An Overview **Iowa State University** ASL-R1505. Endereço eletrônico <http://www.extension.iastate.edu/Pages/ansci/swinereports/asl-1505.pdf>. Acessado em 21/03/2007.

WESLEY, I. V.; BAETZ, A. L.; LARSON, D. J. Infection of cesarean – derived colostrum- deprived 1-day-old piglets with *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, and *Arcobacter skirrowii*. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 6, p. 2295-2299, 1996.

ZANETTI, F.; VAROLI, O.; STAMPI, S.; DE LUCA, G. Prevalence of thermophilic *Campylobacter* and *Arcobacter butzleri* in food of animal origin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 35, p. 315-321, 1996.