

Andrey Pereira Lage

ESTUDO DAS ESPÉCIES TERMOTOLERANTES DE  
Campylobacter ISOLADAS DE BEZERROS COM  
E SEM DIARRÉIA

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da  
Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito  
parcial para a obtenção do grau de Mestre em  
Medicina Veterinária.  
Área: Medicina Veterinária Preventiva

BELO HORIZONTE  
MINAS GERAIS  
1992

T 636. 089 69

L174e

Lage, Andrey Pereira, 1966-

Estudo das espécies termo-  
tolerantes de *Campylobacter*  
isoladas de bezerros com e  
sem diarreia / Andrey Pereira  
Lage.- Belo Horizonte: UFMG.  
Escola de Veterinária, 1992.

48p.:il. -

Dissertação (Mestrado)

1. *Campylobacter* - Teses  
2. Bezerro - Doenças - Te-  
ses. 3. Diarreia em ani-  
mais - Teses. I. Título.

Aprovada em 26 de fevereiro de 1992.

  
ROMULO CERQUEIRA LEITE  
Orientador

  
ANTONIO FERNANDO PESTANA DE CASTRO

  
DULCIENE MARIA DE MAGALHAES QUEIROZ

  
EDILBERO NOGUEIRA MENDES

  
EDUARDO OSORIO CISALPINO

"Never take anything for  
gospel truth, even if it  
comes from a mahatma!"

Mohandas Karamchand "Mahatma " Gandhi

---

A Vó Maria, por me ensinar  
o amor e o respeito aos  
livros;

Ao Vô Pereira, pelo exemplo  
de vida.

---

## AGRADECIMENTOS

No decorrer deste trabalho beneficiei-me de contribuições tão difíceis de esquecer quanto de agradecê-las todas. Quero manifestar profunda gratidão a todas as pessoas e instituições que propiciaram condições e auxílio à realização deste trabalho.

Este trabalho obteve apoio financeiro do CNPQ (405149/88.3), da FAPEMIG (CAG 009/90) e da FEP-MVZ Preventiva.

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A minha família pelo apoio e carinho constantes;

A Profª Dulciene Maria de Magalhães Queiroz que no momento oportuno soube indicar o caminho e abrir as portas;

Ao Profº Rômulo Cerqueira Leite, orientador e amigo, que apoiando, estimulando e aconselhando, revelou-me a prática veterinária.

## RESUMO

Foram estudados 38 bezerros com diarreia e 34 sem diarreia, de idade entre 4 e 60 dias, de 20 propriedades produtoras de leite do município de Pará de Minas, Minas Gerais. A metodologia para o isolamento de espécies termotolerantes de *Campylobacter*, a frequência de isolamento de amostras de *Campylobacter* termotolerante em animais com e sem diarreia, a produção de citotoxinas e a sensibilidade aos antimicrobianos das amostras de *Campylobacter* sp isoladas foram avaliadas. O meio CSM possibilitou o isolamento de 36 (92,31%) amostras de *Campylobacter* sp. Três (7,69%) amostras de animais sem diarreia só foram isoladas após enriquecimento em CSME, e o procedimento CSM + CSME possibilitou o isolamento de 39 (100,0%) amostras, sendo superior ao SKM + SKME. Não foram encontradas diferenças significativas entre a frequência de *Campylobacter* termotolerantes, bem como de amostras de *Campylobacter* sp produtoras de citotoxinas, em animais com e sem diarreia. Entretanto a diferença entre a frequência de amostras citotóxicas de *C. jejuni* isoladas de bezerros com e sem diarreia foi próxima à significância ( $p=0,07$ ). Entre as amostras de *Campylobacter* sp estudadas encontrou-se fenótipos de resistência à ampicilina (10,26%), à penicilina (89,74%), à associação sulfametoxazol + trimetoprim (58,97%) e à tetraciclina (25,64%). Algumas amostras (20,15%) apresentaram-se intermediariamente sensíveis à canamicina.

## SUMMARY

Thirty-eight diarrheic and 34 normal calves, aging 4 to 60 day-old, belonging to 20 dairy herds from Pará de Minas, Minas Gerais, Brazil, were studied. The methodology for isolating and the frequency of thermotolerant *Campylobacter* from diarrheic and normal calves, the cytotoxin production and the antimicrobial sensitivity of the isolated strains were tested. CSM was superior to the other procedures tested for isolating *Campylobacter*, but three strains, from normal calves, were only isolated after enrichment in CSME. The procedure CSM + CSME were able to isolate 39 (100,0%) strains of *Campylobacter* sp and were significantly ( $p<0,001$ ) better than SKM + SKME (46,15%). There was no significant difference in the frequency of thermotolerant *Campylobacter* and of cytotoxin production by *Campylobacter* sp from diarrheic and normal calves. However, the frequency of cytotoxic *C. jejuni* from diarrheic calves was near significance ( $p=0,07$ ) when compared to cytotoxic *C. jejuni* from normal calves. Resistance to ampicillin (10,26%), to penicillin (89,74%), to sulfametoxazol + trimethoprim (59,97%) and to tetracycline (25,64%) were observed in *Campylobacter* isolates. Some strains were intermediary resistant to kanamycin.

## SUMÁRIO

Página

|                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 INTRODUÇÃO                                                                                 | 1  |
| 2 LITERATURA CONSULTADA                                                                      | 3  |
| 2.1 Histórico                                                                                | 3  |
| 2.2 Diagnóstico                                                                              | 6  |
| 2.3 Diarréia por <u>Campylobacter</u> sp em bezerros                                         | 10 |
| 2.4 Fatores de virulência de amostras de <u>Campylobacter</u> termotolerantes                | 13 |
| 2.5 Suscetibilidade das espécies termotolerantes de <u>Campylobacter</u> aos antimicrobianos | 15 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS                                                                         | 18 |
| 3.1 População estudada                                                                       | 18 |
| 3.2 Coleta do material                                                                       | 18 |
| 3.3 Procedimentos bacteriológicos                                                            | 19 |
| 3.3.1 Enriquecimento e isolamento de <u>Campylobacter</u> sp                                 | 19 |
| 3.3.2 Enriquecimento e isolamento de <u>Salmonella</u> sp                                    | 19 |
| 3.3.3 Isolamento de <u>Escherichia coli</u>                                                  | 20 |
| 3.3.4 Identificação de <u>Campylobacter</u> sp                                               | 20 |
| 3.3.5 Triagem e identificação de <u>Salmonella</u> sp e <u>E. coli</u>                       | 20 |
| 3.3.6 Manutenção das amostras de <u>Campylobacter</u> sp                                     | 21 |

|                                                                                                                                   |        |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 3.3.7 Manutenção das amostras de <i>Salmonella</i> sp e <i>E. coli</i>                                                            | 21     |
| 3.3.8 Pesquisa de citotoxina nas amostras de <i>Campylobacter</i> sp isoladas                                                     | 21     |
| 3.3.9 Pesquisa de toxina termoestável (ST) e citotoxina nas amostras de <i>E. coli</i> isoladas                                   | 22     |
| 3.3.10 Testes de suscetibilidade aos antimicrobianos                                                                              | 22     |
| 3.4 Procedimentos parasitológicos                                                                                                 | 23     |
| 3.4.1 Manutenção das amostras de fezes                                                                                            | 23     |
| 3.4.2 Pesquisa de <i>Cryptosporidium</i> sp                                                                                       | 23     |
| 3.5 Controle de qualidade                                                                                                         | 23     |
| 3.6 Análise estatística                                                                                                           | 24     |
| <br>4 RESULTADOS                                                                                                                  | <br>25 |
| 4.1 Características da população estudada                                                                                         | 25     |
| 4.2 Isolamento de <i>Campylobacter</i> sp e produção de citotoxinas                                                               | 26     |
| 4.3 Identificação de outros enteropatógenos                                                                                       | 28     |
| 4.4 Suscetibilidade das amostras de <i>Campylobacter</i> sp isoladas aos antimicrobianos                                          | 29     |
| <br>5 DISCUSSÃO                                                                                                                   | <br>31 |
| 5.1 Avaliação da metodologia para o isolamento de espécies termotolerantes de <i>Campylobacter</i> de bezerros com e sem diarreia | 31     |
| 5.2 Participação de <i>Campylobacter</i> termotolerante na diarreia de bezerros até 60 dias de idade                              | 32     |

|     |                                                                                                            |    |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.3 | Produção de citotoxinas por amostras de <u>Campylobacter</u><br>sp isoladas de bezerros com e sem diarreia | 34 |
| 5.4 | Suscetibilidade das amostras termotolerantes de<br><u>Campylobacter</u> sp aos antimicrobianos             | 35 |
| 6   | CONCLUSÕES                                                                                                 | 37 |
| 7   | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS                                                                                 | 39 |

## LISTA DE TABELAS

Página

|                                                                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TABELA 1 - Frequência de isolamento de <i>Campylobacter</i> sp<br>nos diversos meios de cultura e procedimentos<br>utilizados       | 26 |
| TABELA 2 - Distribuição das espécies de <i>Campylobacter</i> sp<br>por faixas etárias e produção de citotoxinas                     | 27 |
| TABELA 3 - Distribuição dos enteropatógenos encontrados<br>por faixas etárias e presença concomitante de<br><i>Campylobacter</i> sp | 28 |
| TABELA 4 - Suscetibilidade aos antimicrobianos de amostras<br>de <i>Campylobacter</i> sp isoladas de bezerros<br>com e sem diarreia | 30 |

## LISTA DE FIGURAS

Página

FIGURA 1 - Características bioquímicas das espécies  
termotolerantes de *Campylobacter*

9

## LISTA DE GRÁFICOS

Página

GRÁFICO 1 - Distribuição da população estudada em  
faixas etárias

25

## 1 INTRODUÇÃO

A pecuária leiteira do Estado Minas Gerais sempre contribuiu significativamente para a economia do Estado, bem como do país. Apesar da tradição da pecuária leiteira no Estado, as condições sanitárias de nossas criações são precárias e dados sobre seu real estágio são escassos.

Estudos sobre a situação sanitária da pecuária mineira evidenciaram que a diarreia dos bezerros constitui uma das mais importantes causas de perdas nos rebanhos (LEITE & LIMA, 1982; RIBEIRO et al, 1983; VIANA et al, 1987; PRADO, 1991).

São vários os agentes atualmente considerados enteropatogênicos, destacando-se, pela frequência e pelo maior volume de informações existentes, os rotavírus, as amostras de *Escherichia coli* citotoxigênicas e enteropatogênicas, a *Salmonella* sp, e o *Cryptosporidium* sp (HOLLAND, 1990; WRAY, 1991).

Após os progressos ocorridos nas duas décadas precedentes em relação à participação das espécies termotolerantes de *Campylobacter* sp como agente de diarreia em crianças e adultos (BUTZLER & SKIRROW, 1979), grande interesse foi despertado para o estudo destas espécies como agentes causadores de diarreia em animais domésticos (AL-MASHAT & TAYLOR, 1980a; MODULO et al, 1987), não estando, entretanto, muito bem compreendida a participação de *Campylobacter* sp no processo diarreico dos animais domésticos (TERZOLO et al, 1987)

## 2 LITERATURA CONSULTADA

### 2.1 Histórico

Os primeiros relatos de bactérias espiraladas hoje classificadas no gênero *Campylobacter* datam do início do século quando MCFADYEAN & STOCKMAN (1909, 1913) observaram microrganismos espiralados em surtos de abortos em ovinos e bovinos. Em 1919, SMITH & TAYLOR ao pesquisarem sobre o aborto em bovinos encontraram bactérias espiraladas semelhantes às encontradas por MCFADYEAN & STOCKMAN e as denominaram "*Vibrio fetus*".

Estudando rebanhos com disenteria de inverno, JONES et al (1931) isolaram, de bezerros e de vacas acometidas, uma bactéria espiralada semelhante ao "*V. fetus*" e a denominaram "*Vibrio jejuni*". Em 1944, DOYLE isolou de casos de disenteria suína uma bactéria espiralada e a denominou "*Vibrio coli*". De acordo com estes autores o "*V. jejuni*" e o "*V. coli*" seriam os agentes etiológicos destas disenterias. Atualmente, o coronavírus bovino e a *Serpula hyodisenteriae* são considerados os respectivos agentes etiológicos destas disenterias (SAIF et al, 1988; STANTON et al, 1991).

KING (1957) isolou do sangue de pacientes com diarreia bactérias espiraladas semelhantes ao "*V. jejuni*" e ao "*V. coli*", com capacidade de crescerem a 42°C e as denominou "*related vibrio*". Apesar de não ter conseguido isolar estes microrganismos

das fezes dos pacientes, a autora supôs a participação deste "related vibrio" na etiologia do quadro apresentado pelos pacientes.

FIREHAMMER (1965) isolou, de fezes de ovinos, uma bactéria espiralada que denominou de "*Vibrio fecalis*", que viria a ser reclassificada em *Campylobacter sputorum* biovar *fecalis* por ROOP et al (1985).

Baseados em diferenças bioquímicas e na composição de bases do DNA, SÉBALD & VÉRON em 1963 propuseram a criação do gênero *Campylobacter*, no qual, em 1973, VÉRON & CHATELAIN listaram *C. fetus*, *C. jejuni*, *C. coli* e *C. sputorum*.

No começo da década de 1970, utilizando o processo de filtração DEKEYSER et al (1972) e BUTZLER et al (1973) conseguiram isolar *C. jejuni* das fezes de crianças com diarreia e confirmaram a hipótese da King (1957) quanto à participação destas bactérias no quadro diarreico.

Com o interesse despertado por estes trabalhos e com a formulação de meios seletivos para o isolamento de *C. jejuni* a partir de fezes (SKIRROW, 1977; BUTZLER & SKIRROW, 1979) ocorreu um grande avanço no conhecimento sobre as bactérias do gênero *Campylobacter*.

BENJAMIN et al (1983) denominaram de *C. "laridis"* amostras de *Campylobacter* resistentes ao ácido nalidíxico e termofílicas (NARTC), isolados por SKIRROW & BENJAMIN (1980b) de galvotas. GRAEVENITZ (1990) revisou a nomenclatura e as denominou *C. lari*.

Em 1983, SANDSTEDT et al (1983) isolaram de cães com e sem diarreia bactérias espiraladas termotolerantes, catalase negativa ou fracamente positiva e geneticamente diferentes das espécies conhecidas de *Campylobacter*, as quais foram denominadas *C. "upsaliensis"*.

Ao estudarem o complexo adenomatose intestinal suína, GEBHARDT et al (1983) isolaram uma bactéria espiralada que participava como agente etiológico deste complexo e a denominaram *C. hyointestinalis* (GEBHARDT et al, 1985).

Algumas amostras de *C. jejuni* isoladas de espécimes clínicos diferiam da amostra padrão por apresentarem o teste da catalase variável e o de nitrato negativo, levando STEELE & OWEN (1988) a classificarem estas amostras em *C. jejuni* subespécie *doylei*.

Durante as últimas duas décadas, um total de 19 novas espécies e subespécies de bactérias espiraladas foram descobertas e identificadas, sendo, atualmente, divididas em três gêneros: *Campylobacter*, *Arcobacter*, e *Helicobacter* (VANDAMME et al, 1991).

Dentre as 11 espécies que hoje compõem o gênero *Campylobacter* são consideradas como termotolerantes *C. jejuni*, *C. jejuni doylei*, *C. coli*, *C. lari*, *C. "upsaliensis"* e *C. sputorum* biovar *fecalis* (PENNER, 1988).

## 2.2 Diagnóstico

Os primeiros isolamentos de amostras termotolerantes de *Campylobacter* sp de fezes foram realizados pela filtração de suspensões fecais através de membranas filtrantes com poros de 0,65  $\mu$ m (DEKEYSER et al, 1972). Desde estes primeiros isolamentos até nossos dias, novas técnicas foram introduzidas, incluindo-se meios de transporte, de enriquecimento e seletivos, o que permitiu um aumento da sensibilidade e uma maior facilidade para o isolamento de rotina destes microrganismos.

Por serem bactérias microaerofílicas, os membros do gênero *Campylobacter* necessitam de uma atmosfera em torno de 5% de oxigênio e de 10% de dióxido de carbono (SMIBERT, 1984) para o crescimento "in vitro", o que pode ser conseguido através de geradores químicos de microaerofilia ou da técnica de lavagem de jarra (BUTZLER & SKIRROW, 1979). Para diminuir os efeitos tóxicos do oxigênio no crescimento destes microrganismos, GEORGE et al (1978) propuseram um suplemento, denominado FBP, que atua como quelante de radicais tóxicos de oxigênio (superóxidos, peróxidos).

Devido às características microaerofílicas, meios de transportes adequados são necessários na impossibilidade do processamento imediato das amostras para o isolamento destes microrganismos. Estes meios são em geral semi-sólidos, criando zonas de

diferentes tensões de oxigênio dentro do tubo, e contendo o suplemento FBP (WANG et al, 1980; SJÖGREN et al, 1987; ROGOL et ali, 1990).

Outro aspecto importante a ser considerado quando se pretende o isolamento de *Campylobacter* sp é o enriquecimento, apesar de alguns autores acreditarem que este é dispensável (AGULLA et al, 1987; HUTCHINSON & BOLTON, 1983). Os meios de enriquecimento são recomendados principalmente para o isolamento de *Campylobacter* sp de locais onde a concentração de bactérias é pequena, como em fezes de bovinos sem diarreia (MARTIN et al, 1983). Estes meios de cultura líquidos ou semi-sólidos são compostos de bases ricas, sendo, algumas vezes, suplementados com sangue e/ou misturas de antimicrobianos (WANG et al, 1980; BOLTON & ROBERTSON, 1982; CHAN & MACKENZIE, 1982; MARTIN et al, 1983; SJÖGREN et al, 1987; ROGOL et al, 1990). Podem aumentar em até 40% o isolamento de *Campylobacter* sp, como demonstrou SJÖGREN et al (1987), utilizando o meio de enriquecimento de CHAN & MACKENZIE (1982).

O desenvolvimento de meios seletivos contendo antimicrobianos veio facilitar o isolamento de bactérias do gênero *Campylobacter*. Devido a variações de concentrações e de tipo de antimicrobianos utilizados, estes suplementos possuem diferenças quanto ao seu poder supressivo na flora contaminante. Comparando-se vários meios seletivos para o isolamento de *Campylobacter* sp de fezes de seres humanos (MERINO et al, 1986; ENDTZ et al, 1991) e de animais (WEBER et al, 1983; RUBSAMEN, 1986; TRESCHNAK &

HELLMAN, 1987) observou-se que os meios mais seletivos proporcionaram um maior número de amostras isoladas. Nestas observações o suplemento menos inibidor foi o SKM proposto por SKIRROW (1977). KARMALI et al (1986) recomendam a utilização de mais de um meio seletivo para favorecer o isolamento de maior número de amostras. ENDTZ et al (1991) obtiveram um maior número de amostras isoladas quando utilizaram um meio de baixa seletividade (SKM) e um de alta seletividade (CSM - KARMALI et al, 1986). Isto deve-se ao fato de que a maioria dos meios seletivos foram desenvolvidos para *C. jejuni*, podendo ser inibidores para outras espécies do gênero (NG et al, 1985). Além disto, diferenças regionais de sensibilidade das amostras de *Campylobacter* sp aos antimicrobianos empregados nos meios seletivos podem ocorrer. WALMSLEY & KARMALI (1989) descreveram o isolamento de *C. "upsaliensis"*, no Canadá, em meio CSM, o que, segundo os padrões de sensibilidade das amostras de *C. "upsaliensis"* isoladas por filtração na Bélgica, não seria viável, pois, somente 19,2% das amostras belgas são resistentes à cefoperazona que este meio contém (GOOSSENS & BUTZLER, 1989).

A identificação do gênero *Campylobacter* é feita através de características morfo-tintoriais e bioquímicas. São bactérias Gram negativas, móveis, espiraladas em forma de "S", vírgula, ou asa de gaivota. São microaerofílicas com um metabolismo do tipo respiratório, não utilizam carboidratos nem oxidativamente nem fermentativamente e são oxidase positivas (SMIBERT, 1984).

Para a identificação das espécies termotolerantes são

utilizados os testes da catalase, redução de nitrato, hidrólise de hipurato, produção de H<sub>2</sub>S em TSI, sensibilidade à cefalotina e ao ácido nalidíxico, crescimento a 25°C e a 42°C, tolerância a 1,5% e 2,0% de NaCl, crescimento em anaerobiose em meio contendo 0,1% de TMAO (trimetilamina N-óxido), e a transformação rápida em forma cocóide (SMIBERT, 1984; PENNER, 1988). A FIGURA 1 apresenta as características de cada uma das espécies termotolerantes de *Campylobacter*.

| Espécies                             | cat | hip | nal | cef | nit | H <sub>2</sub> S | gli | TMAO | 1,5% NaCl | 2,0% NaCl | TTC |
|--------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|------------------|-----|------|-----------|-----------|-----|
| <i>C. jejuni jejuni</i>              | +   | +   | s   | r   | +   | -                | +   | -    | -         | -         | +   |
| <i>C. jejuni doylei</i>              | v   | +   | s   | v   | -   | -                | +   | -    | -         | -         | +   |
| <i>C. coli</i>                       | +   | -   | s   | r   | +   | v                | +   | -    | -         | -         | +   |
| <i>C. lari</i>                       | +   | -   | r   | r   | +   | -                | +   | +    | +         | -         | +   |
| <i>C. hyointestinalis</i>            | +   | -   | r   | s   | +   | +                | +   | +    | -         | -         | -   |
| <i>C. sputorum</i> biovar<br>fecalis | +   | -   | r   | s   | +   | +                | +   | +    | +         | +         | D   |
| " <i>C. upsaliensis</i> "            | v   | -   | s   | s   | +   | -                | -   | -    | -         | -         | D   |

FIGURA 1 - Características bioquímicas das espécies termotolerantes de *Campylobacter*

cat - catalase; hip - hidrólise de hipurato; nal - ácido nalidíxico (30µg); cef - cefalotina (30µg); nit - redução de nitrato; H<sub>2</sub>S - produção de ácido sulfídrico em TSI; gli - tolerância a 1% de glicina; TMAO - crescimento em anaerobiose na presença de 0,1% de TMAO; 1,5% NaCl - tolerância à 1,5% de NaCl; 2,0% NaCl - tolerância à 2,0% de NaCl; TTC - transformação rápida em forma cocóide; + - positivo; - - negativo; s - sensível; r - resistente; v - variável; D - sem dados.

FONTE - PENNER, 1988.

Para as provas de tolerância, o tamanho do inóculo deve ser padronizado e, segundo ON & HOLMES (1991), uma concentração de 10<sup>6</sup> microrganismos/ml parece ideal para ser usada como inóculo

nestas provas. Utilizando este inóculo, estes autores observaram que amostras padrões se comportavam como o relatado nos trabalhos de descrição das espécies. ON & HOLMES (1991b) também verificaram que a base utilizada nos testes levava a diferenças nos resultados e propuseram a base ideal para cada prova de tolerância.

Para a manutenção de amostras de *Campylobacter* sp alguns meios têm sido propostos (WANG et al, 1983; NAIR et al, 1984; RODOL et al, 1990), mas a sobrevivência das amostras nestes meios se limita a algumas semanas. Segundo MILLS & GHERNA (1988) a melhor metodologia para a manutenção de amostras de *Campylobacter* sp é através do congelamento a  $-196^{\circ}\text{C}$  em meio contendo 10% de glicerol. Por este método, que é superior ao congelamento a  $-80^{\circ}\text{C}$  ou à liofilização, as amostras permanecem viáveis por anos. Outro método que tem se mostrado bastante satisfatório e que oferece a vantagem de não ser necessário o descongelamento de toda a amostra para se fazer repiques, é o congelamento das amostras em uma solução contendo 5% de citrato de sódio e 40% de glicerol adsorvida em papel de filtro, que pode ser mantida a  $-20^{\circ}\text{C}$  ou a  $-70^{\circ}\text{C}$  (LIND et al, 1989).

### 2.3 Diarréia por Campylobacter sp em bezerros

A diarréia tem sido apontada como um dos maiores problemas da criação de bezerros no Estado de Minas Gerais (LEITE & LIMA, 1982; RIBEIRO et al, 1983; VIANA et al, 1987; PRADO, 1991).

Sua importância é muito grande, devido aos sérios prejuízos econômicos causados à exploração pecuária leiteira (HOUSE, 1978), relacionados à sua alta morbidade e ao comprometimento dos animais em sua futura vida produtiva e reprodutiva (WALTNER-TOEWS et al, 1986; CORREA et al, 1988; CURTIS et al, 1989).

Vários trabalhos têm apontado como principais agentes etiológicos da diarreia em bezerros os rotavírus, a *Escherichia coli* enterotoxigênica e o *Cryptosporidium* sp (HOLLAND, 1990), mas vários outros agentes estão envolvidos (AL-MASHAT & TAYLOR, 1980a; TZIPORI, 1981; RYCKE et al, 1986; SNODGRASS et al, 1986; HERBST et al, 1987). Dentre estes outros agentes que vêm ganhando destaque nos últimos anos, está o *Campylobacter* sp.

AL-MASHAT & TAYLOR (1980b), utilizando uma amostra de *C. jejuni* isolada de um bezerro com diarreia, reproduziram quadros de diarreia e disenteria em bezerros lactentes e desmamados. As lesões intestinais foram semelhantes às encontradas por JONES & LITTLE (1931) ao infectarem bezerros com amostras de "*V. jejuni*" por eles isoladas. TERZOLO et al (1987) utilizando uma amostra de *C. jejuni* isolada de bezerro, infectaram bezerros gnotobióticos e observaram mudança na consistência das fezes dos animais, com presença de muco e sangue. Lesões do intestino grosso também foram verificadas.

Mudança na consistência das fezes e presença de muco e sangue foram também observados em bezerros desmamados infectados com uma amostra de *C. "fecalis"* isolada do abomaso de uma novilha de 18 meses de idade (AL-MASHAT & TAYLOR, 1981).

Outros autores infectaram bezerros convencionais e bezerros impedidos de mamarem colostro com amostras de *Campylobacter* sp, sem, contudo, conseguirem induzir a diarreia ou a lesões intestinais nestes animais (FIREHAMMER & MYERS, 1981; WARNER & BRYNER, 1984). Entretanto, as amostras utilizadas por estes autores não eram de origem bovina.

Outro aspecto importante é que em nenhum destes trabalhos os fatores de virulência das amostras era conhecido.

Um surto de diarreia em bezerros causado por *C. hyointestinalis* foi descrito por DIKER et al (1990) em três fazendas na Turquia.

O isolamento de *Campylobacter* sp de fezes de bezerros tem sido descrito como frequente não havendo, porém, diferenças significativas entre animais com e sem diarreia (FIREHAMMER & MYERS, 1981; WEBER et al, 1984; RYCKE et al, 1986; MODOLO et al, 1987), mesmo se estas amostras são identificadas ao nível específico (AL-MASHAT & TAYLOR, 1980a; SNODGRASS et al, 1986). MODOLO et al (1987) relatam uma maior concentração de *Campylobacter* sp em fezes de bezerros com diarreia ( $10^8$ ) que em bezerros sem diarreia ( $10^2$ - $10^4$ ).

GLASS et al (1983) observaram que em Bangladesh a frequência da infecção por *C. jejuni* em crianças com diarreia era tão alta quanto em portadores assintomáticos, sendo que a diarreia nesta população era mais branda. BLASER et al (1985) verificaram que as taxas de anticorpos anti-*C. jejuni* em crianças em Bangladesh eram mais altas que em crianças dos Estados Unidos, e relacionaram este achado às más condições sanitárias em que estas

crianças vivem. MENDES et al (1987) também encontraram altas taxas de infecção por *C. jejuni* em crianças com e sem diarreia em Belo Horizonte, Minas Gerais.

O isolamento de enteropatógenos de bezerros sem diarreia não é um achado raro e diversos autores já descreveram a presença de *E. coli* enterotoxigênica, rotavírus, *Salmonella* sp e outros agentes nestes animais, relacionando-os as más condições higiênicas das criações de bezerros (UEDA et al, 1982; MYERS et al, 1984; WRAY, 1991).

#### 2.4 Fatores de virulência de amostras de Campylobacter termotolerantes

Os principais fatores de virulência de amostras de *Campylobacter* termotolerantes são a produção de citotoxinas, a produção de uma enterotoxina e a capacidade de aderir e invadir células epiteliais (WALKER et al, 1986).

Um dos primeiros fatores de virulência de *Campylobacter* sp causadores de diarreia estudado foi a produção de uma enterotoxina semelhante à toxina colérica (RUIZ-PALACIOS et al, 1983). Esta toxina é capaz de aumentar a quantidade de AMPc nas células epiteliais, promovendo uma maior secreção de íons  $\text{Cl}^-$  e impedindo a absorção de íons  $\text{Na}^+$ , o que leva a um desequilíbrio hidroeletrolítico que se manifesta por uma diarreia aquosa (HOLMGREN, 1981). O encontro desta enterotoxina é frequente entre amostras

de *Campylobacter* sp isoladas de seres humanos (BELBOURI & MEGRAUD, 1988; LINDBLOM et al, 1990b).

O poder invasivo é uma característica marcante das espécies de *Campylobacter*. Os enteropatógenos invasivos lesam o intestino, produzindo uma diarreia com presença de sangue, muco e, às vezes, fragmentos de mucosa (WALKER et al, 1986). A capacidade de adesão, que é um processo anterior à invasão celular, e a capacidade de invasão de células epiteliais por *Campylobacter* sp pode ser mensurada "in vitro" utilizando-se culturas celulares (FAUCHÈRE, 1986; BUCKHOLM & KAPPERUD, 1987). Estes testes são empregados para avaliar o poder patogênico de cepas de *Campylobacter* sp, sendo frequente o fenótipo invasivo entre amostras de *Campylobacter* sp isoladas de pessoas com diarreia sangüinolenta (LINDBLOM et al, 1990a). A co-infecção de cultivos celulares com amostras de *Campylobacter* sp e alguns vírus enteropatogênicos aumenta o poder invasivo destas amostras (BUCKHOLM & KAPPERUD, 1987). Outro fator importante na colonização e invasão da mucosa intestinal por amostras de *Campylobacter* sp relaciona-se com a presença de muco. MELO & PÉCHÈRE (1988) verificaram que a taxa de invasão de *C. jejuni* foi aumentada em até 20 vezes na presença de mucina.

A citotoxina de *C. jejuni* atua destruindo a membrana citoplasmática de células epiteliais, levando à morte celular (PANG et al, 1987). Existe alguma semelhança imunológica entre esta citotoxina e a toxina de *Shigella dysenteriae* 1, mas em experimentos de hibridização não foi observada semelhança entre os genes que codificam a citotoxina de *Shigella dysenteriae* 1 e de

amostras citotoxigênicas de *C. jejuni* (MOORE et al, 1988). Amostras citotoxigênicas são isoladas frequentemente de indivíduos que apresentam diarreia sanguinolenta (KLIPSTEIN et al, 1985).

Os conhecimentos sobre os fatores de virulência de amostras termotolerantes de *Campylobacter* sp isoladas de animais domésticos são escassos, mas a produção de citotoxinas, de enterotoxinas e o fenótipo invasor já foram relatados em amostras de *Campylobacter* sp isoladas de animais sem diarreia (Mc CARDELL et al, 1984; FRICKER et al, 1989; LINDBLOM et al, 1990b; MILON et al, 1990).

## **2.5 Suscetibilidade das espécies termotolerantes de Campylobacter aos antimicrobianos**

Segundo BUTZLER & SKIRROW (1979) os aminoglicosídeos, a eritromicina, as tetraciclínas e o cloranfenicol são as drogas mais efetivas contra os *Campylobacter* termotolerantes. Outros antimicrobianos, como a clindamicina e a furazolidona, também são bastante eficazes (BUTZLER & SKIRROW, 1979; ENTERIC ..., 1980). Para estes mesmos autores, a ampicilina e as sulfonamidas apresentam uma atividade intermediária e a penicilina G, lincomicina, colistina e trimetoprim mostram pequena atividade contra estes microrganismos (BUTZLER & SKIRROW, 1979; ENTERIC ..., 1980).

A droga de escolha para o tratamento da infecção entérica por *Campylobacter* termotolerantes é a eritromicina

(ENTERIC ..., 1980), entretanto a resistência a esta droga já foi descrita (ANDREASEN, 1987; TAYLOR & COURVALIN, 1988).

MENDES et al (1987) e DIAS et al (1990) estudando amostras de *C. jejuni* isoladas de crianças e de carcaças de frangos, respectivamente, em Belo Horizonte, Minas Gerais, encontraram amostras resistentes à ampicilina, à associação sulfametoxazol + trimetoprim e às tetraciclinas. Todas as amostras testadas foram sensíveis aos aminoglicosídeos, à eritromicina, e ao cloranfenicol.

AL-MASHAT & TAYLOR (1983) estudando a suscetibilidade de amostras de *C. jejuni*, *C. fetus fetus*, *C. fecalis* e algumas amostras não identificadas de *Campylobacter* isoladas de bezerros com diarreia frente aos antimicrobianos encontraram 100% das amostras sensíveis à neomicina, à eritromicina e ao cloranfenicol. Somente uma amostra de *C. jejuni* foi resistente à ampicilina e uma à furazolidona. Uma amostra não identificada de *Campylobacter* foi resistente à tetraciclina. Todas as amostras foram resistentes à penicilina e à associação sulfametoxazol + trimetoprim, à exceção de uma amostra de *C. fecalis* que foi sensível à esta associação.

MODULO et al (1989) encontraram, entre amostras de *Campylobacter* sp (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* e *C. fetus venerealis*) isoladas de bezerros com e sem diarreia, resistência ao cloranfenicol, tetraciclina, furazolidona, ampicilina, eritromicina, canamicina, penicilina e à associação sulfametoxazol + trimetoprim. Somente amostras de *C. lari* apresentaram resistência à neomicina e à nitrofurantoína. Resistência à gentamicina foi

encontrada somente em amostras de *C. jejuni*.

Em *Campylobacter* sp, a resistência a eritromicina (macrolídeos) é codificada por genes cromossômicos, assim como a resistência ao cloranfenicol e a ampicilina (TAYLOR & COURVALAIN, 1988; WANG & TAYLOR, 1990), porém a resistência à tetraciclina é plasmidial (TAYLOR et al, 1983).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 População estudada

Foram estudados 72 bezerros mestiços holandês x zebu, com idade variando entre 4 e 60 dias, de 20 propriedades produtoras de leite da região de Pará de Minas, Minas Gerais, no período de janeiro a fevereiro de 1991. Foram considerados como diarreicos os animais que apresentaram fezes de consistência semi-fluidas ou fluidas no momento da coleta.

#### 3.2 Coleta e transporte do material

Foram coletadas amostras de fezes diretamente do reto dos animais com auxílio de sacos plásticos e de dois "swabs" por animal. As amostras coletadas em sacos plásticos foram transportadas em gelo até o laboratório onde foram processadas para os exames parasitológicos e parte dos exames bacteriológicos. Um dos "swabs" foi inoculado no meio de transporte e enriquecimento para *Campylobacter* proposto por CHAN & MACKENZIE (1982) modificado, contendo o suplemento de antibióticos de SKIRROW (1977) (SKME), e o outro no mesmo meio contendo o suplemento de antibióticos de KARMALI et al (1986) (CSME). Estes meios foram transportados à temperatura ambiente. Todas as amostras foram processadas no período máximo de quatro horas após a coleta.

### 3.3 Procedimentos bacteriológicos

#### 3.3.1 Enriquecimento e isolamento de *Campylobacter* sp

Os "swabs" transportados no meio de CHAN & MACKENZIE (1982) suplementado com as misturas de antibióticos SKM (vancomicina, 10mg/l; trimetoprim, 5mg/l e polimixina B, 2500 UI/l - Merck) (SKIRROW, 1977) e CSM (cefoperazona - Pfizer, 32mg/l; cicloheximide - Sigma, 100mg/l e vancomicina - Eli Lilly, 20mg/l) foram inoculados em ágar BHI (Brain Heart Infusion ágar) (Difco) suplementado com 10% de sangue de carneiro e contendo SKM e CSM, respectivamente. Após 24h de enriquecimento a 42°C no mesmo meio de CHAN & MACKENZIE (1982) suplementado, os "swabs" foram semeados em SKM e CSM. As placas de SKM e CSM foram incubadas a 42°C em microaerofilia (5% de O<sub>2</sub>, 10% de CO<sub>2</sub> e 85% de N<sub>2</sub>) por até 96h.

#### 3.3.2 Enriquecimento e isolamento de *Salmonella* sp

Da porção de fezes transportadas em gelo, um grama ou um mililitro foi inoculado em tubos contendo 10 ml de caldo tetrationato (Merck) suplementado com 0,2 ml de solução iodo-iode-tada e 0,1 ml de solução de verde brilhante a 1/1000 (EDWARDS & EWING, 1972) e incubados a 37°C e a 42°C por 18h. Após o enriquecimento em caldo tetrationato o conteúdo de cada tubo foi inoculado em ágar de Mac Conkey (MC) (Difco) e em ágar *Salmonella-Shigella* (SS) (Difco) que foram incubados a 37°C por 24h.

### 3.3.3 Isolamento de *Escherichia coli*

Placas de ágar MC foram inoculadas com parte das fezes transportadas em gelo que foram a seguir incubadas a 37°C por 24h.

### 3.3.4 Identificação de *Campylobacter* sp

As colônias semelhantes a *Campylobacter* sp nos meios de SKM e CSM foram identificadas segundo a morfologia ao Gram, e às provas de catalase, oxidase, motilidade, redução de nitrato (MAC FADDIN, 1980), sensibilidade ao ácido nalidixico (disco de 30ug) e à cefalotina (disco de 30ug), crescimento a 25°C e a 42°C, hidrólise de hipurato (SKIRROW & BENJAMIN, 1980a), produção de H<sub>2</sub>S em TSI (Triple Sugar Iron ágar) (Merck), tolerância a 1,5% e a 2,0% de NaCl, tolerância a 1,0% de glicina, crescimento em anaerobiose na presença de 0,1% de TMAO (trimetilamina-N-óxido) (Sigma) (ON & HOLMES, 1991b), e a transformação rápida em forma cocóide (KARMALI et al, 1981).

### 3.3.5 Triagem e identificação de *Salmonella* sp e *E. coli*

As colônias semelhantes às de *Salmonella* sp nos meios de MC e SS e as de *E. coli* no de MC foram triadas segundo TOLEDO et al (1982a, 1982b) e identificadas segundo as recomendações de EDWARDS & EWING (1972).

### 3.3.6 Manutenção das amostras de *Campylobacter* sp

As amostras de *Campylobacter* sp isoladas foram congeladas em caldo tioglicolato com 10% de glicerol a  $-196^{\circ}\text{C}$  (MILLS & GHERNA, 1988) e a  $-70^{\circ}\text{C}$ , em papel de filtro embebido em uma solução contendo 5% de citrato de sódio e 40% de glicerol (LIND et al, 1989).

### 3.3.7 Manutenção das amostras de *Salmonella* sp e *E. coli*

As amostras de *Salmonella* sp e *E. coli* isoladas foram mantidas em ágar simples fosfatado, à temperatura ambiente e ao abrigo de luz (EDWARDS & EWING, 1972).

### 3.3.8 Pesquisa de citotoxina nas amostras de *Campylobacter* sp isoladas

De amostras de *Campylobacter* sp crescidas por 48h, a  $42^{\circ}\text{C}$ , em microaerofilia, em ágar BHI suplementado com 5% de sangue de carneiro foi preparada uma suspensão, com densidade equivalente ao tubo nº10 da escala de McFarland, em PBS (solução salina tamponada) pH 7,2. Esta suspensão foi sonicada em gelo (4 ciclos de 30 segundos) e o sobrenadante do material sonicado foi utilizado para a pesquisa de citotoxina em cultivos de células HeLa (ATCC CCL2) (GUERRANT et al, 1987).

### 3.3.9 Pesquisa de toxina termoestável (ST) e citotoxina (SLT) em amostras de E. coli

A toxina termoestável (ST) foi pesquisada em sobrenadantes de amostras cultivadas no meio de EVANS et al (1973), incubadas sob agitação de 150 rpm, por 18-20h a 37°C, pelo teste do camundongo recém-nascido, segundo as recomendações de CASTRO et al (1978).

A pesquisa de citotoxina (SLT) em amostras de E. coli foi realizada em sobrenadantes do cultivo destas amostras em caldo TSB (Tryptic Soy Broth) (Difco) após incubação de 20-24h em agitação (150 rpm) a 37°C, utilizando-se células HeLa (ATCC CCL2), conforme as recomendações de GENTRY & DALRYMPLE (1980).

### 3.3.10 Testes de suscetibilidade aos antimicrobianos

Para os testes de sensibilidade aos antimicrobianos foi utilizada a técnica de difusão em ágar (BAUER et al, 1966) segundo as recomendações de BARRY & THORNSBERRY (1985), utilizando-se discos da marca CECON. Para testar as amostras de *Campylobacter* sp foi empregado o ágar de Mueller-Hinton (Difco) suplementado com 5% de sangue de carneiro e um tempo de incubação de 48h (AL-MASHAT & TAYLOR, 1983).

### 3.4 Procedimentos parasitológicos

#### 3.4.1 Manutenção das amostras de fezes

As amostras de fezes transportadas em gelo foram conservadas a 4°C até a realização da pesquisa de *Cryptosporidium* sp.

#### 3.4.2 Pesquisa de *Cryptosporidium* sp

Do sobrenadante de uma suspensão de fezes preparada como para a técnica de flutuação, foi feito um esfregão em uma lâmina previamente tratada com ovoalbumina, que, a seguir, foi corado pela técnica de Ziehl-Nielsen modificada (HENRIKSEN & POHLENZ, 1981). A pesquisa de *Cryptosporidium* sp foi realizada no Laboratório de Parasitoses do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG.

### 3.5 Controle de qualidade

Foram utilizadas as amostras de *E. coli* B41 e *E. coli* H30 como controles positivos para a produção de ST e citotoxina de *E. coli*, respectivamente, e *E. coli* K12 como controle negativo para ambas as toxinas.

As amostras *C. jejuni* FM4799 e *C. jejuni* FM4815 foram empregadas como controles negativo e positivo, respectivamente, para a produção de citotoxina de *Campylobacter* sp.

As amostras de *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 e *P. aeruginosa* ATCC 27853 foram utilizadas no controle de qualidade dos antibiogramas.

Além das amostras acima citadas foram empregadas *S. typhimurium* ATCC 13311, *P. mirabilis* FM 2968 e *C. fetus* EV06 como controles das provas bioquímicas.

### 3.6 Análises estatísticas

As análises estatísticas, quando adequadas, foram realizadas pelos testes do chi-quadrado, de Fisher, de Mc Nemar e de Q de Cochran (SIEGEL, 1975; SNEDECOR & COCHRAN, 1981) e os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Características da população estudada

Trinta e oito (52,78%) bezerros apresentavam diarreia. A distribuição dos animais por faixas etárias encontra-se no gráfico 1. As médias de idade para os grupos de 4 a 15 dias, 16 a 30 dias e 31 a 60 dias foram, respectivamente,  $12,91 \pm 4,06$  dias,  $25,68 \pm 4,40$  dias e  $50,17 \pm 8,34$  dias.

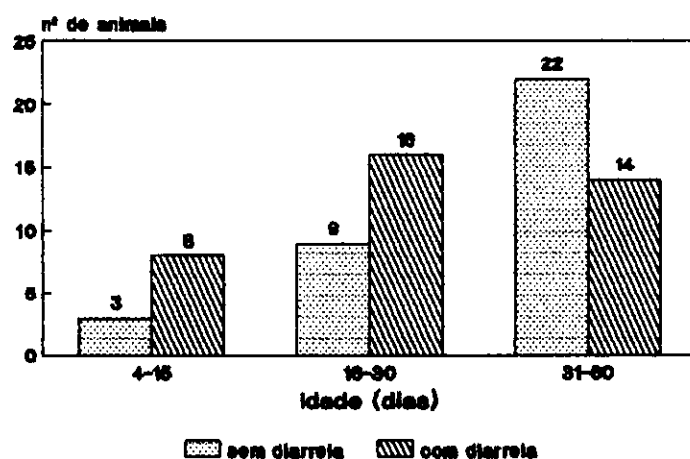


Gráfico 1: Distribuição da população estudada em faixas etárias

#### 4.2 Isolamento de Campylobacter sp e produção de citotoxinas

Campylobacter sp foi isolado de 39 (54,17%) bezerros em 17 (85%) das 20 propriedades estudadas, sendo 20 (27,78%) de animais diarreicos e 19 (26,39%) de animais sem diarreia. Destas amostras, 36 foram isoladas no CSM, 12 no SKM, 16 no CSM após enriquecimento em CSME e 7 no SKM após enriquecimento em SKME. Três amostras (1 de *C. jejuni* e 2 de *C. lari*) somente foram isoladas após enriquecimento em CSME. Utilizando-se o CSM + CSME foram isoladas 39 amostras e, o SKM + SKME, 18 amostras (Tabela 1). Foi considerado como 100% de isolamento o número total de amostras isoladas.

TABELA 1

Frequência de isolamento de *Campylobacter* sp nos diversos meios de cultura e procedimentos utilizados.

| meios      | animais<br>com diarreia (%) | animais<br>sem diarreia (%) | TOTAL (%)                |
|------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| CSM        | 20 (51,28%)                 | 16 (41,03%)                 | 36 (92,31%) <sup>A</sup> |
| SKM        | 9 (23,08%)                  | 3 ( 7,69%)                  | 12 (30,77%) <sup>B</sup> |
| CSME       | 8 (20,51%)                  | 8 (20,51%)                  | 16 (41,03%) <sup>B</sup> |
| SKME       | 2 ( 5,13%)                  | 5 (12,82%)                  | 7 (17,95%) <sup>B</sup>  |
| CSM + CSME | 20 (51,28%)                 | 19 (48,72%)                 | 39 (100,0%) <sup>X</sup> |
| SKM + SKME | 10 (25,64%)                 | 8 (20,51%)                  | 18 (46,15%)              |

<sup>A</sup>  $p < 0,001$   $\chi^2 = 22,84$   $gl = 1$

<sup>X</sup>  $p < 0,001$   $\chi^2 = 19,05$   $gl = 1$

<sup>B</sup> não significativo

Dentre as amostras de *Campylobacter* sp isoladas, 22 (56,41%) foram classificadas como *C. lari*, 8 (20,51%) *C. jejuni*, 6 (15,38%) *C. coli*, e 3 (7,69%) *C. hyointestinalis*. Doze amostras de *C. lari* produziram citotoxinas, assim como 5 amostras de *C. jejuni*, 2 de *C. coli* e 1 de *C. hyointestinalis*. Não houve diferença significativa entre o isolamento de *Campylobacter* sp de bezerros com e sem diarreia. Apesar de não haver diferença significativa entre a frequência de produção de citotoxinas por amostras de *Campylobacter* sp isoladas de animais com e sem diarreia, a frequência de amostras de *C. jejuni* produtoras de citotoxinas isoladas de bezerros com diarreia apresentou uma diferença próxima à significância ( $p=0,07$ ) quando comparada às isoladas de bezerros sem diarreia. A distribuição das espécies por faixas etárias, presença ou ausência de diarreia e produção de citotoxinas se encontram na <sup>188.</sup> tabela 2.

TABELA 2

Distribuição das espécies de *Campylobacter* sp por faixas etárias e produção de citotoxinas

| espécies                  | 4-15 dias |         | 16-30 dias |         | 31-60 dias |         | TOTAL   |         |
|---------------------------|-----------|---------|------------|---------|------------|---------|---------|---------|
|                           | D(cit+)   | S(cit+) | D(cit+)    | S(cit+) | D(cit+)    | S(cit+) | D(cit+) | S(cit+) |
| <i>C. lari</i>            | 2(1)      | 0       | 5(3)       | 5(4)    | 4(1)       | 5(3)    | 12(5)   | 10(7)   |
| <i>C. jejuni</i>          | 0         | 0       | 3(3)       | 2(0)    | 1(1)       | 2(1)    | 4(4)    | 4(1)    |
| <i>C. coli</i>            | 3(1)      | 2(1)    | 0          | 1(1)    | 0          | 0       | 3(1)    | 3(1)    |
| <i>C. hyointestinalis</i> | 0         | 2(0)    | 1(1)       | 0       | 0          | 0       | 1(1)    | 2(0)    |
| TOTAL                     | 5(2)      | 4(1)    | 10(7)      | 8(5)    | 5(2)       | 7(4)    | 20(11)  | 19(9)   |

cit+ - amostras produtoras de citotoxinas

D- animais com diarreia

S- animais sem diarreia

### 4.3 Identificação de outros enteropatógenos

Nos animais estudados não foram encontradas amostras de *E. coli* produtoras de ST. Amostras de *E. coli* SLT<sup>+</sup> foram isoladas de 12 animais. *Salmonella* sp foi isolada de 17 bezerros. A presença de *Cryptosporidium* sp foi diagnosticada em 16 animais. A frequência de isolamento de *Campylobacter* sp como único enteropatógeno presente em bezerros com diarreia também não se mostrou significativa. A distribuição destes enteropatógenos por faixas etárias e a presença concomitante de *Campylobacter* sp são apresentados na <sup>TAB.</sup> ~~tabela~~ 3.

TABELA 3

Distribuição dos enteropatógenos isolados por faixas etárias e  
presença concomitante de *Campylobacter* sp

| enteropatógenos                 | 4-15 dias |         | 16-30 dias |         | 31-60 dias |         | TOTAL   |         |
|---------------------------------|-----------|---------|------------|---------|------------|---------|---------|---------|
|                                 | D(camp)   | S(camp) | D(camp)    | S(camp) | D(camp)    | S(camp) | D(camp) | S(camp) |
| <i>E. coli</i> SLT <sup>+</sup> | 3(0)      | 0       | 2(2)       | 1(0)    | 3(0)       | 3(2)    | 8(2)    | 4(2)    |
| <i>Salmonella</i> sp            | 0         | 0       | 3(3)       | 2(2)    | 5(4)       | 7(2)    | 8(7)    | 9(4)    |
| <i>Cryptosporidium</i> sp       | 0         | 0       | 6(4)       | 3(3)    | 1(1)       | 6(5)    | 7(5)    | 9(8)    |
| TOTAL                           | -         | -       | -          | -       | -          | -       | -(11)   | -(11)   |

camp - presença concomitante de *Campylobacter* sp

SLT - Shiga-like toxin

D - animais com diarreia

S - animais sem diarreia

#### 4.4 Suscetibilidade das amostras de Campylobacter sp aos antimicrobianos

Todas as amostras testadas foram suscetíveis à amicacina, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina, neomicina e nitrofurantoína.

A resistência à penicilina foi encontrada em 89,74% das amostras.

A resistência à ampicilina, à associação sulfametoxazol + trimetoprim e à tetraciclina foi de 10,26%, 58,97% e 25,64%, respectivamente.

Dito amostras (20,51%) apresentaram resistência intermediária à canamicina.

Três amostras de *C. lari*, uma de *C. jejuni* e uma de *C. hyointestinalis* foram resistentes simultaneamente à tetraciclina e à associação sulfametoxazol + trimetoprim.

Foram encontradas uma amostra de *C. coli* e três de *C. jejuni* resistentes à tetraciclina, à associação sulfametoxazol + trimetoprim e com resistência intermediária à canamicina.

Uma amostra de *C. jejuni* mostrou-se resistente à tetraciclina e intermediariamente resistente à canamicina.

A resistência à associação sulfametoxazol + trimetoprim e a resistência intermediária à canamicina foi observada em uma amostra de *C. lari*.

O padrão de suscetibilidade das amostras estudadas, classificadas por espécies, está na <sup>TRO.</sup>tabela 4.

TABELA 4

Suscetibilidade aos antimicrobianos das amostras de *Campylobacter* sp isoladas de bezerros com e sem diarreia

| Antimicrobianos | <i>C. lari</i><br>nº (%) | <i>C. jejuni</i><br>nº (%) | <i>E. coli</i><br>nº (%) | <i>C. hyointestinalis</i><br>nº (%) | TOTAL<br>nº (%) |
|-----------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|-------------------------------------|-----------------|
| Amicacina       | 22 (100,0%)              | 8 (100,0%)                 | 6 (100,0%)               | 3 (100,0%)                          | 39 (100,0%)     |
| Ampicilina      | 22 (100,0%)              | 5 (62,50%)                 | 5 (83,33%)               | 3 (100,0%)                          | 35 (89,74%)     |
| Canamicina      | 21 (95,45%)              | 4 (50,00%)                 | 3 (50,00%)               | 3 (100,0%)                          | 31 (79,49%)     |
| Cloranfenicol   | 22 (100,0%)              | 8 (100,0%)                 | 6 (100,0%)               | 3 (100,0%)                          | 39 (100,0%)     |
| Eritromicina    | 22 (100,0%)              | 8 (100,0%)                 | 6 (100,0%)               | 3 (100,0%)                          | 39 (100,0%)     |
| Gentamicina     | 22 (100,0%)              | 8 (100,0%)                 | 6 (100,0%)               | 3 (100,0%)                          | 39 (100,0%)     |
| Neomicina       | 22 (100,0%)              | 8 (100,0%)                 | 6 (100,0%)               | 3 (100,0%)                          | 39 (100,0%)     |
| Nitrofurantoina | 22 (100,0%)              | 8 (100,0%)                 | 6 (100,0%)               | 3 (100,0%)                          | 39 (100,0%)     |
| Penicilina      | 1 ( 4,55%)               | 1 (12,50%)                 | 0 ( 0,00%)               | 2 (66,67%)                          | 4 (10,26%)      |
| Sulfazotrim     | 9 (40,91%)               | 3 (37,50%)                 | 4 (66,67%)               | 0 ( 0,00%)                          | 16 (41,03%)     |
| Tetraciclina    | 18 (81,82%)              | 5 (62,50%)                 | 4 (66,67%)               | 3 (66,67%)                          | 29 (74,36%)     |

Sulfazotrim = sulfametoxazol + trimetoprim

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Avaliação da metodologia para o isolamento de espécies termotolerantes de Campylobacter de bezerros com e sem diarreia

A maior taxa de isolamento de *Campylobacter* sp em CSM que em SKM observada neste estudo também sido relatada por outros autores (KARMALI et al, 1986; ENDTZ et al, 1991). O isolamento de *Campylobacter* termotolerante é, em geral, maior nos meios mais inibidores da flora fecal, principalmente aqueles contendo cefoperazona como o CSM. Isto se deve ao fato de que a maioria das amostras de *Campylobacter* termotolerantes é resistente à cefoperazona, que é um excelente inibidor de bactérias Gram-negativas, que compõem, em grande parte, a microbiota intestinal (KARMALI et al, 1986). É interessante notar que ao trabalhar com o isolamento de *Campylobacter* sp de fezes de seres humanos em meio contendo cefoperazona, grande parte dos autores (KARMALI et al, 1986; MERINO et al, 1986; ENDTZ et al, 1991) isolou *Campylobacter* sp em cultura pura em frequências maiores que 50%. Neste estudo, *Campylobacter* sp só foi isolado em cultura pura em CSM das fezes de um animal com diarreia, apesar de, na maioria das vezes, os contaminantes só crescerem no primeiro quadrante das placas. Uma maior resistência da flora fecal aos antimicrobianos utilizados nos meios de cultura pode ter resultado na presença de contaminantes na quase totalidade das placas, assim como a baixa efi-

ciência do SKM (30,77%) onde o crescimento de contaminantes era maciço, o que tornava muito difícil a identificação de colônias semelhantes a *Campylobacter* sp. Outro fator que pode ter influenciado no maior número de contaminantes nas placas de CSM que o habitualmente descrito na literatura foi a utilização, neste experimento, de sangue em substituição ao carvão ativado da formulação original.

A utilização do enriquecimento, isoladamente, foi inferior ao plaqueamento direto em CSM ( $p < 0,001\%$ ) como já verificado por alguns autores (HUTCHINSON & BOLTON, 1983; AGULLA et al, 1987), mas, três (7,69%) amostras de *Campylobacter* sp de bezerros sem diarreia somente foram isoladas após enriquecimento em CSME. O procedimento CSM + CSME permitiu o isolamento de 39 (100,0%) amostras de *Campylobacter* termotolerantes, sendo superior ao SKM + SKME ( $p < 0,001\%$ ). Este ganho de 7,69.% no isolamento de espécies termotolerantes de *Campylobacter* de fezes de bezerros sem diarreia provavelmente deve-se ao pequeno número ( $10^2-10^4$ ) de bactérias deste gênero presentes em fezes de bezerros sem diarreia (MODULO et al, 1987).

## 5.2 Participação de Campylobacter termotolerante na diarreia de bezerros até 60 dias de idade

O isolamento de *Campylobacter* sp em 17 (85%) das propriedades estudadas, em taxas próximas a 50% , é um achado comum em vários outros países, podendo haver pequenas variações resultantes de metodologias de isolamento, idade dos animais e dife-

renças regionais (FIREHAMMER & MYERS, 1981; WEBER et al, 1984; RYCKE et al, 1986; MODULO et al, 1987). A não existência de diferenças significativas entre o isolamento de *Campylobacter* termotolerante de bezerros com e sem diarreia observadas neste trabalho, também têm sido relatada por outros autores (FIREHAMMER & MYERS, 1981; WEBER et al, 1984; RYCKE et al, 1986; MODULO et al, 1987).

A taxa de infecção de bezerros com e sem diarreia por diferentes espécies de *Campylobacter* sp também não se mostrou significativa, neste estudo, à semelhança do relatado por autores que os separaram em espécies (AL-MASHAT & TAYLOR, 1980a; SNODGRASS et al, 1986).

A ausência de significância entre a frequência de isolamento de *Campylobacter* termotolerantes de bezerros com e sem diarreia deve-se, provavelmente, às precárias condições de higiene dos locais onde estes animais são criados, o que predispõe à uma elevada taxa de infecção podendo os animais manifestarem ou não sinais clínicos. Situação semelhante foi relatada por GLASS et al (1983) e BLASER et al (1985) em crianças de Bangladesh, onde a infecção por *Campylobacter* sp e a presença de portadores assintomáticos é frequente e os sintomas de diarreia são brandos. Em nosso meio, MENDES et al (1987) também observaram frequências de isolamento de *C. jejuni* semelhantes entre crianças com e sem diarreia. RUSSEL et al (1989) verificaram em macacos Rhesus (*Macaca memestrina*) que a reinfecção por outras espécies ou sorotipos de *Campylobacter* sp é frequente em animais criados em condições higiênicas inadequadas. Em bezerros, a presença de entero-

patógenos como *E. coli* enterotoxigênica, *Salmonella* sp e rotavírus (UEDA et al, 1982; MYERS et al, 1984; WRAY, 1991) já foram observadas em animais sem diarreia criados em más condições de higiene. No presente estudo a infecção por *Salmonella* sp em animais sem diarreia também foi frequente (26,47 %).

### 5.3 Produção de citotoxina por amostras de *Campylobacter* sp isoladas de bezerros com e sem diarreia

A produção de citotoxina em amostras de *Campylobacter* sp isoladas de bezerros já havia sido relatada (Mc CARDELL et al, 1984).

Neste estudo, a diferença entre a frequência de amostras citotoxigênicas de *Campylobacter* sp isoladas de bezerros com e sem diarreia não foi significativa. BELBOURI & MÉGRAUD (1988) também não encontraram diferenças na produção de enterotoxinas entre amostras de *Campylobacter* sp isoladas de pacientes com e sem diarreia.

Entretanto, mesmo não tendo sido significativa, a frequência de amostras citotoxigênicas de *C. jejuni* isoladas de animais com diarreia apresentou uma diferença muito próxima à significância ( $p=0,07$ ) quando comparada à frequência de *C. jejuni* citotoxigênica em bezerros sem diarreia, provavelmente devido ao pequeno número de amostras estudadas. Maiores estudos são neces-

sários para a compreensão do papel de amostras citoxigênicas de *C. jejuni* na diarreia dos bezerros.

#### 5.4 Suscetibilidade das amostras termotolerantes de Campylobacter sp aos antimicrobianos

A presença de amostras resistentes à tetraciclina, ampicilina e à associação sulfametoxazol + trimetoprim observada neste estudo foi semelhante à encontrada por MENDES et al (1987) e DIAS et al (1990) em Belo Horizonte, Minas Gerais, em crianças e em carcaças de frangos, respectivamente. AL-MASHAT & TAYLOR (1983) e MODULO et al (1989) também observaram estes padrões de resistência em amostras isoladas de bezerros.

As amostras isoladas neste estudo foram sensíveis à gentamicina, neomicina, amicacina, eritromicina, cloranfenicol e nitrofurantoína, padrões frequentemente observados em amostras de *Campylobacter* termotolerantes (BUTZLER & SKIRROW, 1979; WHO..., 1980; AL-MASHAT & TAYLOR, 1983; MENDES et al, 1987; DIAS et al, 1990), apesar de MODULO et al (1989) terem encontrado amostras resistentes a estes antimicrobianos entre suas amostras isoladas de bezerros.

A maior parte dos autores cita como resistentes à penicilina G as amostras termotolerantes de *Campylobacter* (AL-MASHAT & TAYLOR, 1983; ANDREASEN, 1987; MODULO et al, 1989), mas BUTZLER & SKIRROW (1979) afirmam que algumas amostras, como as

encontradas neste estudo, podem ser suscetíveis à penicilina G.

Das amostras estudadas, 20,51% apresentaram valores intermediários de resistência à canamicina. MENDES et al (1987) e DIAS et al (1990) não encontraram entre suas amostras de *C. jejuni* alguma resistente à canamicina, mas MODOLO et al (1989) reportam resistência à canamicina entre 3 e 25% das amostras isoladas de bezerros por eles estudadas.

## 6 CONCLUSÕES

A - O meio de cultura CSM foi o que proporcionou o maior número de isolamentos de amostras de espécies termotolerantes de *Campylobacter*, sendo significativamente ( $p < 0,001$ ) superior aos outros meios. Três amostras (7,69%) de bezerros sem diarreia só foram isoladas após enriquecimento em CSME. O procedimento CSM + CSME possibilitou o isolamento de um total de 39 (100,0%) amostras de *Campylobacter* sp e foi significativamente ( $p < 0,001$ ) superior ao SKM + SKME.

B - Não houve diferença significativa entre a frequência de amostras de *Campylobacter* sp isoladas de bezerros com e sem diarreia, mesmo quando as diferentes espécies foram consideradas, ou quando *Campylobacter* sp era o único enteropatógeno encontrado.

C - Não houve diferença significativa entre a produção de citotoxinas pelas amostras de *Campylobacter* sp isoladas de bezerros com e sem diarreia, mas, apesar do pequeno número de amostras estudadas, a frequência de *C. jejuni* citotoxigênico em animais com diarreia se aproximou da significância ( $p = 0,07$ ) quando comparada com as amostras de *C. jejuni* isoladas de animais sem diarreia.

D - Entre as amostras de *Campylobacter* sp estudadas foi encontrada resistência à ampicilina (10,26%), à associação sulfametoxazol + trimetoprim (58,97%) e a tetraciclina (25,64%). Dito amostras (20,51%) apresentaram resistência intermediária à canamicina.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGULLA, A., MERIND, F. J., VILLASANTE, P. A., et al. Evaluation of four enrichment media for isolation of *Campylobacter jejuni*. J. Clin. Microbiol., v.25, p.174-5, 1987.
- ANDREASEN, J. J. In vitro susceptibility of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated in Denmark to fourteen antimicrobial agents. Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand., v.95B, p.189-92, 1987.
- AL-MASHAT, R.R. , TAYLOR, D.J. *Campylobacter* spp in enteric lesions in cattle. Vet. Record, v.107, p.31-4, 1980a.
- AL-MASHAT, R.R. , TAYLOR, D.J. Production of diarrhoea and dysentery in experimental calves by feeding pure cultures of *Campylobacter fetus* subspecies *jejuni*. Vet. Record, v.107, p.459-464, 1980b.
- AL-MASHAT, R.R. , TAYLOR, D.J. Production of enteritis in calves by the oral inoculation of pure cultures of *Campylobacter fecalis*. Vet. Record, v.109, p.97-101, 1981.
- AL-MASHAT, R.R. , TAYLOR, D.J. In vitro sensitivity of 28 bovine isolates of *Campylobacter* to some commonly used antimicrobials. Vet. Record, v.113, p.89, 1983.
- BARRY, A.L. , THORNSBERRY, C. Susceptibility tests: diffusion test procedures. In: LENNETE, E.H., BALLOWS, A., HAUSLER Jr., W.J. et al. Manual of Clinical Microbiology. 4. ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, p. 978-987. 1985.
- BAUER, A.W., KIRBY, M.M., SHERRIS, N.C. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol., v.36, p.493-496, 1966.
- BELBOURI, A. , MEGRAUD, F. Enterotoxin-like activity produced by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from patients and healthy controls in Algeria. FEMS Microbiol. Lett., v.51, p.25-8, 1985.
- BENJAMIN, J., LEAPER, S., OWEN, R. J. et al. Description of *Campylobacter laridis* a new species comprising the nalidixic acid resistant thermophilic *Campylobacter* (NARTC) group. Curr. Microbiol., v.8, p.231-8, 1983.
- BLASER, M.J., BLACK, R.E., DUNCAN, D.J. et al. *Campylobacter jejuni*-specific serum antibodies are elevated in healthy Bangladeshi children. J. Clin. Microbiol., v.21, p.164-7, 1985.
- BOLTON, F.J., ROBERTSON, L. A selective medium for isolating *Campylobacter jejuni/ coli*. J. Clin. Pathol., v.35, p.462-7, 1982.

- BUCKHOLM, G. , KAPPERUD, G. Expression of *Campylobacter jejuni* invasiveness in cell cultures coinfectd with other bacteria. *Infect. Immun.*, v.55, p.2816-21, 1987.
- BUTZLER, J. P., DEKEYSER, P., DETRAIN, M. et al. Related vibrios in stools. *J. Pediatr.*, v.82, p.393-5, 1973.
- BUTZLER, J. P. , SKIRROW, M. B. *Campylobacter enteritis*. *Clin. Gastroenterol.*, v.8, p.737-65, 1979.
- CASTRO, A.F.P., SERAFIM, M.B., RANGEL, H.A. et al. Swiss and inbred mice in the infant mouse test for the assay of *Escherichia coli* thermostable enterotoxin. *Infect. Immun.*, v.22, p.972-974, 1978.
- CHAN, F. T. H. , MACKENZIE, A. M. R. Enrichment medium control system for isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* from stools. *J. Clin. Microbiol.*, v.15, p.12-15, 1982.
- CORREA, A.T., CURTIS, C.R., ERB, H.N. et al. Effect of calfhoo morbidity on age at first calving in New York holstein herds. *Prev. Vet. Med.*, v.6, p.253-262, 1988.
- CURTIS, C.R., WHITE, M.E., ERB, H.N. Effects of calfhoo morbidity on long-term survival in New York Holstein herds. *Prev. Vet. Med.*, v.7, p.173-186, 1989.
- DEKEYSER, P., GOSSUIN-DETRAIN, M, BUTZLER, J. P. et al. Acute enteritis due to related *Vibrio*: first positive stool cultures. *J. Infect. Dis.*, v.125, p.390-2, 1972
- DIAS, T. C., QUEIROZ, D. M. M., MENDES, E. N. et al. Chicken carcasses as a source of *Campylobacter jejuni* in Belo Horizonte, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.32, p.414-8, 1990.
- DIKER, K.S., DIKER, S., ÖZLEM, M.B. Bovine diarrhea associated with *Campylobacter hyointestinalis*. *J. Vet. Med.*, v.37B, p.158-60, 1990.
- DOYLE, L. P. A *Vibrio* associated with swine dysentery. *Am. J. Vet. Res.*, v.14, p.3-5, 1944.
- EDWARDS, P.R. , EWING, W.H. Identification of Enterobacteriaceae. 4. ed. Minneapolis: Burgess Publishing Co., 1972. 362p.
- ENTERIC infections due to *Campylobacter*, *Yersinia*, *Salmonella*, and *Shigella*. *WHO Bull.*, v.58, p.519-537, 1980.
- ENDZT, H.P., RUIJS, G.J.H., ZWINDERMAN, A.H. et al. Comparison of six media, including a semisolid agar, for the isolation of various *Campylobacter* species from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.*, v.29, p.1007-10, 1991.

- EVANS Jr., D.J., EVANS, D.G., GORBACH, S.L. Production of vascular permeability factor by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from man. *Infect. Immun.*, v.8, p.725-730, 1973.
- FAUCHÈRE, J. L., ROSENAU, A., VERDN, M. et al. Association with Hela cells of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from human feces. *Infect. Immun.*, v.54, p.283-7, 1986.
- FIREHAMMER, B. D. The isolation of vibrios from ovine feces. *Cornell Vet.*, v.55, p.482-94, 1965.
- FIREHAMMER, B.D. , MYERS, L.L. *Campylobacter fetus* subsp *jejuni*: its possible significance in enteric disease of calves and lambs. *Am. J. Vet. Res.*, v.42, p.918-22, 1981.
- FRICKER, C.R. , PARK, R.W.A. A two-year study of the distribution of 'thermophilic' campylobacters in human, environmental and food samples from the Reading area with particular reference to toxin production and heat-stable serotype. *J. Appl. Bacteriol.*, v.66, p.477-90, 1989.
- GEBHARDT, C. J., WARD, G. E., CHANG, K. et al. *Campylobacter hyointestinalis* (new species) isolated from swine with lesions of proliferative ileitis. *Am. J. Vet. Res.*, v.44, p.361-7, 1983.
- GEBHARDT, C. J., EDMONDS, P., WARD, G. E. et al. "*Campylobacter hyointestinalis*" sp. nov.: a new species of *Campylobacter* found in the intestines of pigs and other animals. *J. Clin. Microbiol.*, v.21, p.715-20, 1985.
- GENTRY, M.K. , DALRYMPLE, J.M. Quantitative microtiter cytotoxicity assay for *Shigella* toxin. *J. Clin. Microbiol.*, v.12, p.361-366, 1980.
- GEORGE, H. A., HOFFMAN, P. S., SMIBERT, R. M., et al. Improved media for growth and aerotolerance of *Campylobacter fetus*. *J. Clin. Microbiol.*, v.8, p36-41, 1978.
- GLASS, R.I., STOLL, B., HUQ, M., et al. Epidemiological and clinical features of endemic *Campylobacter jejuni* infection in Bangladeshi. *J. Infect. Dis.*, v.148, p.292-296, 1983.
- GUERRANT, R. R., WANKE, C. A., PENNIE, R. A., et al. Production of a unique cytotoxin by *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.*, v.55, p.2526-2530, 1987.
- GOOSENS, H., BUTZLER, J.-P. Isolation of *Campylobacter upsaliensis* from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.*, v.27, p.2143-4, 1989.
- GRAEVENITZ, A. Revised nomenclature of *Campylobacter laridis*, *Enterobacter intermedium*, and "*Flavobacterium branchiophila*". *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.40, p.221, 1990.

- HENRIKSEN, S.A., POHLENZ, J.F.L. Staining of *Cryptosporidium* by a modified Ziehl-Nielsen technique. *Acta Vet. Scand.*, v.22, p.594-6, 1981.
- HERBST, W., LANGE, H., KRAUSS, H. Die Rota- und Coronavirusinfektionen des Kalbes aus diagnostischer Sicht. *Tierärztl. Umsch.*, v.42, p.296-300, 1987.
- HOLLAND, R.E. Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.4, p.345-75, 1990.
- HOLMGREN, J. Actions of cholera toxin and prevention and treatment of cholera. *Nature*, v.292, p.413-7, 1981.
- HOUSE, J.A. Economic impact of rotavirus and other neonatal disease agents of animals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.173, p.573-6, 1978.
- HUTCHINSON, D.N., BOLTON, F.J. Is enrichment culture necessary for the isolation of *Campylobacter jejuni* from faeces? *J. Clin. Pathol.*, v.36, p.1350-2, 1983.
- JONES, F. S., ORCUTT, M., LITTLE, R. B. *Vibriosis* (*Vibrio jejuni* n. sp.) associated with intestinal disorders of cows and calves. *J. Exp. Med.*, v.53, p.853-64, 1931.
- JONES, F. S., LITTLE, R. B. The etiology of infectious diarrhea (winter scours) in cattle. *J. Exp. Med.*, v.53, p.835-44, 1931.
- KARMALI, M. A., ALLEN, A. K., FLEMING, P. C. Differentiation of catalase-positive campylobacters with special reference to morphology. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.31, p.64-71, 1981.
- KARMALI, M.A., SIMOR, A.E., ROSCOE, M., et al. Evaluation of a blood-free, charcoal-based, selective medium for the isolation of *Campylobacter* organisms from feces. *J. Clin. Microbiol.*, v. 23, p.456-9, 1986.
- KING, E. D. Human infection with *Vibrio fetus* and a closely related vibrio. *J. Infect. Dis.*, v.101, p.119-28, 1957.
- KLIPSTEIN, F.A., ENGERT, R. F., SHORT, H., et al. Pathogenic properties of *Campylobacter jejuni*: assay and correlation with clinical manifestations. *Infect. Immun.*, v.50, p.43-9, 1985.
- LEITE, R.C., LIMA, J.D. Fatores sanitários que influenciam na criação de bezerros. *Arq. Esc. Vet. UFMG*, v.34, p.485-492, 1982.
- LIND, L., SJÖGREN, E., WELINDER-OLSSON, C., et al. Plasmids and serogroups in *Campylobacter jejuni*. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.*, v.97, p.1097-1102, 1989.

- LINDBLOM, G. B., CERVANTES, L. E., SJÖGREN, E., et al. Adherence, enterotoxigenicity, invasiveness and serogroups in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains from adult humans with acute enterocolitis. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.*, v.98, p.179-89, 1990a.
- LINDBLOM, G. B., JOHNY, M., KHALIL, K., et al. Enterotoxigenic and frequency of *Campylobacter jejuni*, *C. coli* and *C. lariidis* in human and animal stool isolates from different countries. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.66, p.163-8, 1990b.
- LINDBLOM, G. B., KAIJSER, B., SJÖGREN, E. Enterotoxin production and serogroups of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from patients with diarrhea and from healthy laying hens. *J. Clin. Microbiol.*, v.27, p.1272-6, 1989.
- Mac FADDIN, J. F. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Buenos Aires, Editorial Medica Panamericana, 1980. 301p.
- MARTIN, W.T., PATTON, C.M., MORRIS, G.K., et al. Selective enrichment broth medium for isolation of *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.*, v.17, p.85-5, 1983.
- Mc CARDELL, B. A., MADDEN, J. M., LEE, E. C. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* production of a cytotoxic toxin immunologically similar to cholera toxin. *J. Food Prot.*, v.47, p.943-9, 1984.
- McFADYEAN, J., STOCKMAN, S. Report of the departmental committee appointed by the Board of Agriculture and Fisheries to inquire into epizootic abortion. Appendix D., Her Majesty's Stationery Office, London, 1909. p156.
- McFADYEAN, J., STOCKMAN, S. Report of the departmental committee appointed by the Board of of Agriculture and Fisheries to inquire into epizootic abortion. Appendix to part III. Her Majesty's Stationery Office, London, 1913.
- MELO, M.A. , PECHERE, J.-C. Effect of mucin on *Campylobacter jejuni* association and invasion on HEP-2 cells. *Microbial Path.*, v.5, p. 71-76, 1988.
- MENDES, E. N., QUEIROZ, D. M. M., CISALPINO, E. O., et al. Ocorrência de *Campylobacter jejuni* em crianças com e sem diarreia, em Belo Horizonte. *Rev. Microbiol.*, v.18, p.25-30, 1987.
- MERINO, F.J., AGULLA, A., VILLASANTE, P.A., et al. Comparative efficacy of seven selective media for isolating *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.*, v.24, p.451-2, 1986.
- MILLS, C. K. , GHERNA, R. L. Cryopreservation studies of *Campylobacter*. *Cryobiology*, v.25, p.148-52, 1988.

- MILON, A., ABDITCHO, S., BOURY, M. Caractères de pathogénicité chez des souches de *Campylobacter jejuni* d'origine animale. *Rev. Med. Vet.*, v.141, p.275-80, 1990.
- MODULO, J.R., BISPING, W., KIRPAL, K. Isolamento de *Campylobacter* sp de bezerros com e sem diarreia. *Pesq. Vet. Bras.*, v.7, p.23-25, 1987.
- MODULO, J.R., BISPING, W., KIRPAL, G. Susceptibilidade "in vitro" de *Campylobacter* isolada de bezerros contra 22 antimicrobianos. *Rev. Microbiol.*, v.20, p.391-5, 1989.
- MOORE, M. A.; BLASER, M. J.; PEREZ-PEREZ, G. I., et al Production of a Shiga-like cytotoxin by *Campylobacter*. *Microb. Pathog.*, v.4, p.455-62, 1988.
- MYERS, L.L., FIREHAMMER, B.D., BORDER, M.M., et al. Prevalence of enteric pathogens in the feces of healthy beef calves. *Am. J. Vet. Res.*, v.45, p.1544-8, 1984.
- NAIR, G.B., CHOWDHURY, S., DAS, P., et al. Improved preservation medium for *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.*, v.19, p.298-9, 1984.
- NG, L.K., STILES, M.E., TAYLOR, D.E. Inhibition of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* by antibiotics used in selective media. *J. Clin. Microbiol.*, v.22, p.510-4, 1985.
- ON, S.L.W., HOLMES, B. Effect of inoculum size on the phenotypic characterization of *Campylobacter* species. *J. Clin. Microbiol.*, v.29, p.923-6, 1991a.
- ON, S.L.W., HOLMES, B. Reproducibility of tolerance tests that are useful in the identification of *Campylobacter* species. *J. Clin. Microbiol.*, v.29, p.1785-8, 1991b.
- PANG, T., WONG, P. Y., PUTHUCHEARY, S. D., et al. In-vitro and in-vivo studies of a cytotoxin from *Campylobacter jejuni*. *J. Med. Microbiol.*, v.23, p.193-8, 1987.
- PENNER, J.L. The genus *Campylobacter*: a decade of progress. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.1, p.157-72, 1988.
- PRADO, E. Características da produção pecuária leiteira em Divinópolis, Minas Gerais. Belo Horizonte: Escola de Veterinária, UFMG. 1991. 110p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária).
- RIBEIRO, M.F.B., PATARROYO SALCEDO, J.H., SANTOS, J.L., et al. Inquérito de opinião com criadores da Zona da Mata do Estado de Minas Gerais: I. alguns fatores associados com mortalidade de bezerros. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.35, p.547-556, 1983.

- ROGOL, M., SCHNAIDMAN, B., KATZENELSON, E., et al. Improved medium for storage and transportation of thermophilic campylobacters. *Eur. J. Clin. Microbiol.*, v.9, p.760-2, 1990.
- ROOP II, R. M., SMIBERT, R. M., JOHNSON, J. L., et al. DNA homology studies of the catalase-negative campylobacters and "Campylobacter fecalis" an emended description of *Campylobacter sputorum* and proposal of the neotype strain of *Campylobacter sputorum*. *Can. J. Microbiol.*, v.31, p.823-31, 1985.
- RUIZ-PALACIOS, G. M., TORRES, J., TORRES, N. I., et al. Cholera-like enterotoxin produced by *Campylobacter jejuni*. *Lancet*, v.ii, p.250-2, 1983.
- RUSSELL, R. G., SARMIENTO, J. I., FOX, J. G., et al. Evidence of infection with multiple strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in *Macaca nemestrina* housed under hyperendemic conditions. *Infect. Immun.*, v.58, p.2149-55, 1989.
- RYCKE, J., BERNARD, S., LAPORTE, J. et al. Prevalence of various enteropathogens in the feces of diarrheic and healthy calves. *Ann. Rech. Vet.*, v.117, p.159-168, 1986.
- RÜBSAMEN, S. Über den Nachweis von *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* aus mehreren Tierspezies mit und ohne Enteriditen bei Verwendung verschiedener Antibiotika-Supplemente vergleichend. *Tierärztl. Umsch.*, v.41, p.134-40, 1986.
- SAIF, L.J., REDMAN, D.R., BROCK, K.V., et al. Winter dysentery in adult dairy cattle: detection of coronavirus in the faeces. *Vet. Record*, v.123, p.300-1, 1988.
- SANDSTEDT, K., URSING, J., WALDER, M. Thermotolerant *Campylobacter* with no or weak catalase activity isolated from dogs. *Curr. Microbiol.*, v.8, p.2089-13, 1983.
- SEBALD, M., VÉRON, M. Teneur en bases l'ADN et classification des vibrions. *Ann. Inst. Pasteur*, v.105, p.897-910, 1963.
- SIEGEL, S. *Estatística não-paramétrica: para as ciências do comportamento*. São Paulo: Mc Graw-Hill do Brasil, 1975. 350p.
- SJÖGREN, E., LINDBLÖM, G.-B., KAIJSER, B. Comparison of different procedures, transport media, and enrichment media for isolation of *Campylobacter* species from healthy laying hens and humans with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.*, v.25, p.1966-8, 1987.
- SJÖGREN, E., RUIZ-PALACIOS, G., KAIJSER, B. *Campylobacter jejuni* isolations from Mexican and Swedish patients, with repeated symptomatic and/or asymptomatic diarrhoea episodes. *Epidemiol. Inf.*, v.102, p.47-57, 1989.

- SKIRROW, M. B. *Campylobacter* enteritis a new disease. *Br. Med. J.*, v.2, p.9-11, 1977
- SKIRROW, M. B. , BENJAMIN, J. Differentiation of enteropathogenic *Campylobacter*. *J. Clin. Pathol.*, v.33, p.1122, 1980a.
- SKIRROW, M. B. , BENJAMIN, J. "1001" *Campylobacters*: cultural characteristics of intestinal campylobacters from man and animals. *J. Hyg.*, v.85, p.427-42, 1980b.
- SMIBERT, R. M. Genus *Campylobacter*. In KRIEG, N.R. , HOLT, J.G. ed. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins Co., 1984. p.111-8.
- SMITH, T , TAYLOR, M. S. Some morphological and biological characters of the *Spirilla* (*Vibrio fetus*, n. sp.) associated with disease of the fetal membranes in cattle. *J. Exp. Med.*, v.30, p.299-312, 1919.
- SNODGRASS, D.R., TERZOLO, H.R., SHERWOOD, D., et al. Aetiology of diarrhea in young calves. *Vet. Record*, v.119, p. 31-4, 1986.
- SNEDECOR, G.W., COCHRAN, W.G. *Statistical methods*. 7th ed. Ames, Iowa State University, 1981. 507p.
- STANTON, T.B., JENSEN, N.S., CASEY, T.A., et al. Reclassification of *Treponema hyodysenteriae* and *Treponema innocens* in a new genus, *Serpula* gen. nov., as *Serpula hyodysenteriae* comb. nov. and *Serpula innocens* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.41, p.50-8, 1991.
- STEELE, T. W. , DWEN, R. J. *Campylobacter jejuni* subsp. *doylei* subsp. nov. a subspecies nitrate-negative campylobacters isolated from human clinical specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.38, p.316-18, 1988.
- TAYLOR, D. E., GARNER, R. S., ALLAN, B. J. Characterization of Tetracycline resistance plasmids from *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.24, p.930-5, 1983.
- TAYLOR, D. E. , COURVALIN, P. Mechanisms of antibiotic resistance in *Campylobacter* species. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.32, p.1107-12, 1988.
- TERZOLO, H.R., LAWSON, G.H.K., ANGUS, K.W., et al. Enteric *Campylobacter* infection in gnotobiotic calves and lambs. *Res. Vet. Sci.*, v.43, p.72-7, 1987.
- TOLEDO, M.R.F, FONTES, C.F., TRABULSI, L.R. MILI - um meio para a realização dos testes de motilidade, indol e lisina descarboxilase. *Rev. Microbiol.*, v.13, p.230-5, 1982a.

- TOLEDO, M.R.F., FONTES, C.F., TRABULSI, L.R. EPM - modificação do meio de Rugai e Araújo para a realização simultânea dos testes de produção de gás a partir de glicose,  $H_2S$ , urease e triptofano desaminase. Rev. Microbiol., v.13, p.309-15, 1982b.
- TRESCHNAK, E., HELLMANN, E. Vergleich verschiedener Campylobacter-Selektivnährböden bei der Untersuchung von Fäzesproben von Haustieren. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., v.100, p.381-5, 1987.
- TZIPORI, S. The aetiology and diagnosis of calf diarrhea. Vet. Record, v.108, p.510-4, 1981.
- UEDA, H., TERAKADO, N., SEKIZAKI, T., et al. Distribution of enterotoxigenic Escherichia coli in diarrheal calves and healthy cattle. Jpn. J. Vet. Sci., v.44, p.751-757, 1982.
- VANDAMME, P., FALSE, E., ROSSAU, R., et al. Revision of Campylobacter, Helicobacter and Wolinella taxonomy: emendations of generic descriptions and proposal of Arcobacter gen. nov. Int. J. Syst. Bacteriol., v.41, p.88-103, 1991.
- VÉRON, M., CHATELAIN, R. Taxonomic study of the genus Campylobacter Sebald and Véron and designation of the neotype strain for the type species Campylobacter fetus (Smith and Taylor) Sebald and Véron. Int. J. Syst. Bacteriol., v.23, p.122-34, 1973.
- VIANA, F.C., CRUZ, F.E.R., LAENDER, F.C., et al. Diagnóstico de situação da produção bovina de leite do município de Sete Lagoas, Minas Gerais. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.39, p.699-717, 1987.
- WALKER, R. I., CALDWELL, M. B., LEE, E. C., et al. Pathophysiology of Campylobacter enteritis. Microbiol. Rev., v.50, p.81-94, 1986.
- WALMSLEY, S.L., KARMAI, M.A. Direct isolation of atypical thermophilic Campylobacter species from human feces on selective agar medium. J. Clin. Microbiol., v.27, p.668-70, 1989.
- WALTNER-TOEWS, D., MARTIN, S.W., MEEK, A.H. The effect of early calfhood health status on survivorship and age at first calving. Can. J. Vet. Res., v. 50, p.314-317, 1986.
- WANG, Y., TAYLOR, D.E. Chloramphenicol resistance in Campylobacter coli: nucleotide sequence, expression, and cloning vector construction. Gene, v.94, p.23-8, 1990.
- WANG, W.L.L., LUECHTEFELD, N.W., RELLER, L.B., et al. Enriched Brucella medium for storage and transport of cultures of Campylobacter fetus subsp. jejuni. J. Clin. Microbiol., v.12, p.479-80, 1980.
- WARNER, D.P., BRYNER, J.H. Campylobacter jejuni and Campylobacter coli inoculation of neonatal calves. Am. J. Vet. Res., v.45, p.1822-4, 1984.

WEBER, A., LEMBKE, C., SCHAFER, R., et al. Vergleichende Anwendung von zwei Selektivnährböden zur Isolierung von *Campylobacter jejuni* aus Kotproben von Tieren. Zentralbl. Veterinaemed., reihe B, v.30, p.175-9, 1983.

WEBER, A., BERGMANN, I., BAUER, K. Nachweis von *Campylobacter jejuni* in Kotproben von Kälbern mit und ohne Enteritiden. Berl. Münch. Tierärztl. Wscrh., v.97, p.10-3, 1984.

WRAY, C. Salmonellosis in cattle. In Pract., v.13, p.13-5, 1991.