

Isolamento e caracterização genética de estirpes de *Campylobacter* spp. em amostras humanas e ambientais: implicações para a saúde pública

Aldo P. Ferreira¹
Eduardo D. Wermelinger²
W. T. C. Esteves³

Resumo

Doença bacteriana zoonótica, a campilobacteriose tem como agentes predominantes *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*, responsáveis mundialmente por frequentes casos de gastroenterite humana. Investigou-se a presença de estirpes de *Campylobacter* em amostras de água do baixo curso do rio São João – RJ, e como complemento da pesquisa, na água de abastecimento, poços, e fezes de voluntários. No processo de isolamento e identificação realizou-se a análise fenotípica e genotípica, caracterizando as seguintes espécies: *C. jejuni* (50%), *C. coli* (21,43%) e *Campylobacter* spp. (28,57%). O alto índice de isolamento no rio São João, indica a contaminação por essa bactéria e sua possível manutenção natural no ambiente. Pela não detecção na água distribuída pela rede pública sugere efetividade no processo de tratamento, já que a água é retirada da lagoa de Juturnaíba, um dos pontos que apresentou maior percentual de positividade para este gênero dentro do nosso estudo. Políticas públicas e ações de saneamento representarão a melhoria da qualidade de vida da população que está diretamente exposta, possibilitando mitigar agravos à saúde da população em decorrência ao uso recreativo do rio.

Palavras-chave: *Campylobacter*, contaminação da água, saúde pública, rio São João

Abstract

Isolation and genetic characterization of *Campylobacter* spp. strains in human and environmental samples: implications for public health. A zoonosis and bacterial disease, campylobacteriosis, is predominantly caused by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*, agents that are responsible for frequent cases of human gastroenteritis worldwide. It was investigated the presence of *Campylobacter* spp. in water samples in the lower course of São João river - RJ, and complement the research, in the water supply, wells, and volunteers' feces. The process for isolation and identification was done by phenotypic and genotypic analysis, characterizing the following species: *C. jejuni* (50%), *C. coli* (21.43%) and *Campylobacter* spp. (28.57%). The high isolation *Campylobacter* rate in São João river indicates that contamination by these bacteria and their possible retention in the natural environment. For non-detection in the public water distributed suggests effectivity in treatment process, since the water is removed from Juturnaíba lagoon, one of the points which presented higher percentage of positivity for this genus within our study. Public politicians and sanitation actions policies will represent an improvement the quality of life in population that is directly exposed, allowing mitigate health problems due to recreational use of this river.

Keywords: *Campylobacter*, water pollution, public health, São João river

Introdução

A campilobacteriose é uma zoonose de distribuição mundial, onde ao adquirir a infecção por via oro-fecal, o período de incubação no ser humano varia de 24 a 72 horas, podendo, assim como a *Salmonella*, causar distúrbios que variam desde infecção inaparente até disenteria incapacitante. Os principais sintomas são febre, dor abdominal, vômito e diarreia, podendo ser observado também, desidratação, cefaleia, mialgia, fadiga e artralgia. Em 50 a 90% dos casos as fezes líquidas podem apresentar sangue visível ou oculto, muco e leucócitos. O curso da doença

pode ser auto limitante com remissão dos sintomas agudos entre dois a três dias e cura completa entre uma semana a dez dias (Saleha et al., 1998; Acha & Szyfres, 2001; Songer & Post, 2005).

Durante a infecção podem se manifestar complicações incluindo apendicite, colecistite, pancreatite, peritonite, bacteremia, sepse, meningite, endocardite, osteomielite e uveíte, além de complicações pós-infecção como artrite infecciosa reativa, aborto, síndrome hemolítica urêmica, síndrome de Miller Fisher e síndrome de Guillain-Barré (Calil et al., 2008).

¹ CESTE/ENSP/FIOCRUZ - Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Leopoldo Bulhões, 1480, Manguinhos, 21041-210, Rio de Janeiro RJ, Brasil. aldopachecoferreira@gmail.com

² DCB/ENSP/FIOCRUZ – Departamento de Ciências Biológicas, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Leopoldo Bulhões, 1480, Manguinhos, 21041-210, Rio de Janeiro RJ, Brasil. edw@fiocruz.br

³ IOC/FIOCRUZ – Departamento de Bacteriologia, Instituto Oswaldo Cruz. Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, 21040-970 - Rio de Janeiro, RJ – Brasil. wthadeu@fiocruz.br

De acordo com Fernandez (2005) nos países em desenvolvimento, incluindo os da América do Sul, o *Campylobacter* está presente nas fezes de 10 a 35% das crianças, podendo, a ausência de controle higiênico-sanitário e a falta de saneamento básico, acarretar em prematuras infecções e reinfecções, contribuindo, além para condição de portadoras intestinais de *Campylobacter* para o aumento dos títulos séricos de anticorpos.

Sob aspectos da gestão ambiental, o termo contaminação é usado para expressar as modificações das características naturais ambientais, causada por elementos que lançados na água, no ar, no solo, etc., torna-os diferentes e nocivos, seja pela presença de substâncias tóxicas ou pela existência de agentes patogênicos, prejudicando o substrato, ou o entorno, em tal grau que crie ou ofereça riscos reais à vida e à saúde. O elemento contaminante é de caráter ativo e deve ser encarado como um problema de saúde pública (Soares & Ferreira, 2004).

A saúde ambiental como subárea da saúde pública, busca articular o conhecimento científico interdisciplinar, de forma a contribuir para a formulação de políticas públicas para o desenvolvimento humano sustentável, através da inter-relação entre os aspectos do ambiente que impactam a saúde e vice-versa, como forma de entender cada vez mais esse processo interativo e dinâmico, proporcionando mitigar com ações concretas os agravos à saúde e ao ambiente (Tucci et al., 2000).

Do ponto de vista da questão saúde, a influência do ambiente pode ser positiva ou negativa, na medida em que promova condições que propiciem o bem estar e a plena realização das capacidades humanas para todas as populações ou contribuam para o aparecimento e manutenção de doenças, agravos e lesões traumáticas colaborando para o aniquilamento e morte da população como um todo ou para grupos populacionais particulares (Geo-Brasil, 2002).

A promoção do acesso à água de qualidade e a proteção contra os riscos decorrentes dos contaminantes de importância e repercussão na saúde pública presentes na água são de grande relevância para a humanidade (Lehtola et al., 2006, Fernandes Neto & Ferreira, 2007; Pitkänen, 2013). Nesse aspecto, o Conselho Nacional de Saúde apresenta à sociedade brasileira os maiores desafios atuais para o Sistema Único de Saúde (SUS): estruturação do novo modelo de atenção a saúde que, a partir da grande função de saúde pública, subordine os

conceitos e programas de assistência médica individual aos preceitos e programas dos interesses coletivos e direitos da cidadania, e realize, efetivamente, as ações de promoção e proteção da saúde (Conselho Nacional de Saúde, 2002).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 85% das doenças conhecidas são de veiculação hídrica, ou seja, estão relacionadas à água. O agravo em saúde, mais comumente associado à água contaminada por esgotos, é a gastroenterite, que pode levar principalmente as crianças, à desidratação (Scarcelli et al., 1998). Destaca, ainda, o fato do *Campylobacter jejuni* ser o agente mais frequentemente relatado nos casos de gastroenterite em seres humanos nos países desenvolvidos.

Sua presença remete a diarreia aguda com cólicas abdominais, onde pessoas de todas as idades podem ser afetadas pela doença. *C. jejuni* e *C. coli* são as espécies de maior importância destas enfermidades em humanos e estão associadas a quadros esporádicos de diarreia. A doença tem a duração de 2 a 5 dias, podendo em alguns indivíduos apresentar sintomas até o décimo dia de infecção. Todavia, como o contato entre as pessoas e as fontes de contaminação são pouco frequentes, não há o desenvolvimento precoce da imunidade, levando os pacientes a quadros graves de gastroenterite aguda quando ocorre o primeiro contato (Butzler, 2004).

No Brasil há relatos demonstrando a presença de *Campylobacter* spp. em fezes de indivíduos com diarreia aguda ou crônica e até em indivíduos assintomáticos, observando-se que a incidência nos quadros diarreicos tem variado entre 2,3% a 17,0%, dependendo da faixa etária e das condições socioeconômicas dos pacientes (Ruiz-Esquide et al., 2003). Todavia por seu potencial de veiculação hídrica, há subsídios científicos que apontam ser de suma importância obter-se dados em relação a sua distribuição nestes ambientes e possíveis portadores, bem como sua relação com acometimentos diarreicos na população, sendo esta a vertente exploratória deste artigo.

Material e Métodos

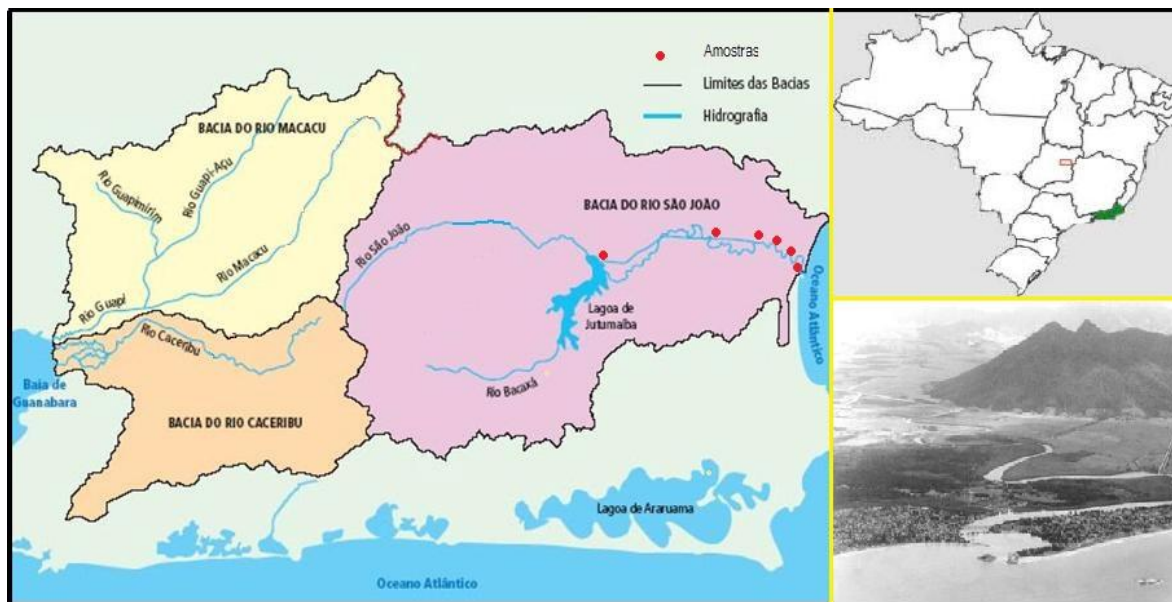
Caracterização do Sítio de Estudo: bacia do rio São João

O rio São João inicia sua jornada a 800 m de altitude, no município de Cachoeiras de Macacu, num ramo da serra do Mar conhecida por

serra do Sambê. Apresenta as coordenadas de 22° 20' e 22° 50' de latitude sul e 42° 00' e 42° 40' de longitude oeste, compreendendo uma superfície de 2.160 km². Seu curso é de 120 km e apresenta-se do seguinte modo: a) alto São João - das

nascentes, no trecho de montanha, até ingressar na planície, com 5 km; b) médio São João – ingressa na planície até a represa de Juturnaíba, com 50 km; c) represa de Juturnaíba, onde cerca de 13 km de leito estão submersos; e d) baixo São João - da barragem até a foz, com 65 km (**Figura 1**).

Figura 1. Bacia do rio São João e Morro São João, Rio de Janeiro



Coleta e análise de amostras humanas

Para a coleta de amostras de fezes se fizeram contatos prévios com dois Postos de Saúde, duas unidades do Programa de Saúde da Família (PSF), uma associação de serviços a comunidade e duas creches. Todas essas instituições se localizam na região do entorno da foz do rio São João, no período do presente estudo. Dispositivos do tipo *swab* com meio de transporte Cary-Blair (conservante) foram usados para a obtenção das amostras fecais. Entre a coleta e o processamento do material, o tempo transcorrido, não ultrapassou um período total de uma semana, evitando-se assim, a perda de viabilidade dos microrganismos presentes na amostra.

A semeadura foi realizada em placa de Petri com o mesmo meio de cultura usado para o isolamento em amostras de água. O único diferencial entre as duas técnicas de processamento das amostras foi o inóculo do material, que neste caso foi realizado com o próprio *swab*, apoiado em uma das extremidades da placa, seguindo-se então a semeadura em “T”, feita com alça bacteriológica.

Coleta e análise de amostras ambientais

Para a análise de amostras de água, originárias do rio e da água de abastecimento, foram coletadas 200 mL em frascos estéreis, acondicionados sob refrigeração em caixa térmica, até o momento do processamento, que não excedeu seis horas entre a coleta e o processamento.

No laboratório, o material foi centrifugado em tubos de centrífuga estéreis do tipo FALCON® a 3000 rpm por 30 minutos a 4°. O *pellet* foi semeado em placas de Petri contendo meio enriquecido e seletivo de Agar Columbia com 5% de sangue desfibrinado de carneiro ou 0,4% de carvão ativo, acrescido de 5% de uma solução redutora de oxigênio (FBP) e 0,5% de uma solução de antibióticos (cloranfenicol e gentamicina). Após a semeadura, as placas de Petri foram colocadas em jarra metálica hermética com atmosfera de microaerofilia (Probac do Brasil) e incubadas a 37°C por 72 a 96 horas. A leitura do crescimento foi realizada após o período de incubação, onde colônias sem cor, transparentes e com brilho, lembrando gotas d’água foram selecionadas como sendo suspeitas de *Campylobacter* spp. (Andrade et al., 2007).

A partir das colônias suspeitas, a identificação em caráter presuntiva foi realizada por microscopia em lâminas com esfregaço das colônias fixadas e utilizando-se o método de Gram. A observação foi realizada em microscópio de luz (campo claro), para a observação das características celulares típicas do gênero bacteriano. A identificação presuntiva das amostras é obtida pela observação de bacilos (bastonetes) curvos ou em forma de “S”, Gram negativos ou pela presença de células cocóides, características de amostras em estágio degenerativo (Montolio et al., 2005).

As amostras de colônias típicas, que se desenvolveram nos meios seletivos e que se enquadraram como suspeitas de *Campylobacter* spp., foram então submetidas a provas bioquímicas clássicas para a confirmação de gênero bacteriano e identificação ao nível de espécie (Filgueiras & Hofer, 1989).

Análises de Biologia Molecular

Utilizaram-se análises de biologia molecular para a confirmação dos resultados obtidos na metodologia clássica ou nos casos de eliminação de dúvidas de identificação, onde cepas controle de *C. jejuni* e *C. coli* foram incluídas em todos os testes como controles positivos. Em todas as amostras com isolamento de *Campylobacter*, se obteve quantidade suficiente de material a partir da massa de **Tabela 1**. *Primers* usados para PCR neste estudo.

Nomenclatura dos <i>Primers</i>	Sequência dos Oligonucleotídeos	Gene
pg3	(5'- GAACTTGAACCGATTTG - 3')	<i>flaA</i>
pg50	(5'- ATGGGATTTTCGTATTAAC - 3')	<i>flaA</i>
C1	(5'- CAAATAAAGTTAGAGGTAGAATGT-3')	não-determinado
C4	(5'-GGATAAGCACTAGCTAGCTGAT - 3')	não-determinado
C412F	(5'-GGATGACACTTTTCGGAGC-3')	16S rRNA
C1288R	(5'-CATTGTAGCACGTGTGTC-3')	16S rRNA
F2B	(5'-TGGAGGGTAATTTAGATATG-3')	cadF
R1B	(5'-CTAATACCTAAAGTTGAAAC-3')	cadF

Após a reação de PCR, 10µL de todos os produtos amplificados e 7µL de um marcador de peso molecular de 100 pb (*invitrogen*) foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1,0%. Após a etapa de corrida (TBE 0,5x), o gel foi corado com solução de brometo de etídio (Sigma, St. Louis, IL, EUA) na concentração de 0,5 mg/mL, descorado em água e observado em sistema de transiluminação (Sambrook et al., 2001). A fotografia digital do gel e das bandas de DNA separadas eletroforeticamente foi realizada em aparelho tipo

crescimento bacteriano após semeadura em Agar Columbia, para aplicar a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), Multiplex (Vilardo et al., 2006).

A extração e purificação do DNA total foram realizadas por métodos clássicos e por kits comerciais seguindo seus protocolos próprios, posteriormente foram executadas as técnicas de PCR e eletroforese em gel de agarose. Algumas colônias provenientes do crescimento já descrito, em placas de meio de Ágar Columbia foram ressuspensas em 100 µl de tampão estéril TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0), a fim de obter 2×10^9 células por ml (Englen & Kelley, 2000).

Para a extração do DNA bacteriano, foram aplicados dois diferentes métodos com o intuito de avaliar qual deles era o mais eficiente: extração pela guanidina e utilizando o Kit de extração GenomicPrep™ Cells and Tissue DNA Isolation (Roche Diagnostics Corp.).

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O DNA extraído foi submetido ao PCR através amplificação em um termociclador automático (*PTC 150* - MJ Research, Incorporation). Os iniciadores (*primers*) utilizados foram definidos com base em sequências conhecidas e utilizadas para os microrganismos de interesse (**Tabela 1**).

Gel Doc UVP GDS 7.500 (Gel Documentation System, Califórnia, EUA).

Aspectos Éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca (Ensp/Fiocruz). Todos os sujeitos receberam informações sobre a pesquisa, tendo assinado o formulário do consentimento informado antes de participar e assegurados o anonimato e a confidencialidade.

Resultados

A pesquisa totalizou 110 amostras englobando material de origem fecal e hídrica.

Amostras de material de origem fecal

De um total de 55 amostras de material de origem fecal, foram positivas *Campylobacter* 2

amostras, confirmadas pela metodologia clássica e pelas provas moleculares, ambas de indivíduos do sexo feminino, sem diarreia, maiores de 18 anos que frequentavam a mesma associação de moradores do local, encontramos duas diferentes espécies de *C. coli* e *C. jejuni*. A **tabela 2** apresenta as características do grupo de humanos trabalhado.

Tabela 2. Dados obtidos do material de origem fecal humana

Total de amostras	Grupo etário		Sexo		Diarreia		Resultado	
	< de 18 anos	≥ de 18 anos	M	F	Sim	Não	Positivo	Negativo
55	26	29	26	29	14	41	2	53

Amostras de água

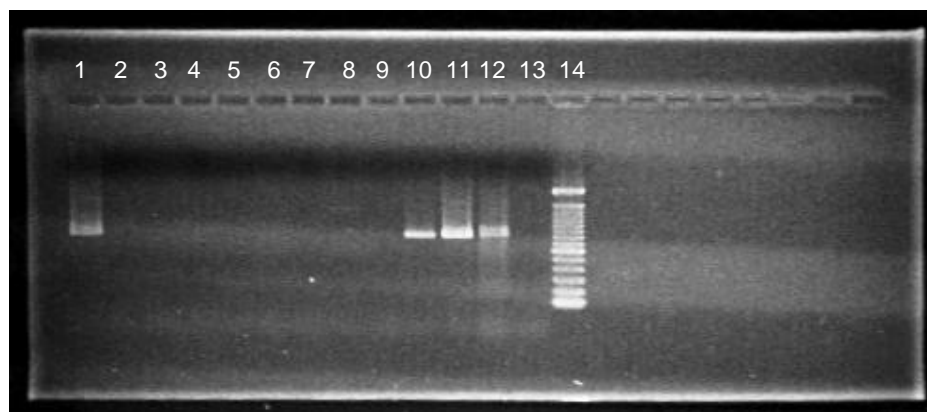
De um total de 55 amostras de água (51 amostras do rio São João, 2 amostras de poço artesiano domiciliar, 1 amostra de reservatório de água de chuva (Prefeitura de Barra de São João) e 1 amostra de caixa d'água (Prefeitura de Barra de São João), foram positivas para *Campylobacter* 22 amostras, das quais, 21 eram do rio São João e uma amostra de poço, comprovadas pelas provas morfo-tintoriais e bioquímicas.

Entre os isolados gerais de todas as fontes pesquisadas obteve-se 24 amostras positivas, das quais 12 foram agrupadas na espécie *C. jejuni*, 4 amostras na espécie *C. coli* e 8 amostras agrupadas no gênero *Campylobacter* spp.

Após a caracterização bioquímica clássica as amostras foram submetidas as extrações químicas através da Guanidina e da precipitação dos sais (kit GFX – GE health care), evidenciando os dois métodos boa eficácia na qualidade do DNA extraído (Pitkänen et al., 2013).

Para a pesquisa molecular associada ao gênero, utilizou-se *primers* que amplificam um fragmento de 816-pb somente encontrado nas espécies de *Campylobacter* urease positivos termotolerantes (UPTC) e *Ureolyticus*: C412F, 5'-GGATGACACTTTTCGGAGC-3' e C1288R, 5'-CATTGTAGCACGTGTGTC-3' (**figura 2**). As amostras 1, 10, 11, 12 e 14 evidenciaram a variável testada.

Figura 2. Gel do PCR realizado com os *primers* de gênero



A **figuras 3** e a **figura 4** apresentam o resultado em gel de agarose a 1% feito com os produtos do multiplex PCR com os *primers* associados as espécies *C. coli* e *C. jejuni*. Pg3 (5'-GAACTTGAACCGATTG - 3'), pg50 (5'-ATGGGATTTTCGTATTAAC-3'), C1 (5'-

CAAATAAAGTTAGAGGTAGAATG T-3'), C4 (5'-GGATAAGCACTAGCTAGCTGAT- 3'). Na figura 3a, as amostras 4, 5, 6, 7, 8, 10 e 15 são identificadas como *C. jejuni*. Na figura 3b, a amostra 12 é identificada como *C. coli* e as amostras 13 e 14 identificadas como *C. jejuni*.

Figura 3. Géis de agarose apresentando o resultado da PCR com os *primers* associados à diferenciação das espécies

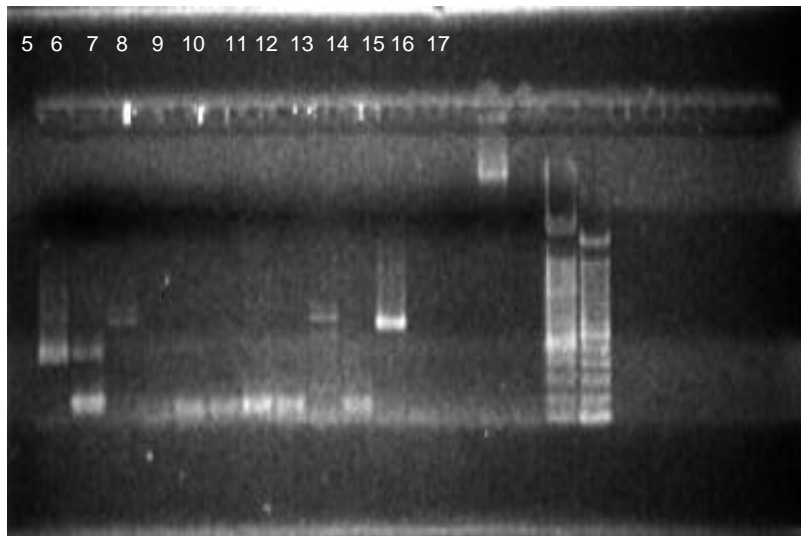
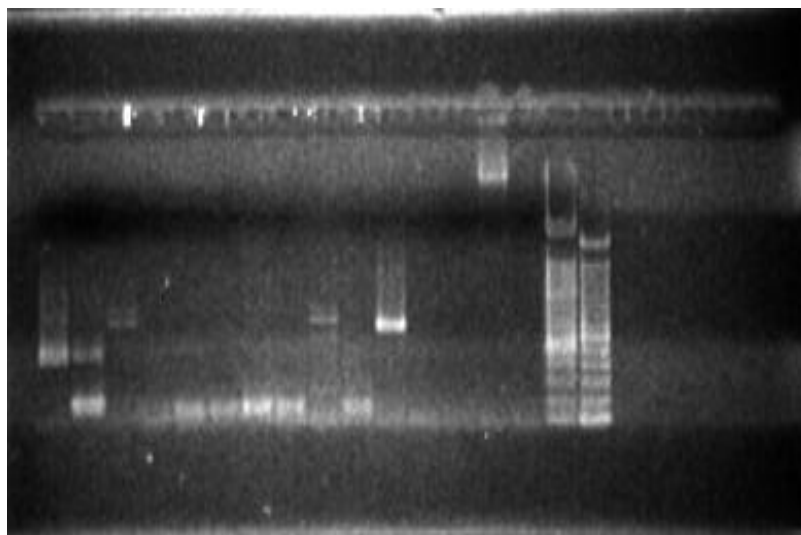


Figura 4. Géis de agarose apresentando o resultado da PCR com os *primers* associados à diferenciação das espécies



Discussão

A partir dos resultados obtidos aliados com o conhecimento da precariedade na rede de saneamento da região observada em nossas visitas, identificamos potencialidade para contaminação dos corpos d'água da região por amostras de *Campylobacter* spp. A ausência de sintomas diarréicos nesses indivíduos pode estar ligada a contato precoce e freqüente com o microorganismo, o que pode levar a geração de uma imunidade ainda na infância possibilitando quadros leves ou assintomáticos na idade adulta (Tosin & Machado, 1995). A questão fundamental em termos de saúde pública está associada a

melhoria das condições sanitárias desta população prevenindo esse tipo de condição, que favorece o contato e a conseqüente infecção por agentes bacterianos patogênicos.

Quanto às amostras fecais, a partir de conversas com moradores da região do entorno dos pontos de coleta, tomamos ciência da ocorrência de alguns episódios diarréicos na localidade. Todavia, não foram isoladas cepas de *Campylobacter* de indivíduos diarréicos. Provavelmente os indivíduos com sintomatologia diarréica, ou estavam acometidos por outros tipos

de microrganismos ou esse agravo estava associado a distúrbios alimentares.

Um fato observado durante o processamento das amostras de origem ambiental foi que estas amostras demoraram um tempo muito maior para se desenvolver nos meios de cultura clássicos do que as amostras provenientes de animais e humanos. Nestes isolamentos foi necessário aguardar até 96 h para obtenção de crescimento em placa enquanto que, nas outras amostras (fezes) em 48 h já era possível detectar o crescimento bacteriano.

Conclusões

No Brasil, desde seu reconhecimento como agente etiológico até pouco tempo, se considerava o isolamento de *Campylobacter* de ambiente ou de processos diarreicos um acontecimento excepcional, essa idéia, difundida por vários pesquisadores, fez com que esse gênero bacteriano fosse considerado de raro isolamento em nosso país. Avaliando trabalhos publicados em outros países e o presente estudo, verifica-se que seu isolamento não é um fato tão incomum como se supunha, principalmente quando verificamos seu alto índice de isolamento em amostras ambientais e a presença de portadores animais e humanos assintomáticos hígidos como foi verificado neste trabalho.

As questões ambientais atualmente estão na pauta dos debates mundiais, porém, na prática, pouco está sendo feito para proteger o elemento essencial para vida humana, a água. A degradação dos recursos hídricos é crescente, pois acompanha as atividades humanas de urbanização, desmatamento, agricultura e industrialização que provocam todo tipo de contaminação. É preciso posturas mais firmes em termos de legislação contra o desperdício de água e contra a degradação de nossos mananciais de abastecimento, para que o consumo no futuro seja garantido.

A existência de novas metodologias laboratoriais permitiu pesquisar e quantificar níveis baixos de microrganismos e toxinas, assim como identificar, de forma inequívoca, espécies, sorotipos, fagotipos e fatores de patogenicidade. Deste modo, tornou-se assim possível melhorar o conhecimento dos patógenos e conseguir diferenciá-los. Com tudo isto, estamos perante novos cenários para surtos, podendo constatar surtos difusos e dispersos, de cunho ambiental em evidências cada vez mais frequentes.

Com isso, acreditamos que este trabalho venha contribuir para aumentar as informações disponíveis em nosso país sobre a distribuição

deste gênero bacteriano em ambientes aquáticos e sua ação patogênica.

Referências

- ACHA, P.N. & SZYFRES, B. 2001. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3 Ed. Washington, D.C.: Organización Panamericana da Saúde.
- ANDRADE, M.C.R.; GABEIRA, S.C.O.; ABREU-LOPES, D.; ESTEVES, W.T.C.; VILLARDO, M.C.B.; THOMÉ, J.D.S.; CABELLO, P.H. & LAURIA-FILGUEIRAS, A.L. 2007. Circulation of *Campylobacter* spp. in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) held in captivity: a longitudinal study. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 102(1): 53-57.
- BUTZLER, J.P. 2004. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. Clinical Microbiology and Infection 10(10): 868-876.
- CALIL, R.M.; SCARCELLI, E.; MODELLI, K.D. & CALIL, E.M.B. 2008. Campilobacteriose: o agente, a doença e a transmissão por alimentos. São Paulo: Ricardo Moreira Calil, 129p.
- CARLIER, V. 1994. Les campylobacterioses. Bulletin de la Societe Veterinaire Pratique de France 78(6-7): 333-337.
- CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE. 2002. Desenvolvimento do Sistema Único de Saúde no Brasil: Avanços, desafios e reafirmação de princípios e diretrizes. Saúde em Debate 26(62): 295-310.
- ENGLER, M.D. & KELLEY, L.C. 2000. A rapid DNA isolation procedure for the identification of *Campylobacter jejuni* by the polymerase chain reaction. Letters of Applied Microbiology 31: 421-426.
- FERNANDEZ, H. 2005. Família *Campilobacteriaceae*. 2005. In: Trabulsi, L.R.; Alterthum, F.; Martinez, M.B.; Campos, L.C.; Gompertz, O.F. & Rác, M.L. Microbiologia. 4 Ed. São Paulo: Editora Atheneu, 347-352p.
- FERNANDES NETO, M.L. & FERREIRA, A.P. 2007. Perspectivas da sustentabilidade ambiental diante da contaminação química da água: Desafios normativos. Interface 2: 1-15.
- FILGUEIRAS, A.L.L. & HOFER, E. 1989. Ocorrência de *Campylobacter* termofílico em diferentes pontos de uma estação de tratamento de esgotos na cidade do Rio de

- Janeiro, RJ. *Revista de Microbiologia* 20: 303-308.
- GEO BRASIL 2002. *Perspectivas do Meio Ambiente no Brasil*. Brasília: Edições IBAMA.
- LEHTOLA, M.J.; PITKANEN, T.; MIEBACH, L. & MIETTINEN, I.T. 2006. Survival of *Campylobacter jejuni* in potable water biofilms: a comparative study with different detection methods. *Water Science Technology*, 54(3): 57-61.
- MONTOLIO, T.S.; JORDÁN VIDAL, M.M. & SANFELIU, A.B. 2005. *Contaminación y medio ambiente*. Santiago (Chile) - Castellón (España): Universitat Jaume I.
- PITKÄNEN, T. 2013. Review of *Campylobacter* spp. In drinking and environmental waters. *J Microbiol Methods* 95(1):39-47.
- PITKÄNEN, T.; RYU, H.; ELK, M.; HOKAJÄRVI, A.M.; SIPONEN, S.; VEPSÄLÄINEN, A.; RÄSÄNEN, P.; SANTO DOMINGO, J.W. 2013. Detection of fecal bacteria And Source tracking identifiers in environmental waters using rRNA-based rt-qPCR and rDNA-based qPCR assays. *Environ Sci Technol*. 47(23): 13611-20.
- RUIZ-ESQUIDE, F.; LAFOURCADE, M. & FERNÁNDEZ, H. 2003. Neonatal *Campylobacter coli* enteritis and bacteraemia. *Brazilian Journal of Microbiology* 34: 341-343.
- SALEHA, A. A.; MEAD, G. C. & IBRAHIM, A. L. 1998. *Campylobacter jejuni* in poultry production and processing in relation to public health. *J. World Poult. Sci.* 54: 49-58.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- SCARCELLI, E.; GENOVEZ, M.E.; CARDOSO, M.V.; SOUZA, M.C.A.M.; GRASSO, L.M.P.S.; SOUZA, C.A.I. & TORRES, A.P. 1998. Avaliação do potencial de disseminação de *Campylobacter* spp. por diferentes espécies animais. *Arquivos do Instituto Biológico* 65(1): 55-61.
- SOARES, B.E.C. & FERREIRA, A.P. 2004. Desenvolvimento sustentável e biodiversidade: Gestão racional e ecológica dos recursos ambientais. *Revista Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento* 33: 72-75.
- SONGER, J.G. & POST, K.W. 2005. *Veterinary microbiology: bacterial and fungal agents of animal disease*. Missouri: Elsevier, Inc.
- TOSIN, I. & MACHADO, R.A. 1995. Ocorrência de *Campylobacter* spp. entre manipuladores de alimentos em cozinhas hospitalares de localidade urbana da região Sul do Brasil. *Revista de Saúde Pública* 29(6): 472-477.
- TUCCI, C.E.M.; HESPANHOL, I. & CORDEIRO NETTO, O.M. 2000. Cenários da Gestão da Água no Brasil: Uma Contribuição para "Visão Mundial da Água". *Revista Brasileira de Recursos Hídricos* 5: 31-43.
- VILARDO, M.C.B.; THOMÉ, J.D.S.; ESTEVES, W.T.C.; FILGUEIRAS, A.L.L. & OLIVEIRA, S.S. 2006. Application of biochemical and polymerase chain reaction assays for identification of *Campylobacter* isolates from non-human primates. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 101(5): 499-501.