

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO GÊNERO *Arcobacter*

Charles L. G. Batista*
Gildevânia C. de Melo*
Tâmara G. A. Barbosa*
Willma J. Santana**
Luciana B. S. de Souza**
Henrique Douglas M. Coutinho**

BATISTA, C.L.G.; MELO, G.C.; BARBOSA, T.G.A.; SANTANA, W.J.; SOUZA, L.B.S.; COUTINHO, H.D.M. Epidemiologia molecular do gênero *Arcobacter*. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**, Umuarama, 8(2), mai./ago. p.143-152, 2004.

RESUMO: Pertencente à família *Campylobacteriaceae*, os bacilos gram-negativos curvos *Arcobacter* apresentam quatro subtipos: *A. cryaerophylos*, *A. butzleri*, *A. nitrofrigidis* e *A. skirrowii*. Estudos de DNA e rRNA foram usados para evidenciar as diferenças genotípicas entre estas e as dos gêneros *Campylobacter* e *Helicobacter*. Tais bactérias foram encontradas em carcaças de suínos, bovinos e aves, bem como em esgotos, sedimentos de pântanos salgados e humanos com enterites, o que sugere que possam ser patógenos humanos transmitidos principalmente através de água não tratada e carnes pouco cozidas.

PALAVRAS-CHAVES: *Arcobacter*. *Campylobacteriaceae*. Enterites. Água não tratada. Carnes mal cozidas.

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF GENUS *Arcobacter*

BATISTA, C.L.G.; MELO, G.C.; BARBOSA, T.G.A.; SANTANA, W.J.; SOUZA, L.B.S.; COUTINHO, H.D.M. Molecular epidemiology of genus *Arcobacter*. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**, Umuarama, 8(2), mai./ago. p.143-152, 2004.

ABSTRACT: Belonging to the *Campylobacteriaceae* family, the gram-negative curved *Arcobacter* bacilli present four subtypes: *A. cryaerophylos*, *A. butzleri*, *A. nitrofrigidis* and *A. skirrowii*. Studies of DNA and rRNA were used to evidence the genotypic differences between these and the *Campylobacter* and *Helicobacter* ones. Such bacteria were found in carcasses of swine, bovine and birds, as well as in sewers, sediments of salty and human swamps with enteritis, which suggests that human pathogens may be transmitted mainly through the treated water and little cooked meats.

KEY-WORDS: *Arcobacter*. *Campylobacteriaceae*. Enteritis. No treated water. Badly cooked meats.

Introdução

As bactérias da família das *Campylobacteriaceae* estão divididas em gêneros que são: *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Arcobacter*, este tendo sido inicialmente integrado ao gênero *Campylobacter*, mas estudos realizados no DNA e RNAr demonstraram que não existem relações genotípicas, acarretando a criação de um novo gênero (TRABULSI *et al*, 2002).

O gênero *Arcobacter* é constituído de bacilos Gram-negativos curvos, não esporulados, móveis por flagelação monotríquia ou anfitriquia, tendo em 30°C a temperatura ideal de crescimento, isolamento primário feito em microaerofilia, porém em condições posteriores podem crescer em aerobiose (TRABULSI *et al*, 2002).

Ocorrem subtipos de bactérias do gênero *Arcobacter*, são elas: *A. cryaerophylos*, *A. butzleri*, *A. skirrowii*, *A. nitrofrigidis*. Esse grupo *Arcobacter* pertence ao grupo II de rRNA, no qual possuem espécies denominadas campilobactérias aerotolerantes, porque crescem em

presença de oxigênio em níveis atmosféricos (KONEMAN *et al*, 2001).

A. cryaerophylos tem a capacidade de proliferar em presença de oxigênio atmosférico e em temperaturas inferiores a 37°C. Já foi isolada em fezes de bovinos, porcos e primatas, como em fetos abortados de porcos, bovinos e eqüinos. Estudos futuros irão estabelecer o papel etiológico desta bactéria na infecção humana (TRABULSI *et al*, 2002). Bioquimicamente é similar a *C. fetus fetus*, entretanto, *A. cryaerophylos* é acetato de indoxila-positiva, enquanto que *C. fetus fetus* não o é. A maioria das cepas é sensível ao ácido nalidíxico e resistente a cefalotina (KONEMAN *et al*, 2001).

A. nitrofrigidis é a única espécie da família *Campylobacteraceae* que tem a capacidade de fixar nitrogênio, e é isolada em associação com raízes de plantas originadas de pântanos salinos, sendo uréia-positiva e não patogênica para o homem (KONEMAN *et al*, 2001). *A. butzleri* já foi isolada de fezes de homens e animais com diarreia, como em fetos abortados de bovinos e porcos,

*Discente da Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte - FMJ;

**Docente da Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte - FMJ;

Endereço para correspondência: Henrique Douglas M. Coutinho, Universidade Federal da Paraíba - UFPB, Centro de Ciências Exatas e da Natureza - CCEN, Departamento de Sistemática E Ecologia - DSE, Programa de Pós - Graduação em Ciências Biológicas, João Pessoa - PB. Brasil. 58051-900, hdouglas@zipmail.com.br / h-douglas@bol.com.br

fezes de avestruz e de primatas, mas, também foram obtidos três isolados de conteúdos abdominais ou de líquido peritoneal, e três de sangue em humanos (KONEMAN *et al*, 2001). Sua verdadeira patogenicidade em relação a humanos deve ser esclarecida futuramente. Essa espécie cresce em ágar MacConkey e em meios que contenham glicina e nitratos, e em NaCl a 1,5% e a 3,5% (ENGBERG *et al*, 2000; KONEMAN *et al*, 2001). *A. butzleri* parece ser mais resistente a dissecação que o enteropatogênico clássico *Campylobacter* (OTTH *et al*, 2001). *A. skirrowii* por ser a mais recente descoberta, sua significação clínica ainda deve ser esclarecida. Tem sido isolada em fetos abortados de bovinos, ovinos e suínos, como também em fezes diarreicas destes animais, e principalmente do líquido prepucial de touros (KONEMAN *et al*, 2001).

Estudos feitos com *A. butzleri* e *A. cryaerophilus* demonstraram que essas espécies expressam resistência à dissecação e à radiação, sendo a primeira mais resistente que a segunda (OTTH *et al*, 2001).

Estudos recentes sobre a concentração de Manganês (Mn) e a integração microbiológica, através da aproximação biogeoquímica provaram ser muito útil para investigar a ecologia de redução de Mn microbiano. O papel ecológico das bactérias do gênero *Arcobacter* não foi identificado, mas sua concentração na parte superior do sedimento de anóxico está de acordo com a distribuição de profundidade esperada para um organismo que cresce pela redução de óxidos de Mn e o achado de redução de Mn que foi catalisado por bactérias que previamente não foram conhecidas como redutoras enfatiza a necessidade de uma procura específica por microorganismos Mn-redutores no ambiente (THAMDRUP *et al*, 2000).

Doença infecciosa em corais emergiram como uma das causas primárias da destruição global acelerada de ecossistemas de coral de recife. Várias sucessões que representam bactérias e organismos terrestres (inclusive humanos) estavam isoladas nas superfícies de corais infetadas, inclusive *Arcobacter* sp. e *Campylobacter* sp. (LOPEZ *et al*, 2002).

Análise comparativa, baseada na comunidade de microrganismos associados a doenças infecciosas em corais, não foi previamente completada. Sucessões afiliadas com patógenos conhecidos nos humanos e outros organismos descobertos no tapete microbiológico sugerem que esgoto humano, infecções de outros organismos marinhos, e terrestre podem ter contribuído para o desenvolvimento da doença (LOPEZ *et al*, 2002).

Genética e diagnóstico microbiológico

A identificação de bactérias em laboratórios de microbiologia clínicos é executada tradicionalmente por isolamento dos organismos e estudo das características de seus fenótipos, inclusive por método de coloração, morfologia, exigência de cultura e reações bioquímicas. Porém, estes métodos de identificação bacteriana têm desvantagens. Primeiro, eles não podem ser usados para organismos não cultiváveis. Segundo, ocasionalmente, os organismos exibem características bioquímicas que não se ajustam a padrões de qualquer gênero e espécie conhecidos.

Terceiro, a identificação de organismos de lento cultivo exigiria bastante tempo e seria difícil (WOO *et al*, 2003).

Métodos como biotipagem, sorotipagem e comparação de proteína celular perfila demonstraram ter capacidade distintiva limitada e por confiar em características fenotípicas que podem ter retratação mal e instável. Métodos de datilografia molecular, como o ensaio polimórfico ampliado de DNA (RAPD), ribotipagem e análise baseada em DNA polimórfico repetitivo foram executados com números limitados de *Arcobacters*, mas não houve uma avaliação profunda do desempenho e das habilidades distintivas desses métodos para as três espécies de *Arcobacters* examinadas neste estudo. Para isto, foi mostrada a eletroforese em gel de pulsar-campo de fragmentos de macrorrestrrição que é um método bem apropriado com respeito a seu poder distintivo para *A. butzleri* e *A. cryaerophilus*. Os perfis de DNA são visualizados através de transiluminação de raios Ultra Violeta e em seguida são fotografados. Os padrões de DNA que se diferenciam em um ou mais fragmentos representam tipos de espécies diferentes. Porém, este procedimento é complexo, caro e demorado (HOUF *et al*, 2002).

O método de PCR-RFLP foi usado para diferenciar os vários tipos de bactérias pertencentes ao gênero *Arcobacter*, *Campylobacter* e *Helicobacter* (MARSHALL *et al*, 1999). A enzima *Taq1* produz impressões para 3 subtipos de *Arcobacter*: *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii* (MARSHALL *et al*, 1999). Coloração SYPRO e citometria de fluxo também mostraram-se eficazes na determinação de proteínas específicas em determinadas espécies desse gênero (ZUBKOV *et al*, 1999).

Neste estudo, foram aperfeiçoados consensos de intergenes repetitivos PCR (ERIC-PCR) e RAPD-PCR de enterobactérias para caracterização genética de *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, e *A. skirrowii* e avaliados o desempenho e as habilidades distintivas destes métodos usando uma coleção de tensão bem definida que consiste em sócios destas três espécies de *Arcobacter*. Além disso, a utilidade de uma preparação de método simples e rápido de DNA foi avaliada. A diversidade genotípica presente de *Arcobacters* em carcaças de grelha, de suínos, em fezes humanas e em esgotos foi estudada, e foi determinado o impacto do procedimento de isolamento e o número de isolados caracterizados em resultados de investigações epidemiológicas (HOUF *et al*, 2002). As descobertas do PCR e do sequenciamento de DNA mostraram que a comparação das sucessões de genes de espécies bacterianas (16S gene de rRNA) é altamente conservada dentro de uma espécie e entre espécies do mesmo gênero. Conseqüentemente, pode ser usada como o padrão “de ouro novo” para identificação de bactérias para o nível de espécies. Usando esse padrão novo, são construídas árvores filogenéticas, baseadas em diferenças de base entre espécies, e as bactérias são classificadas e reclassificadas em novo gênero. Recentemente, esta técnica para a identificação do nível de espécies de tensões bacterianas foi apresentada para espécies que mostraram problemas de identificação nos laboratórios de microbiologia clínica, como também o impacto clínico de identificação precisa de tal isolado (WOO *et al*, 2003).

Foi verificado que técnicas de Fishe PCR são métodos rápidos, sensíveis, e específicos para descobrir e identificar

patógenos em alimentos. Além disso, uma combinação de ambos os métodos poderia ser uma ferramenta excelente para descobrir campilobactérias termotolerantes em amostras de água, sabendo que espécies de *Arcobacter* são aerotolerantes (MORENO *et al.*, 2003). Essa bactéria também pode ser detectada através de uma hibridação específica com sonda ARC94 (BROSSA *et al.*, 1998) e ARC1430 (WIRSEN *et al.*, 2002).

O Microsequenciamento de 500 16S ribossomal do DNA (sistema de identificação bacteriano baseado em DNA) foi projetado para identificação precisa de patógenos bacterianos. Nesse sistema, o primeiro 527-bp fragmento do 16S gene de rRNA da tensão bacteriana é ampliado, seqüenciado e analisado usando o banco de dados do sistema. Para isso foi mostrado que o sistema é útil para a identificação de bacilos patogênicos aeróbios gram-negativos. Porém, devido à automatização inadequada na amplificação e procedimentos de sequenciamento, é ainda muito intensiva a mão-de-obra. O custo efetivo também não favorece o uso deste sistema para identificação rotineira de todo isolado bacteriano em laboratórios de microbiologia clínicos. No momento, o uso desse sistema ou outro 16S gene de rRNA é limitado a métodos de identificação baseados em sucessão para identificação bacteriana em laboratórios de microbiologia clínicos em grande parte à identificação de tensões que são de difícil identificação através de métodos fenotípicos. Neste estudo, usando sequenciamento de DNA do 16S gene de rRNA completo como o “padrão de ouro”, foi avaliada a utilidade clínica desse sistema na identificação de tensões bacterianas significantes que mostraram perfis bioquímicos ambíguos. Essas tensões não representaram duplicações aeróbias gram-positivas e gram-negativas e anaeróbias. O potencial para sequenciamento 16S de gene de rRNA para uso geral em laboratórios de microbiologia clínicos também é discutido (WOO *et al.*, 2003).

ERIC-PCR e RAPD-PCR são ambas valiosas técnicas por caracterizar *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, e *A. skirrowii* isolados. Ambos os métodos têm habilidade e poder distintivo satisfatórios. Diferenças de uma faixa entre duas impressões digitais geradas por um método representaram tipos diferentes, como confirmada pelos resultados do outro método de datilografia. As impressões digitais geradas com ERIC-PCR eram mais retrativas e complexas que as impressões digitais geradas com RAPD-PCR. Além disso, o uso de alíquotas de suspensões não padronizadas de células fervidas só foi possível com ERIC-PCR. Então, para caracterização de um grande número de *Arcobacters* isolados, ERIC-PCR com suspensões de células fervidas, como os modelos de DNA, é a primeira escolha para um método de caracterização. Isolados para os quais são gerados resultados de ERIC quase idênticos podem necessitar impressões digitais subseqüentes por RAPD-PCR, embora ajustes e padronizações da alíquota e do modelo de DNA sejam necessárias (HOUF *et al.*, 2002).

A análise de avícola isolada mostrou que aqueles produtos não só podem abrigar mais de uma espécie como também genótipos múltiplos da mesma espécie. Dependendo do procedimento de isolamento, podem ser isoladas espécies de *Arcobacter* diferentes. Além disso, um grande número de isolados deve ser caracterizado para recuperar tantas tensões

diferentes quanto possíveis (HOUF *et al.*, 2002).

Epidemiologia

A epidemiologia de espécies de *Arcobacter* é pouco conhecida. Pois, há dificuldades para se detectar a presença de bactérias da família *Campylobacteriaceae* por um único método, necessitando de quatro a cinco dias devido a seu crescimento lento e condições adequadas de pH, nutrientes e temperatura (ENGBERG *et al.*, 2000; MORENO *et al.*, 2003). O fato de eles serem freqüentemente isolados de animais doentes, carcaças de galinha e humanos com enterite sugere que espécies de *Arcobacter* podem ser importantes patógenos em humanos, sendo percebido que a água é um importante meio de transmissão destes organismos, pois se sabe que o consumo de água não tratada é o principal fator de risco para doenças diarréicas associadas com *Arcobacter*, o que é provado através de estudos feitos em esgotos, onde foram achadas espécies de *Arcobacter* numa freqüência que varia de 41 a 80%, sendo que nesses esgotos e encostas foram encontradas bactérias dessa família numa concentração 10^2 a 10^5 CFU/100 ml e 10^1 a 10^3 CFU/100 ml, respectivamente, sugerindo comprometimento de animais e da saúde humana (LOPEZ *et al.*, 2002). Porém, devem ser feitos estudos mais extensos para avaliar o real risco para saúde pública.

A verdadeira incidência de *Arcobacter* em amostras ambientais e infecções humanas é mascarada pela semelhança entre essa espécie e a espécie *Campylobacter*, devido ao fenótipo parecido e a uso de métodos convencionais com pouca sensibilidade, sendo classificadas como *Campylobacter* atípico (LOPEZ *et al.*, 2002). Logo, a descoberta e a identificação de *Campylobacter* e *Arcobacter* é uma tarefa árdua por causa desses fatores e devido a um espectro relativamente estreito de reatividade bioquímica (RASHID *et al.*, 2000).

Segundo MORENO *et al.* (2003) há grande prevalência de *Arcobacter* na superfície da água, e métodos de cultura disponíveis são insuficientes para sua descoberta, o que é provado através de estudos feitos por BROSSA *et al.* (1998) em que se constatou que quase nenhum organismo desse gênero foi encontrado a 3,5 cm abaixo da superfície do mar.

A presença das bactérias em carcaças de suínos, aves, amostras colhidas de fetos, amostras de músculo peitoral ascendente e de líquido prepucial de suínos e amostras fecais de animais e humanos constitui um risco de infecção ao homem, havendo predominância de cultivos positivos para *A. butzleri* (OLIVEIRA *et al.*, 2003; THAMDRUP *et al.*, 2000). Foi constatado que *A. butzleri* não é habitante normal do intestino de seres humanos, tendo sido detectado em apenas 2% de amostras fecais normais examinadas, sendo concluído que, em pacientes com gastroenterite nos quais se isolam *Arcobacter*, há um forte indício de que os microorganismos tenham sido a causa do problema. A primeira constatação da presença de *Arcobacter sp.* em carcaças de suínos ocorreu em Iowa, EUA em 1994, através do isolamento das bactérias de carne suína moída. No Brasil, as bactérias foram cultivadas de órgãos genitais de reprodutores e de fetos suínos abortados e em carcaças de suínos de abate e matrizes descartadas de granjas no Rio Grande do Sul (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Em outras pesquisas realizadas em suínos no Brasil, houve predominância de isolamentos da espécie *A. cryaerophilus* de fetos abortados, úteros e ovidutos de porcas e do líquido de divertículo prepucial de reprodutores e de suínos de abate, com poucos cultivos de *A. butzleri*. Esta constatação de que as espécies *A. butzleri* e *A. cryaerophilus* de bactérias predominaram, respectivamente, em músculo de carcaças e em órgãos genitais de fetos de suínos é uma observação que merece estudos epidemiológicos, verificação de diferenças de patogenicidade e diferenças antigênicas e genéticas entre amostras para que seja bem compreendida (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

O estudo realizado por WESLEY *et al.* (2000) verificou que em amostras fecais de vacas achados de *Arcobacter* eram positivos para 71% das vacas leiteiras que habitam em conjunto e 14,3% para vacas leiteiras isoladas. *A. butzleri* foi identificada em 17 de 33 amostras de *Arcobacter* positivas, disponíveis para análise. Assim, *Arcobacter sp.*, inclusive o *A. butzleri* e *C. jejuni*, existem nos intestinos de vacas leiteiras saudáveis, podendo contaminar o ambiente e a cadeia alimentícia humana. Também foi identificado que *Arcobacters* ocorrem mais em rebanhos sulistas que naqueles do norte, mostrando a importância de temperaturas mais altas para sua proliferação (WESLEY *et al.*, 2000). Também é demonstrado que condições adequadas de oxigênio e compostos de enxofre são importantes para seu desenvolvimento, pois, algumas espécies produzem enxofre como produto final de seu metabolismo (WIRSEN *et al.*, 2002). Comparativamente, em humanos, sua contaminação é facilitada em aglomerações e em rebanhos. O uso de águas individuais e alimentação rica em alfafa parece proteger contra infecções pelo *Arcobacter* (WESLEY *et al.*, 2000).

A prevalência de *Arcobacter* em carne de boi saudável ou gado de leiteira é desconhecida. Fatores de risco para infecção humana incluem consumo de avícola contaminado, viagem para países em desenvolvimento, e consumo de água contaminada. *A. butzleri* foi detectada em reservatórios de água na Alemanha, plantas, rios, os canais de Bangkok, onde amostras de água foram consumidas por jovens que acampavam em Idaho, seguindo-se de uma eclosão de enterites (WESLEY *et al.*, 2000).

Conclusão

A família *Campylobacteriaceae*, na qual o gênero *Arcobacter* está inserido, é a fonte principal de infecções por comida de origem animal porque esses organismos que fazem parte da flora intestinal de muitos animais, e por meio de água não tratada e esgotos. Como são conhecidas muitas espécies de animais que alimentam os homens, este estudo mostrou o considerável valor à vigilância em saúde pública e o desenvolvimento de novas substâncias para o combate desses patógenos, pois os dados sobre a susceptibilidade de *A. butzleri* e *A. cryaerophilus* para certos agentes é limitado (HOUF *et al.*, 2001.). Embora o potencial patogênico dessas bactérias não esteja claro, estudos adicionais relativos à prevalência, à descoberta e à identificação são completamente justificáveis.

Referências bibliográficas

- BROSSA, E. L.; MORA, R. R.; AMANN, R. Microbial community composition of wadden sea sediments as revealed by fluorescence *In Situ* hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 64, n. 7, p. 2691-2696, 1998.
- ENGBERG, J. et al. Prevalence of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter*, and *Sutterella* spp. in human fecal samples as estimated by a reevaluation of isolation methods for campylobacters. *J. Clin. Microbiol.* v. 38, n. 1, p. 286-291, 2000.
- HOUF, K. et al. Susceptibility of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, and *Arcobacter skirrowii* to antimicrobial agents used in selective media. *J. Clin. Microbiol.* v. 39, n. 4, p. 1654-1656, 2001.
- HOUF, K. et al. Assessment of the genetic diversity among *Arcobacters* isolated from poultry products by using two PCR-Based typing methods. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 68, n. 5, p. 2172-2178, 2002.
- KONEMAN, E. W. et al. *Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido*. 5. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. 1465 p.
- LOPEZ, J. F. et al. Partitioning of bacterial communities between seawater and healthy, black band diseased, and dead coral surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 68, n. 5, p. 2214-2228, 2002.
- MARSHALL, S. M. et al. Rapid identification of *Campylobacter*, *Arcobacter*, and *Helicobacter* isolates by PCR-Restriction fragment length polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. *J. Clin. Microbiol.* v. 37, n. 12, p. 4158-4160. 1999.
- MORENO, Y. et al. Specific detection of *Arcobacter* and *Campylobacter* strains in water and sewage by PCR and fluorescent *In Situ* hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 69, n. 2, p. 1181-1186, 2003.
- OLIVEIRA, S. J. et al. Isolamento de *Arcobacter butzleri* de músculos de carcaças de suínos de terminação e de matrizes descartadas abatidos em um matadouro no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, v. 33, n. 5, p. 889-892, 2003.
- OTTH, L.; WILSON, M.; FERNANDEZ, H. Desiccation resistance in *Arcobacter butzleri*. *Braz. J. Microbiol.* v. 32, n. 4, p. 311-312. 2001.
- RASHID, S. T. A. et al. Identification of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, *Arcobacter butzleri*, and *A. butzleri*-Like species based on the *glyA* Gene. *J. Clin. Microbiol.* v. 38, n. 4, p. 1488-1494, 2000.
- THAMDRUP, B.; MORA, R. R.; AMANN, R. Microbial manganese and sulfate reduction in black sea shelf sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 66, n. 7, p. 2888-2897, 2000.
- TRABULSI, L. R. et al. *Microbiologia*. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2002. 586 p.
- WESLEY, I. V. et al. Fecal shedding of *Campylobacter* and *Arcobacter* spp. in dairy cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 66, n. 5, p. 1994-2000, 2000.
- WIRSEN, C. O. Characterization of an autotrophic sulfide-oxidizing Marine *Arcobacter* sp. That produces Filamentous Sulfur. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 68, n.1, p. 316-325. 2002.
- WOO, P. C. Y. et al. Usefulness of the microSeq 500 16S ribosomal DNA-Based bacterial identification system for identification of clinically significant bacterial isolates with ambiguous biochemical profiles. *J. Clin. Microbiol.* v. 41, n. 5, p. 1996-2001, 2003.
- ZUBKOV, M. V. et al. Determination of total protein content of bacterial cells by SYPRO staining and flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 65, n. 7, p. 3251-3257, 1999.

Recebido para publicação em: 10/05/2004

Received for publication on: 10/05/2004

Aceito para publicação em: 10/09/2004

Accepted for publication on: 10/09/2004